



HAL
open science

Développement d'un concept innovant de détection et de quantification de la protéine " Multidrug Resistance " P-gp avec les traceurs fluorescents LightSpot® ainsi que d'une nouvelle méthodologie de conservation de sphéroïdes du cancer du sein Triple Négatif dans le milieu synthétique OptiPASS®

Antoine Goisnard

► **To cite this version:**

Antoine Goisnard. Développement d'un concept innovant de détection et de quantification de la protéine " Multidrug Resistance " P-gp avec les traceurs fluorescents LightSpot® ainsi que d'une nouvelle méthodologie de conservation de sphéroïdes du cancer du sein Triple Négatif dans le milieu synthétique OptiPASS®. Médecine humaine et pathologie. Université Clermont Auvergne, 2021. Français. NNT: 2021UCFAC060 . tel-03622397

HAL Id: tel-03622397

<https://theses.hal.science/tel-03622397>

Submitted on 29 Mar 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.

Université Clermont Auvergne (UCA) - 2021

École doctorale des Sciences de la Vie, Santé, Agronomie et Environnement

THÈSE

*Présentée pour l'obtention du grade de **DOCTEUR D'UNIVERSITÉ**
selon le décret n°84-573 du 5 juillet 1984*

Spécialités : Biologie Cellulaire, Biotechnologies, Ingénierie pour la Santé

Présentée et soutenue par :

Goisnard Antoine

Soutenue publiquement le 12/10/2021

Développement d'un concept innovant de détection et de quantification de la protéine « Multidrug Resistance » P-gp avec les traceurs fluorescents LightSpot® ainsi que d'une nouvelle méthodologie de conservation de sphéroïdes du cancer du sein Triple Négatif dans le milieu synthétique OptiPASS®

Membres du jury :

Présidente :

Mme Frédérique PENAULT-LLORCA, PU-PH, UMR
INSERM/UCA1240 IMoST, Centre de Lutte contre le Cancer Jean
Perrin, Université Clermont Auvergne - Clermont-Ferrand, France

Rapporteurs :

Mr Jacques BERNIER, PU, INRS – Institut Armand Frappier Santé
Biotechnologie - Université Laval, Québec

Mr Joseph GLIGOROV, PU-PH, Département d'Oncologie Médicale,
Hôpital Tenon, Université Pierre et Marie Curie – Paris, France

Directrice de thèse :

Mme Mahchid BAMDAD, PU, UMR INSERM/UCA1240 IMoST,
Institut Universitaire de Technologie Clermont Auvergne, Université
Clermont Auvergne - Clermont-Ferrand, France

Communications incluses dans la thèse

Articles publiés :

- **Antoine Goisnard**, Clémence Dubois, Pierre Daumar, Corinne Aubel, Marie Depresle, Jean Gauthier, Bernard Vidalinc, Frédérique Penault-Llorca, Emmanuelle Mounetou, Mahchid Bamdad: *The New Serum-Free OptiPASS® Medium in Cold and Oxygen-Free Conditions: An Innovative Conservation Method for the Preservation of MDA-MB-231 Triple Negative Breast Cancer Spheroids*. *Cancers (Basel)* vol. 13 (8) 1945. 18 Apr. 2021, DOI: 10.3390/cancers13081945 (IF : 6,639).
- **Antoine Goisnard**, Pierre Daumar, Clémence Dubois, Corinne Aubel, Manon Roux, Marie Depresle, Jean Gauthier, Bernard Vidalinc, Frédérique Penault-Llorca, Emmanuelle Mounetou, Mahchid Bamdad: *LightSpot®-FL-1 fluorescent probe: an innovative tool for cancer drug resistance analysis by direct detection and quantification of the P-glycoprotein (P-gp) on monolayer culture and spheroid Triple Negative Breast Cancer models*. *Cancers (Basel)* vol. 13 (16) 4050. 11 Aug. 2021, DOI:10.3390/cancers13164050 (IF : 6,639).

Brevet :

- Mahchid Bamdad, Pierre Daumar, Clémence Dubois, Jean Gauthier, **Antoine Goisnard**, Emmanuelle Mounetou, Frédérique Penault-Llorca, Bernard Vidalinc (contributions égales) - Brevet LigthSPOT : « Méthode de détection, localisation et quantification de protéines MDR » - Brevet UCA/INSERM/BIOMARQUEURS - n° FR1911035 du 04 octobre 2019 - n° WO 2021/064191 du 08/04/2021 (contribution égale de l'ensemble des auteurs).

Article rédigé :

- **Antoine Goisnard**, Pierre Daumar, Clémence Dubois, Corinne Aubel, Manon Roux, Marie Depresle, Jean Gauthier, Bernard Vidalinc, Frédérique Penault-Llorca, Emmanuelle Mounetou, Mahchid Bamdad: *LightSpot® fluorescent probes present different staining profiles in Triple Negative Breast Cancer cells, for the labelling of the P-gp multidrug resistance protein*.

Posters Scientifiques :

- Développement d'un modèle de culture cellulaire 3D d'une lignée d'adénocarcinome mammaire triple-négatif impliquant une matrice extra-cellulaire de type trisomie 21 – Poster, 24^{èmes} Journées du Collège des histologistes, embryologistes et cytogénéticiens - mars 2019 (<https://doi.org/10.1016/j.morpho.2019.10.038>) - Laetitia Gouas, My-Anne Hong, Gaëlle Salaun, Clémence Dubois, **Antoine Goisnard**, Eléonore Eymard-Pierre, Céline Pebrel-Richard, Carole Goumy, Mahchid Bamdad, Philippe Vago.
- Treatment efficacy modelling combining anti-PARP1 Olaparib® and fractionated irradiation on 3D Triple-Negative breast cancer cultures - Clémence Dubois, Fanny Martin, Chervin Hassel, **Antoine Goisnard**, Pierre Daumar, Corinne Aubel, Mounetou Emmanuelle, Frédérique Penault-Llorca, Mahchid Bamdad – Poster, Congrès Cancéropole Lyon Auvergne Rhône Alpes (CLARA), Avril 2019 (hal-02090751, version 1).
- PARP1 inhibitor derived fluorescent probes: synthesis, characterization and in vitro biological evaluation in breast cancer cell lines - Pierre Daumar, Clémence Dubois, **Antoine Goisnard**, Frédérique Penault-Llorca, Mahchid Bamdad, Mounetou Emmanuelle – Poster, Congrès Cancéropole Lyon Auvergne Rhône Alpes (CLARA), Avril 2019 (hal-02090755, version 1).
- OptiPASS® synthetic culture medium combined with cold and oxygen-free condition: development of a new storage concept for the preservation of Triple Negative Breast Cancer MDA-MB-231 spheroids - **Antoine Goisnard**, Clémence Dubois, Pierre Daumar, Corinne Aubel, Marie Depresle, Jean Gauthier, Bernard Vidalinc, Frédérique Penault-Llorca, Emmanuelle Mounetou, Mahchid Bamdad – Poster, Congrès Cancéropole Lyon Auvergne Rhône Alpes (CLARA), Mars 2021.
- Design, synthesis, and in vitro biological evaluation in cancer cell lines of a fluorescent PARP1 inhibitors series - Pierre Daumar, **Antoine Goisnard**, Clémence Dubois, Manon Roux, Marie Despresle, Frédérique Penault-Llorca, Mahchid Bamdad, Emmanuelle Mounetou – Poster, Congrès Cancéropole Lyon Auvergne Rhône Alpes (CLARA), Mars 2021.
- MRP7 MultiDrug Resistance protein expression after co-treatment with PARPi Olaparib and radiation on Triple-negative breast cancer spheroids - Clémence Dubois, **Antoine Goisnard**, Pierre Daumar, Corinne Aubel, Marie Depresle, Bernard Vidalinc, Jean Gauthier, Emmanuelle Mounetou,, Frédérique Penault-Llorca, Mahchid Bamdad – Poster, Congrès Cancéropole Lyon Auvergne Rhône Alpes (CLARA), Mars 2021.

- Development of a new storage concept for the preservation of Triple Negative Breast Cancer MDA-MB-231 spheroid models combining OptiPASS® synthetic culture medium with cold and oxygen-free conditions - **Antoine Goisnard**, Clémence Dubois, Pierre Daumar, Corinne Aubel, Marie Depresle, Jean Gauthier, Bernard Vidalinc, Frédérique Penault-Llorca, Emmanuelle Mounetou, Mahchid Bamdad – Poster, Journées de l'Ecole Doctorale Sciences de la Vie, Santé, Agronomie et Environnement, (Université Clermont Auvergne) 2021 - Mars 2021.
- LightSpot®-FL-1 fluorescent probe: a new tool for cancer drug resistance analysis by direct detection and quantification of the P-glycoprotein (MDR, ABCB1) on 2D and 3D Triple Negative Breast Cancer models - **Antoine Goisnard**, Pierre Daumar, Clémence Dubois, Corinne Aubel, Marie Depresle, Manon Roux, Jean Gauthier, Bernard Vidalinc, Frédérique Penault-Llorca, Emmanuelle Mounetou, Mahchid Bamdad – Young Researchers in Biology of AURA Region Congress, Juin 2021.

Communications orales :

- OptiPASS® culture medium improves artificial tumors® survival and recovery after cold and anoxic conservation: a short-term alternative to cryoconservation –Research2Business Oncology Meeting: Pitches de projets ouverts à la collaboration, Congrès Cancéropole Lyon Auvergne Rhône Alpes (CLARA), Mars 2021.

Dédicaces

Je souhaite dédier cette thèse aux personnes les plus chères à mon cœur, mon entourage essentiel auprès duquel je suis fier d'avancer. Merci pour leur soutien infaillible et pour leur confiance en moi et en mon travail.

A mes parents, Françoise et Loïc,

A ma sœur, Julia,

A ma Mamie, Simone,

A mes grands-parents angevins, Christiane et Pierre,

Aux autres membres de ma famille,

A l'ensemble de mes amis et alliés,

Et enfin à ma très chère Paulette, qui me manque, et qui aurait tant aimé voir l'accomplissement de ce travail,

Remerciements

Je tiens à remercier les Professeurs Jacques Bernier et Joseph Gligorov pour avoir accepté de juger ce travail de thèse.

Je remercie le Professeure Frédérique Penault-Llorca, pour avoir accepté de présider mon jury de thèse et pour avoir toujours soutenu mon travail au sein de l'équipe.

Je souhaite remercier le docteur Elisabeth Miot-Noirault, pour avoir permis le déroulement de cette thèse au sein de l'équipe IMoST (UMR INSERM/UCA 1240). Merci aussi au Professeur Florent Cachin, responsable de l'Equipe 2 Robust, pour m'avoir accueilli dans cette équipe.

Je souhaite très grandement remercier le Professeure Mahchid Bamdad, ma directrice de thèse. Merci Mahchid pour l'immense soutien que tu m'as apporté durant toutes ces années. Depuis que l'on se connaît, du DUT, au Doctorat, en passant par le Master, tu as toujours cru en moi et en mes capacités. Je te remercie pour toutes les opportunités que tu m'as offertes, pour ton aide, tes conseils, ton écoute qui ont été des éléments moteurs dans mon parcours. Ton optimisme à toute épreuve est sans aucun doute ta plus grande force et a été une grande source d'inspiration et de motivation pour moi. J'ai énormément appris et évolué à tes côtés et ce fut un réel plaisir de partager cette aventure avec toi.

Je remercie vivement le Professeure Emmanuelle Mounetou, ma co-directrice de thèse, pour ses précieux conseils et encouragements. Emmanuelle, c'est toujours un plaisir de discuter avec toi. Merci de m'avoir suivi tout au long de mon parcours, depuis la première année de DUT.

Je tiens à remercier le Docteur Pierre Daumar qui lui aussi a toujours été présent tout long de mon parcours. Merci Pierre pour tes nombreux conseils, ton aide et ta sympathie. J'ai toujours été très admiratif de ton grand esprit d'analyse.

Je souhaite remercier Monsieur Bernard Vidalinc, fondateur des sociétés BIOPASS et BIOMARQUEURS, de m'avoir offert cette chance de réaliser mon année de master 2 en alternance. Depuis, ses encouragements et ses félicitations m'ont grandement aidé à poursuivre au mieux mes travaux de thèse. Merci pour son immense bienveillance.

Un grand merci au Docteur Jean Gauthier, directeur scientifique au sein du consortium BIORCELL3D. Son soutien et ses conseils m'ont toujours été d'une aide précieuse. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir continuellement épaulé au cours de ma thèse.

Je tiens à remercier le Professeur Michel Pucéat (Faculté de Médecine de la Timone) pour m'avoir accueilli pendant un mois dans son équipe. Cette période passée à Marseille a été très

riche pour moi sur les plans scientifiques et professionnels. Merci aussi, encore une fois, à Bernard Vidalinc et Jean Gauthier de m'avoir offert cette grande chance d'immersion dans le monde des cardiomyocytes.

Un grand merci au Docteur Clémence Dubois qui a toujours été présente pour moi depuis ces quatre années passées au sein de l'équipe. Merci Clémence pour ton soutien et ton aide apportés sur de très nombreux aspects. Ton parcours a toujours été un exemple à suivre pour moi, un objectif à atteindre, même s'il est difficile de marcher dans tes pas (tu as placé la barre très haute !). Mes travaux de thèse n'auraient pas été aussi aboutis sans toi.

Je remercie vivement mes collègues de laboratoire/bureau : Marie, Manon et Alexandra. Merci pour toute l'aide qu'elles ont pu m'apporter, qui est sans doute plus grande à mes yeux que ce qu'elles imaginent. Merci pour leur convivialité et tous les bons moments passés ensemble. Leurs qualités à chacune nous a permis de former ensemble une très bonne équipe à laquelle je suis fier d'appartenir. Merci aussi à Cassandra Habbouche pour son soutien et son aide pour ces quelques années passées en sa compagnie.

Je tiens à remercier Thomas Bellebois, récemment intégré dans l'équipe. Je le remercie de m'avoir fait confiance pour l'aider à développer le logiciel Chimithèque pour les biologistes.

Je remercie aussi tous les stagiaires dont j'ai croisé la route pendant mes travaux de thèse : Estelle, Florian, Jean-Baptiste, Audrey, Ambre, Naomie et Romain. Merci pour leur bonne humeur et leur implication. Merci aussi à Manon Hiberty, que je n'ai pas encore beaucoup côtoyé, mais qui fera, je pense, une très bonne collègue de bureau.

Je remercie Guillaume Tatti, ingénieur de projet au sein de Direction de la Recherche et de la Valorisation de l'UCA, pour son accompagnement et ses conseils tout au long de ma thèse.

Je souhaite remercier l'ensemble des membres de l'Ecole Doctorale SVSAE (Université Clermont Auvergne) pour m'avoir permis de poursuivre mes études en Doctorat.

Merci également à toute l'équipe de direction de l'IUT de Clermont-Ferrand et à l'ensemble des personnes de l'IUT qui ont pu m'aider d'une façon ou d'une autre à réaliser mes travaux. Un merci particulier à Catherine Vatoux pour m'avoir accompagné pour les TP d'Hématologie et à Marie Gruet et pour sa grande gentillesse.

Je tiens à remercier tous les membres faisant partie de l'équipe INSERM 1240 IMoST. Je remercie notamment Corinne Aubel et Laetitia Gouas pour leur bienveillance. Merci aussi à l'équipe du Service AMP du CHU de Clermont Ferrand, et notamment Sandra Dollet, pour leur aide et sympathie

Pour finir, je souhaite remercier Christelle Blavignac et Lorraine Novais-Gameiro du CICS pour leur aide précieuse.

Sommaire

| | |
|---|----|
| Abréviations | 1 |
| Glossaire | 3 |
| Introduction Générale | 6 |
| Synthèse bibliographique | 9 |
| Partie 1 : Le Cancer du Sein et le Cancer du Sein Triple-Négatif | 10 |
| I. Le Cancer du Sein | 10 |
| I. 1. Généralités et anatomie..... | 10 |
| I. 2. Epidémiologie et facteurs de risque du cancer du sein | 12 |
| I. 3. Classification et pronostics du cancer du sein..... | 14 |
| I. 3. a) Classification histopathologique | 14 |
| I. 3. b) Classification par grade et stade tumoral..... | 15 |
| I. 3. c) Classification immunohistochimique et statut des récepteurs membranaires..... | 16 |
| I. 3. d) Classification moléculaire | 17 |
| I. 4. Prise en charge thérapeutique du cancer du sein | 20 |
| I. 4. a) La chirurgie | 20 |
| I. 4. b) La radiothérapie | 20 |
| I. 4. c) Les chimiothérapies..... | 21 |
| I. 4. d) L'hormonothérapie | 23 |
| I. 4. e) Les thérapies ciblées..... | 24 |
| II. Le Cancer du Sein Triple Négatif | 25 |
| II. 1. Généralités et classification | 25 |
| II. 1. a) Caractéristiques cliniques..... | 27 |
| II. 2. Prise en charge thérapeutique du Cancer du Sein Triple Négatif..... | 29 |
| II. 2. a) Traitement de la maladie précoce..... | 29 |
| II. 2. b) Traitement la maladie avancée et métastatique..... | 31 |

| | |
|---|----|
| II. 2. c) Maladie résiduelle et résistance au traitement | 32 |
| Partie 2 : Les protéines « Multidrug Resistance » et la résistance tumorale aux traitements | 34 |
| I. 1. Les protéines « Multidrug Resistance » | 34 |
| I. 1. a) Les transporteurs de type ATP Binding Cassette (ABC)..... | 34 |
| I. 1. b) Les protéines « Multidrug Resistance » et la résistance aux xénobiotiques | 35 |
| I. 1. c) Implication des protéines « Multidrug Resistance » dans la résistance tumorale aux traitements | 36 |
| I. 2. La P-glycoprotéine (ABCB1)..... | 38 |
| I. 2. a) Généralités sur la P-gp..... | 38 |
| I. 2. b) Mécanismes d'efflux des substrats par la P-gp..... | 39 |
| I. 2. c) Implication de la P-gp dans la résistance tumorale aux traitements | 42 |
| I. 3. Intérêt clinique de la P-gp en Oncologie | 44 |
| I. 3. a) La P-gp comme cible thérapeutique | 44 |
| I. 3. b) La P-gp, outil pour l'étude du screening de médicaments | 45 |
| I. 3. c) La P-gp comme marqueur prédictif et pronostic de la maladie..... | 46 |
| I. 4. Les méthodes d'étude de la résistance tumorale instaurée par la P-glycoprotéine..... | 46 |
| I. 4. a) Etudes de la P-gp au niveau de l'ARNm..... | 47 |
| I. 4. b) Etudes de la P-gp au niveau protéique..... | 47 |
| I. 4. c) Outils d'étude de l'activité de la P-gp | 48 |
| Partie 3 : Le développement de sphéroïdes comme outils précliniques <i>in vitro</i> pour la modélisation de la résistance tumorale aux traitements..... | 49 |
| I. L'intérêt des modèles de culture cellulaires en trois dimensions dans le processus de développement de médicaments | 49 |
| I. 1. Le processus de développement des médicaments..... | 49 |
| I. 2. Les modèles précliniques | 51 |
| I. 2. a) Les modèles de cultures cellulaires en deux dimensions..... | 51 |
| I. 2. b) Les modèles animaux | 52 |

| | |
|---|----|
| I. 3. La culture cellulaire en trois dimensions | 53 |
| II. Utilisation des sphéroïdes pour modéliser le Cancer du Sein Triple Négatif..... | 55 |
| II. 1. Le sphéroïde, un modèle <i>in vitro</i> de microtumeurs avasculaires | 55 |
| II. 1. a) Mimétisme de l'organisation d'une microrégion tumorale avasculaire.... | 55 |
| II. 1. b) Modélisation de la résistance tumorale au traitement | 57 |
| II. 2. Utilisation des sphéroïdes pour le <i>screening</i> de médicaments à grande échelle..... | 59 |
| II. 2. a) L'uniformité et la reproductibilité de production des modèles de sphéroïde..... | 60 |
| II. 2. b) Les méthodes d'analyse et d'évaluation de l'efficacité/résistance des candidats médicaments | 61 |
| II. 2. c) L'intégration dans une plateforme de criblage à haut débit | 63 |
| III. Les méthodologies de conservation des modèles multicellulaires | 64 |
| III. 1. Les techniques classiques de cryoconservation | 65 |
| III. 2. Les techniques alternatives à la cryoconservation | 68 |
| Objectifs des travaux de thèse | 71 |
| Résultats expérimentaux | 74 |
| I. Le développement de traceurs fluorescents innovants pour l'analyse de la résistance tumorale par détection et quantification directes de la P-gp | 75 |
| I. 1. Introduction..... | 75 |
| I. 2. Brevet LightSpot : Méthode de détection, localisation et quantification des protéines MDR | 76 |
| I. 3. Article publié : <i>LightSpot®-FL-1 fluorescent probe: an innovative tool for cancer drug resistance analysis by direct detection and quantification of the P- glycoprotein (P-gp) on monolayer culture and spheroid Triple Negative Breast Cancer models</i> | 78 |
| I. 3. a) Présentation | 78 |
| I. 3. b) Article publié..... | 79 |

| | |
|---|----|
| I. 4. Article Rédigé : LightSpot® fluorescent probes present different staining profiles in Triple Negative Breast Cancer cells, for the labelling of the P-gp multidrug resistance protein..... | 80 |
| I. 4. a) Présentation | 80 |
| I. 4. b) Article rédigé | 81 |
| II. Le développement d'un concept innovant de préservation de sphéroïdes de Cancer du Sein Triple Négatif MDA-MB-231 dans le milieu synthétique OptiPASS®.. | 82 |
| II. 1. Introduction..... | 82 |
| II. 2. Article publié : <i>The New Serum-Free OptiPASS® Medium in Cold and Oxygen-Free Conditions: An Innovative Conservation Method for the Preservation of MDA-MB-231 Triple Negative Breast Cancer Spheroids</i> | 83 |
| II. 2. a) Présentation | 83 |
| II. 2. b) Article publié..... | 85 |
| Conclusion générale et perspectives | 86 |
| Références Bibliographiques..... | 93 |

Abréviations

5-FU : 5-Fluoro-Uracile

ABC : *ATP-Binding Casette*

ADMET : *Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, Toxicity*

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARN : Acide Ribonucléique

ATP : Adénosine Tri-Phosphate

BCRP : *Breast Cancer Resistance Protein*

BRCA1/2 : *Breast Cancer 1/2* (Cancer du sein)

CAR : *Constitutive Androstane Receptor*

CSTN : Cancer du Sein Triple Négatif

CYP3A4 : Cytochromes P3A4

CYP450 : Cytochromes P450

Da : Dalton, unité de masse atomique utilisée en biochimie

DMSO : Diméthylsuloxyde

EGF : *Epidermal Growth Factor* (facteur de croissance épidermique humain)

ELISA : *Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay*

EPO : Erythropoïétine

ER : *Estrogen Receptors* (Récepteurs aux Œstrogènes)

FEC : 5-FU, Epirubicine, Cyclophosphamide - protocole de chimiothérapie

GFP : *Green Fluorescent Protein*

HER2 : *Human Epidermal Growth Factor Receptor-2* (récepteur au facteur de croissance épidermique humain)

HIF-1 alpha : *Hypoxia Induced Factor-1 alpha*

HR : *Homologous Recombination* (système de réparation de l'ADN par recombinaison homologue)

IMoST : Imagerie Moléculaire et Stratégie théranostique

kDa : kilo Dalton (= 1 000 Daltons)

LH : Lutéinostimuline

MDR : *MultiDrug Resistance* (Résistance croisée aux médicaments)

MEC : Matrice Extracellulaire

MRP : *MultiResistance Protein* (classe de protéine MDR)

NASA : *National Aeronautics and Space Administration*

NBD : *Nucleotid Binding Domain* (Domaine intracellulaire des transporteurs ABC)

PD1 : récepteur *Programmed Death 1*

PDL1 : *Programmed Death-Ligand 1*

PDX : *Patient Derived Xenograft* (xénogreffe dérivée de patient)

PEG : Polyéthylène-glycol

P-gp : *Permeability-glycoprotein*

PR : *Progesteron Receptors* (Récepteurs à la Progestérone)

PXR : *Pregnane X Receptor*

ROS : *Reactive Oxygen Species*

SEM : *Scanning Electron Microscopy* (Microscopie électronique à balayage)

SVF : Sérum de Veau Foetal

TEM : *Transmission Electron Microscopy* (Microscopie électronique à transmission)

TEP : Tomographie par Emission de Positons

TMD : *Transmembrane Domain* (Domaine Transmembranaire des transporteurs ABC)

TNM : *Tumor, Nodes, Metastasis* (Tumeur, Ganglions, Métastase)

ULA : *Ultra Low Attachment*

Glossaire

Amphiphile : propriété d'une molécule (en général organique) portant à la fois un(des) groupement(s) hydrophile(s) et un(des) groupement(s) hydrophobe(s).

Anoxie : absence d'oxygène présent dans des tissus ou fluides biologiques.

Apoptose : l'apoptose (ou la mort cellulaire programmée) est le processus par lequel des cellules déclenchent leur autodestruction en réponse à un signal extérieur.

Aprocrine : une cellule des glandes exocrines libérant son produit de sécrétion par une élimination dans le pôle apical.

Atypies cyto-nucléaires : il s'agit de modifications anormales des caractéristiques du noyau ou du cytoplasme de la cellule telles que des changements de taille ou de structure.

Cellules souches adultes/somatiques : les cellules souches adultes ou somatiques sont présentes chez l'enfant et l'adulte identifiées dans la plupart des organes testés : la peau, l'intestin, l'os, la moelle osseuse, le foie, le cœur, le cerveau, le pancréas, etc. Les cellules souches adultes assurent un renouvellement constant des cellules permettant l'homéostasie et la réparation des tissus tout en maintenant en même temps un réservoir de cellules souches.

Chimiorésistance : caractère d'une tumeur ou d'un organisme à résister aux traitements chimiothérapeutiques.

Cryostat : le cryostat est utilisé pour l'étude des cellules ou de coupes de tissus. Il sert à produire des rubans de coupes de cellules ou de tissus de très faible épaisseur, observables au microscope optique, à partir d'un bloc obtenu après congélation rapide de l'objet à observer. Les coupes obtenues placées entre lame et lamelle sont colorées ensuite et/ou utilisées pour des expériences d'immunohistochimie.

Cytométrie en flux : technique permettant de compter et de caractériser les cellules par un défilement à grande vitesse dans le faisceau d'un laser. C'est la lumière réémise (par diffusion ou fluorescence) par les cellules qui permet de les classer en différentes populations cellulaires, en fonction de leur taille et/ou leur caractéristique, suivant les critères déterminés.

Différenciation : ensemble des processus par lesquels une cellule souche acquière des fonctions spécialisées. La différenciation s'accompagne en général d'une limitation de la capacité de division cellulaire.

Dormance tumorale : persistance de cellules cancéreuses, pendant une période prolongée en équilibre avec l'hôte, sans que la tumeur ne croisse.

Effet de Warburg : effet selon lequel la plupart des cellules cancéreuses opèrent un changement de métabolisme. En effet, au lieu d'un taux relativement bas de glycolyse suivie d'une oxydation du pyruvate dans les mitochondries (comme retrouvé chez les cellules saines) les cellules tumorales favorisent un fort taux de glycolyse suivie d'une fermentation d'acide lactique dans le cytoplasme.

Epigénétique : discipline étudiant l'ensemble des mécanismes pouvant modifier l'expression des gènes sans changer la séquence nucléotidique de l'ADN génomique.

Facteur de croissance : les facteurs de croissance sont des molécules qui favorisent la multiplication des cellules, en favorisant l'augmentation de leur taille et/ou en provoquant leur division.

Facteur de transcription : un facteur de transcription est une protéine nécessaire à l'initiation ou à la régulation de la transcription d'un gène.

Highthroughput Screening : Criblage à grande échelle de médicaments.

Hypoxie : l'hypoxie est la diminution de la quantité d'oxygène distribuée par le sang aux tissus.

Lysosome : les lysosomes sont des organites cellulaires présents dans le cytosol. Il s'agit de « sacs enzymatiques » qui ont pour fonction d'effectuer la dégradation de différents substrats, principalement grâce à trois types d'enzymes : des lipases, des protéases et des osidases.

Mésothéliome : tumeur maligne rare qui affecte les cellules du mésothélium (membrane protectrice qui recouvre la plupart des organes internes du corps dont la plèvre, le péritoine et le péricarde).

Métastase : ensemble de cellules cancéreuses issues d'une tumeur qui migrent vers d'autres tissus et organes sains, pour s'y implanter et proliférer, engendrant ainsi la propagation des cellules tumorales au sein de l'organisme.

Néo-angiogenèse : développement de nouveaux vaisseaux sanguins au sein d'une tumeur jouant un rôle fondamental dans la croissance tumorale.

Peptide : un peptide est un polymère d'acides aminés reliés entre eux par des liaisons peptidiques. Les peptides constitués d'un faible nombre d'acides aminés (de deux à quelques dizaines) sont nommés oligopeptides. Les polymères comprenant un plus grand nombre d'acides aminés sont nommés polypeptides.

pKa : Constante d'acidité exprimée en échelle logarithmique exprimant la force d'un acide en solution.

Protéasome : complexe enzymatique multiprotéique retrouvé dans le cytosol chez les cellules eucaryotes, ainsi que chez les archées et certaines bactéries. Le protéasome est associé au réticulum endoplasmique et permet de dégrader les protéines dénaturées, obsolètes ou présentant des défauts de repliement.

Quiescence cellulaire : phase de repos cellulaire durant laquelle la cellule arrête de se diviser et sort du cycle cellulaire.

Rab GTPases : famille de protéines G membranaires impliqués dans le transport intracellulaire de vésicules.

Xénobiotique : substance chimique étrangère à l'organisme et capable d'interagir avec le vivant.

Introduction Générale

La résistance des cellules tumorales aux traitements anticancéreux est un des défis majeurs actuels en Oncologie. En effet, elle constitue la principale cause d'échec thérapeutique et représente un facteur important empêchant la guérison complète de patients atteints de cancer. Notamment, la résistance tumorale acquise, résultant de divers mécanismes cellulaires, est souvent associée à un taux important de rechute et de récidives. Aujourd'hui, de nombreux efforts sont menés par la communauté scientifique afin de comprendre les mécanismes impliqués dans la résistance tumorale et développer de nouvelles stratégies thérapeutiques efficaces permettant de cibler les cellules résistantes aux traitements.

Dans ce contexte, l'axe majeur des travaux du groupe de recherche « Résistance » de l'équipe ROBUST de l'UMR INSERM-UCA 1240 Imagerie Moléculaire et Stratégies Théranostiques (IMoST) est d'étudier les mécanismes de résistance tumorale aux traitements par le développement d'outils précliniques *in vitro*, dans une démarche d'optimisation du traitement des cancers. Ces travaux sont réalisés dans le cadre du consortium BIORCELL3D© issu d'un partenariat public/privé entre le groupe Résistance IMoST et les deux sociétés de biotechnologie BIOPASS SAS et BIOMARQUEURS SAS (Riom 63). Le consortium travaille également en étroite collaboration avec le Centre de Lutte contre le Cancer Jean Perrin.

Le principal modèle d'étude du groupe « Résistance » est le Cancer du Sein Triple Négatif (CSTN). Ce sous type hétérogène de cancer du sein particulièrement agressif est marqué par une résistance tumorale particulière, à l'origine de rechutes et de récidives chez les patientes. Le groupe a notamment focalisé son expertise sur l'étude de la chimiorésistance tumorale instaurée par les protéines « *Multidrug Resistance* » (MDR). Ces dernières sont des pompes d'efflux membranaires surexprimées chez les cellules tumorales et reconnues comme étant impliquées dans les mécanismes de chimiorésistance des tumeurs. En effet, par une approche multidisciplinaire associant des expertises en pharmaco-chimie, en biologie cellulaire et en imagerie, le groupe « Résistance » développe des traceurs fluorescents pouvant être utilisés comme outils de diagnostic. En effet, les travaux de pharmacomodulations par synthèse organique permettent le développement de nouveaux traceurs fluorescents tels que des dérivés des inhibiteurs de PARP (PARPi) et aussi des traceurs LightSpot® ciblant spécifiquement les protéines MDR notamment la « *Permeability glycoprotein* » (P-gp). La preuve de concept est ensuite évaluée sur des modèles cellulaires *in vitro* précliniques.

D'autre part, le consortium développe également des modèles de sphéroïdes à partir de lignées cellulaires cancéreuses, intitulés « Tumeurs Artificielle® », notamment à partir de lignées cellulaires de CSTN. Ces modèles des cultures cellulaires en trois dimensions permettent de recréer de nombreuses caractéristiques tumorales impliquées dans la résistance aux traitements et miment fidèlement les microrégions tumorales avasculaires. Ainsi, ces outils précliniques *in vitro* permettent d'étudier l'efficacité/résistance de différents traitements anticancéreux, mais également de suivre la pénétration, distribution de composés fluorescents au sein de masses cellulaires.

Ces deux axes de développement complémentaires ont notamment permis au sein du Consortium BIORCELL3D® la mise en place d'une réelle chaîne de valorisation incluant la recherche fondamentale, la recherche finalisée, valorisation par dépôt de brevet et communications scientifiques, conception de prototypes, transfert et production industrielle et commercialisation des produits finis d'outils *in vitro* d'intérêt en Santé Humaine. En effet, l'ensemble des travaux de recherche et développement translationnels menés au sein du consortium ont permis le développement de plusieurs produits à haute valeur ajoutée :

(1) un milieu de culture synthétique intitulé OptiPASS® adapté pour la culture de modèles de sphéroïdes et ne nécessitant pas l'ajout de sérums animaux.

(2) divers modèles de sphéroïdes formés à partir de cellules saines ou cancéreuses applicables pour le *screening* à haut débit de médicaments.

(3) des traceurs fluorescents d'intérêt pour le diagnostic *in vitro* en Oncologie.

Dans ce contexte général, mes travaux de thèse ont porté d'une part, sur le développement de traceurs fluorescents comme outils innovants pour l'analyse de la résistance tumorale aux traitements. En effet, ces traceurs dénommés LightSpot® ont été spécifiquement conçus pour détecter, localiser et quantifier la P-glycoprotéine, la protéine MDR majeure. Pour ce faire, ces travaux ont été réalisés sur différents modèles cellulaires en deux et trois dimensions de CSTN et ont fait l'objet d'un brevet international et d'une publication (Goisnard et al., 2021a). D'autre part, une autre partie des travaux de recherche menés au cours de ma thèse ont permis le développement d'une nouvelle méthodologie de préservation/conservation de modèles de sphéroïdes tumoraux à long terme associant le milieu OptiPASS®, les conditions anoxiques et la basse température. Ce nouveau concept innovant qui a fait l'objet d'une publication (Goisnard et al., 2021b) et a permis au Consortium de proposer une nouvelle gamme de milieu de conservation OptiPASS®.

Synthèse bibliographique

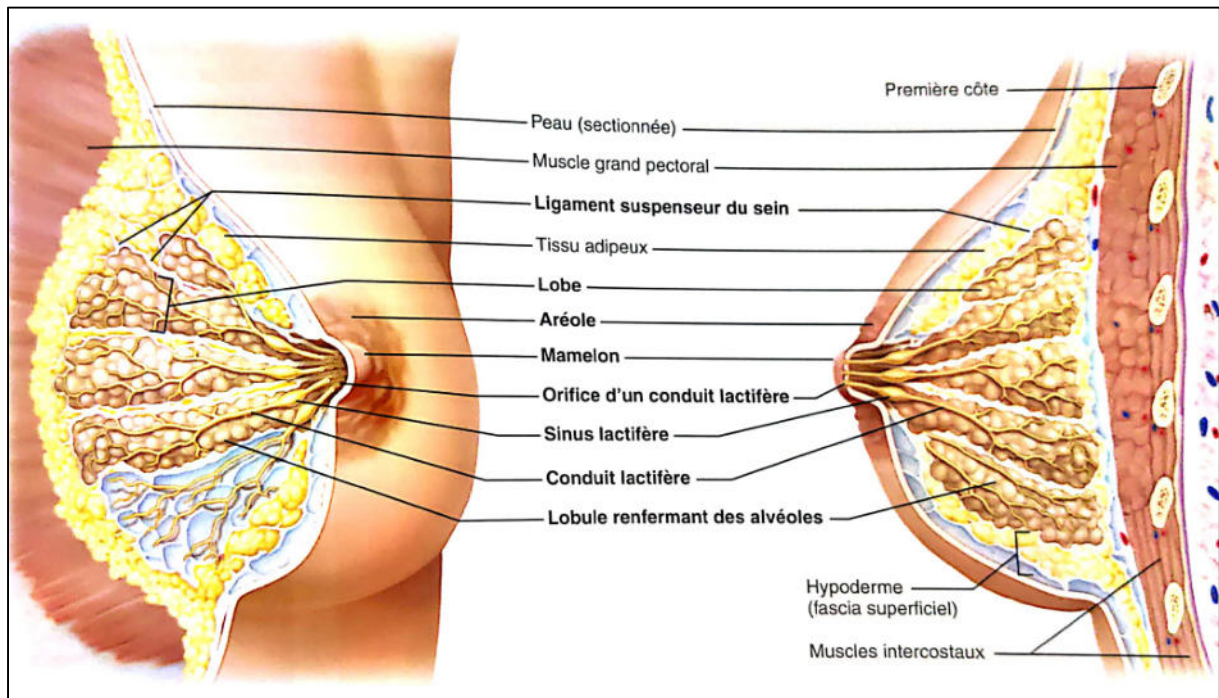


Figure 1 : Structure anatomique de la glande mammaire chez la femme présentant à gauche une vue antérieure et à droite une vue pariétale. La glande mammaire est constituée de plusieurs lobes disposés en rayon autour du mamelon, chacun d'eux formés de plusieurs lobules. Des sinus et conduits lactifères permettent l'excrétion du lait produit par ces lobules, en débouchant au niveau des canaux galactophores, eux-mêmes débouchant au niveau du mamelon.

Source : N. Marieb, E.; Hoehn, K.; Moussakova, L. Anatomie et Physiologie Humaines : Adaptation de La 9e Édition Américaine; Pearson.; 2010.

Partie 1 : Le Cancer du Sein et le Cancer du Sein Triple-Négatif

I. Le Cancer du Sein

I. 1. Généralités et anatomie

Le sein est une structure anatomique arrondie située devant les muscles pectoraux thoraciques. Cette structure englobe la glande mammaire et est particulièrement développée chez la Femme. En effet, les glandes mammaires sont des organes présents chez les personnes des deux sexes mais ne sont fonctionnelles que chez les personnes de sexe féminin. Il s'agit de glandes exocrines dont la fonction principale est la lactation, c'est-à-dire la production de lait pour la nutrition du nourrisson. Ces glandes sont localisées dans l'hypoderme et sont directement reliées au mamelon visible à la surface du sein. Chaque glande mammaire est constituée de 15 à 20 lobes disposés en rayon autour du mamelon et séparés entre eux par du tissu conjonctif et du tissu adipeux (Figure 1) (N. Marieb et al., 2010; Radijov, 1997). Notamment, le tissu conjonctif interlobaire constitue les ligaments suspenseurs du sein le fixant aux muscles sous-jacents et au derme sus-jacent.

Chacun des lobes débouche au niveau du mamelon par le canal galactophore (Figure 1). Pour entrer plus précisément dans les détails structurels, les lobes sont divisés en unités plus petites appelées des lobules qui eux-mêmes contiennent l'unité de base de la glande portant le nom d'alvéole ou d'acinus. Il est estimé que chaque lobe est composé de 20 à 40 lobules et que chaque lobule contient entre 10 et 100 acini. Chaque acinus draine sa production de lait par un canal intralobulaire ou alvéolaire (Kamina, 1996). Ces canaux de troisième ordre rejoignent des canaux interlobulaires dits conduits galactophores de deuxième ordre qui eux-mêmes débouchent sur un canal galactophore de premier ordre. Ce conduit s'élargit alors pour former le sinus lactifère et rejoint les pores situés à la surface des mamelons. Ce système complexe permet l'excrétion du lait vers l'extérieur. Cette production du lait n'est active que chez la femme qui allaite ou en troisième trimestre de grossesse. Ceci est expliqué par l'hormonodépendance du développement du tissu mammaire principalement régulé par deux hormones synthétisées au niveau des ovaires, les œstrogènes et la progestérone. Aux autres moments de la vie chez la femme, ces structures glandulaires ne sont pas très développées avec un réseau de conduits assez rudimentaire. La masse des seins contient alors majoritairement du tissu adipeux qui forme la majorité du stroma

mammaire et constitue un réservoir de lipides (Kamina, 1996). Le stroma mammaire contient également des fibroblastes nécessaires à la production de la matrice extracellulaire (MEC) jouant un rôle prépondérant dans le soutien du tissu mammaire. En effet ces cellules sont productrices de collagène, de protéoglycanes et de fibronectines mais aussi de nombreux facteurs de croissance et de cytokines (Costa et al., 2018a).

Afin d'assurer son rôle dans la lactation, le tissu mammaire est bien vascularisé. Trois troncs artériels perfusent le sein : l'artère thoracique interne, l'artère axillaire et les artères intercostales qui se ramifient en rameaux profonds afin de pénétrer l'épaisseur de la glande et se terminent par un réseau de capillaires péri-acineux. Ce réseau artériel est associé à un système veineux se chargeant du drainage de la circulation sanguine et comprenant les veines médianes, latérales et postérieures. En complément, le sein est parcouru par plusieurs réseaux lymphatiques assurant le drainage des excès de liquides, participant à la détoxification des organes et permettant la circulation de différents éléments du système immunitaires et d'hormones. Il existe tout d'abord le réseau lymphatique cutané pouvant être séparé en deux plexus distincts, l'un dit superficiel ou dermique et l'autre dit profond ou sous-dermique. Ce réseau communique *via* des collecteurs avec le réseau lymphatique glandulaire et les ganglions axillaires. Ces derniers forment un groupe de 10 à 40 ganglions présents au niveau des aisselles formant une masse continue et abritant de nombreux lymphocytes et macrophages (N. Marieb et al., 2010; Radijov, 1997). Enfin, le tissu mammaire est innervé par deux groupes de nerfs. Le premier groupe comprend les nerfs superficiels cutanés issus des plexus cervical, brachial et des nerfs intercostaux. Le second groupe est constitué des nerfs profonds envoyant de nombreuses ramifications vers l'aréole et le mamelon, en faisant des zones très sensibles à différents stimuli (Radijov, 1997).

La glande mammaire est, comme beaucoup d'organes, sujette au développement de tumeurs malignes également appelées cancers. Il s'agit d'un ensemble de pathologies diverses provoquant la transformation de cellules saines rendant leur comportement anormal et incontrôlé par rapport aux tissus voisins. Le terme latin *cancer* signifie crabe et fut pour la première fois attribué aux tumeurs malignes par Hippocrate. Celui-ci fit référence à la forme arrondie centrale de tumeurs mammaires se prolongeant par différentes ramifications à l'instar de celles du crustacée présentant une carapace dont partent de nombreuses pattes et pinces (Ligue contre le cancer, 2015). Le processus de développement des cancers appelé la carcinogénèse est un phénomène multi-étape et multifactoriel. En effet, les cellules de notre organisme sont continuellement exposées avec différents facteurs d'origine chimique, physique, biologique et génétique pouvant être associés entre eux et entraînant des lésions

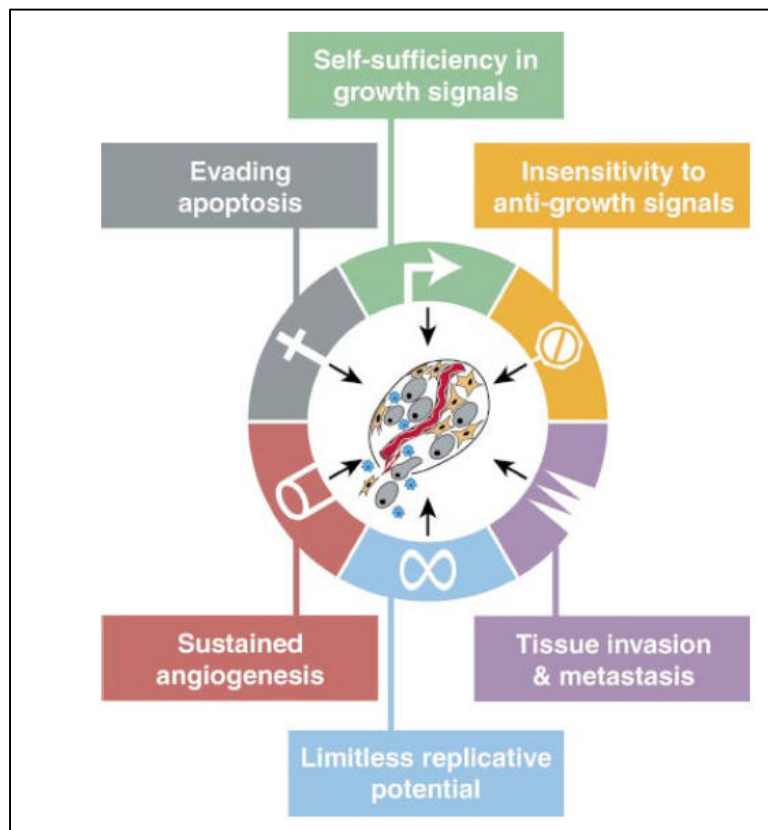


Figure 2 : Caractéristiques de la cellule tumorale décrites par Hanahan et Weinberg. Selon la définition de la cellule cancéreuse établie par Hanahan et Weinberg, six altérations sont nécessaires pour le développement tumoral, c'est-à-dire, (1) l'autosuffisance par rapport aux signaux prolifératifs (*self-sufficiency in growth signals*), (2) l'insensibilité aux signaux antiprolifératifs (*insensitivity to anti-growth signals*), (3) l'échappement à la mort cellulaire programmée (*evading apoptosis*), (4) le pouvoir illimité de réplication (*limitless replicative potential*), (5) la promotion de l'angiogenèse (*sustained angiogenesis*) et (6) la capacité d'invasion tissulaire et de dissémination métastatique (*tissue invasion & metastasis*).

Source : Hanahan, D.; Weinberg, R.A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 2000, 100, 57–70, doi:10.1016/s0092-8674(00)81683-9.

du génome cellulaire. Nos cellules sont naturellement munies de divers systèmes de détection et de réparations de ces dommages qui permettent de maintenir l'intégrité du génome. Malgré cela, une exposition trop importante ou trop longue aux agents carcinogènes peut altérer l'efficacité de ces systèmes de réparation engendrant une accumulation de multiples altérations génomiques. Cette succession de modifications de l'ADN conduit à l'établissement progressif des caractéristiques de la cellule tumorale. En 2000, Hanahan et Weinberg ont défini le génotype d'une cellule cancéreuse comme étant la manifestation de six altérations essentielles dans la physiologie cellulaire (Figure 2). Ces altérations regroupent (1) l'autosuffisance par rapport aux signaux prolifératifs, (2) l'absence de réponse aux signaux antiprolifératifs, (3) l'échappement à la mort cellulaire programmée (apoptose), (4) le pouvoir illimité de réplication, (5) la promotion de l'angiogenèse et (6) la capacité d'invasion tissulaire et de dissémination métastatique (Hanahan and Weinberg, 2000). Ces six caractéristiques confèrent à la cellule tumorale un pouvoir de prolifération incontrôlée et indépendant par rapport aux cellules et tissus voisins, tout en permettant à la masse tumorale de s'étendre et d'envahir son environnement. Au cours du temps, la définition du cancer a peu à peu évolué, soulignant davantage l'importance du microenvironnement dans le développement tumoral. Notamment, en 2016, de nouvelles caractéristiques ont été ajoutées telles que l'instabilité génomique avec l'apparition permanente de mutations, la reprogrammation du métabolisme énergétique, l'échappement à la destruction par le système immunitaire et le maintien d'une inflammation résiduelle dans la masse tumorale (Fouad and Aanei, 2017; Hanahan and Weinberg, 2011). L'ensemble de ces caractéristiques font du cancer un groupe de pathologies complexe et très hétérogène, notamment pour le cancer du sein.

I. 2. Epidémiologie et facteurs de risque du cancer du sein

Malgré de considérables avancées sur le dépistage et le traitement du cancer, celui-ci reste à l'heure actuelle la première cause de mortalité en France représentant 29% des causes de décès et se plaçant devant les maladies cardiovasculaires qui sont quant à elles responsables de 24% des décès. Au niveau mondial, il s'agit de la deuxième cause de mortalité et il est estimé qu'un décès sur six est dû au cancer (Ferlay et al., 2015). Cela en fait un des principaux problèmes de santé publique majeur selon l'Organisation Mondiale de la Santé (Bray et al., 2018). Par ailleurs, les dernières publications de la base de données GLOBOCAN indiquent que chaque année plus de 19,3 millions de nouveaux cas sont diagnostiqués, ce qui cause plus de 9,9 millions de morts à l'échelle mondiale (GLOBOCAN

2020). Pour l'année 2020 en France, 467 965 nouveaux cas de cancer ont été diagnostiqués et 185 621 personnes sont mortes des suites d'une tumeur maligne.

En France, le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme représentant 12,4% des cas de cancers féminins (Bray et al., 2018). En 2020, il a été responsable au niveau mondial de 2 261 419 nouveaux cas et de 684 996 décès (e-cancer.fr, 2020). Sur le territoire français pour cette même année, 58 083 nouveaux cas de cancer du sein ont été recensés et 14 183 personnes sont décédées de cette pathologie (e-cancer.fr, 2020). Ces données soulignent le fait que malgré les importantes avancées apportées sur la prévention, sur le dépistage mais aussi sur la prise en charge du cancer du sein, ce dernier représente toujours un défi médical majeur pour les femmes. D'autre part, le cancer du sein peut également survenir chez un individu de sexe masculin mais de manière beaucoup plus anecdotique. En effet, seulement 0,6% des tumeurs mammaires concernent des hommes mais celles-ci sont différentes de la pathologie retrouvée chez les femmes et nécessitent des prises en charge souvent différentes (Oger et al., 2015).

De nombreux facteurs de risques pouvant être associés entre eux sont incriminés dans la survenue de cette maladie multifactorielle qu'est le cancer du sein. Certains de ces facteurs sont intrinsèques et directement liés à l'individu. Notamment, le risque de développer une telle maladie augmente avec l'âge. En effet, plus de 80 % des cancers du sein se développent après 50 ans (Coughlin, 2019). Des facteurs hormonaux peuvent également être mis en cause. Notamment une exposition prolongée aux œstrogènes et à la progestérone peut augmenter le risque de cancer du sein. Par exemple, ceci peut être le cas suite à une puberté précoce ou une ménopause tardive (Gompel, 2019). Enfin, le patrimoine génétique d'une personne influence sur l'augmentation ou la réduction du risque de développer un cancer. Notamment, il existe des prédispositions génétiques qui sont des mutations constitutionnelles augmentant le risque de cancérogenèse (Laloo and Evans, 2012). Ces mutations ne conduisent pas systématiquement au développement tumoral mais augmentent le risque de sa survenue (Filippini and Vega, 2013). D'autres facteurs dits extrinsèques peuvent également jouer un rôle dans la survenue d'un cancer du sein. Ces facteurs ne sont pas liés à l'individu en lui-même mais à son comportement ou à son exposition avec des facteurs environnementaux. Par exemple, la consommation d'alcool ou de tabac ou l'exposition à des agents chimiques cancérogènes ainsi qu'à des perturbateurs endocriniens augmentent de façon significative le risque d'apparition du cancer du sein (Brody et al., 2007; Rodgers et al., 2018).

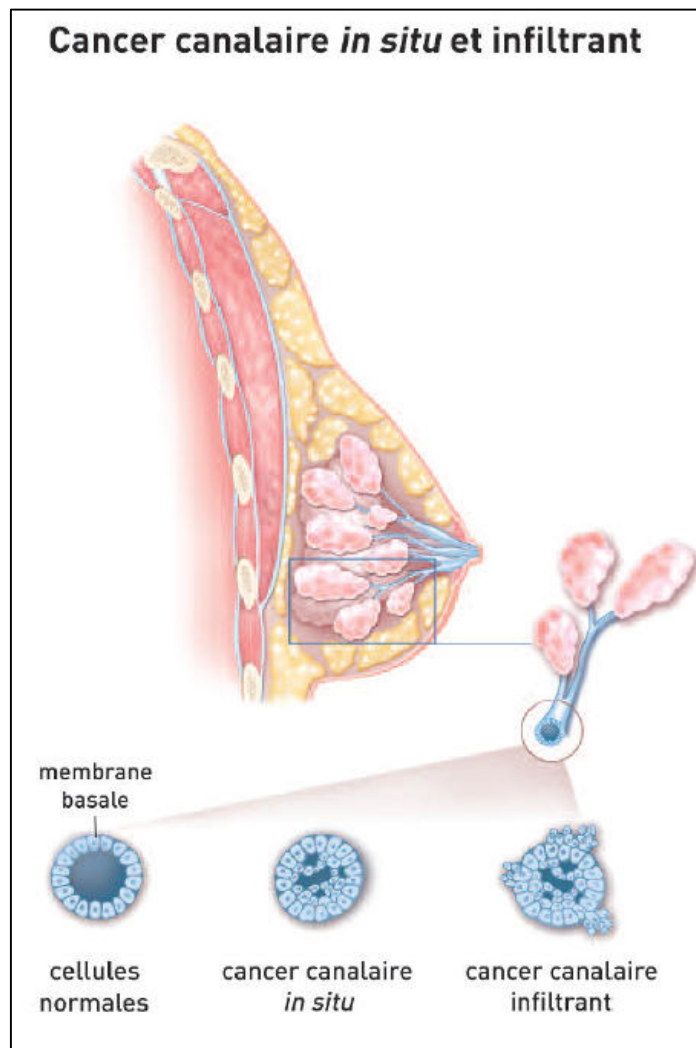


Figure 3 : Schéma explicatif des différences entre un cancer canalaire *in situ* et un cancer canalaire infiltrant. Un cancer canalaire *in situ* reste limité à l'intérieur d'un canal. Au contraire, un cancer canalaire infiltrant présente une invasion des tissus avoisinant le canal.
Source : disponible en ligne sur le site https://www.ligue-cancer.net/article/26094_cancer-du-sein, consulté le 28/04/2021.

I. 3. Classification et pronostics du cancer du sein

Le cancer du sein est une pathologie très hétérogène en termes de morphologie, de phénotype, de caractéristiques génétiques et de réponse aux traitements (Rouzier et al., 2005). De ce fait, il s'agit d'un type tumoral complexe et difficile à caractériser. La classification en différents sous-groupes selon les caractéristiques cliniques et biologiques s'avère être primordiale afin d'adapter et optimiser la prise en charge des patientes, améliorant ainsi le pronostic de la maladie (Cancer Genome Atlas Network, 2012).

I. 3. a) Classification histopathologique

Les cancers du sein peuvent être classés en fonction de leur type histopathologique, c'est-à-dire en fonction de leur origine tissulaire. Un cancer mammaire peut se développer à partir de tous les types histologiques abrités dans le sein mais touche majoritairement les constituants épithéliaux qui revêtent les canaux galactophores ou les lobules. Il s'agit alors d'adénocarcinomes représentant plus de 95% des cancers du sein. Des formes plus rares peuvent toucher le tissu conjonctif dans le cas de sarcome ou le tissu lymphatique dans le cas de lymphome. Selon leur lieu d'implantation, les adénocarcinomes seront qualifiés de canaux ou de lobulaires. Ils apparaissent tous deux à l'intérieur du canal ou du lobule. On parle à ce stade d'**adénocarcinome *in situ*** avec un faible nombre de cellules se limitant à la zone d'implantation initiale (Figure 3). Au cours du développement tumoral, les cellules malignes franchissent progressivement la lame basale pour infiltrer les tissus environnants. Il s'agit alors d'un **adénocarcinome infiltrant** présentant un plus fort pouvoir d'invasion et de dissémination. Notamment, des cellules tumorales infiltrantes peuvent se détacher de la tumeur primaire pour gagner les circulations sanguines ou lymphatiques et atteindre d'autres parties du corps. Ce phénomène est appelé la **dissémination métastatique** et est associé à un mauvais pronostic (Figure 3).

L'Organisation Mondiale de Santé actualise régulièrement la classification histologique des carcinomes mammaires et a recensé 44 types distincts dans sa cinquième édition de 2019 (Cserni, 2020; WHO Classification of Tumors Editorial Board). Les trois types histopathologiques les plus fréquemment rencontrés sont les carcinomes canaux invasifs représentant 55% des cas, les carcinomes canaux *in situ* représentant 13% des cas et les carcinomes lobulaires invasifs qui constituent quant à eux 5% des cas (Malhotra et al., 2010; Pourteimoor et al., 2016). Les autres types histopathologiques appelés spéciaux sont eux-mêmes classifiés en plus de 30 sous-groupes. Ce type de classification permet d'estimer le pronostic de la maladie. En effet, il est estimé que le taux de survie global à 5 ans est de plus 89% pour les carcinomes canaux *in situ* qui sont de meilleur pronostic que les carcinomes

| Feature | Score |
|---|-------|
| Tubule formation (%) | |
| Majority of tumor (>75) | 1 |
| Moderate degree (10-75) | 2 |
| Little or none (<10) | 3 |
| Nuclear pleomorphism | |
| Small, uniform cells | 1 |
| Moderate increase in size/variation | 2 |
| Marked variation | 3 |
| Mitotic counts (per 10-40×fields) | |
| 0-5 (histo) or 0-1 (cyto) | 1 |
| 6-10 (histo) or 2-4 (cyto) | 2 |
| >11 (histo) or >5 (cyto) | 3 |
| Grade 1 (well-differentiated) (sum) | 3-5 |
| Grade 2 (moderately differentiated) (sum) | 6-7 |
| Grade 3 (poorly differentiated) (sum) | 8-9 |
| SBR=Scarff-Bloom-Richardson | |

Figure 4 : Système de notation SRB (Scarff-Bloom-Richardson) pour établir le grade tumoral. Ce système de notation prend en compte différents facteurs comme la formation de microtubules intracellulaires, les atypies cyto-nucléaires et l'index mitotique. Chacun de ces facteurs est noté de 1 à 3. La somme des scores de ces facteurs permet d'établir le grade tumoral.

Source : disponible en ligne sur le site <https://epomedicine.com/medical-students/tnm-staging-breast-cancer-simplified/>, consulté le 29/04/2021.

invasifs lobulaires ou canaux présentant tous deux un taux de survie global à 5 ans proche de 85% (Arpino et al., 2004; Kole et al., 2019). D'autre part, des profils de dissémination métastatique différents ont été observés entre ces plusieurs types. Plusieurs études ont souligné que les carcinomes lobulaires invasifs sont caractérisés par une incidence plus faible de propagation vers les poumons, mais en revanche plus forte pour une dissémination au niveau osseux ou gastro-intestinal par rapport aux carcinomes canaux invasifs (Ferlicot et al., 2004; Lamovec and Bracko, 1991; McCart Reed et al., 2021). Cependant, cette classification ne reflète que très peu le caractère hétérogène du cancer du sein et ne permet pas d'expliquer les différences de réponses aux traitements au sein d'un même sous-type. Ainsi, de nouveaux types de classification permettent d'affiner la description de cette pathologie (Guiu et al., 2012).

1. 3. b) Classification par grade et stade tumoral

Les tumeurs mammaires peuvent également être classifiées en fonction de leur stade ou de leur grade tumoral qui sont deux notions distinctes en lien avec le pronostic de la pathologie.

Premièrement, le grade tumoral fait référence au niveau de différenciation des cellules cancéreuses. En conditions physiologiques, la majorité des cellules d'un organe adulte sont différenciées avec une forme et une fonction spécifique. Les cellules tumorales perdent peu à peu ces propriétés de différenciation et deviennent désorganisées avec une division cellulaire incontrôlée et une perte de l'intégrité nucléaire. Plus les cellules d'une tumeur seront différenciées et meilleur sera le pronostic de la maladie. Le système de notation « Nottingham » qui est une version modifiée du système « Scarff-Bloom-Richardson » se base sur trois critères afin d'attribuer un grade tumoral (Lee and Ellis, 2008). En effet, ce système considère (i) le niveau de différenciation cellulaire (*via* la formation de structures tubulaires intracellulaires), (ii) les atypies cyto-nucléaires et (iii) l'index mitotique reflétant l'activité proliférative de la tumeur (Figure 4) (Amat et al., 2002; Rakha et al., 2008). Chacun de ces critères est noté avec un score allant de 1 à 3 permettant d'obtenir un score final en additionnant ces trois valeurs. Le grade tumoral peut alors être attribué comme suit :

- Un score de 3 à 5 : Grade tumoral I : tumeur bien différenciée avec un pronostic favorable (Figure 4).
- Un score de 6 à 7 : Grade tumoral II : tumeur modérément différenciée avec un pronostic intermédiaire (Figure 4).





| | | | | |
|--------------------|--|--|---|--|
| Tumor size | Tumor size < 2 cm | Tumor size 2-5 cm | Tumor size > 5 cm | Tumor extends to skin or chest wall |
| T |  T1 |  T2 |  T3 |  T4 |
| Lymph Nodes | N0 No lymph node metastasis | N1 Metastasis to ipsilateral, movable, axillary LNs | N2 Metastasis to ipsilateral fixed axillary, or IM LNs | N3 Metastasis to infraclavicular/supraclavicular LN, or to axillary and IM LNs |
| N | | | | |
| Metastasis | M0 No distant metastasis | M1 Distant metastasis | LNs= Lymph Nodes; IM= Internal Mammary | |
| M | | | | |

Figure 5 : Système de notation TNM (*Tumor, Nodes, Metastasis*) pour établir le stade tumoral. Ce système permet d'établir le stade tumoral en fonction de la taille de la tumeur (T pour *Tumor*), de l'invasion des ganglions lymphatiques environnants (N pour *Nodes*) et la dissémination métastatique de la maladie (M pour *Metastasis*).

Source : disponible en ligne sur le site <https://epomedicine.com/medical-students/tnm-staging-breast-cancer-simplified/>, consulté le 29/04/2021.

- Un score de 8 à 9 : Grade tumoral III : tumeur peu différenciée avec un pronostic défavorable (Figure 4).

Deuxièmement, le stade tumoral fait référence au niveau d'évolution et de propagation de la maladie. Plusieurs systèmes de classification comme la « *Surveillance Epidemiology, and End Results Programm Extent of Disease* » (SEER EDO) ou la « *Surveillance Epidemiology, and End Results Programm Summary Stage* » (SEER SS) existent pour la stadification des cancers (Purteimoor et al., 2016). Cependant, le système le plus couramment utilisé est le système TNM (« *Tumor, Nodes and Metastases* » en anglais ou Tumeur, Ganglions et Métastases en français) (Cserni et al., 2018; Sawaki et al., 2019). Cette classification a été pour la première fois proposée en 1959 pour le cancer du sein et constitue un code international récemment mis à jour en 2018 pour une huitième édition. Ce code commence par la lettre **T** pour Tumeur suivi d'un chiffre allant de **0 à 4** indiquant la taille de la tumeur et son niveau d'invasion dans les tissus voisins (Figure 5). Le code continue avec la lettre **N** désignant les ganglions (« *Nodes* ») suivis d'un chiffre allant de **0 à 3** décrivant le niveau d'invasion des ganglions lymphatiques par des cellules tumorales (Figure 5). Enfin, ce code se termine par la lettre **M** pour les **Métastases** suivi d'un **0 ou d'un 1** informant sur la dissémination métastatique de la pathologie (Figure 5) (Cserni et al., 2018). Ce code permet d'attribuer la tumeur à un stade complet de 0, I, II, III ou IV indiquant de manière croissante et graduelle la sévérité et l'agressivité du cancer (Cserni et al., 2018). A titre d'exemple, une tumeur mammaire présentant une grande taille, une invasion des ganglions sentinelles ainsi qu'une dissémination métastatique sera associée à un stade élevé de IV et donc à un pronostic défavorable.

I. 3. c) Classification immunohistochimique et statut des récepteurs membranaires

Les cancers du sein sont également couramment caractérisés par des méthodes d'immunohistochimie visant à déterminer l'expression ou l'absence d'expression de trois récepteurs membranaires. En effet, le développement des cellules tumorales mammaires dépend souvent de la présence d'hormones telles que les œstrogènes et la progestérone et de facteurs de croissance tels que l'*Epidermal Growth Factor 2* (EGF2). La présence de récepteurs membranaires aux œstrogènes (ER), à la progestérone (PR) ou à l'EGF2 (HER2 pour Human Growth Factor 2 ou ErbB2) renseigne sur la dépendance de la tumeur vis-à-vis de ces différents facteurs environnants. Cette classification basée sur le statut d'expression de ces récepteurs permet de distinguer trois groupes de cancers du sein.

Le groupe principal est celui des cancers dits hormonodépendants représentant 70 à 80% des tumeurs mammaires (Lim et al., 2012). Pour ce groupe, les cellules tumorales présentent à leur surface les récepteurs ER et /ou PR. Ces cancers sont généralement de stade et de grade peu avancés et sont associés à un pronostic relativement favorable (Drăgănescu and Carmocan, 2017).

Certaines tumeurs mammaires peuvent également présenter une surexpression du récepteur HER2. Cette caractéristique est retrouvée dans 15% des cas de cancers du sein formant le groupe appelé « HER2+ » (Figueroa-Magalhães et al., 2014). Elle peut être due à une surexpression associée ou non à une amplification de l'oncogène *HER2/neu* qui reste aujourd'hui un biomarqueur important pour le diagnostic des cancers du sein (Dhesy-Thind et al., 2008). Ce groupe de tumeur est généralement de stade et de grade avancés et donc associé à un pronostic défavorable.

Enfin les cancers mammaires ne présentant ni une expression des récepteurs PR et ER, ni une surexpression du récepteur HER2 sont appelés Triple Négatifs (TN). Ce dernier groupe représente 10 à 15% des cancers du sein (Kumar and Aggarwal, 2016). Il s'agit d'un groupe particulièrement hétérogène et complexe qui rassemble des tumeurs généralement très peu différenciées présentant un profil relativement agressif et associé à un pronostic défavorable. Notre groupe de recherche s'intéresse particulièrement à l'étude de ce phénotype.

1. 3. d) Classification moléculaire

Depuis une vingtaine d'années, de nombreux efforts ont été apportés par les pathologistes afin d'affiner la classification des cancers du sein, notamment pour mieux représenter leur complexité et leur diversité. Dans ce cadre, de nombreuses études du niveau d'expression génique par approche de micropuces à ADN a permis la distinction de plusieurs sous-types moléculaires (Reis-Filho et al., 2006; van't Veer and Bernards, 2008). Cette nouvelle approche a notamment permis une meilleure compréhension de l'hétérogénéité dans le comportement et la réponse aux traitements entre les différents groupes de cancers du sein (Peppercorn et al., 2008). A l'instar des autres types de classification, ce mode de classement est en constante évolution en fonction de l'arrivée de nouvelles technologies disponibles et des découvertes associées permettant de corriger ou préciser la classification.

En 2000, Perou et son équipe proposent une classification distinguant quatre groupes de tumeurs mammaires par regroupement hiérarchique de gènes présentant une variation d'expression significative (Perou et al., 2000). En effet ces travaux différencient les tumeurs

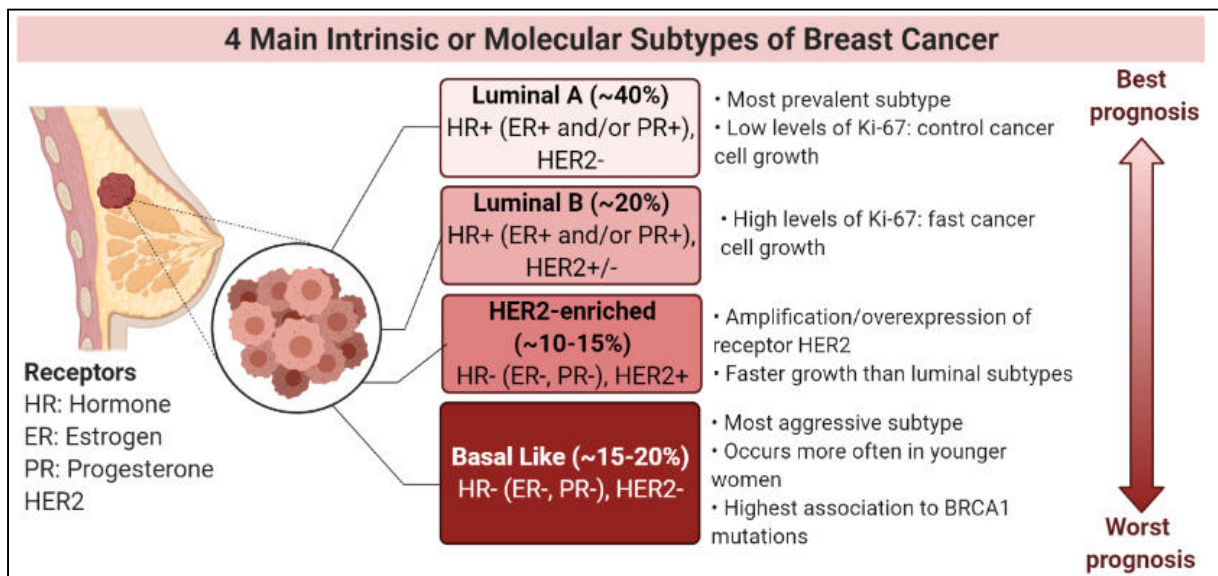


Figure 6 : Schéma récapitulatif des quatre sous-types moléculaires de cancer du sein selon la classification de Perou. Cette classification permet de distinguer 4 sous-types moléculaires (*Luminal A*, *Luminal B*, *HER-2 Enriched* et *Basal-like*) en fonction de l'expression de différents marqueurs, dont les récepteurs hormonaux aux œstrogènes et à la progestérone, les récepteurs HER2 et le marqueur nucléaire Ki67. L'attribution des tumeurs à ces différents sous-types est liée au pronostic de la maladie.

Source : adapté du modèle Biorander d'Anna Lazaratos : Intrinsic and Molecular Subtypes of Breast Cancer.

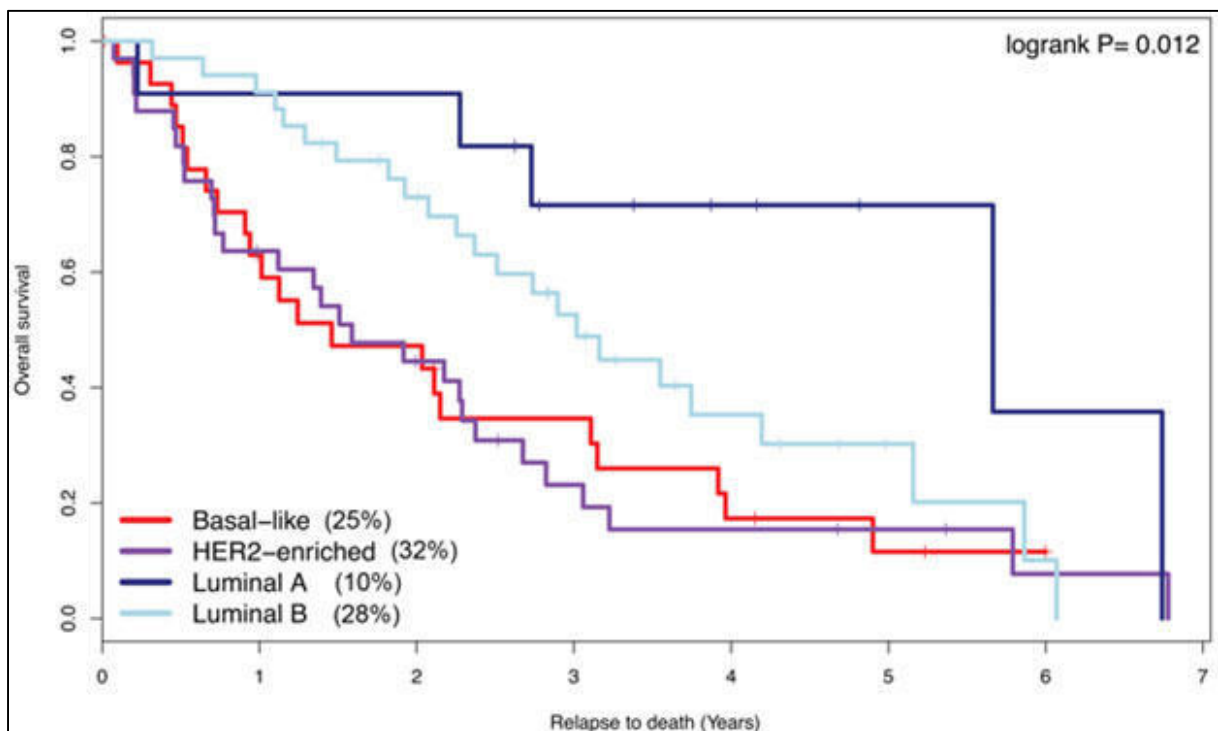


Figure 7 : Courbes de survie globale à sept ans entre les différents sous-types moléculaires intrinsèques de cancer du sein (*Basal-Like*, *HER2-enriched*, *Luminal A* et *Luminal B*).

Source : Tobin et al. 2014 Molecular subtype and tumor characteristics of breast cancer metastases as assessed by gene expression significantly influence patient post-relapse survival.

dites « *Luminal-like* », les « *Basal-like* », les « *HER2-positive* » et les « *Normal-Breast-like* ». L'année suivante, une autre étude portée par la même équipe a permis la subdivision des tumeurs « *Luminal* » en deux sous-groupes, celui des tumeurs « *Luminal A* » et des tumeurs « *Luminal B* » permettant ainsi d'affiner cette classification (Sørli et al., 2001). Par ailleurs, le groupe « *Normal-Breast-like* » a peu à peu été abandonné en raison de son manque de représentation d'un sous-type pathologique. En effet, la première identification de ce sous-type été basée en grande partie sur l'inclusion de nombreux échantillons non tumoraux ou présentant une faible proportion de cellules tumorales (inférieure à 50%). Les quatre autres sous-types moléculaires sont aujourd'hui encore largement employé pour la caractérisation et la prise en charge des tumeurs mammaires (Pourteimoor et al., 2016). On peut ainsi distinguer :

- Le sous-type « **Luminal A** » : il s'agit du groupe le plus fréquemment retrouvé dans 44,9% des cas de cancer du sein (Figure 6). Ce sous type regroupe une forte proportion de tumeur ER+/HER2- avec une forte activité des voies de signalisation liées aux œstrogènes. De plus, ce groupe est marqué par une forte incidence d'apparition de mutations sur le gène *PI3K*. Ces tumeurs montrent un faible indice de prolifération associé à une faible expression du facteur de transcription Ki-67. De ce fait, il s'agit de cas cliniques de grade généralement peu élevé associé à un faible risque de récurrence et donc présentant un pronostic favorable (Figure 7) (Cancer Genome Atlas Network, 2012; Peppercorn et al., 2008).
- Le sous-type « **Luminal B** » : ce groupe est retrouvé dans 25,2% des cas de cancers du sein présente comme le groupe précédent une forte proportion de tumeurs ER+/HER2-(Figure 6). En revanche, contrairement au sous-type « *Luminal A* », les cancers « *Luminal B* » sont associés à un fort taux de prolifération cellulaire en majorité expliqué par l'apparition de mutations sur le gène codant la Cycline D1 responsables d'un cycle cellulaire incontrôlé. La voie de signalisation des œstrogènes est par ailleurs moins soutenue que dans le cas des tumeurs « *Luminal A* ». Ce sous type est aussi caractérisé par une surexpression des facteurs de transcription FoxM1 et c-Myc impliqués dans les processus de prolifération tumorale et d'invasion tissulaire. Ces tumeurs sont de grade variable avec un pronostic intermédiaire (Figure 7) (Cancer Genome Atlas Network, 2012; Peppercorn et al., 2008; Prat et al., 2015).
- Le sous-type **HER2+** : il s'agit du sous-type le moins fréquemment rencontré en clinique représentant 11,3% des tumeurs mammaires (Figure 6). Sa principale caractéristique qui lui vaut par ailleurs son nom est la forte incidence d'amplification du

gène *HER2/ErbB2* entraînant une forte activation des voies de signalisation tyrosine kinase liées à l'EGF associée à une forte prolifération cellulaire (taux d'expression de Ki-67 élevé). Ce groupe présente aussi une forte instabilité génomique. Il s'agit majoritairement de tumeurs de haut grade avec un pronostic relativement défavorable (Figure 7) (Cancer Genome Atlas Network, 2012; Prat et al., 2015; Sørlie et al., 2001).

- Le sous-type « **Basal-like** » : ce groupe représente 18,6% des cas de cancer du sein comprenant majoritairement des tumeurs triple négatives (dans près de 80% des cas) (Figure 6). Elles présentent souvent une mutation et donc un dysfonctionnement du gène suppresseur de tumeur *TP53* associé à une faible expression de *RB1*. Ces caractéristiques confèrent aux tumeurs un caractère particulièrement agressif avec un index prolifératif élevé. De plus, ce groupe présente un fort taux d'expression des protéines impliquées dans les systèmes de réparation de l'ADN se montrant souvent déficient et associés avec une importante instabilité génomique. Notamment, ce groupe présente un fort taux de mutations somatiques ou constitutionnelles portées sur les gènes *BRCA1* ou *BRCA2*. Les tumeurs « *Basal-Like* » sont généralement de haut grade avec un risque élevé de récurrence et de ce fait associé à un pronostic défavorable (Figure 7) (Cancer Genome Atlas Network, 2012; Peppercorn et al., 2008; Sørlie et al., 2001).

Afin de compléter la définition de ces quatre sous-types, un autre groupe intitulé « *Claudin Low* » a été identifié plus tard en 2010 (Prat et al., 2010). Ce groupe présente une faible expression de gènes impliqués dans l'adhésion intercellulaire et une haute expression de gènes impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse avec une forte expression de la vimentine et du facteur ZEB1. Par ailleurs, des études montrent un fort taux d'expression de l'enzyme ALDH1 et une surreprésentation de cellules CD44⁺/CD24^{-low} dans ce groupe de tumeurs (Moreira et al., 2018; Prat et al., 2010). Ces éléments apparentent ces caractéristiques à celles des cellules souches mammaires et au concept des cellules souches cancéreuses (Fougner et al., 2020; Prat et al., 2010). Les tumeurs « *Claudin-Low* » sont associées à une faible instabilité génomique et un faible taux de mutations mais présentent un fort index prolifératif. Elles représentent une faible proportion des cancers du sein qui varie fortement entre 1,5 et 14% selon les cohortes de patients considérées (Pereira et al., 2016; Prat et al., 2015). Ce groupe reste une forme incomprise en raison de sa très grande hétérogénéité et de ses similitudes avec certains autres sous-types moléculaires. Très récemment, une redéfinition de celui-ci a été proposée visant à le considérer non pas comme

un sous-type moléculaire en lui-même, mais comme un phénotype dont peuvent se rapprocher ou s'éloigner n'importe quelles tumeurs des autres sous-types (Fougner et al., 2020).

La classification moléculaire des cancers du sein est en constante évolution et est largement employée aujourd'hui afin d'appréhender correctement la complexité de cette pathologie. Elle reste un élément majeur permettant de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques pour la prise en charge des patients atteints de cette maladie (Antoniou et al., 2019).

I. 4. Prise en charge thérapeutique du cancer du sein

Il existe différents types de traitements pouvant être utilisés seuls ou associés les uns aux autres afin de prendre en charge les patientes atteintes de cancer du sein. Ces traitements peuvent avoir un seul ou plusieurs objectifs notamment afin de supprimer la/les masse(s) tumorale(s), supprimer les métastases, ralentir le développement tumoral, réduire le risque de récurrence ou limiter les symptômes engendrés par la maladie (Zardavas et al., 2015). Le choix du traitement est adapté à chaque cas clinique selon différents facteurs. Notamment sont pris en compte les caractéristiques tumorales comme l'unifocalité (un seul site tumoral) ou la multifocalité (plusieurs sites), le type histologique, le stade, le grade ou encore si le cancer est hormonosensible ou s'il présente un profil HER2 positif (Maughan et al., 2010). D'autres facteurs tels que l'âge de la patiente, le fait qu'elle soit ménopausée ou non ainsi que ses antécédents familiaux ou personnels orientent également la stratégie de traitement.

I. 4. a) La chirurgie

Une intervention chirurgicale vise à retirer la tumeur (Maughan et al., 2010). Il peut s'agir d'une chirurgie mammaire conservatrice appelée tumorectomie ou segmentectomie. Celle-ci consiste à retirer une partie délimitée du sein contenant la tumeur et une partie des tissus qui l'entourent. Dans les cas de tumeurs de stades et de grades élevés, l'intervention peut être une chirurgie mammaire non conservatrice appelée mastectomie. Il s'agit alors de retirer l'intégralité du sein dans lequel se situe la tumeur afin de limiter au maximum le risque de récurrence ou de rechute (Wöckel et al., 2018). Une intervention chirurgicale est très souvent associée à d'autres traitements qualifiés alors de traitements adjuvants.

I. 4. b) La radiothérapie

La radiothérapie consiste à utiliser des rayonnements ionisants afin de détruire les cellules cancéreuses. Il s'agit d'un traitement loco-régional permettant de diriger précisément les rayons sur la zone à traiter, tout en préservant au mieux les tissus ou organes voisins dits à risque. Le type de radiothérapie le plus utilisé est celle dite externe, c'est-à-dire, qui utilise

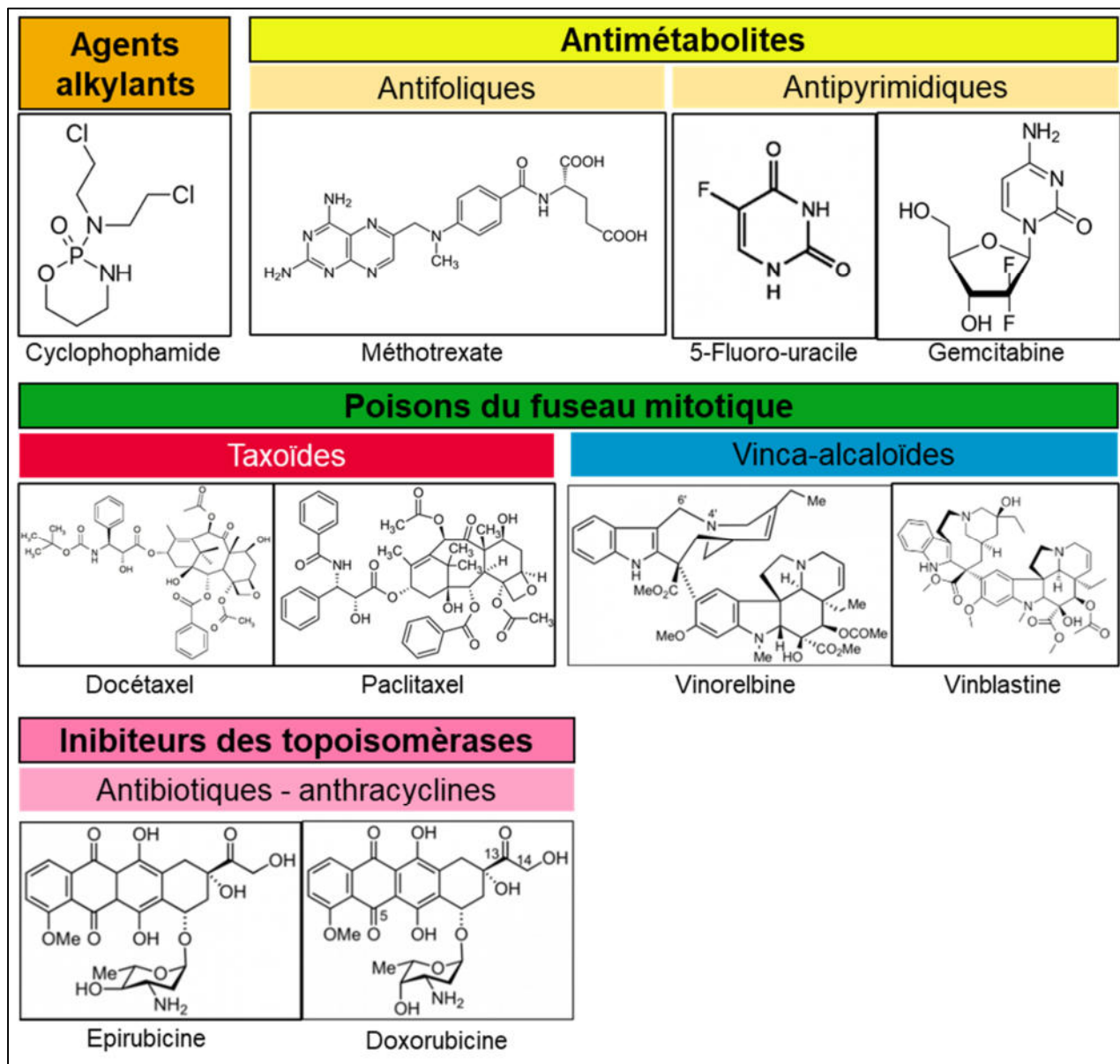


Figure 8 : Structures chimiques des principales molécules de chimiothérapie utilisée pour le traitement du cancer du sein.

Structures chimiques issues du site internet <https://dictionnaire.acadpharm.org>.

une source de rayonnement externe traversant la peau pour traiter la zone cancéreuse (He et al., 2018). Les rayons sont le plus fréquemment produits à l'aide d'un accélérateur de particules. Il existe aussi la curiethérapie qui utilise une source radioactive placée à l'intérieur du corps et s'accumulant de manière spécifique dans les zones à traiter. Cependant la curiethérapie est très peu utilisée dans le cadre du traitement d'un cancer du sein.

La radiothérapie externe adjuvante est quasiment toujours indiquée à la suite d'une chirurgie conservatrice (He et al., 2018; Høst et al., 1986). Elle permet de limiter les risques de récives notamment dans le cas de carcinomes infiltrants. Elle peut également être mise en place à la suite d'une mastectomie pour les cas présentant des facteurs de risques de récives ou un envahissement important des tissus sains. Par ailleurs, pour certains cancers du sein métastatiques, une radiothérapie du sein peut être envisagée pour freiner l'évolution de la tumeur ou des métastases. En combinaison avec la chirurgie, ce type de traitement s'avère particulièrement efficace pour cibler les tumeurs sans endommager les tissus sains (He et al., 2018; Høst et al., 1986). Cependant, dans de nombreux cas, il est nécessaire d'avoir recours à des traitements médicamenteux pour limiter le risque de récives ou la progression de la maladie.

1. 4. c) Les chimiothérapies

Les traitements antitumoraux par des molécules de chimiothérapie sont des traitements généraux dits systémiques qui agissent sur l'ensemble du corps permettant ainsi d'atteindre les cellules tumorales quelle que soit leur localisation. Cette stratégie s'avère être adaptée dans le cas de maladies agressives infiltrantes et/ou métastatiques. Il existe un grand nombre de molécules de chimiothérapie avec différents modes d'action mais agissant toujours sur les mécanismes de division cellulaire. Ces molécules sont généralement associées entre elles et administrées en intraveineux.

Dans le contexte du traitement de cancers du sein infiltrants, différentes molécules se sont montrées efficaces afin de détruire ou réduire la masse tumorale et limiter sa progression (Maughan et al., 2010). Il peut s'agir d'agents alkylants tels que le cyclophosphamide (Endoxan[®]) (Figure 8). Ces agents ajoutent des groupements alkyls sur l'ADN empêchant ainsi sa réplication. D'autres molécules bloquent la division cellulaire en agissant sur le fuseau mitotique. En effet, les taxanes sont des dérivés des taxoïdes de l'if connus pour leur pouvoir stabilisant des microtubules du fuseau provoquant alors l'arrêt du cycle cellulaire (Figure 8) (McGrogan et al., 2008). Ces molécules telles que le docétaxel (Taxotère[®]) ou le paclitaxel (Taxol[®]) sont connues pour le traitement du cancer du sein (McGrogan et al., 2008). Une autre famille de chimiothérapeutiques, appelée les anthracyclines, a largement été utilisée pour le

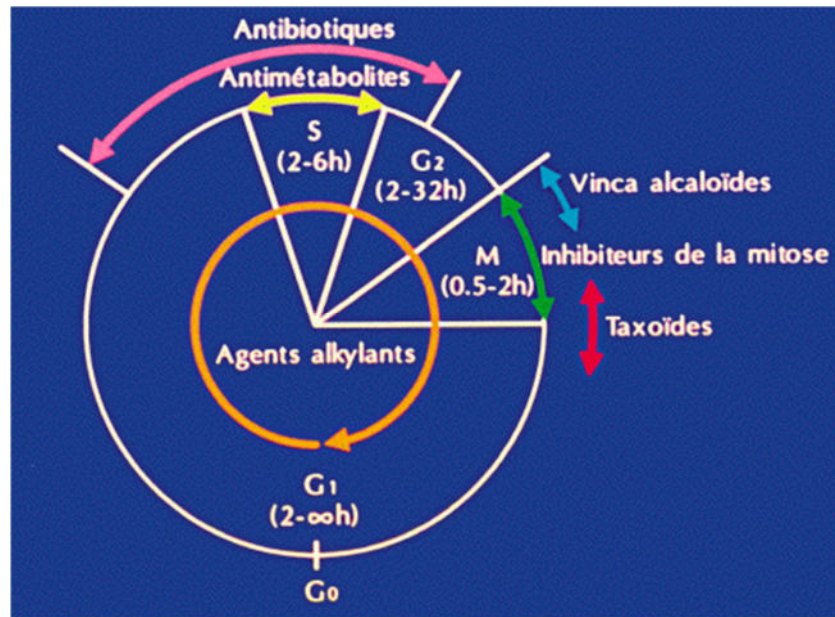


Figure 9 : Intervention des différentes classes de molécules de chimiothérapies dans le cycle cellulaire. Les antibiotiques ont une action cytotoxique sur les cellules en phases G₁, S et G₂ du cycle cellulaire. Les antimétabolites interviennent lors de la phase S du cycle cellulaire. Les vinca-alcaloïdes interviennent lors de la phase M du cycle cellulaire. Les taxoïdes interviennent lors de la phase M du cycle cellulaire. Les agents alkylants ont une action sur les cellules, quelle que soit la phase du cycle cellulaire.

Source : <https://www.urofrance.org/base-bibliographique/chimiotherapie-principes-pratiques>

traitement des cancers du sein infiltrants (Shah and Gradishar, 2018). Ces molécules sont reconnues pour jouer un rôle d'intercalant de l'ADN et pour inhiber la topoisomérase II, une enzyme essentielle lors de la réplication de l'ADN. Ainsi cette classe de molécule empêche la réplication de l'ADN lors de la mitose. Les anthracyclines sont une classe d'antibiotiques isolées à partir de micro-organismes du genre *Streptomyces* dont le chef de file est la doxorubicine (Adriamycine®) (Shah and Gradishar, 2018). Celles-ci tout comme un autre membre de cette classe, l'épirubicine (Ellence®), sont classiquement utilisées comme traitement adjuvant des cancers du sein avancés (Figure 8) (Khasraw et al., 2012). Enfin, des antimétabolites peuvent être utilisés pour traiter des carcinomes mammaires invasifs tels que le 5-FU (5-fluoro-uracile) et le méthotrexate (Figure 8). Ces molécules empêchent la synthèse des bases azotées indispensables pour la réplication et la traduction de l'ADN. Notamment, le 5-FU est un analogue structural des bases pyrimidiques et bloque la synthèse de l'ARN messager (Cameron et al., 1994). Le méthotrexate est quant à lui le chef de file des antimétabolites antifoliques, bloquant la synthèse des folates essentiels à la production des bases puriques et pyrimidiques (Cronstein, 1997).

Pour le traitement des cancers du sein métastatiques, certaines classes de molécules préalablement évoquées peuvent être utilisées comme les anthracyclines, les taxanes ou le cyclophosphamide (Sledge, 2016). D'autres molécules ont également montré leur efficacité pour les carcinomes métastatiques telles que le gemcitabine (Gemzar®) (Figure 8) (Heinemann, 2005). Cette molécule est un antimétabolite pyrimidique inhibant la synthèse nucléotidique et entraînant la mort cellulaire par apoptose (Seidman, 2001). Enfin, le corps médical peut avoir recours dans certains cas à des membres de la famille des vinca-alcaloïdes tels que la vinorelbine (Navelbine®) ou la vinblastine (Figure 8) (Maughan et al., 2010; Stebbing and Ngan, 2010). Ces molécules souvent extraites de la pervenche de Madagascar sont des poisons du fuseau mitotique inhibant la polymérisation des microtubules lors de la mitose.

Même si tous les agents de chimiothérapie ont pour but de stopper la division cellulaire, ces molécules ont des modes d'actions divers et n'agissent pas tous aux mêmes moments du cycle cellulaire. Certains composés, comme les agents alkylants, sont dits cycles-dépendants et agissent sur les cellules engagées dans le cycle cellulaire quel qu'en soit la phase (Figure 9) (Drabløs et al., 2004). Les autres agents sont dits phase-dépendants et agissent spécifiquement pendant une phase précise du cycle (McGrogan et al., 2008). A titre d'exemple, les antimétabolites agissent pendant la phase S (phase de réplication de l'ADN) alors que les vinca-alcaloïdes ou les taxanes entrent en action pendant la phase M (phase de la mitose) (Figure 9). En monothérapie, c'est-à-dire lors de l'utilisation d'un seul agent de chimiothérapie,

TYPES D'HORMONOTHÉRAPIE UTILISÉS CHEZ LA FEMME MÉNOPAUSÉE ET NON MÉNOPAUSÉE, DANS LE CANCER DU SEIN NON MÉTASTATIQUE

| Type d'hormonothérapie | Femme non ménopausée | Femme ménopausée |
|------------------------|--|---|
| Anti-œstrogènes | Le plus souvent proposé comme premier traitement pour une durée de 5 ans | <ul style="list-style-type: none"> ■ Pendant 2 à 3 ans, suivi d'un inhibiteur de l'aromatase, pour un total de 5 ans de thérapie hormonale ■ ou pendant 5 ans |
| Anti-aromatases | | <ul style="list-style-type: none"> ■ Le plus souvent proposé comme premier traitement pour une durée de 5 ans ■ ou pendant 2 ans, suivi par un traitement par tamoxifène (pour un total de 5 ans de thérapie hormonale) |
| Agonistes de la LH-RH | Envisageable au cas par cas pour une durée de 3 à 5 ans | |

Figure 10 : Indications de traitements médicamenteux antihormonaux dans le cadre du cancer du sein. Les traitements médicamenteux par hormonothérapie peuvent être divisés en trois classes. Les anti-œstrogènes sont indiqués pour les femmes non-ménopausées ou ménopausées. Les anti-aromatases sont indiqués pour les femmes ménopausées. Les agonistes de la LH-RH sont envisageables pour les femmes non ménopausées.

Source : https://www.ligue-cancer.net/article/26094_cancer-du-sein.

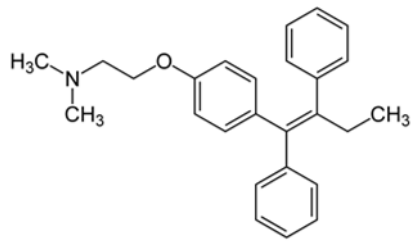
la fréquence d'échecs thérapeutiques reste élevée, principalement en raison de l'apparition de résistance cellulaire au traitement ou de problèmes de distribution corporelle (Chun et al., 2017). De ce fait, les stratégies thérapeutiques allient le plus souvent plusieurs molécules possédant différents modes de diffusion et mécanismes d'action afin de potentialiser l'effet thérapeutique. Les molécules sont administrées selon un schéma et un calendrier précis. Par exemple, le protocole FEC est couramment employé dans le cadre du cancer du sein combine le 5-FU, l'épirubicine et le cyclophosphamide en quatre à six séances espacées chacune de trois semaines (Blomqvist et al., 1992; Ishiguro et al., 2020).

Le principal problème rencontré dans les cas de traitement par chimiothérapie est celui de la toxicité. En effet, les agents chimiothérapeutiques manquent de spécificité et agissent sur toutes cellules en division, mêmes les cellules saines (McKnight, 2003). Ainsi, ces molécules sont fréquemment associées à des atteintes des tissus régénératifs tels que la peau, les muqueuses, la moelle osseuse ou encore les parois du tube digestif (Lowenthal and Eaton, 1996). Des effets secondaires tels qu'une alopecie, des mucites, des nausées et vomissements ou une insuffisance de l'hématopoïèse sont classiquement observés chez les patients sous chimiothérapie (Lowenthal and Eaton, 1996). De plus, de nombreuses molécules présentent également une cardiotoxicité. C'est notamment le cas des anthracyclines, des agents alkylants ou de certains antimétabolites (Jain and Aronow, 2019; Padegimas et al., 2020). Cette toxicité est à l'origine d'effets cardiovasculaires variés tels qu'un dysfonctionnement du ventricule gauche, une insuffisance cardiaque congestive ou des troubles du rythme (Mondal et al., 2019). Par conséquent, depuis la fin du XX^{ème} siècle, des efforts considérables ont été faits afin de proposer des stratégies thérapeutiques médicamenteuses ciblant de manière plus spécifique les cellules tumorales.

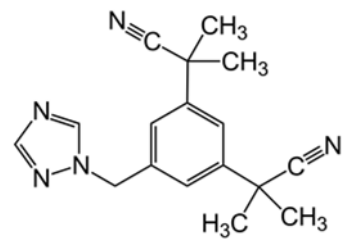
1. 4. d) L'hormonothérapie

L'hormonothérapie adjuvante est couramment utilisée le traitement de cancers du sein hormonodépendants. Elle peut se faire de manière chirurgicale, notamment en procédant à une ovariectomie visant à supprimer la synthèse des hormones œstrogènes et progestérone en retirant les ovaires du corps (de Cremoux, 2011). Cependant, le choix thérapeutique se porte plus souvent vers des stratégies médicamenteuses moins invasives. Dans ce contexte, il existe trois classes de molécules (Figure 10) :

- Les anti-œstrogènes : ils sont indiqués en première intention pour les femmes non encore ménopausées. Ils peuvent également être proposés pour les femmes ménopausées mais seulement en deuxième intention. Ces molécules empêchent la



Tamoxifène



Anastrazole

Figure 11 : Structures chimiques du Tamoxifène et de l'Anastrazole, deux molécules d'hormothérapie classiquement utilisées pour le traitement du cancer du sein hormonodépendant. Structures chimiques issues du site internet <https://dictionnaire.acadpharm.org>.

fixation des œstrogènes sur leurs récepteurs membranaires. Le chef de file de cette classe médicamenteuse est le Tamoxifène (Nolvadex[®], Figure 11) (de Cremoux, 2011).

- Les inhibiteurs d'aromatases : ils sont proposés en première intention pour uniquement les femmes ménopausées. En effet, ces molécules inhibent l'action des aromatases, des enzymes responsables de la transformation des androgènes en œstrogènes après la ménopause chez la femme. Le chef de file de cette classe de médicaments est l'Anastrozole (Arimidex[®], Figure 11) (de Cremoux, 2011).
- Les agonistes de la LH-RH : ceux-ci sont rarement proposés et seulement pour les femmes non ménopausées. Ils imitent l'action de la lutéinostimuline (LH) dans le but de stopper sa sécrétion par l'hypophyse et ainsi inhiber la synthèse des œstrogènes au niveau des ovaires (de Cremoux, 2011).

L'hormonothérapie s'avère efficace pour le traitement des cancers hormonodépendants qui représentent la grande majorité des cancers du sein (de Cremoux, 2011). Notamment il a été montré qu'une hormonothérapie médicamenteuse adjuvante de 5 ans améliore considérablement le pronostic des patientes en diminuant le risque de récives (de Cremoux, 2011). Néanmoins, ce type de traitement ne peut être proposé aux patientes atteintes de tumeurs insensibles aux hormones.

1. 4. e) Les thérapies ciblées

Les thérapies ciblées sont des traitements anticancéreux visant des mécanismes spécifiques des cellules tumorales. Elles s'inscrivent dans une démarche de médecine personnalisée ayant pour but d'adapter de manière précise la stratégie thérapeutique en fonction des caractéristiques moléculaires de la tumeur. Ces thérapies sont spécifiques de cibles moléculaires responsables de l'anomalie des cellules cancéreuses. Elles vont donc relativement épargner les tissus sains, contrairement à la chimiothérapie. Durant les vingt dernières années, les connaissances disponibles concernant la survenue et le développement des cancers a permis d'identifier de nombreuses cibles thérapeutiques (Mohamed et al., 2013).

Ce développement de nouveaux médicaments a notamment amélioré le traitement de tumeurs mammaires HER2+. En effet, des anticorps monoclonaux tels que le Trastuzumab (Herceptin[®]) se sont montrés efficaces pour bloquer la partie extracellulaire des récepteurs HER2 (Figueroa-Magalhães et al., 2014). D'autres molécules ont été mises sur le marché pour le traitement de cancers du sein HER2+ comme le Lapatinib (Tyverb[®]) inhibant l'activité

tyrosine kinase intracellulaire du récepteur ou bloquant les voies de signalisation qui en découlent comme l'Évérolimus (Afinitor®), un inhibiteur du système m-Tor (Figueroa-Magalhães et al., 2014).

Néanmoins, des résistances *de novo* ou acquises à ces thérapies sont responsables d'échecs thérapeutiques (Gu et al., 2016). De plus, le Cancer du Sein Triple Négatif (CSTN) est resté longtemps sans cibles thérapeutiques identifiées. Ce groupe de tumeurs hétérogènes a nécessité ainsi le développement de nouvelles thérapies ciblant ses particularités et reste encore aujourd'hui un défi thérapeutique majeur dans le traitement du cancer du sein (Mohamed et al., 2013).

II. Le Cancer du Sein Triple Négatif

II. 1. Généralités et classification

Le Cancer du Sein Triple Négatif (CSTN) est défini comme un groupe immunohistochimique de tumeurs mammaires n'exprimant pas de récepteurs membranaires ER ou PR et ne présentant par une surexpression du récepteur HER2 ou une amplification du gène *HER2/neu* (Kumar and Aggarwal, 2016). L'appellation de CSTN est souvent considérée à tort comme un synonyme du sous-type moléculaire « *Basal-Like* ». Ceci est en partie dû à des caractéristiques pathologiques communes entre les deux appellations et au manque de consensus concernant les terminologies employées dans les études moléculaires [78]. Il est vrai que la majorité des tumeurs triple négatives présente un profil d'expression génique « *Basal-Like* ». Cependant, toutes les tumeurs « *Basal-Like* » ne présentent pas un phénotype Triple Négatif et peuvent exprimer des récepteurs hormonaux, notamment des ER (Borri and Granaglia, 2020). Ces deux groupes tumoraux présentent de ce fait plus de 30% de discordance entre eux et ne partagent pas toujours les mêmes caractéristiques cliniques (Bertucci et al., 2008; Rakha et al., 2008). Par ailleurs, l'étude des profils d'expressions géniques ont permis de définir deux catégories distinctes de CSTN : (1) les tumeurs « *Basal-Like* » les plus fréquemment rencontrées dans ce sous types, et (2) les tumeurs « *Normal Breast-Like* » (Perou et al., 2000).

Cette première distinction en deux catégories de CSTN s'est avérée particulièrement importante d'un point de vue clinico-pathologique (Rakha et al., 2009). En effet, les CSTN « *Basal-Like* » présentent généralement des pronostics plus défavorables que les CSTN « *Normal Breast-Like* ». Ils sont également associés à des index mitotiques importants, des grades tumoraux importants ainsi qu'à une forte instabilité génétique (Leidy et al., 2014; Rakha et al., 2008; Toft and Cryns, 2011).

Compte tenu de la nature complexe et hétérogène des CSTN, leur classification moléculaire s'est peu à peu affinée au cours du temps afin de mieux correspondre à leurs différences cliniques. Notamment, en 2011, Lehmann et son équipe ont décrit six sous-types de CSTN basés sur l'analyse de l'expression génique de 21 ensembles de données sur le cancer du sein (Lehmann et al., 2011). La classification de Lehman permet de distinguer ainsi :

- Le sous-type « **Basal-Like 1** » (**BL1**), caractérisé par une activité proliférative, une perte des points de contrôle du cycle cellulaire et une expression élevée des gènes impliqués dans les mécanismes de réparation de l'ADN (Lehmann et al., 2011).
- Le sous-type « **Basal-Like 2** » (**BL2**), montrant un phénotype baso-myoépithélial avec une forte activité de la voie de signalisation médiée par l'EGF ou de la voie Wnt/ β -caténine. Ce groupe présente également un important métabolisme glucidique avec une activité de glycolyse et de gluconéogenèse élevée (Chen et al., 2012; Lehmann et al., 2011).
- Le sous-type « **Immunomodulatory** » (**IM**) marqué par des ontologies géniques liées aux processus de transduction du signal immunitaire (Lehmann et al., 2011).
- Le sous-type « **Mesenchymal** » (**M**) présentant une forte expression des gènes responsables de la motilité cellulaire, de la transition épithélio-mésenchymateuse et des processus de différenciation cellulaire, notamment les voies de signalisation Wnt et *Anaplastic Lymphoma Kinase* (ALK) (Chen et al., 2012; Lehmann et al., 2011).
- Le sous-type « **Mesenchymal Stem-Like** » (**MSL**) partageant de nombreuses similitudes avec le sous-type M concernant les processus de motilité et de différenciation cellulaire. Ce groupe se distingue néanmoins par une forte activité des voies de signalisation retrouvées chez les cellules souches (incluant la voie *Platelet Derived Growth Factor*) et par un faible taux de prolifération et d'expression des protéines de la famille des Claudines (constituants les jonctions serrées intercellulaires). Par ailleurs, ce sous type se rapproche particulièrement du phénotype *Claudin-Low* (Chen et al., 2012; Lehmann et al., 2011).
- Le sous-type « **Luminal Androgen Receptor** » (**LAR**) exprimant des niveaux élevés de récepteurs hormonaux aux androgènes et présentant une différenciation de type apocrine. De plus, les tumeurs LAR présentent des niveaux élevés d'expression des kératines dites luminales et une absence d'expression des kératines de type basal, qui sont principalement exprimées dans les sous-types BL1, BL2 et M (Borri and Granaglia, 2020; Lehmann et al., 2011).

TNBCtype-4

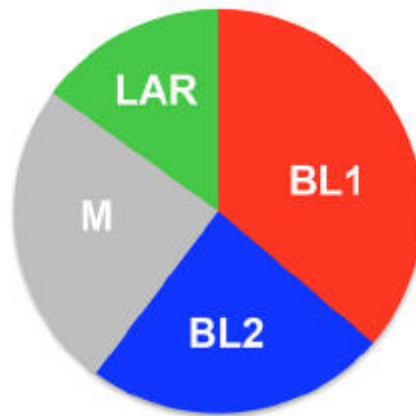


Figure 12 : Distribution de 767 échantillons de Cancer du Sein Triple Négatif selon les quatre sous types moléculaires définis par Lehmann et al. selon la méthode TNBCtype-4 .

BL1 : *Basal-Like 1*, BL2 : *Basal-Like 2*, M : *Mesenchymal* & LAR : *Luminal Androgen Receptor*.

Source: Lehmann, B.D.; Jovanović, B.; Chen, X.; Estrada, M.V.; Johnson, K.N.; Shyr, Y.; Moses, H.L.; Sanders, M.E.; Pietenpol, J.A. Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. PLoS ONE 2016, 11, e0157368, doi:10.1371/journal.pone.0157368.

Plus récemment, Lehmann et al. ont rétrospectivement restreint cette classification en quatre sous types moléculaires (BL1, BL2, M et LAR) (Lehmann et al., 2016). En effet, les premières études menées sur les profils d'expression géniques reposaient sur des compositions variables de cellules tumorales, mais également de cellules saines environnantes constituant le micro-environnement tumoral (notamment des cellules stromales et immunitaires) (Lehmann et al., 2016). Ainsi de nombreuses tumeurs classifiées comme IM présentaient un fort taux d'infiltrats lymphocytaires tout en présentant des profils d'expression proches des autres sous types de CSTN (notamment BL1, BL2, MSL et LAR). D'autre part, les échantillons identifiés comme MSL présentaient fréquemment une forte proportion de tissus mésenchymateux associés à la masse tumorale (Lehmann et al., 2016). De ce fait, les appellations IM et MSL ne font plus références aujourd'hui à des groupes de tumeurs présentant des profils génomiques distincts, mais à des caractéristiques décrivant le niveau d'infiltration des masses tumorales par des cellules saines environnantes (Lehmann et al., 2016).

Parmi, les quatre sous-types moléculaires de CSTN le groupe BL1 est le plus fréquemment rencontré représentant environ 35% des cas (Figure 12). Le sous-type BL2 représente 22% des cas. La proportion de ces deux premiers groupes concorde avec le fait qu'une grande partie des CSTN présente un profil « *Basal-like* ». Les sous-types M et LAR représentent respectivement 25% et 16% des cas. Enfin, malgré les efforts réalisés pour classer et caractériser au mieux ce groupe hétérogène de pathologies, 2% des CSTN ne peuvent être associés à aucun des sous-types préalablement décrits et restent non classés (Lehmann et al., 2016).

II. 1. a) Caractéristiques cliniques

Le CSTN représente 15 à 20% de l'ensemble des cancers du sein (Morris et al., 2007). Il est généralement décrit comme un sous-type particulièrement agressif et associé à un pronostic défavorable. En effet, selon l'*American Cancer Society*, le taux de survie globale à cinq ans n'est que de 77% pour les CSTN, alors qu'il est de 93% pour les autres sous-types de cancers du sein (Borri and Granaglia, 2020). Ceci est en partie expliqué par sa grande hétérogénéité en termes de caractéristiques cliniques et biologiques ainsi que de réponse au traitement (Kumar and Aggarwal, 2016; Pogoda et al., 2013). Cette grande hétérogénéité et plasticité tumorale du CSTN en font un modèle d'étude d'intérêt dans le domaine de la Recherche sur le cancer du sein. Dans ce cadre, notre groupe de recherche s'intéresse particulièrement à ce sous-type pour l'étude de la résistance tumorale aux traitements avec pour objectif d'optimiser le traitement de cette pathologie.

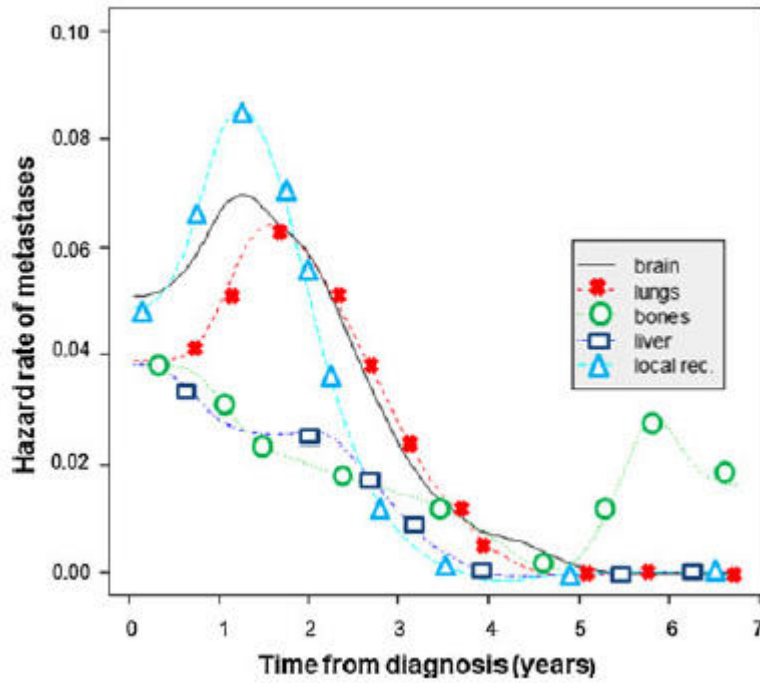


Figure 13 : Risque de récidives du Cancer du Sein Triple Négatif au cours du temps (en années après le diagnostic) en fonction des différents sites métastatiques (récidives locaux régionales ou à partir de métastases cérébrales, pulmonaires, osseuses ou hépatiques).

Source : Pogoda, K.; Nawińska, A.; Murawska, M.; Pieńkowski, T. Analysis of Pattern, Time and Risk Factors Influencing Recurrence in Triple-Negative Breast Cancer Patients. Med Oncol 2013, 30, 388, doi:10.1007/s12032-012-0388-4.

L'agressivité des CSTN se caractérise principalement par leur prévalence à développer des métastases. En effet, il est estimé que près de 94,1% des patientes atteintes de CSTN présentent une dissémination métastatique au moment du diagnostic (Tseng et al., 2013). L'apparition de métastases dépend principalement des instabilités génomiques présentes dans la tumeur primaire et la capacité de cette dernière à échapper au système immunitaire (Borri and Granaglia, 2020). Le site le plus commun d'apparition des métastases est le cerveau et les poumons représentant à eux deux plus de la moitié des cas de métastases (Tseng et al., 2013). Des métastases osseuses, hépatiques et pleurales sont également couramment observées. De plus, plusieurs métastases peuvent apparaître simultanément sur différents sites au moment de la dissémination initiale, compliquant d'autant le pronostic de la pathologie (Pogoda et al., 2013).

D'autre part, les CSTN sont marqués par un important taux de récurrences. En effet, des études ont montré que les patients atteints de CSTN présentent un taux de récurrences compris entre 6,7% et 10,5%, alors que ce taux est compris entre 2,1% et 6,4% pour les patients atteints de cancer du sein, quel que soit le sous-type tumoral (Noh et al., 2011). De plus, les patients atteints de CSTN présentent des délais de récurrence plus courts, allant de 19 à 40 mois contre 35 à 67 mois chez les patients atteints d'autres sous-types de cancer du sein (Malorni et al., 2012). Plus particulièrement, même si elles apparaissent généralement de manière précoce, le délai des récurrences de CSTN est très hétérogène. En effet, le risque de récurrences s'étale dans les sept premières années suivant le diagnostic et présentent des disparités de site d'apparition (Figure 13) (Pogoda et al., 2013). Le risque de récurrences dites « précoces » est élevé un à trois ans suivant le diagnostic avec des résurgences locorégionales ou aux niveaux pulmonaire ou cérébral (Pogoda et al., 2013). Ce risque diminue ensuite significativement les années suivantes avant de remonter légèrement lors de la cinquième année avec cette fois-ci un risque plus accru de récurrences osseuses (Pogoda et al., 2013).

L'âge au moment du diagnostic est également un facteur pronostic du CSTN (Liedtke et al., 2013). Notamment, cette pathologie touche d'avantage les femmes âgées de moins de 40 ans et s'avère d'autant plus agressive pour cette population, pour lesquelles il est fréquemment diagnostiqué des tumeurs de grade 3 (Badve et al., 2011). Dans la littérature, ce jeune âge au moment du diagnostic est classiquement associé à la forte influence génétique dans l'apparition des CSTN (Kumar and Aggarwal, 2016). En effet, il est estimé que près de 35,7% des CSTN apparaissent dans un contexte d'antécédents familiaux et associés à des mutations délétères héréditaires sur des gènes de prédispositions (Couch et al., 2015). Dans ce cadre, les mutations les plus fréquemment retrouvées sont celles portées sur les gènes

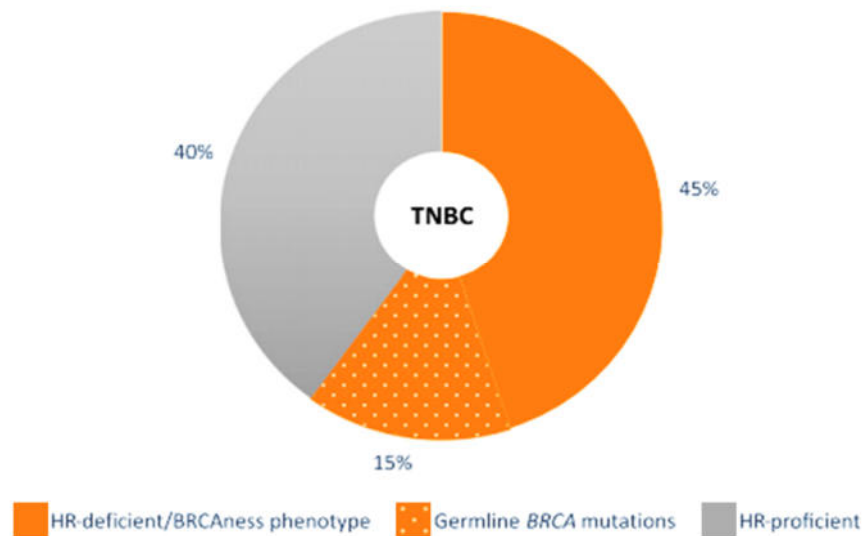
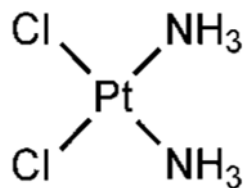


Figure 14 : Proportion de déficience du système de réparation de l'ADN *Homologous Recombination* (HR) dans les tumeurs mammaires triple négatives (TNBC pour *Triple Negative Breast Cancer*).

Environ 60% des Cancer du TNBC présentent une déficience du système HR le rendant non fonctionnel. Parmi ces tumeurs déficientes, certaines portent des mutations constitutionnelles sur les gènes BRCA1/2 rendant la protéine BRCA non fonctionnelle (15% des cas de TNBC). D'autres tumeurs présentant un système HR déficient portent une mutation sur d'autres gènes impliqués dans le système HR entraînant de la même manière une déficience de ce système (45% des TNBC). Les cas de TNBC restants (40%) possèdent un système HR efficient (source: Sharma, P. *Biology and Management of Patients with Triple-Negative Breast Cancer*. *Oncologist* 2016, 21, 1050–1062, doi:10.1634/theoncologist.2016-0067).



Cisplatine

Figure 15 : Structures chimiques du cisplatine.

Structure chimique issue du site internet <https://dictionnaire.acadpharm.org>.

Breast Cancer 1 ou *Breast Cancer 2* (mutations BRCA1/2). La protéine BRCA a un rôle suppresseur de tumeur de « caretaker » (gardien du génome) en étant impliqué dans le système de réparation de l'ADN *Homologous Recombination* (HR) (Okuma and Yonemori, 2017). Les mutations délétères BRCA1/2 rendent cette protéine non fonctionnelle, entraînant de lourdes conséquences sur les systèmes de réparation de l'ADN. Notamment, les personnes porteuses de ces mutations présentent des défaillances du système *Homologous Recombination* (HR) de réparation des cassures double-brin de l'ADN (Hahnen et al., 2017). Ceci favorise la dérive génétique et donc la survenue de cancer. On estime que 15 à 20% des patientes atteintes de TNBC portent une mutation BRCA 1/2 (Lips et al., 2013). Cependant d'autres mutations délétères constitutionnelles ou acquises peuvent affecter le système HR donnant à la tumeur un phénotype dit « BCRAness » (Figure 14) (Lips et al., 2013; Sharma, 2016). C'est par exemple le cas de mutations portées sur les gènes *ATM*, *BRIP1* ou *CHEK2* (Hahnen et al., 2017).

L'ensemble de ces caractéristiques cliniques font du CSTN un groupe de pathologies extrêmement hétérogène, malgré le fait qu'elles présentent toutes de manière générale, un profil particulièrement agressif associé à un mauvais pronostic. De ce fait, la disparité des CSTN a rendu leur traitement difficile ne pouvant pas s'appuyer sur des méthodes standardisées, mais nécessitant une fine caractérisation de la maladie pour adapter au mieux la stratégie thérapeutique.

II. 2. Prise en charge thérapeutique du Cancer du Sein Triple Négatif

II. 2. a) Traitement de la maladie précoce

Au moment du diagnostic, les CSTN présentent fréquemment un profil agressif. De ce fait, la chirurgie n'est pas appliquée en première intention afin de limiter la propagation de la maladie (Medina et al., 2020). Le corps médical se tourne alors vers des traitements systémiques permettant de freiner la progression tumorale et détruire la masse tumorale. Dans ce cadre, la chimiothérapie néoadjuvante a été longtemps et reste encore la stratégie thérapeutique la plus utilisée pour le traitement des CSTN précoces. Ces traitements destinés aux tumeurs localement avancées et inopérables ont pour but d'optimiser la réponse pathologique complète chez la patiente. De nombreuses classes de chimiothérapies ont démontré leur intérêt pour améliorer significativement la survie sans progression (Liedtke et al., 2008). Il s'agit principalement des anthracyclines ou des taxanes montrant des taux de réponses pathologiques complètes compris respectivement entre 14% et 47% et entre 17% et 39% (Bergin and Loi, 2019). Ces stratégies ont par ailleurs été améliorées en adoptant des combinaisons d'agents systémiques, notamment des agents alkylants tels que les sels de

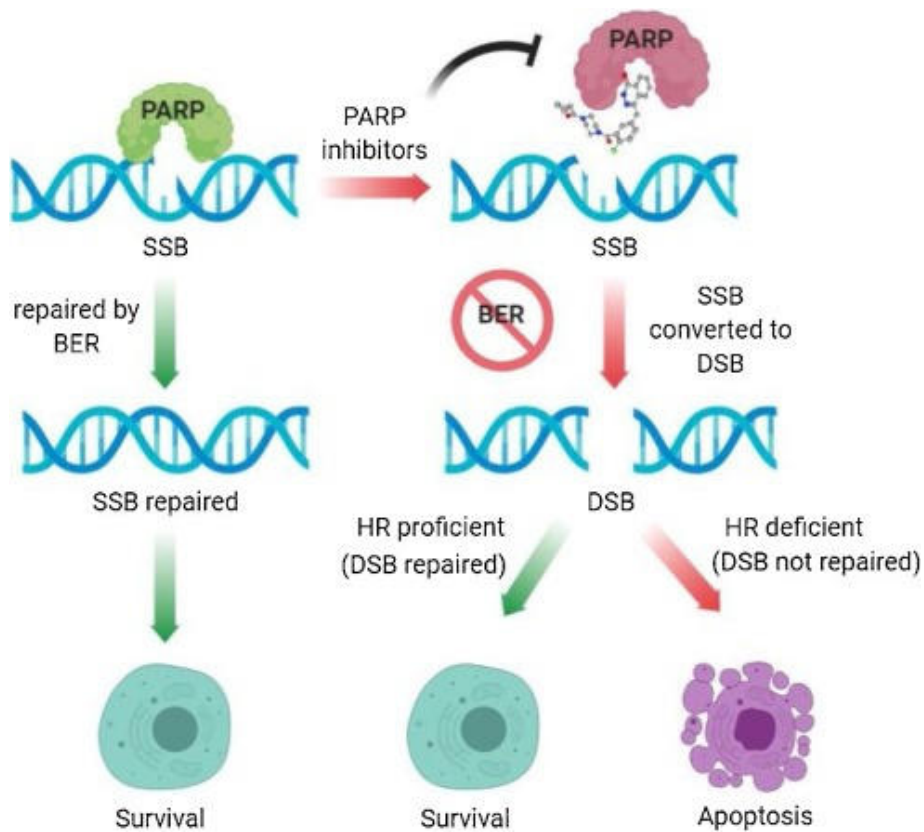


Figure 16 : Schéma explicatif de la létalité synthétique.

En conditions normales les cassures simple brin de l'ADN (SSB pour *Single Strand Breaks*) sont réparées par le système *Base Excision Repair* (BER) par l'intermédiaire de l'enzyme Poly-ADP ribose Polymérase (PARP). En cas d'inhibition de cette enzyme par des inhibiteurs de PARP, ces cassures ne sont pas réparées et occasionnent rapidement l'apparition de cassures double brin de l'ADN (DSB pour *Double Strand Breaks*). Chez les patients porteurs de mutations délétères rendant le système de réparation *Homologous Recombination* (HR) défaillant, ces cassures ne seront pas réparées entraînant ainsi la mort cellulaire par apoptose. En revanche, chez les cellules saines, présentant un système HR efficace, les cassures double brin seront réparées permettant la survie cellulaire (source : Zheng, F.; Zhang, Y.; Chen, S.; Weng, X.; Rao, Y.; Fang, H. Mechanism and Current Progress of Poly ADP-Ribose Polymerase (PARP) Inhibitors in the Treatment of Ovarian Cancer. *Biomed Pharmacother* 2020, 123, 109661, doi:10.1016/j.biopha.2019.109661).

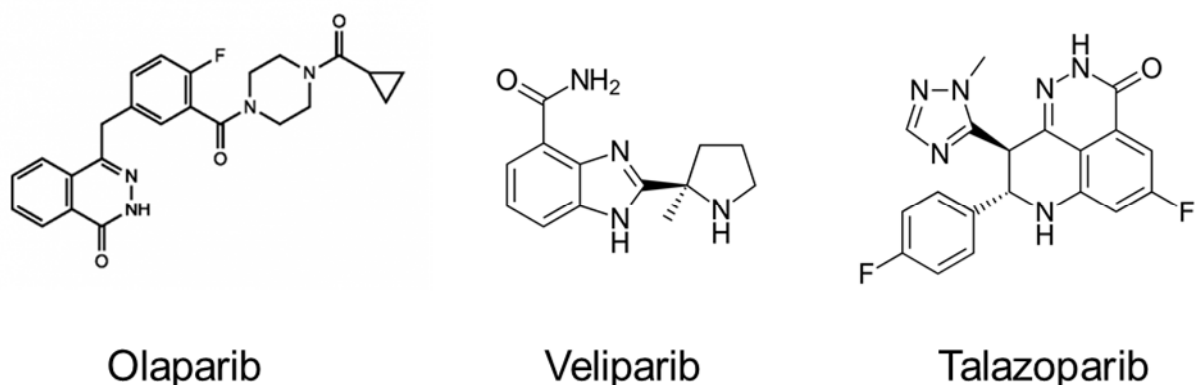


Figure 17 : Structures chimiques de l'Olaparib, du Veliparib et du Talazoparib, trois inhibiteurs de PARP.

Source : structures chimiques issues du site internet <https://dictionnaire.acadpharm.org>.

platine permettant d'atteindre des taux de réponses pathologiques complètes comprises entre 22% et 56% (Bergin and Loi, 2019). Les sels de platines se fixent de manière covalente aux brins d'ADN à l'aide de groupes alkyls, empêchant ainsi la réplication de l'ADN et entraînant la mort cellulaire. Le chef de file de cette classe médicamenteuse est le Cisplatine (Figure 15), classiquement utilisé en monothérapie ou en combinaison pour tumeurs montrant des défauts de réparation de l'ADN liés au système HR. Notamment, de nombreuses études ont démontré la potentialisation de son effet sur des patientes porteuses de mutations BRCA1/2 (Byrski et al., 2009; Caramelo et al., 2019; Poggio et al., 2018).

D'autres approches plus récentes se sont avérées particulièrement efficaces pour cibler les tumeurs porteuses de mutations BRCA1/2. Il s'agit des inhibiteurs de Poly-ADP Ribose (anti-PARP ou PARPi). En effet, l'enzyme PARP est impliquée dans le système de réparation des cassures simple brin de l'ADN *Base Excision Repair* (BER). Ce système permet notamment de maintenir l'intégrité du génome. Depuis 2005, l'inhibition de cette enzyme est étudiée comme cible thérapeutique conformément au principe de la létalité synthétique (Bryant et al., 2005; Farmer et al., 2005). Ce dernier repose sur les réparations récurrentes des cassures simple brin nécessaires à la survie de la cellule par les systèmes de réparation de l'ADN, et notamment par le système BER (Figure 16). Les anti-PARP permettent de bloquer l'activité de ce système de réparation, entraînant de ce fait l'accumulation de cassures simple brin qui seront converties naturellement en cassures double brins, létales pour la cellule. Ces cassures sont naturellement détectées et réparées par le système HR permettant la survie cellulaire. Or, dans le cas de tumeurs portant des mutations affectant le système HR (tumeurs de profils « BRCAness »), ce système s'avérera inefficace pour réparer ces lésions, ce qui conduira ainsi à la mort cellulaire par apoptose. Ce principe permet donc de cibler de manière spécifique les cellules tumorales porteuses de mutations délétères tout en épargnant les cellules ayant une activité préservée de la protéine BRCA (Figure 16). Différents anti-PARP ont été développés, tels que l'Olaparib, le Veliparib ou le Talazoparib (Figure 17). Ces derniers se sont montrés efficaces pour le traitement néoadjuvant des CSTN. Notamment, une amélioration de la réponse pathologique complète a été démontrée après l'utilisation du Veliparib en association avec des sels de platine ou du Talazoparib seul, chez les patients porteurs de mutations germinales BRCA1/2 (Litton et al., 2018a; Loibl et al., 2018).

Enfin, d'autres thérapies ciblées sont en cours d'investigation pour le traitement des CSTN au stade précoce. A titre d'exemple, l'anticorps monoclonal Bevacizumab, ciblant la néo-angiogenèse, s'avèrent être prometteur pour améliorer le taux réponse pathologique complète en combinaison avec des anthracyclines ou des taxanes (Nabholtz et al., 2014).

Néanmoins, malgré les améliorations apportées par ces différentes stratégies, un taux important de dissémination métastatique, de rechutes ou de récurrences demeure présent, même après l'atteinte d'une réponse pathologique complète.

II. 2. b) Traitement la maladie avancée et métastatique

Le but des traitements des CSTN métastatiques est de prolonger la survie de la patiente en retardant la progression de la maladie tout en diminuant les symptômes induits par la maladie ou les traitements et en améliorant la qualité de vie. Dans ce cadre, les agents chimiothérapeutiques sont là encore beaucoup utilisés, souvent de manière combinée tels que les taxanes, les anthracyclines ou le cyclophosphamide (Al-Mahmood et al., 2018). Les sels de platine sont également couramment utilisés avec une meilleure efficacité sur les tumeurs métastatique de type *Basal-Like*, et plus précisément pour celles de sous-type BL1 en comparaison des autres sous types moléculaires (Jovanović et al., 2017). Néanmoins, les stratégies thérapeutiques pour le traitement de la maladie métastatique se tournent de plus en plus vers des thérapies ciblées présentant de manière générale une meilleure tolérance (Yin et al., 2020).

Notamment, les anti-PARP ont montré une meilleure efficacité que les schémas de chimiothérapies pour les CSTN métastatiques porteurs de mutations BRCA1/2. En effet, l'essai clinique OlympiAD a démontré une amélioration significative de la survie sans progression à la suite d'un traitement avec l'Olaparib (Robson et al., 2017). Cet anti-PARP est aujourd'hui indiqué en monothérapie pour le traitement des CSTN localement avancés ou métastatiques, présentant une mutation germinale BRCA1/2, à la suite d'un échec d'un traitement néoadjuvant avec une anthracycline ou un taxane. D'autre part, l'essai EMBRACA a montré une amélioration significative de la survie sans progression après un traitement en monothérapie avec du Talazoparib de 8,6 mois, comparé à 5,6 mois pour des protocoles standards de chimiothérapies (Litton et al., 2018b). De plus, ce traitement a montré un bénéfice non négligeable sur la qualité de vie.

Par ailleurs, d'autres thérapies ciblées sont approuvées ou en cours d'investigation après l'observation de résultats prometteurs pour l'amélioration du traitement du CSTN métastatique. De nombreux développements se font aujourd'hui sur l'immunothérapie, avec l'émergence d'anticorps monoclonaux anti-*Programmed cell Death 1* (PD1), anti-*Programmed cell Death-Ligand 1* (PD-L1) ou anti-*Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4* (CTLA4), montrant une efficacité sur les tumeurs avec un important infiltrat lymphocytaire (Sugie, 2018).

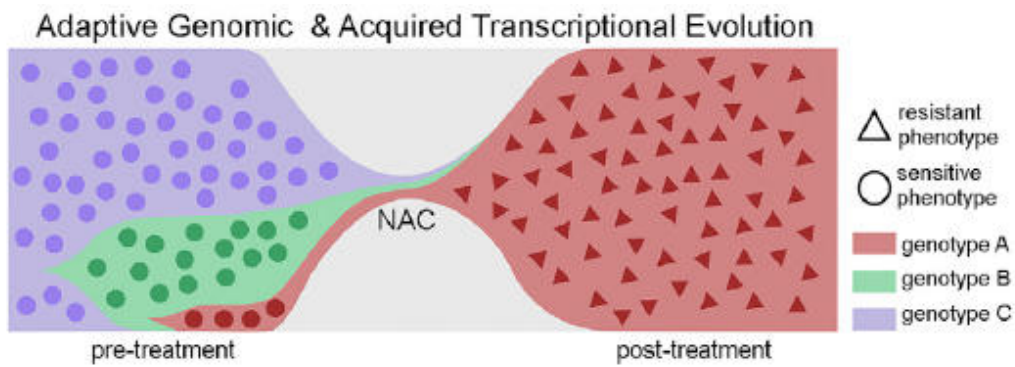


Figure 18 : Schéma explicatif de la sélection clonale au cours de traitements néoadjuvants de chimiothérapie du Cancer du Sein Triple Négatif.

Au cours du développement tumoral avant traitement, l'émergence de différents clones cellulaires intratumoraux présentant différents génotypes est responsable de l'hétérogénéité cellulaire au sein de la masse tumorale. La mise en place d'un traitement néoadjuvant par chimiothérapie (NAC) permet de réduire drastiquement la masse tumorale et l'obtention d'une réponse pathologique complète. Cependant, elle entraîne aussi l'acquisition d'un phénotype résistant à l'un des clones présents dans la tumeur entraînant dans ce cas une rechute de la pathologie en post-traitement (Source : Kim, C.; Gao, R.; Sei, E.; Brandt, R.; Hartman, J.; Hatschek, T.; Crosetto, N.; Foukakis, T.; Navin, N.E. Chemoresistance Evolution in Triple-Negative Breast Cancer Delineated by Single-Cell Sequencing. Cell 2018, 173, 879-893.e13, doi:10.1016/j.cell.2018.03.041).

Cependant, malgré les importants efforts menés pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques, le développement de nouvelles thérapies ciblées reste difficile. Aujourd'hui, seulement quatre molécules de thérapies ciblées ont l'approbation par la *Food and Drug Administration* pour le traitement du CSTN : deux anti-PARP (Olaparib et Talazoparib), un anticorps anti-PD-L1 (Atezolizumab) et un conjugué anticorps-médicament (Sacituzumab-Govitecan). Ceci s'explique en partie par la grande plasticité caractéristique des CSTN leur permettant de rapidement contourner les différentes stratégies de traitement.

II. 2. c) Maladie résiduelle et résistance au traitement

La réponse des CSTN aux différents traitements se distingue principalement des autres types tumoraux par la difficulté à traiter de manière définitive cette pathologie. Ceci est d'autant plus marqué par le phénomène appelé « paradoxe Triple Négatif » (Carey et al., 2007). Selon ce paradoxe, les tumeurs triple négatives présentent d'abord une importante sensibilité vis à vis des traitements, permettant l'arrêt relativement rapide de la progression tumorale et l'obtention d'une réponse pathologique complète. Cependant, malgré cet important taux de réponse aux traitements dans les premiers mois ou années suivant le diagnostic est fréquemment suivi par des difficultés à détruire complètement la masse tumorale. Ceci est notamment associé à la forte incidence de rechutes et de maladie résiduelle caractéristique des CSTN (Carey et al., 2007). Ceci est principalement expliqué par l'hétérogénéité cellulaire au sein de la tumeur et à l'évolution multiclonale de la maladie (Kim et al., 2018). En effet, au cours de la progression tumorale, l'émergence de nouveaux clones et de variations génétiques est à l'origine d'une grande hétérogénéité cellulaire intra-tumorale. La mise en place d'un traitement néoadjuvant conduit souvent à la sélection de clones cellulaires résistants, représentant une faible proportion du nombre total de cellules cancéreuses, mais constituant la maladie résiduelle (Figure 18) (Kim et al., 2018; O'Connor et al., 2018). Cette sélection mène à l'enrichissement de la tumeur en cellules souches cancéreuses particulièrement résistantes aux traitements (Kim et al., 2018; O'Connor et al., 2018).

Le concept des cellules souches cancéreuses proposé depuis une quarantaine d'années, établit que la croissance tumorale provient principalement d'un petit nombre de cellules montrant des propriétés d'autorenouvellement ainsi que la capacité à rétablir une population hétérogène de cellules tumorales (Batlle and Clevers, 2017; Oskarsson et al., 2014). Ces cellules regroupées dans des niches, présentent une résistance particulière aux différents traitements (Batlle and Clevers, 2017). En effet, malgré leur faible taux de prolifération, elles présentent de grandes capacités d'adaptation et de plasticité en réponse à différents stimuli biologiques, chimiques ou physiques. Notamment, ces cellules montrent des

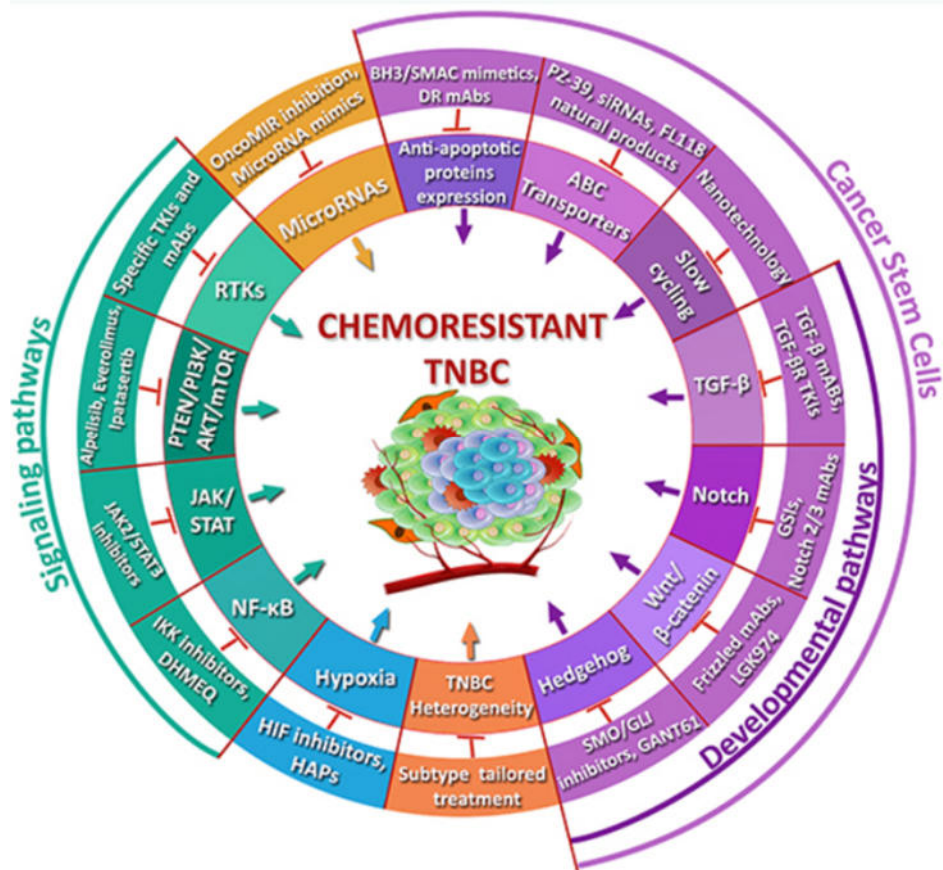


Figure 19 : Représentation schématiques de l'ensemble des mécanismes moléculaires identifiés et impliqués dans la chimiorésistance des Cancer du Sein Triple Négatifs.

Source : Nedeljković, M.; Damjanović, A. Mechanisms of Chemotherapy Resistance in Triple-Negative Breast Cancer-How We Can Rise to the Challenge. *Cells* 2019, 8, doi:10.3390/cells8090957.

capacités à réaliser la transition épithélio-mésenchymateuse, les amenant vers un phénotype relativement indifférencié (Batlle and Clevers, 2017). De nombreuses voies de signalisation associées aux cellules souches adultes ont été retrouvées chez les cellules souches cancéreuses telles que les voies Notch, Wnt/ β -Caténine et Hedgehog (Maugeri-Saccà et al., 2011; Nedeljković and Damjanović, 2019). Ces modifications phénotypiques leur confèrent notamment des capacités à envahir leur microenvironnement et une augmentation de l'activité de réparation de l'ADN (Shibue and Weinberg, 2017). De plus, les cellules souches cancéreuses montrent une forte tendance à entrer en stade de quiescence ou de dormance cellulaire, potentialisant d'autant plus la résistance au traitement et constituant la maladie résiduelle dans des niches spécifiques. Ceci explique notamment la survenue de récurrences précoces ou tardives de la maladie.

De nombreux mécanismes moléculaires ont été identifiés pour être impliqués dans la résistance tumorale aux traitements des CSTN (Figure 19) (Nedeljković and Damjanović, 2019). Ces mécanismes comprennent les caractéristiques de cellules souches cancéreuses, mais également des caractéristiques du microenvironnement tumoral telles que l'hypoxie. Dans ce contexte, notre groupe de recherche s'intéresse particulièrement à l'implication des mécanismes d'efflux membranaire médiés par les transporteurs « *Multidrug Resistance* » (MDR) de la superfamille des protéines de type *ATP Binding Cassette* (ABC), dans la chimiorésistance des CSTN.

L'ensemble de ces caractéristiques de résistance tumorale explique en partie l'installation récurrente de maladies résiduelles et l'absence de curabilité de certains CSTN (Nedeljković and Damjanović, 2019). Ces problématiques soulignent notamment la nécessité de trouver de nouvelles stratégies médicamenteuses ciblant les cellules souches cancéreuses ou la maladie résiduelle afin de réduire les risques de rechutes ou de récurrences tumorales (Bai et al., 2018; O'Connor et al., 2018; Park et al., 2019). C'est pourquoi, l'étude des mécanismes de résistance aux traitements des CSTN reste un enjeu important pour améliorer la prise en charge des patientes atteintes de cette pathologie (Bai et al., 2018, 2021).

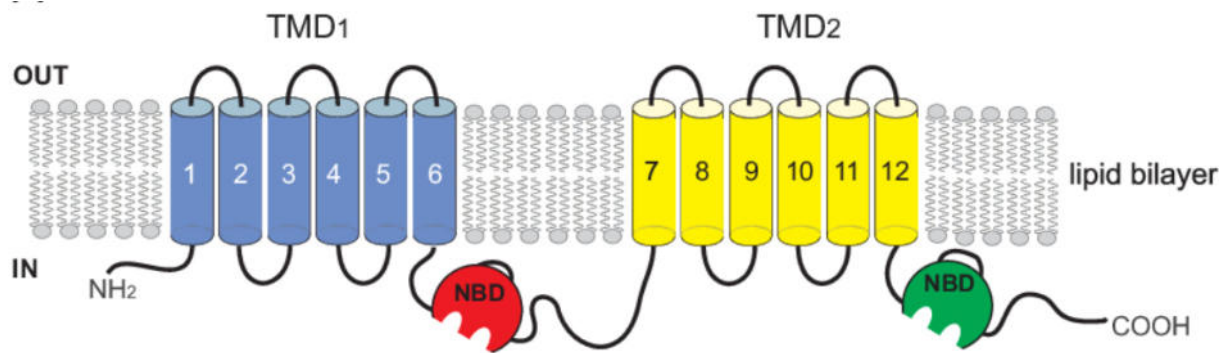


Figure 20 : Schéma classique de la structure complète d'un transporteur de la superfamille ABC (*ATP Binding Cassette*) contenant deux domaines transmembranaires

Classiquement, un transporteur ABC comporte deux domaines TMD (*TransMembran Domains* représentés en bleu pour le TMD1 et en jaune pour le TMD2). Chacun de ces TMD est constitué de six hélices transmembranaires. Les deux TMD fonctionnent en dimères et peuvent être identiques (homodimère) ou différents (hétérodimères). Le transporteur compte également deux domaines intracellulaires NBD (*Nucleotid Binding Domains*, représentés en rouge et en vert) permettant la fixation et l'hydrolyse de l'ATP (source : Van Leeuwen, D. UVA-DARE ABC transporters in Arthropods : genomic comparison and role in insecticide transport and resistance. 2017, Corpus ID: 38901121).

Partie 2 : Les protéines « Multidrug Resistance » et la résistance tumorale aux traitements

I. 1. Les protéines « Multidrug Resistance »

I. 1. a) Les transporteurs de type ATP Binding Cassette (ABC)

Les protéines de la superfamille des transporteurs de type ABC sont retrouvées dans quasiment tous les organismes vivants (Ford and Beis, 2019). Elles utilisent l'énergie libérée par hydrolyse de l'ATP (Adénosine Triphosphate) pour transporter différents types de molécules à travers la membrane cellulaire (Theodoulou and Kerr, 2015). L'ensemble de ces transporteurs présente une structure commune comportant généralement un à trois domaines transmembranaires (*TransMembrane Domains* ou TMD) contenant des sites de liaison pour les substrats (Figure 20). Ces domaines sont attachés à des domaines de liaison nucléotidique (*Nucleotid Binding Domains*, NBD) permettant la fixation et l'hydrolyse de l'ATP (Beis, 2015). La séquence d'acides aminés et la topologie des TMD ne sont pas conservées entre les différents types de transporteurs ABC (Theodoulou and Kerr, 2015). En effet, les transporteurs de type ABC peuvent présenter un à trois domaines TMD formés chacun de six hélices transmembranaires. De plus, ces domaines peuvent fonctionner en homo ou hétérodimères ou être liés entre eux au sein d'une même chaîne polypeptidique. Les domaines NBD présentent quant à eux, divers motifs communs hautement conservés au cours de l'évolution.

Les transporteurs ABC peuvent être divisés en deux groupes (Theodoulou and Kerr, 2015). Le premier groupe rassemble les « **transporteurs importateurs** », désigne des protéines retrouvées de manière prédominante chez les organismes procaryotes assurant l'absorption de nutriments essentiels. Elles permettent le passage de molécules du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire. Le second groupe est celui des « **transporteurs exportateurs** » retrouvés de façon très ubiquitaire, à la fois chez les organismes procaryotes et eucaryotes. Ces transporteurs permettent l'expulsion de déchets métaboliques ou de xénobiotiques à l'extérieur de la cellule (Theodoulou and Kerr, 2015).

Chez les eucaryotes, huit sous-familles de transporteurs ABC ont été identifiées : les sous-familles ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCE, ABCF, ABCG et ABCH (Dean and Annilo, 2005; Theodoulou and Kerr, 2015). Parmi elles, les sous-familles ABCE et ABCF sont constituées uniquement de protéines sans rôle d'efflux transmembranaire, ne possédant que les deux domaines NBD et aucun domaine TMD. Cependant, les membres de cette sous-

famille sont tout de même classés dans les transporteurs de type ABC car les gènes codant leurs domaines NBD correspondent phylogénétiquement aux autres membres de cette superfamille. D'autre part, la sous-famille ABCH n'est pas retrouvée chez les mammifères (Ford and Beis, 2019). Les cinq autres sous-familles de transporteurs ABC présentent un rôle d'efflux de molécules, notamment pour l'export extracellulaire de lipides tels que le cholestérol, de peptides, d'ions ou de xénobiotiques (Dean and Annilo, 2005; Ford and Beis, 2019). Chez l'Homme, 48 gènes différents codant des transporteurs ABC ont été identifiés, représentant ainsi le plus grand groupe de protéines transmembranaires. Durant les dernières décennies, un grand nombre de ces transporteurs a été associé dans diverses pathologies humaines telles que le diabète, la maladie d'Alzheimer et certaines formes d'arthrites (Dean and Annilo, 2005). Cependant, l'étude de ces transporteurs en Santé Humaine a suscité un véritable engouement pour l'étude de la résistance tumorale aux traitements (Theodoulou and Kerr, 2015). En effet, certains transporteurs ABC représentent la première ligne de défense à l'échelle cellulaire avec un rôle de détoxification.

1. 1. b) Les protéines « Multidrug Resistance » et la résistance aux xénobiotiques

Les protéines « Multidrug Resistance » (MDR) sont des transporteurs membranaires appartenant à la super famille des ABC transporteurs. Ces protéines sont très ubiquitaires et ont été extrêmement conservées au cours de l'évolution. Ainsi, elles sont exprimées à l'état naturel dans pratiquement tous les organismes vivants, allant des procaryotes aux grands mammifères. Il s'agit de pompes d'efflux localisées dans la membrane des cellules jouant un rôle détoxificateur. En effet, ces pompes reconnaissent, fixent et expulsent une multitude de xénobiotiques du milieu intracellulaire vers l'extérieur des cellules. Le panel de substrats pris en charge par ces protéines est extrêmement large et varié, incluant de nombreux polluants et de médicaments de structures et de propriété très variées. De par cette propriété d'efflux de xénobiotiques, les protéines MDR représentent une barrière de résistance et/ou de défense à l'échelle cellulaire (Sarkadi et al., 2006).

Chez l'Homme, et plus généralement chez les mammifères, plusieurs tissus expriment physiologiquement et de manière importante des protéines MDR, comme la barrière hématoencéphalique, le pancréas, le foie, les reins, et les cellules souches. La présence de plusieurs protéines MDR a également été démontrée chez de nombreux autres organismes, eucaryotes ou procaryotes. Par exemple, l'expression de ces protéines a été répertoriée chez des bactéries (Bottova et al., 2009; Gerlach et al., 1986; Krogstad et al., 1992), chez des protozoaires (Bamdad et al., 1997, 1999; Camares et al., 2004), chez des invertébrés aquatiques (Kurelec, 1992), chez des insectes (notamment la drosophile) (Vache et al., 2007;

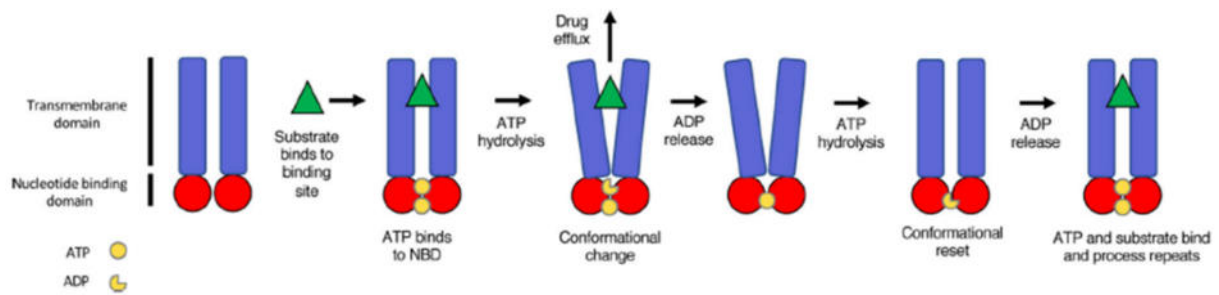


Figure 21 : Schéma du mécanisme d'expulsion d'un substrat par une protéine « *MultiDrug Resistance* ».

Le substrat (représenté en vert) est spécifique reconnu est pris en charge par le domaine transmembranaire du transporteur (représenté en bleu). Les domaines intracellulaires NBD (représentés en rouge) vont alors recruter des molécules d'ATP (représentées en jaunes). L'hydrolyse de ces molécules en ADP va permettre des changements conformationnels de transporteur permettant l'efflux du médicament hors de la cellule. Une seconde hydrolyse de l'ATP permettra au transporteur de retrouver sa conformation initiale afin d'être prêt pour l'expulsion d'autres substrats (Source : Robey, R.W.; Pluchino, K.M.; Hall, M.D.; Fojo, A.T.; Bates, S.E.; Gottesman, M.M. Revisiting the Role of ABC Transporters in Multidrug-Resistant Cancer. *Nat Rev Cancer* 2018, 18, 452–464, doi:10.1038/s41568-018-0005-8).

Vaché et al., 2006) ou encore chez des végétaux (par exemple, *Arabidopsis thaliana*) (Dudler and Sidler, 1998; Geisler et al., 2005). Les protéines MDR, notamment ABCB1, représentent un « biomarqueur de choix » pour étudier l'exposition cellulaire à agents toxiques, et plus particulièrement des polluants. A titre d'exemple, la protéine ABCB1 peut être utilisée pour évaluer le niveau de pollution de l'air et de l'eau. En effet, chez le modèle de la truite des rivières, le taux d'expression de cette protéine, et d'autres membres de transporteurs ABC a été mise en évidence et corrélé avec le niveau de pollution de l'eau (Loncar et al., 2010; Valton et al., 2013, 2015, 2017; Zaja et al., 2007). De la même manière, le niveau d'expression d'ABCB1 a été étudié chez la drosophile pour détecter la pollution de l'air (Vache et al., 2007; Vaché et al., 2006). Cette aptitude à détecter l'exposition des cellules à des xénobiotiques par l'intermédiaire des protéines MDR est également largement utilisée pour étudier la résistance cellulaire à des médicaments cytotoxiques, notamment des anticancéreux.

1.1.c) Implication des protéines « Multidrug Resistance » dans la résistance tumorale aux traitements

En Oncologie, la notion de « *Multidrug Resistance* » (MDR) ou la résistance croisée des cellules tumorales face à la chimiothérapie fait référence à un processus biologique complexe, faisant intervenir différents mécanismes moléculaires (Bugde et al., 2017). En raison de la forte implication de plusieurs transporteurs ABC dans ce processus de détoxification cellulaire, l'appellation de protéines MDR fait classiquement référence à ces protéines transmembranaires (Robey et al., 2018).

L'implication des protéines MDR dans la résistance tumorale a été découverte à la fin des années 1970 (Theodoulou and Kerr, 2015). Notamment, de nombreux cas cliniques présentaient des profils de résistance naturelle ou acquises au cours de traitement par chimiothérapies. De plus, le développement d'une résistance vis-à-vis d'un seul agent chimiothérapeutique était souvent associé à une résistance croisée pour un large panel de molécules (Bugde et al., 2017). L'implication et le mécanisme d'action de ces protéines se sont peu à peu précisés au cours du temps, mettant clairement en évidence leur rôle prépondérant dans la chimiorésistance tumorale.

Les protéines MDR sont capables de reconnaître et de fixer de manière spécifique sur leurs domaines TMD, un panel large de substrats (Figure 21). Après recrutement et hydrolyse de l'ATP sur les domaines NBD, les médicaments anticancéreux seront expulsés hors de la cellule, l'empêchant ainsi de s'accumuler dans le milieu intracellulaire et d'exercer leur action antitumorale. Cet efflux actif dépendant de l'ATP cible différentes classes de substrats, de structure et de propriété très variés, notamment des xénobiotiques hydrophobiques mais

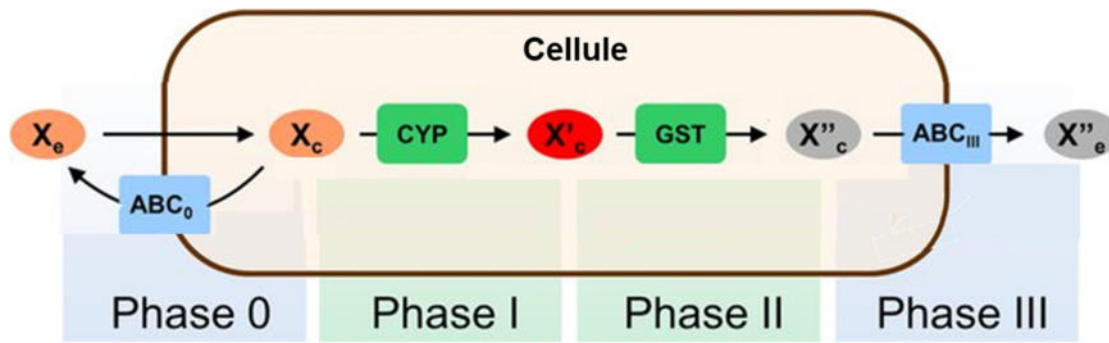


Figure 22 : Schéma simplifié du réseau de chimio-immunité cellulaire.

Le réseau de chimio-immunité cellulaire comprend plusieurs mécanismes permettant l'efflux et le métabolisme de xénobiotiques toxiques de manière coordonnée. Classiquement il est divisé en quatre phases complémentaires. Lors de la Phase 0, le xénobiotique ayant pénétré dans le cytoplasme de la cellule est expulsé par les transporteurs ABC/MDR (ABC_0) dans le milieu extracellulaire (X_e). Lors de la Phase I, le xénobiotique (X_c) est oxydé et dégradé par des cytochromes (CYP) en différents métabolites (X'_c). Lors de la Phase II, les métabolites générés (X'_c) sont conjugués à des composés hydrophiles par des glutathion S-transférases (GST) donnant les conjugués X''_c . Ces derniers seront alors expulsés hors de la cellule par des transporteurs ABC/MDR (ABC_{III}), lors de la Phase III. Source : schéma modifié issu de : Tóth A.; Brózik A.; Szakács G.; Sarkadi B.; Hegedűs T. A Novel Mathematical Model Describing Adaptive Cellular Drug Metabolism and Toxicity in the Chemoimmune System. PLoS ONE 10(2), 2015: e0115533, doi: 10.1371/journal.pone.0115533.

également, des anions et des cations aux propriétés amphipatiques (Ford and Beis, 2019; Sarkadi et al., 2006).

L'ensemble des protéines MDR forme un réseau complexe de défense à l'échelle cellulaire en raison de la multitude de transporteurs impliqués et de substrats pris en charge (Sarkadi et al., 2006). Ceci permet notamment l'acquisition par les cellules tumorales d'une résistance croisée vis à vis de nombreux anticancéreux. En effet, une même protéine MDR peut cibler et expulser plusieurs agents anticancéreux (Bugde et al., 2017; Sarkadi et al., 2006) et le même anticancéreux peut être reconnu et expulsé par plusieurs protéines MDR différentes. Ce chevauchement de spécificités engendre l'instauration d'un véritable réseau de résistance membranaire chez les cellules tumorales, comparable à une immunité cellulaire. On parle d'ailleurs de « chimio-immunité » adaptative afin de décrire la nature des cellules cancéreuses à contourner la cytotoxicité induite des médicaments antitumoraux (Sarkadi et al., 2006). Ce réseau forme une barrière protectrice autour d'un organe qui limite la distribution homogène des médicaments dans l'ensemble de l'organisme, diminuant d'autant plus l'efficacité du traitement (Robey et al., 2018). Ce concept de chimio-immunité est basé sur l'action coordonnée de systèmes de transport spécifiques et du métabolisme cellulaire de xénobiotiques permettant une défense cellulaire contre des composés hydrophobes ou amphipatiques. Il peut être divisé en quatre phases distinctes complémentaires telles que décrites par Sarkadi et al. en 2006 (Sarkadi et al., 2006) (Figure 22) :

- Phase 0 : l'expulsion extracellulaire des xénobiotiques au niveau de la membrane cellulaire par les transporteurs ABC/MDR.
- Phase 1 : le métabolisme de xénobiotiques cytotoxiques par les enzymes intracellulaires appelés cytochromes (CYP) permettant leur oxydation et leur clivage.
- Phase 2 : la conjugaison des produits de métabolisme des xénobiotiques issus de la Phase 1, avec des molécules hydrophiles afin de les rendre plus hydrosolubles. Les xénobiotiques sont souvent conjugués avec le glutathion et seront ainsi plus facilement éliminés par la cellule.
- Phase 3 : l'expulsion extracellulaire des métabolites générés au niveau de la membrane cellulaire par les transporteurs MDR/ABC.

De plus, une réponse de type relai dans la prise en charge des substrats par différentes pompes MDR a été détectée sur des modèles cellulaires, après leur exposition aux anticancéreux, assurant une chimiorésistance continue des cellules tumorales (Dufour et al., 2015). Actuellement, trois sous-familles de protéines MDR d'intérêt clinique, principalement

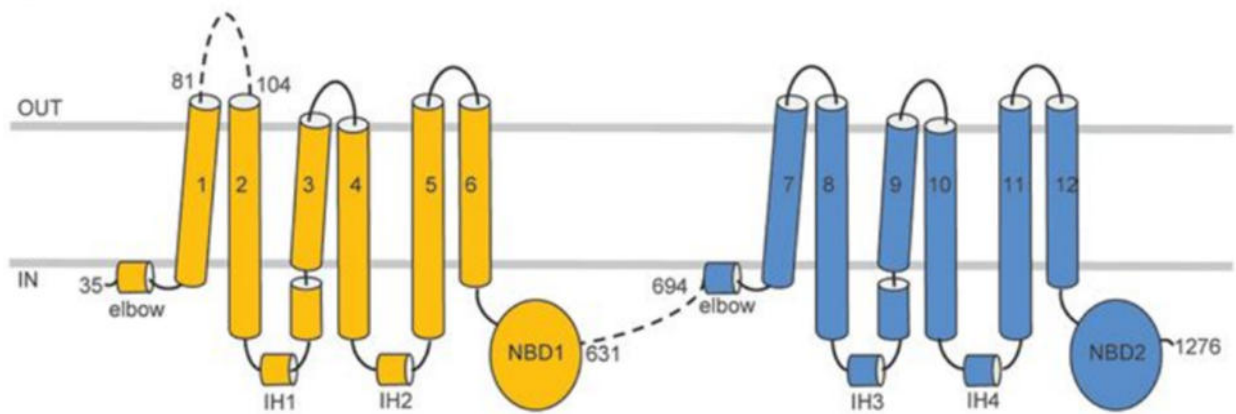


Figure 23 : Schéma représentatif de la structure de la P-glycoprotéine.

La P-gp comporte deux parties chacune comprenant 6 domaines transmembranaires (TMD) et un domaine intracellulaire de fixation de l'ATP (NBD). La partie N-terminale (en jaune) et la partie C-terminale (en bleue) comportent chacune deux hélices intracellulaires (IH = *Intracellular Helice*). Source: Kim, Y.; Chen, J. Molecular Structure of Human P-Glycoprotein in the ATP-Bound, Outward-Facing Conformation. Science 2018, 359, 915–919, doi:10.1126/science.aar7389.

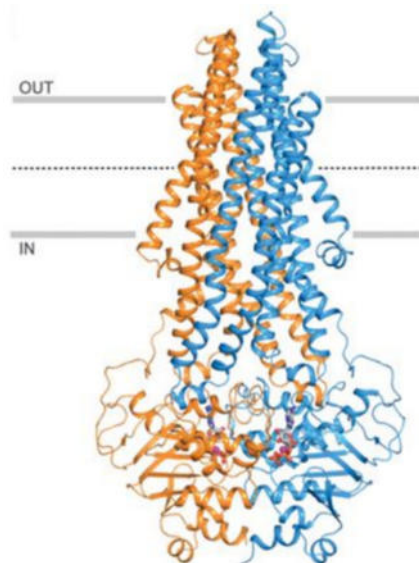


Figure 24 : Représentation tridimensionnelle de la P-glycoprotéine étudiée par cristallographie.

La P-gp est constituée de la partie N-terminale comportant les domaines TMD1 à 6 et NBD1 (en orange) et la partie C-terminale comportant les domaines TMD7 à 12 et NBD2 (en bleue). Source: Kim, Y.; Chen, J. Molecular Structure of Human P-Glycoprotein in the ATP-Bound, Outward-Facing Conformation. Science 2018, 359, 915–919, doi:10.1126/science.aar7389.

impliquées dans le processus de la résistance tumorale aux traitements sont identifiées (Gottesman, 2002; Robey et al., 2018) :

- (1) La sous-famille ABCB, notamment la « **Permeability glycoprotein** » ou la **P-glycoprotein** ou la **P-gp** codée par le gène *ABCB1/MDR1*. Une partie des travaux de ma thèse s'est particulièrement intéressée à la détection et la quantification de cette protéine *via* un nouveau traceur innovant LightSpot®.
- (2) La sous-famille ABCC, notamment les « **Multidrug Resistance-associated Proteins** » ou **MRP** dont principalement les protéines **MRP1, MRP2 ou MRP7**, codées respectivement par les gènes *ABCC1, ABCC2* et *ABCC10*.
- (3) La sous-famille ABCG, notamment la « **Breast Cancer Resistance Protein** » ou **BCRP** codée par le gène *ABCG2*.

La surexpression de ces protéines MDR d'intérêt clinique dans les tumeurs est principalement due aux quatre mécanismes moléculaires différents : (1) une amplification des gènes codant ces protéines MDR, (2) une augmentation de leur transcription, (3) des changements dans l'efficacité de leur traduction ou (4) des réarrangements chromosomiques des gènes, les plaçant par exemple sous l'influence de promoteurs forts (Bugde et al., 2017).

I. 2. La P-glycoprotéine (ABCB1)

I. 2. a) Généralités sur la P-gp

La P-gp a été découverte en 1976 par Juliano et Ling qui avaient mis en évidence la surexpression d'une glycoprotéine transmembranaire sur des lignées cellulaires résistantes à la colchicine, réduisant la perméabilité cellulaire aux médicaments (Juliano and Ling, 1976). Cette protéine a une taille 170 kDa et est composée d'une succession de 1 280 acides aminés également (Kim and Chen, 2018). Elle est codée par le gène *ABCB1* dénommé aussi *MDR1* situé sur la région q21 du chromosome 7. Ce gène contenant 28 exons code pour la synthèse linéaire de la séquence peptidique complète de la protéine.

La structure de la P-gp est composée de deux parties symétriques entre elles appelées cassettes, chacune comprenant un domaine intracellulaire (domaines NBD) et six domaines transmembranaires (domaines TMD) (Figure 23 & 24). Ces deux parties partagent 43% de similitudes sur leurs séquences d'acides aminés et fonctionnent de manière conjointe (Loo and Clarke, 2005). Les domaines transmembranaires sont attachés entre eux par des boucles de liaison polypeptidique flexibles (Aller et al., 2009). Les domaines NBD intracellulaires sont composés chacun de trois segments appelés motifs A, B et C. Le motif A permet le recrutement d'une molécule d'ATP tandis que le motif B permet de fixer des ions de

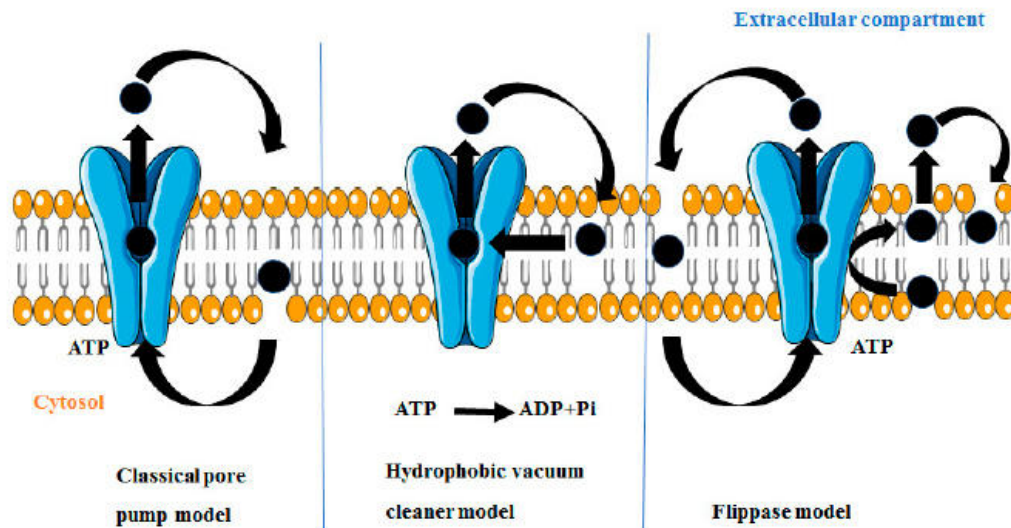


Figure 25 : Schéma explicatif des différents modèles de mécanisme d'action de la P-gp.

Différents modèles de mode d'efflux d'un substrat (point noir) par la P-gp (en bleu) sont proposés comprenant le modèle de la pompe classique (*Classical pore pump model*), celui de l'aspirateur hydrophobe (*Hydrophobic vacuum cleaner model*) et celui de la flippase (*Flippase model*). Source: Dewanjee, S.; Dua, T.K.; Bhattacharjee, N.; Das, A.; Gangopadhyay, M.; Khanra, R.; Joardar, S.; Riaz, M.; Feo, V.D.; Zia-UI-Haq, M. Natural Products as Alternative Choices for P-Glycoprotein (P-Gp) Inhibition. *Molecules* 2017, 22, 871, doi:10.3390/molecules22060871.

Magnésium. La fixation de ces deux éléments est primordiale pour l'action de la P-gp. Le rôle du motif C reste quant à lui encore peu connu, mais il servirait sans doute à catalyser la réaction d'hydrolyse de l'ATP et induire les changements conformationnels de la P-glycoprotéine afin d'exercer l'activité d'efflux membranaire (Aller et al., 2009). Les domaines TMD sont nommés de TM1 à TM12 et forment le site de reconnaissance et d'expulsion des substrats de la P-gp. Notamment, les domaines TM2, TM3, TM6 et TM12 sont les éléments clés pour la reconnaissance spécifique des substrats. Les domaines TM1, TM4, TM10 et TM11 sont quant à eux impliqués dans la liaison du substrat et son transport à travers la membrane cellulaire (Aller et al., 2009).

Chez l'Homme, la P-gp est naturellement exprimée dans un nombre important d'organes (Aller et al., 2009). Elle est par exemple retrouvée au niveau du pôle apical des cellules intestinales, rénales, hépatiques et sur les cellules composant la barrière hémato-encéphalique avec un rôle de protection et de détoxification contre divers xénobiotiques (Clarke et al., 2005). En effet, ce transporteur expulse un large panel de substrats et forme une véritable barrière empêchant la pénétration et l'accumulation de divers composés à l'intérieur de sites anatomiques spécifiques.

1. 2. b) Mécanismes d'efflux des substrats par la P-gp

A l'heure actuelle, il n'existe pas de consensus clairement défini pour décrire le mécanisme d'efflux médié par la P-gp. Trois types de mécanisme d'efflux de substrats par la P-gp ont été décrits dans la littérature et ces trois hypothèses sont encore toutes utilisées pour décrire ce mécanisme (Dewanjee et al., 2017) (Figure 25) :

- Le modèle classique de la **pompe d'efflux** : La P-gp fonctionnerait comme une pompe d'efflux membranaire contenant en son centre un pore, formant un passage hydrophobe par lequel le substrat sera expulsé depuis le cytoplasme vers le milieu extracellulaire. Le substrat n'interagirait pas alors directement avec la membrane plasmique (Dewanjee et al., 2017).
- Le modèle de l'**aspirateur hydrophobe** (ou *Hydrophobic Vacuum Cleaner*) proposé par Gottesman et Pastan (Gottesman and Pastan, 1993) : La P-gp reconnaîtrait et prendrait en charge le substrat directement au niveau de la couche interne de la membrane plasmique, avant qu'il ne pénètre dans le cytoplasme. En effet, en raison du caractère hydrophobe de la plupart des substrats de la P-gp, ce modèle suggère

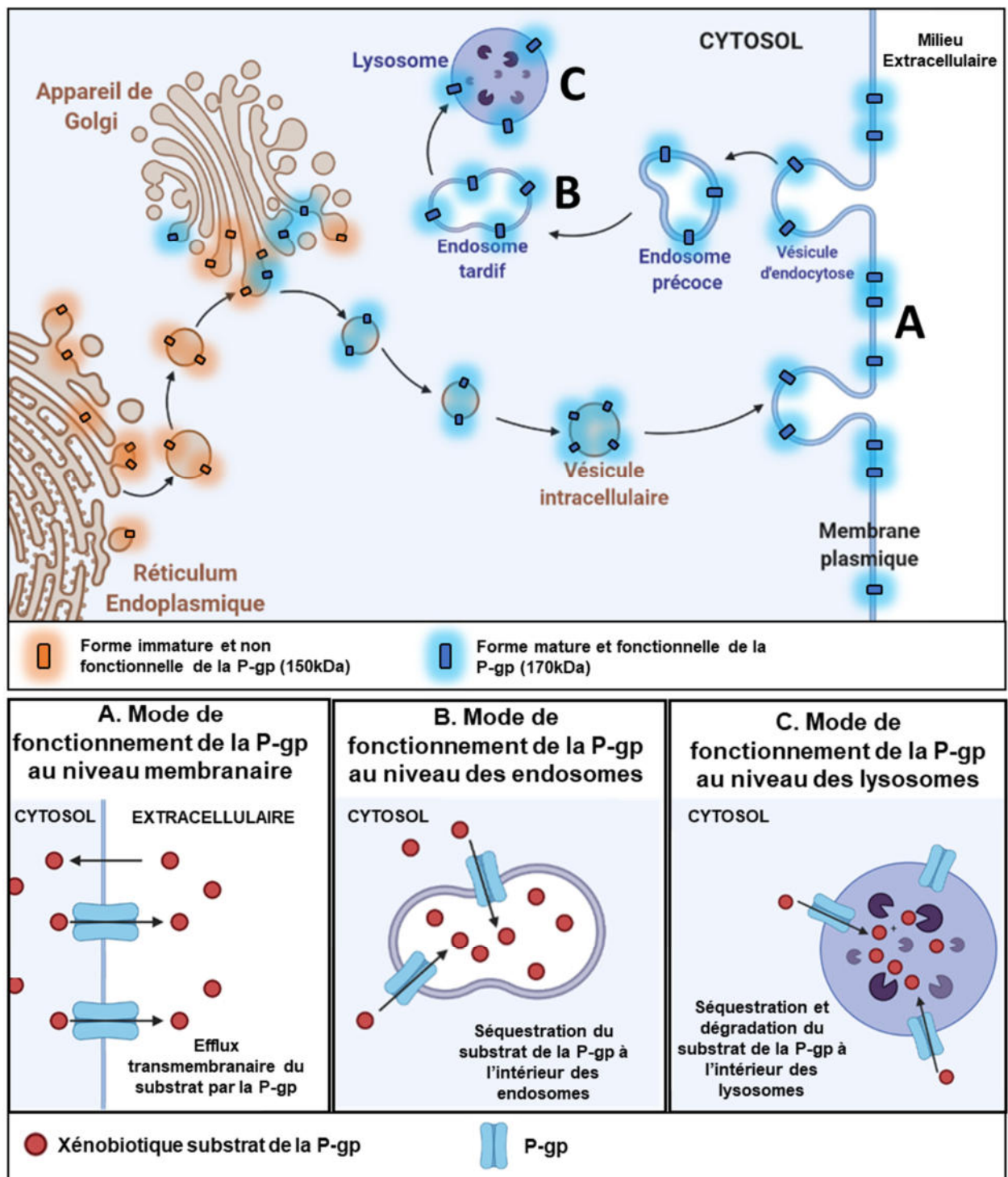


Figure 26 : Schéma explicatif des différents sites intracellulaire de présence de la P-gp.

La P-gp est présente sur la membrane plasmique et sur la membrane de divers organites intracellulaires. Notamment la forme inactive de la P-gp (forme encore glycosylée de 150kDa, représentée en orange) est présente sur la membrane de réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi. La forme active de la P-gp (forme glycosylée de 170kDa, capable d'exercer une activité d'efflux transmembranaire, représentée en bleue) est présente sur les membranes de l'appareil de Golgi, des endosomes précoces ou tardifs ou encore des lysosomes. La P-gp est impliquée dans la chimiorésistance cellulaire au niveau de la membrane plasmique (A) en permettant l'efflux extracellulaires de xénobiotiques, au niveau des endosomes (B) en permettant la séquestration des composés dans la lumière des endosomes, et au niveau des lysosomes (C) en permettant à la fois la séquestration et la dégradation des composés par des enzymes lysosomales. Ces trois modes d'action fonctionnent de manière coordonnée pour induire la résistance des cellules cancéreuses à différents traitements. Source : réalisation personnelle à l'aide du modèle « *Intracellular transport* » disponible sur le site <https://app.biorender.com/>.

que ces molécules transitent de manière prolongée dans les feuillettes internes de la membrane cellulaire avant d'atteindre le cytoplasme (Dewanjee et al., 2017).

- Le modèle de la **flippase** proposé par Higgins et Gottesman (Higgins and Gottesman, 1992) : selon ce modèle, la P-gp interromprait la pénétration des substrats au niveau des feuillettes internes de la membrane plasmique. La P-gp pourrait alors expulser le substrat vers les feuillettes externes de la membrane contre le gradient de concentration.

L'une des principales caractéristiques du mode de fonctionnement de la P-gp est sa spécificité pour un panel de substrats particulièrement étendu. Il s'agit principalement des molécules organiques de taille comprise entre 300 Da et 2 kDa (Sarkadi et al., 2006), mais également certains métaux lourds (Abd El-Aziz et al., 2021). Ce panel comprend différentes classes de molécules (Ferté, 2000):

- Des bases faibles lipophiles (telles que la doxorubicine ou la vinblastine).
- Des cations lipophiles (tels que la Rhodamine 123 ou le Hoechst 33342).
- Des composés neutres polycycliques (tel que le Taxol).
- Des molécules amphiphiles.
- Des peptides hydrophobiques.

Ce panel de substrats lipophiles est proche de celui pris en charge par le mécanisme classique de détoxification cellulaire médié par le système des cytochromes P3A4 et P450 (CYP3A4 et CYP450). Il s'agit d'enzymes de détoxification permettant la dégradation de xénobiotiques exerçant un système complémentaire et synergique avec celui d'efflux membranaire. En effet, ces deux systèmes entrent dans le réseau de chimio-immunité cellulaire associant des systèmes permettant l'efflux extracellulaire d'un xénobiotique et d'autres mécanismes permettant la dégradation du composé (Elmeliegy et al., 2020).

Classiquement, il est considéré que la P-gp est localisée uniquement au niveau de la membrane plasmique. Or une partie non négligeable de la P-gp est présente sur la membrane d'organites intracellulaires. En effet, de nombreuses études basées sur des approches d'immunofluorescence et d'expression de la protéine de fusion P-gp-GFP (P-gp couplée à la *Green Fluorescent Protein*) ont montré la présence de la P-gp sur la membrane de différents organites. La localisation intracellulaire de la P-gp correspond directement avec le schéma classique de transport intracellulaire des glycoprotéines transmembranaires (Figure 26) (Fu, 2013; Fu and Arias, 2012). En effet, comme toutes les protéines, la P-gp est synthétisée au niveau du réticulum endoplasmique, lors de la traduction de l'ARN messenger par les ribosomes

à la surface du réticulum permettant l'intégration de la nouvelle séquence peptidique dans la membrane du réticulum (Fu, 2013; Fu and Arias, 2012). A ce stade, la protéine a une taille proche de 150 kDa et va subir différents repliements tridimensionnels à l'aide de protéines chaperonnes (Fu, 2013; Fu and Arias, 2012). Par la suite, le bourgeonnement de vésicules va permettre le transport de la P-gp du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi. Au niveau de cet organite, la protéine va subir ses dernières modifications, notamment sa glycosylation sur différents sites spécifiques permettant la formation de la protéine finale fonctionnelle de 170 kDa (Fu, 2013; Fu and Arias, 2012).

La P-gp est ensuite transportée de l'appareil de Golgi jusqu'à la membrane plasmique par l'intermédiaire d'un réseau de vésicules appelées endosomes venant s'intégrer à la membrane cellulaire (Fu and Arias, 2012). Ce mécanisme permet de renouveler régulièrement, la quantité de P-gp présente sur la membrane cellulaire. De plus, les endosomes portent également sur leur membrane la forme fonctionnelle de P-gp, leur conférant un rôle de séquestration de xénobiotiques dans la lumière des endosomes. En effet, les domaines de fixation de l'ATP sont toujours en contact du cytoplasme permettant la reconnaissance de substrats intracellulaires et leur efflux du cytoplasme vers la lumière endosomale. Lors de la fusion des endosomes avec la membrane cellulaire, les xénobiotiques séquestrés sont relargués dans le milieu extracellulaire (Fu, 2013; Fu and Arias, 2012). En complément, il existe un mécanisme de recyclage de la P-gp qui sera internalisée par endocytose et se retrouvera à nouveau sur la membrane de vésicules intracellulaires appelées endosomes tardifs qui matureront en lysosomes. Ces derniers jouent un rôle de digestion d'éléments cellulaires, grâce à pH acide qui permettra la dégradation de certains xénobiotiques, notamment les composés basiques (Fu, 2013; Fu and Arias, 2012). La P-gp peut également être retrouvée au niveau du protéasome qui est un complexe enzymatique associé au réticulum endoplasmique. Ainsi, la P-gp présentant des défauts de structure ou de repliement pourra être dégradée (Fu, 2013; Fu and Arias, 2012). L'ensemble de ce trafic intracellulaire de la P-gp se fait donc par l'intermédiaire du réseau de vésicules intracellulaires permettant le transport de cette glycoprotéine d'un organite à l'autre jusqu'à l'atteinte de la membrane plasmique. Ceci est permis majoritairement par des Rab GTPases, une sous famille de 70 types différents de protéines G, importantes pour le bourgeonnement, le transport, la fixation et la fusion de vésicules intracellulaires (Fu, 2013; Fu and Arias, 2012).

De plus, la présence de la P-gp a également été décrite sur la membrane mitochondriale (Munteanu et al., 2006). Cependant, il n'existe pas de consensus clairement établi permettant de considérer de manière fiable sa présence sur les mitochondries. En effet, certaines études

TABLE 1. *Substrates of MDR1/Pgp*

| <i>Anticancer drugs</i> | |
|----------------------------|--|
| Anthracyclines | |
| Daunorubicin | |
| Doxorubicin | |
| Epirubicin | |
| Anthracenes | |
| Bisantrone | |
| Mitoxantrone | |
| Vinca alkaloids | |
| Vinblastine | |
| Vincristine | |
| Vinorelbine | |
| Vindesine | |
| Tubulin polymerizing drugs | |
| Colchicine | |
| Paclitaxel | |
| Docetaxel | |

Figure 27 : Liste des principaux agents de chimiothérapies anticancéreuses substrats de la P-gp.

Source: Sarkadi, B.; Homolya, L.; Szakács, G.; Váradi, A. Human Multidrug Resistance ABCB and ABCG Transporters: Participation in a Chemoimmunity Defense System. *Physiol Rev* 2006, 86, 1179–1236, doi:10.1152/physrev.00037.2005.

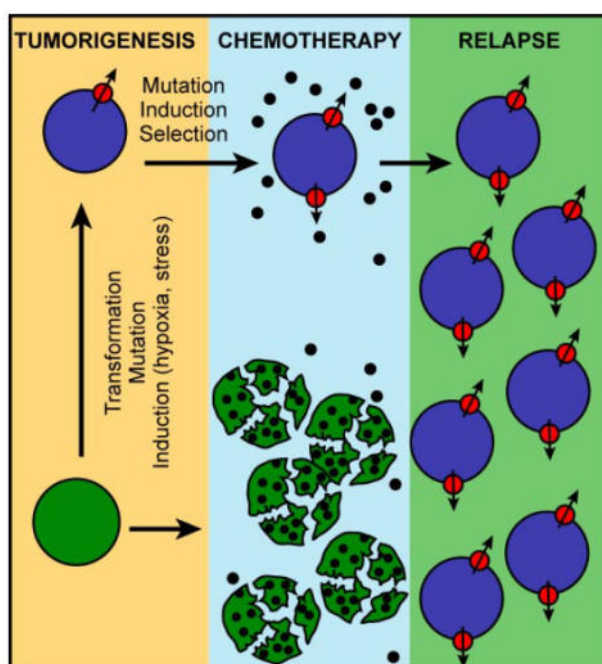


Figure 28 : Schéma explicative de l'acquisition de la résistance tumorale aux traitement instaurée par la P-gp.

Au cours de la tumorigenèse, les cellules cancéreuses subissent différents événements mutationnels pouvant les amener à surexprimer la P-gp (cellules en bleues). Les cellules n'exprimant pas la P-gp (vertes) seront plus sensibles aux chimiothérapies et progressivement éliminées, conduisant ainsi à la sélection des cellules résistantes. De plus, le traitement administré peut induire la surexpression de la P-gp par les cellules cancéreuses. L'avantage sélectif conféré par la surexpression de la P-gp permet aux cellules les plus résistantes de survivre au traitement et de proliférer à nouveau après la fin de la chimiothérapie. Ceci peut être notamment la cause d'une rechute de la maladie. Source: Sarkadi, B.; Homolya, L.; Szakács, G.; Váradi, A. Human Multidrug Resistance ABCB and ABCG Transporters: Participation in a Chemoimmunity Defense System. *Physiol Rev* 2006, 86, 1179–1236, doi:10.1152/physrev.00037.2005.

présentent une colocalisation entre un marquage de la P-gp et un marquage mitochondrial sur des cellules de la lignée leucémique K562 (Munteanu et al., 2006). Par contre, d'autres études révèlent l'absence d'expression de la P-gp au niveau des membranes mitochondriales des lignées cellulaires du cancer du sein MCF7 (Paterson and Gottesman, 2007), de cancer du col de l'utérus KBV1 (Yamagishi et al., 2013) ou sur des hépatocytes de rats (Fu et al., 2013). Malgré cette absence de consensus, la présence potentielle de la P-gp sur la membrane des mitochondries semblerait jouer un rôle dans la résistance tumorale aux traitements.

I. 2. c) Implication de la P-gp dans la résistance tumorale aux traitements

Les chimiothérapeutiques cibles de la P-gp sont des agents lipophiles tels que les taxanes (le Paclitaxel et le Docetaxel), certaines anthracyclines (la Doxorubicine, la Daunorubicine et l'Epirubicine), les vinca-alcaloïdes (la Vinblastine ou la Vincristine par exemple) ou encore l'Etoposide (Figure 27). De plus, il a été démontré que la P-gp reconnaît et engendre également l'efflux des thérapeutiques ciblées anticancéreuses, comme (i) des inhibiteurs de tyrosine kinase tels que l'Imatinib, le Gefitinib ou le Sunitinib, entre autres (ii) des inhibiteurs de m-TOR comme le Tacrolimus (Sarkadi et al., 2006; Waghray and Zhang, 2018) et également, les inhibiteurs de PARP comme l'Olaparib et Veliparib [155,156].

Le rôle de la P-gp dans l'instauration de la chimiorésistance tumorale a largement été décrit (Gottesman, 2002). Elle est due à la surexpression de la P-gp, de type constitutionnel et/ou acquis, conférant aux cellules cancéreuses la résistance à l'encontre d'une grande variété d'agents chimiothérapeutiques (cités, ci-dessus). En effet, une surexpression constitutionnelle de la P-gp a été rapportée dans plusieurs types de cancers, notamment les mélanomes ou les tumeurs mammaires, rénales ou colorectales (Sarkadi et al., 2006). Il est estimé que plus de 40% des cancers du sein présentent une surexpression de la P-gp (Trock et al., 1997). Cependant, dans certains cas, comme des leucémies ou des cancers du sein, l'expression de la P-gp reste à son niveau basal (Kuo, 2007) et c'est seulement après un traitement par chimiothérapie que la surexpression de la P-gp est induite chez ces tumeurs (Leonard et al., 2003). Chez ces patients présentant une forte surexpression acquise de la P-gp, le risque d'échec thérapeutique après chimiothérapie est trois fois plus élevé (Leonard et al., 2003). De manière générale, l'acquisition d'une surexpression de la P-gp est expliquée par trois mécanismes complémentaires (Figure 28) :

1. Des **événements mutationnels** lors de la tumorigenèse conduisant à la surexpression du gène *MDR1/ABCB1* (Sarkadi et al., 2006).

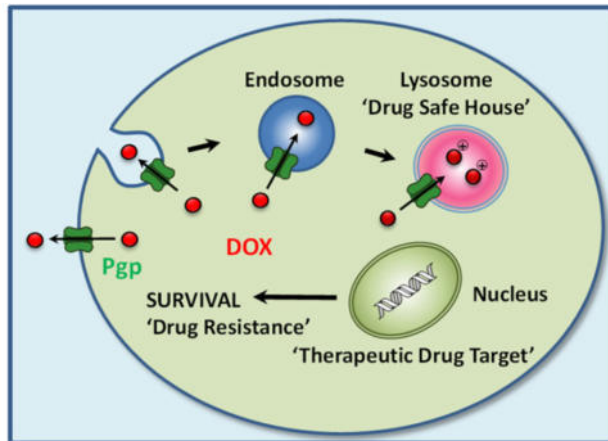


Figure 29 : Schéma explicative de la chimiorésistance cancéreuse médiée par la P-gp présente aux niveaux membranaire, endosomal et lysosomal.

La P-gp membranaire a un rôle d'efflux extracellulaire d'agents de chimiothérapies (par exemple la Doxorubicine DOX) et pour être internalisée par endocytose sur la membrane de vésicules intracellulaire. Il peut s'agir d'endosome sur lesquels la P-gp permettra la séquestration des anticancéreux (« *Drug Safe House* »), ou de lysosomes permettant la neutralisation de la molécule. A ces trois niveaux cellulaires, la P-gp limitera l'action de la doxorubicine au niveau nucléaire, permettant ainsi la survie de la cellule. Source: Al-Akra, L.; Bae, D.-H.; Sahni, S.; Huang, M.L.H.; Park, K.C.; Lane, D.J.R.; Jansson, P.J.; Richardson, D.R. Tumor Stressors Induce Two Mechanisms of Intracellular P-Glycoprotein-Mediated Resistance That Are Overcome by Lysosomal-Targeted Thiosemicarbazones. *J. Biol. Chem.* 2018, 293, 3562–3587, doi:10.1074/jbc.M116.772699.

2. La **sélection des cellules présentant une surexpression de la P-gp**. En effet, cette caractéristique confère un avantage sélectif à certains clones tumoraux au cours de l'évolution de la pathologie (Sarkadi et al., 2006).
3. L'**induction de l'expression de la P-gp** à la suite de l'exposition cellulaire au(x) traitement(s). Ce mécanisme est médié par les récepteurs nucléaires « *Pregnane X Receptor* » (PXR) et « *Constitutive Androstane Receptor* » (CAR) activés par un spectre large de xénobiotiques ou par un stress cellulaire. Les récepteurs activés se fixent sur le motif DR4 du promoteur du gène *ABCB1/MDR1* entraînant une augmentation de la transcription du gène (Waghray and Zhang, 2018).

La combinaison de ces trois mécanismes conduit à l'acquisition d'un phénotype MDR par les cellules tumorales. En clinique, ceci est associé avec le risque d'échec thérapeutique ou de maladie résiduelle. Notamment, une corrélation positive a été observée entre l'expression de la P-gp et la transition épithélio-mésenchymateuse chez les cellules tumorales, étant associée aux phénotypes cancéreux agressifs. De plus, ces deux éléments sont associés avec un risque plus important de maladie résiduelle après chimiothérapie (Qu et al., 2014).

Par ailleurs, il est largement admis que l'efflux membranaire instauré par la P-gp joue un rôle crucial dans la résistance tumorale au traitement (Robey et al., 2018; Sarkadi et al., 2006). Cependant, depuis de nombreuses années, l'implication de la P-gp lysosomale dans l'établissement de chimiorésistance tumorale est de plus en plus établie, en complément du mécanisme d'efflux membranaire. En effet, la P-gp lysosomale permet la séquestration et la neutralisation de certains anticancéreux dans les lysosomes (Fu, 2013) (Figure 29). L'accumulation des composés dans cet organite empêche d'une part la chimiothérapeutique d'atteindre sa cible cellulaire qui est le plus souvent, le noyau cellulaire (Hraběta et al., 2020; Yamagishi et al., 2013). De plus, les anticancéreux accumulés dans les lysosomes suite à l'action de la P-gp lysosomale, peuvent également être neutralisés (Yamagishi et al., 2013). En effet, la dégradation des anticancéreux dans les lysosomes (milieu acide) dépend de leur charge. Les composés faiblement basiques tels que la Doxorubicine, la Daunorubicine ou la Vinblastine sont chargés à pH acide et sont facilement dégradés. Au contraire, les composés neutres à pH acide tels que la Colchicine ou Paclitaxel, seront plus difficilement dégradés dans les lysosomes (Yamagishi et al., 2013). Par ailleurs, le microenvironnement tumoral joue également un rôle dans la résistance aux anticancéreux instaurée par la P-gp (Al-Akra et al., 2018). Premièrement, différents signaux environnementaux de stress cellulaire tels que l'hypoxie, les carences en glucose, l'augmentation de la production de « *Reactive Oxygen Species* » (ROS) ou l'exposition à des xénobiotiques peuvent entraîner une relocalisation de

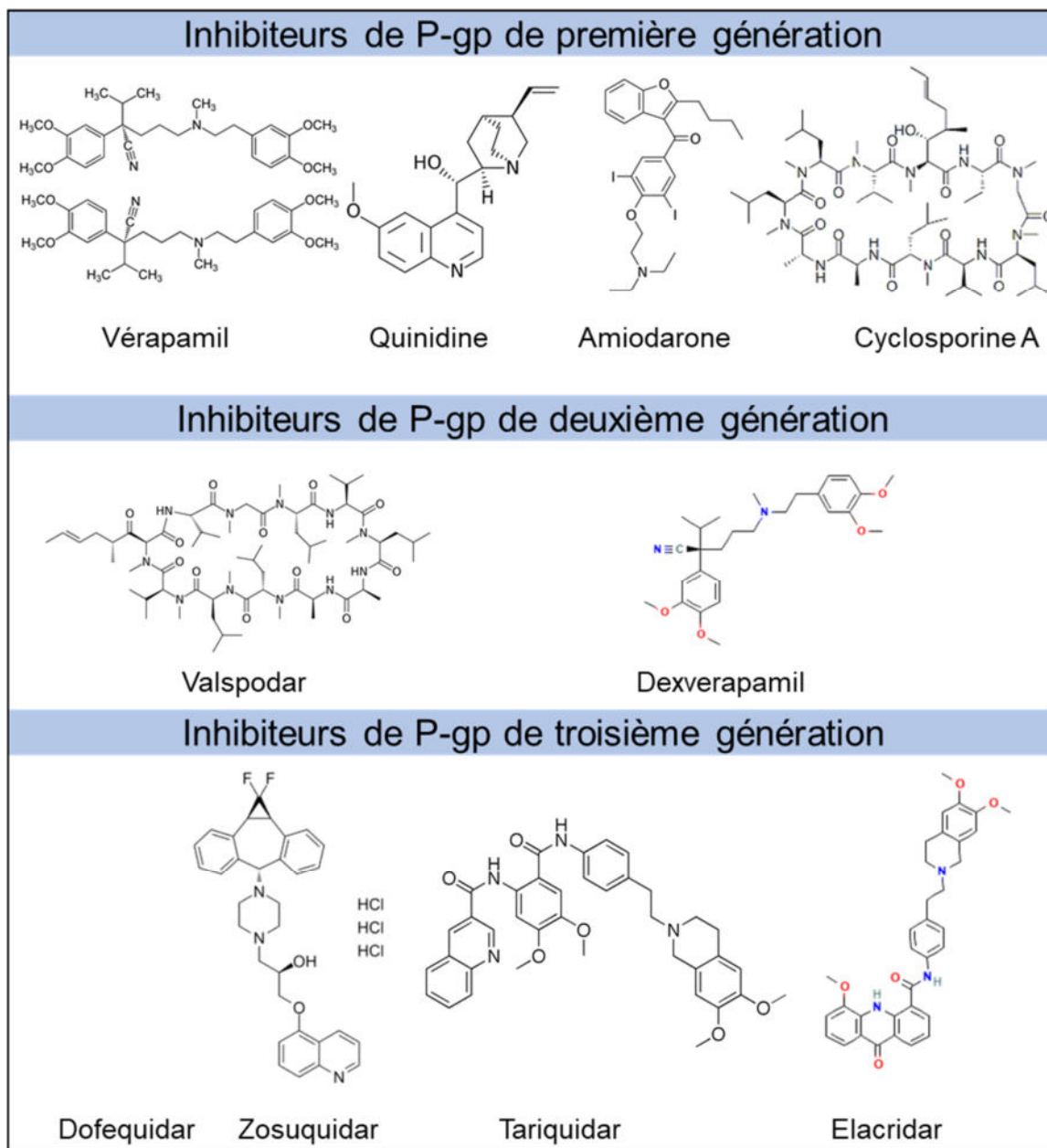


Figure 30 : Structures chimiques des principaux inhibiteurs de P-gp.
 Source : site internet <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.

la P-gp de la membrane vers les lysosomes (Al-Akra et al., 2018). Ce mécanisme intervient généralement dans l'heure suivant l'exposition à un traitement anticancéreux. Deuxièmement, de façon plus tardive, un second mécanisme visera à augmenter l'expression de différents facteurs tel que le HIF-1 alpha connu pour augmenter significativement le taux d'expression de la P-gp et de stimuler la formation de lysosomes (Al-Akra et al., 2018; Doublier et al., 2012). La compréhension de ces deux mécanismes complémentaires et synergétiques a permis de mieux appréhender la résistance tumorale croisée vis-à-vis de différentes molécules anticancéreuses en clinique.

I. 3. Intérêt clinique de la P-gp en Oncologie

I. 3. a) La P-gp comme cible thérapeutique

La P-gp est depuis longtemps considérée comme une cible thérapeutique d'intérêt afin d'accroître la chimiosensibilisation des cellules tumorales et limiter le phénotype MDR. Un intérêt particulier a notamment été apporté pour inhiber l'activité de la P-gp afin de potentialiser l'action d'agents de chimiothérapies et de limiter ainsi le risque d'échec thérapeutique (Gottesman, 2002). De nombreuses molécules ont été développées et démontrées comme efficaces pour inhiber le mécanisme d'efflux instauré par la P-gp. Ces petites molécules inhibitrices sont généralement classifiées par ordre chronologique de développement (trois générations) et ont été largement étudiées lors d'essais précliniques et cliniques (Sarkadi et al., 2006).

Les inhibiteurs de première génération tels que le Vérapamil, la Quinidine, l'Amiodarone et la Cyclosporine A sont des molécules pharmacologiquement actives avec d'autres utilisations cliniques. Ces molécules sont également des substrats préférentiels de la P-gp qui peuvent inhiber/limiter l'activité d'efflux de la P-gp, en combinaison avec d'autres chimiothérapeutiques (Figure 30) (Leonard et al., 2003). Cependant, ces molécules se sont avérées inutilisables à cette fin en clinique, en raison de leur importante toxicité. De ce fait, le développement d'autres inhibiteurs spécifiques de la P-gp, de seconde génération tels que le Valspodar et le Dexvérapamile a été entrepris (Figure 30) (Binkhathlan and Lavasanifar, 2013). Là encore, ces molécules ont montré une toxicité particulière potentialisant les toxicités induites par les chimiothérapies, requérant ainsi la diminution des doses et exposant le patient à un risque de sous-dosage. Enfin, des inhibiteurs de troisième génération ont été développés spécifiquement pour inhiber la P-gp incluant le Dofequidar, le Zosuquidar, le Tariquidar et l'Elacridar (Figure 30) (Robey et al., 2018). Ces molécules se sont avérées plus efficaces pour inhiber le transporteur avec moins d'interactions pharmacocinétiques que les inhibiteurs des générations précédentes (Robey et al., 2018). Cependant, malgré les efforts menés pour

développer ces nouvelles molécules, l'inhibition de la P-gp engendre sur les tissus sains d'importantes toxicités (Robey et al., 2018). Ceci peut expliquer en partie que la majorité des essais cliniques sur des inhibiteurs de la P-gp n'a démontré que très peu de bénéfice clinique, même pour les molécules de troisième génération. De plus, l'inhibition d'un transporteur MDR expose la tumeur au risque de l'acquisition de résistance médiée par d'autres pompes d'efflux MDR, telles que la BCRP et la MRP7. Les principaux problèmes rencontrés lors du développement de ces inhibiteurs de P-gp comprennent (1) une faible spécificité pour la P-gp, (2) une faible efficacité d'inhibition de la P-gp, (3) une toxicité inhérente et (4) des altérations de la pharmacocinétique des agents de chimiothérapie coadministrés (Kou et al., 2018). A l'heure actuelle, aucun inhibiteur de la P-gp n'est approuvé comme thérapeutique, en Oncologie. Cependant, ce type d'approche représente toujours un axe de recherche important pour développer des inhibiteurs de quatrième génération plus efficaces, présentant un réel intérêt clinique (Kou et al., 2018). Dans ce cadre, la stratification des patients en fonction de leur niveau d'expression de la P-gp constitutionnelle et/ou acquise s'avère indispensable en clinique, afin d'identifier les patients les plus aptes à répondre au traitement et/ou d'essayer de limiter les toxicités sur les tissus sains (Robey et al., 2018). Dans ce contexte, les outils d'imagerie dans une démarche de médecine personnalisée semblent particulièrement intéressants.

1. 3. b) La P-gp, outil pour l'étude du screening de médicaments

Le développement de nouveaux médicaments en Oncologie est constitué de différentes étapes, notamment celle de « *screening* » ou le criblage de médicaments permettant l'analyse des propriétés pharmacocinétiques de ces nouveaux composés. Ces études comprennent notamment évaluation de l'Absorption (A), de la Distribution (D), du Métabolisme (M), de l'Excrétion (E) et de la Toxicité (T) ou approche appelée ADMET (Prachayasittikul and Prachayasittikul, 2016). La P-gp joue un rôle important dans la pharmacocinétique car il s'agit d'un acteur clé de détoxification et d'efflux d'un grand nombre de substrats. En effet, dans l'édition de 2020 du guide d'études d'interactions médicamenteuses *in vitro* pour l'industrie, la *Food and Drug Administration* (FDA) recommande de déterminer si le nouveau médicament est un substrat de la P-gp. De plus, cette identification doit s'effectuer le plus tôt possible, dans le processus de développement des nouvelles molécules (U.S. Department of Health and Human Services, 2020). De ce fait, d'importants efforts sont réalisés pour développer des thérapeutiques présentant moins d'affinité pour la P-gp et de meilleures propriétés de pharmaco-distribution. A titre d'exemple, un nouvel inhibiteur de PARP dénommé AZD2461,

a été spécialement conçu pour présenter une affinité pour la P-gp plus faible que celle observée pour l'Olaparib (Oplustil O'Connor et al., 2016).

I. 3. c) La P-gp comme marqueur prédictif et pronostic de la maladie

Le principal intérêt de la P-gp en Oncologie réside dans son utilisation comme marqueur prédictif et pronostic du degré de la résistance des cellules tumorales. En effet, l'évaluation du taux d'expression de la P-gp au moment du diagnostic peut apporter une aide précieuse au choix du traitement à envisager, pour le patient (Robey et al., 2018). Plus précisément, l'administration d'agents thérapeutiques non-sustrats de la P-gp sera à privilégier pour le traitement de tumeurs présentant une surexpression de la P-gp. Une étude menée sur un panel de 59 lignées cellulaires issues de tumeurs mammaires a montré que le taux d'ARN messager correspondant au gène *ABCB1* était inversement proportionnel à l'efficacité de médicaments de première ligne de chimiothérapie (Burger et al., 2003). Une étude plus récente menée en 2013 sur 76 patientes de cancer du sein localement avancé a montré qu'une surexpression de la P-gp était un facteur déterminant pour prédire la réponse à différentes chimiothérapies néoadjuvantes (Vishnukumar et al., 2013).

De plus, l'expression de la P-gp est directement liée au degré de l'agressivité de la tumeur ainsi qu'au risque de rechutes ou de récives. Notamment, pour les tumeurs avancées de cancer du sein, l'expression de la P-gp s'est montrée être corrélée avec le risque de récive (Gregorcyk et al., 1996). D'autre part, une étude menée sur 58 patientes de cancer du sein invasif a montré une forte corrélation entre l'expression de la P-gp et celle de l'érythropoïétine (EPO) et de l'*Hypoxia Induced Factor 1 alpha* (HIF-1 alpha). L'expression de ces trois facteurs s'est avérée être associée aux tumeurs de mauvais pronostic avec des atteintes ganglionnaires (Badowska-Kozakiewicz et al., 2017). Cependant, malgré l'intérêt que présente ce marqueur en clinique, il n'est que très peu évalué en routine de diagnostic des tumeurs (Gottesman et al., 2016). Ceci est en partie dû au manque de méthode standard suffisamment pertinente et efficace pour évaluer le niveau d'expression de la P-gp dans des échantillons tumoraux (Robey et al., 2018).

I. 4. Les méthodes d'étude de la résistance tumorale instaurée par la P-glycoprotéine

L'étude du taux d'expression constitutionnelle ou acquise de la P-gp peut s'effectuer par différentes approches: (a) au niveau de l'expression génique *via* le taux d'expression des ARN messagers, (b) au niveau de la protéine en elle-même ou (c) par des tests fonctionnels (van der Heyden et al., 1995; Sarkadi et al., 2006).

I. 4. a) Etudes de la P-gp au niveau de l'ARNm

Différentes méthodologies permettent de quantifier le taux d'ARN messager notamment par *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR), RT-PCR en temps réel ou encore par *Northern-Blot* (van der Heyden et al., 1995; Sarkadi et al., 2006). Il s'agit du reflet direct du taux de transcription du gène *ABCB1/MDR1* permettant d'évaluer le taux d'expression de la protéine à un instant donné. Cette approche fournit une grande sélectivité et sensibilité pour la P-gp. Cependant, malgré les progrès technologiques ayant entraîné une nette réduction des coûts de ce type d'approche, le prix reste élevé et le temps d'analyse trop important pour une utilisation en routine clinique (Sarkadi et al., 2006). De plus, cette approche globale ne permet pas de limiter l'analyse sur une zone précise dans l'échantillon biologique. Notamment, pour les échantillons tumoraux, ces approches prennent en compte des cellules environnantes de la tumeur pouvant biaiser les résultats, notamment les cellules stromales présentant une forte expression constitutionnelle de la P-gp (Zhou et al., 2014).

I. 4. b) Etudes de la P-gp au niveau protéique

Afin d'étudier la P-gp, l'approche la plus évidente est de détecter directement la présence de la protéine. Des méthodes telles que le Western Blot ou l'ELISA (*Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay*) permettent une quantification globale de la P-gp dans un échantillon cellulaire. Cependant, comme vu précédemment pour les approches moléculaires, ces méthodes ne permettent pas de distinguer les cellules tumorales des cellules saines environnantes. De ce fait, d'autres approches de détection de la P-gp par immunomarquages sont plus largement utilisées. Cette approche peut être réalisée par cytométrie en flux permettant de quantifier la présence membranaire de la P-gp (Beck et al., 1996). Néanmoins, la détection de ces approches par immunomarquages se fait le plus souvent par des techniques d'immunohistochimie (De Lange et al., 2018; Prajoko and Aryandono, 2019) ou d'immunofluorescence (Cregunta Nicolae et al., 2016; Hu et al., 2014). Celles-ci permettent notamment de cibler spécifiquement par délimitation spatiale le tissu tumoral et de localiser la présence de la P-gp. La délimitation de détails micro anatomiques et la reconnaissance de l'hétérogénéité cellulaire intra-tumorale (en termes de cellules saines ou différentiels d'expression de la P-gp) sont de réels avantages pour ce type d'approche. Cependant, il existe une grande disparité entre les techniques et le type d'anticorps utilisés. De plus, il s'agit des techniques très majoritairement focalisées sur la P-gp membranaire (spécificité des anticorps pour des épitopes externes de la P-gp) et n'explorent pas la présence de la P-gp sur les

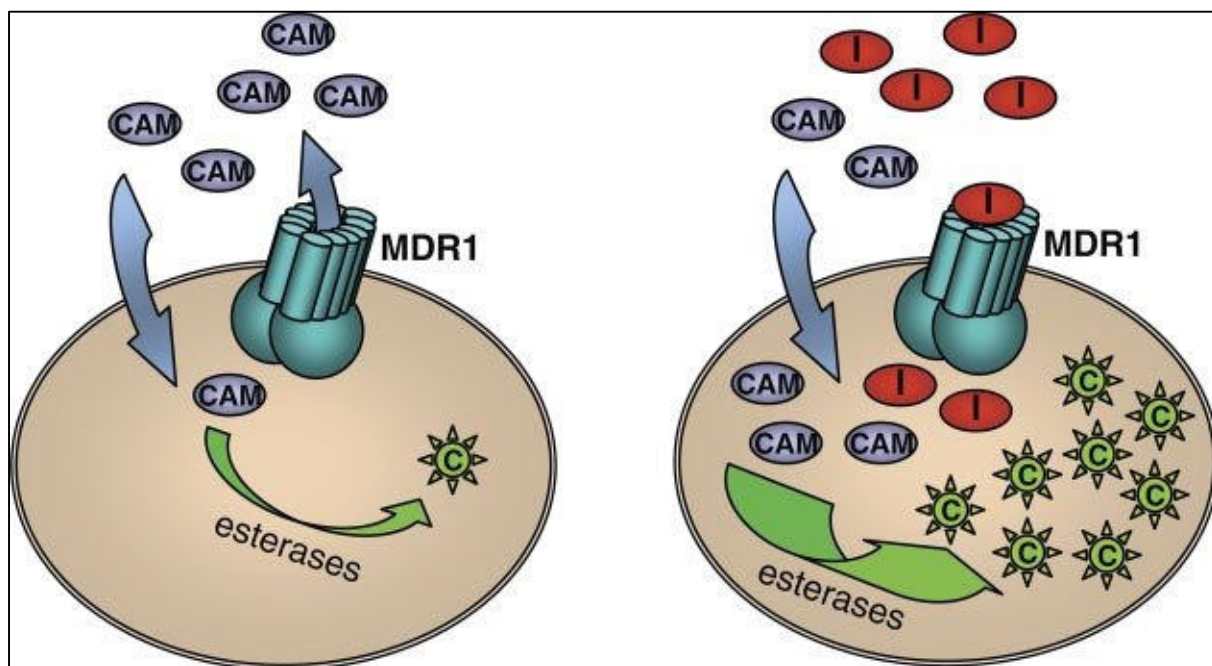


Figure 31 : Schéma représentatif du principe du dosage de la Calcéine pour étudier l'activité de la P-gp.

La Calcéine-AM (CAM), un composé non fluorescent, traverse rapidement la membrane cellulaire et est transformée en une forme fluorescente (acide libre de Calcéine) par les estérases intracellulaires. Dans les cellules multirésistantes exprimant la Pgp, la calcéine-AM est expulsée par le transporteur avant sa transformation intracellulaire. Puisque la quantité de calcéine-AM disponible pour les estérases cellulaires est réduite, l'accumulation de Calcéine libre, qui n'est pas un substrat de la P-gp, est également réduite dans ces cellules. Lorsque l'expulsion de la Calcéine-AM est bloquée par un agent qui interfère avec la P-gp, la calcéine libre s'accumule rapidement dans la cellule. Source: Sarkadi, B.; Homolya, L.; Szakács, G.; Váradi, A. Human Multidrug Resistance ABCB and ABCG Transporters: Participation in a Chemoinmunity Defense System. *Physiol Rev* 2006, 86, 1179–1236, doi:10.1152/physrev.00037.2005.

organites intracellulaires. Par ailleurs, il est encore très difficile de standardiser les procédures et les critères d'évaluation avec ces techniques.

I. 4. c) Outils d'étude de l'activité de la P-gp

La majorité des études évaluant la P-gp reposent sur des tests *in vitro* de son activité d'efflux. Ces derniers ne permettent pas de détecter et/ou de quantifier directement la présence de la P-gp à l'échelle tissulaire et/ou cellulaire. Il s'agit de tests indirects de type fonctionnel reflétant l'activité d'efflux de différents substrats par la P-gp, au niveau cellulaire. Ces derniers reposent sur le principe de la quantification du signal émis par des substrats détectables, le plus souvent fluorescente, par des méthodes d'imagerie et/ou par cytométrie en flux. Pour cela, plusieurs stratégies peuvent être appliquées (Sarkadi et al., 2006). La plus simple est l'utilisation d'une molécule fluorescente connue pour être un substrat de la P-gp. L'intensité intracellulaire de fluorescence sera le reflet de l'accumulation de la molécule dans la cellule et est donc inversement proportionnelle à l'activité d'efflux instaurée par la P-gp (Legrand et al., 1998). Par exemple, dans ce cas de figure, la rhodamine 123, la Calcéine-AM ou le Hoeschst 33342 peuvent être utilisés (Glavinas et al., 2011; Jouan et al., 2016; Legrand et al., 1998) (Figure 31, exemple de la Calcéine-AM). D'autres stratégies visent à mettre en compétition ces substrats fluorescents avec d'autres composés afin d'évaluer leur efflux et/ou leur inhibition par la P-gp. C'est notamment ce type d'approches qui est utilisé dans le cadre de l'évaluation de l'efflux de nouveaux médicaments par la P-gp pour le criblage à hauts débit d'agents thérapeutiques (van der Sandt et al., 2000). En effet, ces méthodes sont assez simples à mettre en place et adaptées pour une utilisation *in vitro* à grande échelle (Glavinas et al., 2011; Hamrang et al., 2014). Néanmoins, elles requièrent l'utilisation de cellules ou tissus vivants présentant un P-gp fonctionnelle. Ce point est l'élément principal bloquant l'utilisation de ces approches en routine clinique pour le diagnostic.

Cependant d'autres tests fonctionnels reposant sur l'accumulation tissulaire de radiotraceurs ont été étudiés pour une application en Médecine Nucléaire (Sylvänen and Eriksson, 2012). Notamment, des traceurs radiomarqués substrats spécifiques de la P-gp ont été développés comme le [¹¹C]Vérapamil détectable par TEP (Tomographie par Emission de Positons). Robey et al. ont récemment reporté, en 2018, le réel besoin d'une méthode d'imagerie validée en Médecine Nucléaire pour détecter la présence de la P-gp *in vivo* (Robey et al., 2018). Cependant, l'expression importante physiologique de la P-gp sur des tissus sains, notamment au niveau de la Barrière Hémato-Encéphalique et des reins rend ces méthodes d'imagerie difficilement interprétables et très peu spécifiques pour le ciblage des tumeurs.

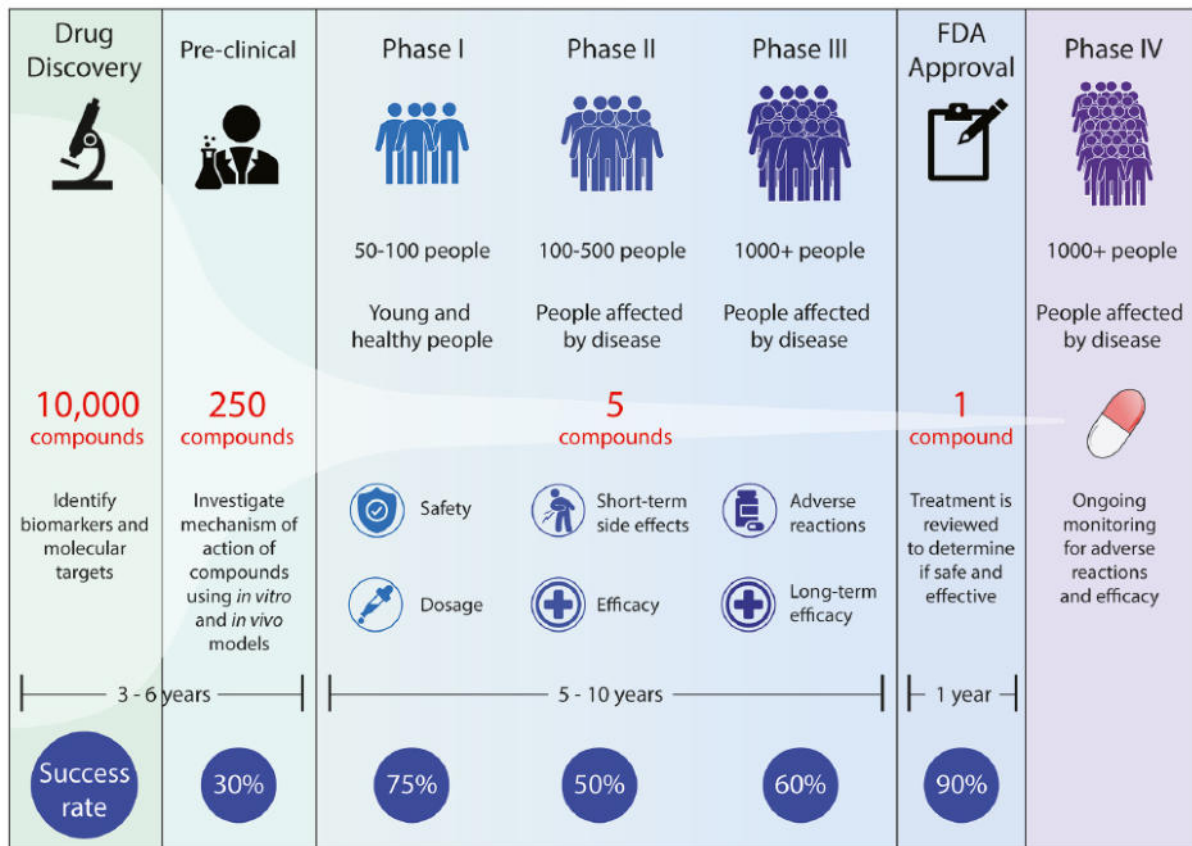


Figure 32 : Schéma représentatif des différentes étapes de développement d'un nouveau médicament. Ce schéma décrit les différentes étapes du processus de développement d'un nouveau biopharmaceutique depuis la découverte d'un nouveau composé (Drug Discovery), jusqu'à la mise sur le marché en passant par les essais précliniques et cliniques. Le durée moyenne et le taux de succès de chaque étape sont indiqués. Source : Belfiore, L.; Aghaei, B.; Law, A.M.K.; Dobrowolski, J.C.; Raftery, L.J.; Tjandra, A.D.; Yee, C.; Piloni, A.; Volkerling, A.; Ferris, C.J.; et al. Generation and Analysis of 3D Cell Culture Models for Drug Discovery. European Journal of Pharmaceutical Sciences 2021, 163, 105876, doi:10.1016/j.ejps.2021.105876.

Partie 3 : Le développement de sphéroïdes comme outils précliniques *in vitro* pour la modélisation de la résistance tumorale aux traitements

I. L'intérêt des modèles de cultures cellulaires en trois dimensions dans le processus de développement de médicaments

I. 1. Le processus de développement des médicaments

Le processus de développement de nouveaux médicaments a considérablement évolué depuis les premiers concepts de criblage (ou *screening*) à haut-débit établis dans les années 1970. En effet, une nette amélioration des connaissances de la communauté scientifique sur la biologie tumorale a conduit à une augmentation du développement de thérapies anticancéreuses efficaces (Nass et al., 2018). Cependant, ce processus de développement des médicaments reste long et fastidieux (Figure 32). Il débute par l'identification de nouveaux biomarqueurs ou processus biologique pouvant constituer des cibles thérapeutiques potentielles. Par la suite, un large panel de composés préexistants ou spécialement conçus pour induire l'action biologique souhaitée sera constitué. Ces composés sont alors soumis à des études précliniques visant à étudier leur mécanisme d'action permettant ainsi la sélection des substrats candidats présentant les meilleures efficacités (Belfiore et al., 2021).

Ces essais précliniques sont réalisés par modélisation, c'est-à-dire l'utilisation d'un système relativement simple représentant une version la plus ressemblante possible de la réalité physiologique (Adams, 2012). Ces essais permettent de faire une sélection conséquente des composés avant leur transfert en clinique afin de limiter au maximum le nombre d'essais cliniques infructueux. Il peut s'agir de modèles *in vitro*, c'est-à-dire de modèles utilisés en dehors d'un organisme vivant complet (Adams, 2012). Principalement, les essais sont menés sur des modèles enzymatiques ou cellulaires. Ces derniers ont pour but de mettre à l'épreuve les composés candidats pour induire la réponse moléculaire ou cellulaire souhaitée et obtenir des premières informations sur les possibles toxicités (Adams, 2012). Il peut également s'agir de modèles *in vivo*, lors de l'utilisation d'animaux pour modéliser l'action

d'un composé actif. Ces modèles ont pour but de mener les premières études de distribution tissulaires et déterminer de manière approximative les gammes de doses d'administration. Par la suite, les candidats médicaments ayant montré un intérêt thérapeutique lors des essais précliniques seront transférés vers des essais cliniques divisés en plusieurs phases (Phase I, Phase II et Phase III) (Belfiore et al., 2021). Ceux-ci permettent d'évaluer la sûreté, les potentiels effets secondaires à courts termes, les effets indésirables, l'efficacité et affiner les doses d'administration du traitement (Adams, 2012).

L'ensemble de ce processus de développement de médicaments est long et caractérisé par un faible taux de succès. En effet, il est estimé que le taux de succès de développement d'un médicament en Oncologie est de 3,4%, le taux le plus bas parmi les principaux domaines thérapeutiques (Wong et al., 2019). En 2012, Adams et al. évoquent même l'expression de « Vallée de la Mort » (ou « *The Valley of Death* ») afin de souligner le faible rendement du processus de développement de nouveaux anticancéreux (Adams, 2012). La sélection d'un nouveau médicament dure entre 10 à 17 ans, depuis l'identification d'une cible thérapeutique potentielle jusqu'à l'approbation finale et l'autorisation de mise sur le marché (Antoszczak et al., 2020). D'autre part, il faudrait un criblage d'environ 10 000 composés candidats pour le développement d'un seul médicament montrant un bénéfice thérapeutique (Wong et al., 2019). En Oncologie, il est estimé qu'entre 10 et 20 nouvelles molécules sont acceptées par la FDA chaque année (Antoszczak et al., 2020). L'ensemble de ces chiffres soulignent notamment des difficultés actuelles à traduire les connaissances biologiques disponibles en thérapies efficaces, notamment dans le domaine de l'Oncologie (Adams, 2012). Même si les chances de succès d'un médicament dépendent de nombreux facteurs financiers et économiques, elles dépendent majoritairement de facteurs de développement scientifique. Notamment, ces derniers comprennent des limites à caractériser la physiologie tumorale, des problèmes de pharmacocinétique, l'utilisation de modèles précliniques peu adaptés et la difficulté à déterminer des doses d'administration lors du transfert clinique (Adams, 2012).

De plus, moins de 10% des médicaments candidats arrivant en phase I seront finalement approuvés pour une mise sur le marché (Wong et al., 2019). Ces échecs lors de la validation clinique sont principalement dus à trois facteurs : (i) un manque d'efficacité thérapeutique dans 57% des cas, (ii) des problèmes de toxicités importantes dans 17% des cas ou (iii) des raisons commerciales notamment liées au manque de moyens financiers (Hwang et al., 2016). Les essais cliniques représentent un coût élevé. De ce fait, il paraît primordial d'optimiser le criblage de médicaments en amont, lors des étapes précliniques, afin de le rendre plus efficace et plus prédictif avec une plus grande capacité de criblage. Ceci

permettrait notamment de sélectionner de manière plus pertinente les composés aux stades précliniques pour réduire le nombre d'échecs observés plus tard lors des essais cliniques (Belfiore et al., 2021). Ce type de démarche s'inscrit dans une stratégie de criblage préclinique à haut débit. Ce dernier permet la sélection de candidats médicaments parmi de larges catalogues de molécules appelés chimiothèques. Cette sélection a pour but d'augmenter les capacités de criblage le plus tôt possible dans la chaîne de développement de médicament de manière à permettre la tri de candidats médicaments idéaux avant d'investir du temps et des ressources supplémentaires dans le développement ultérieur (Belfiore et al., 2021). Elle a pour but principal de limiter le nombre de candidats médicaments peu prometteurs arrivant jusqu'aux essais cliniques. Pour cela, il est nécessaire d'utiliser des modèles précliniques adaptés.

I. 2. Les modèles précliniques

I. 2. a) Les modèles de cultures cellulaires en deux dimensions

La culture cellulaire classique en deux dimensions (2D) a été longtemps et reste encore le modèle simple et standard pour le *screening in vitro* d'efficacité/toxicité de médicaments. Dans le domaine de la recherche fondamentale en oncologie, les cultures 2D sont très souvent issues de lignées cellulaires tumorales de référence. En effet, ces lignées sont relativement accessibles, simples d'utilisation et reproductibles (Duval et al., 2017). Elles recréent les principales caractéristiques intrinsèques des tumeurs et des altérations génomiques similaires à celles retrouvées dans les tumeurs primaires (Ferreira et al., 2013; Wilding and Bodmer, 2014). Plus précisément, elles présentent les mêmes altérations oncogénétiques incluant les mutations somatiques, les profils de méthylation de l'ADN et les anomalies de nombre de copies de gènes (Wilding and Bodmer, 2014). Elles sont facilement amplifiables et reproductibles à grande échelle. Malgré ces avantages, elles présentent certaines limites. Notamment, les conditions de cultures utilisées peuvent altérer leur morphologie et leur profil d'expression génique, entre autres (Ferreira et al., 2013).

Par ailleurs, chez les modèles de cultures cellulaires 2D, les interactions des cellules tumorales avec leur microenvironnement sont très peu représentées. Or, ces interactions ont une influence importante dans la progression cancéreuse incluant l'agressivité, l'invasion et la dissémination métastatique (Mbeunkui and Johann, 2009). Ce microenvironnement comprend divers éléments physiques, chimiques et biologiques autour des cellules cancéreuses tels que des forces mécaniques interstitielles, des gradients de concentrations en différentes molécules biochimiques, des cellules stromales, des cellules immunitaires et des réseaux de vascularisation. Les interactions avec les cellules stromales sont particulièrement importantes

pour le développement tumoral. Ces cellules communiquent de différentes façons avec les cellules cancéreuses par l'intermédiaire de facteurs solubles, d'interactions physiques *via* des molécules d'adhésion ou des interactions de types ligands-récepteur (McMillin et al., 2013). Ainsi, les cultures 2D en conditions statiques sur des supports plats représentent faiblement la complexité des propriétés biologiques tumorales (Jo et al., 2018). De plus, ce manque de complexité crée un fossé de représentation avec les modèles animaux.

I. 2. b) Les modèles animaux

Les essais précliniques *in vivo* sont basés sur l'utilisation de modèles animaux. Notamment, de nombreux modèles de petits rongeurs ont été générés pour développer spontanément des tumeurs à la suite de l'exposition à des agents chimiques mutagènes par voie postnatale, ou induite après infection virale ou bactérienne (Byrne et al., 2017). Ils permettent de fournir de nombreuses informations d'efficacité/toxicité et de chimio-prévention après l'injection de nouveaux composés dans des organismes vivants. Par ailleurs, les modèles les plus utilisés sont les modèles de souris athymiques appelées « *nude* », présentant une immunodéficiência importante grâce à laquelle elles sont incapables de rejeter des greffes de tissus humains. Elles sont utilisées notamment pour des xéno-greffes orthotopiques de cellules de lignées tumorales mélangées à de la Matrice Extracellulaire (MEC) ou directement d'un fragment d'échantillon tumoral provenant d'un patient (*Patient Derived Xenograft* (PDX)) (Byrne et al., 2017). Cependant, même si ces modèles présentent de nombreuses similarités avec l'organisme humain, des différences en biologie cellulaire et génomiques sont bien notables. En effet, ces modèles fournissent un environnement différent de celui pouvant être retrouvé *in vivo* dans le microenvironnement tumoral. De plus, dans le schéma classique de développement des médicaments, un écart de représentation est souvent observé entre les modèles de cultures cellulaires en monocouche et les modèles animaux. De même, de grandes disparités sont présentes entre les données observées sur les modèles animaux et les premiers essais cliniques sur l'Homme (Kunnumakkara et al., 2019). Cela se traduit par de grandes difficultés de transférabilités cliniques de composés à potentiels thérapeutiques, et un fort taux d'échec lors d'essais cliniques de phase I (Kunnumakkara et al., 2019). Pour cela, il y a un réel besoin de développer de nouveaux modèles prédictifs permettant de mieux stratifier la sélection des médicaments dans les étapes précliniques.

La principale limite de l'utilisation de ces modèles animaux est leur incapacité à représenter de manière suffisante le lien existant entre la tumeur et son microenvironnement. De plus, les considérations éthiques liées à ce genre de pratiques sont de plus en plus mises

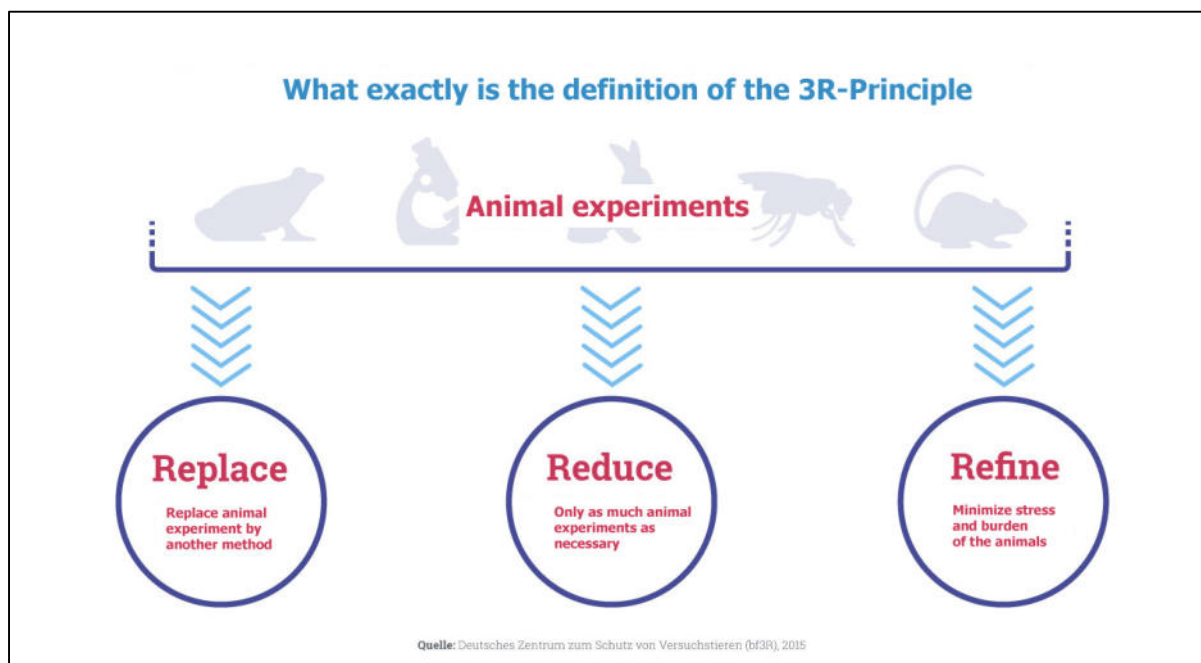


Figure 33 : Représentation schématique du concept des 3R dans l'expérimentation animale. Ce concept implique de Remplacer (*Replace*), Réduire (*Reduce*) et Raffiner (*Refine*) l'utilisation de modèles animaux lors des essais précliniques pour le développement de nouveaux médicaments.
Source : site internet <https://www.tierschutz.uzh.ch/en/about-us/3R-Coordination.html>.

en lumière. A titre d'exemple, le règlement européen numéro EU 1223/2009 a déjà banni totalement les tests sur animaux pour le développement de produits cosmétiques (Sneddon et al., 2017). Pour le développement de médicaments, l'usage des animaux est de plus en plus contrôlé, régulé et soumis à de nombreuses normes afin de répondre à ces exigences portées sur l'éthique. Ces contrôles sont principalement basés sur le concept des 3R établi par Russell et Burch en 1959 (Russel and Burch, 1959). Ce concept a servi de référence pour la législation et les procédures concernant l'expérimentation animale (Tannenbaum and Bennett, 2015). Il associe trois actions permettant de réguler l'utilisation de modèles animaux, c'est à dire (i) le Remplacement, (ii) la Réduction et (iii) le Raffinement (Tannenbaum and Bennett, 2015) (Figure 33). Le Remplacement implique l'adoption de modèles alternatifs au lieu de modèles animaux si ces modèles suffisent à répondre à la question scientifique. La Réduction consiste à minimiser autant que possible le nombre d'animaux utilisés dans l'expérience. Enfin, le Raffinement implique à la fois de réduire l'invasivité des techniques utilisées sur l'animal tout en améliorant sa santé et son bien-être durant le processus d'expérience (Tannenbaum and Bennett, 2015).

Dans ce cadre, de nombreux efforts sont apportés collectivement pour développer des modèles alternatifs de micro-tissus dans le but de représenter au mieux de manière *in vitro* la physiologie retrouvée *in vivo*. C'est notamment le cas des modèles de cultures cellulaires en trois dimensions (cultures 3D).

I. 3. La culture cellulaire en trois dimensions

Les modèles de culture cellulaires 3D sont définis comme des cultures de cellules permettant de recréer de manière artificielle les interactions entre les cellules et des constituants de leur microenvironnement, afin de mimer les conditions *in vivo* d'un micro-tissu. Ils sont utilisés depuis le début du XX^{ème} siècle mais ont été introduits en tant que modèle dans le début des années 1980. En effet, en 1982, Mina Bissel a démontré l'importance de la Matrice Extracellulaire (MEC) pour modéliser *in vitro* des structures acineuses représentant des tissus mammaires sains ou cancéreux (Bissell et al., 1982). Les modèles de culture 3D ont été utilisés à une échelle réduite pendant longtemps, en raison des difficultés techniques de leur production. Cependant, au cours de la dernière décennie, des progrès technologiques ont permis leur utilisation comme outils de choix en Recherche, afin de mieux comprendre la maladie tumorale (Langhans, 2018). De manière générale, les modèles de cultures cellulaires 3D représentent efficacement le microenvironnement tumoral. Ils permettent de recréer les interactions entre les cellules et la MEC influençant leur morphologie, ainsi que leur comportement et leur profil d'expression génique (Langhans, 2018). En effet, les interactions

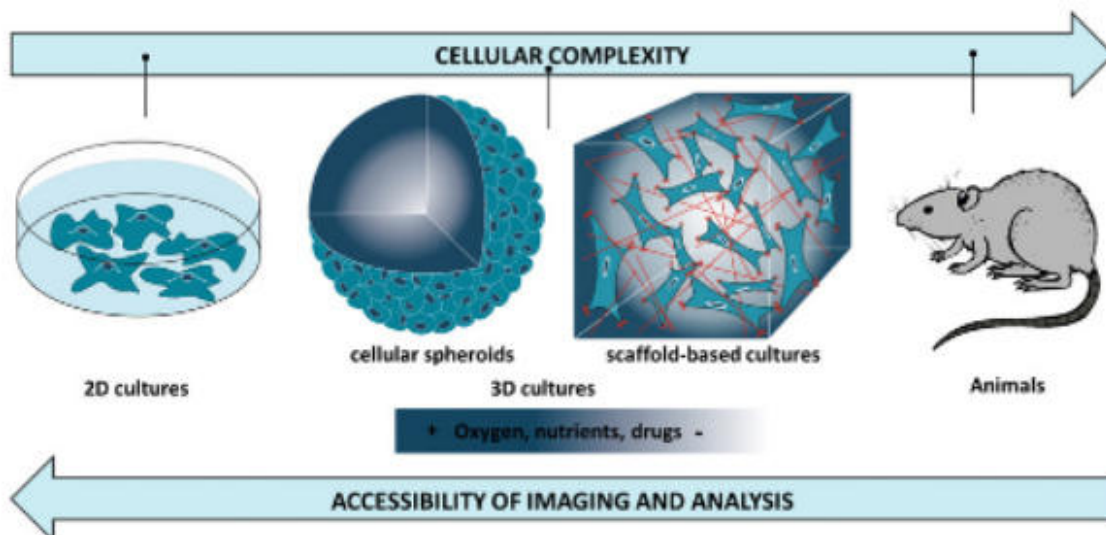


Figure 34 : Position des modèles de culture cellulaire en trois dimensions (3D) dans les essais précliniques.

Les modèles de cultures cellulaires 3D permettent de recréer de manière plus précise les conditions du microenvironnement tissulaire que les modèles conventionnels en deux dimensions. Ils sont par ailleurs moins complets que les modèles animaux pour mimer les conditions physiologiques in vivo mais plus accessibles, plus facilement analysable et adaptés au criblage à haut débit. De ce fait, les cultures cellulaires 3D peuvent être pertinemment être intégrés dans les essais précliniques, comblant le fossé existant entre les cultures 2D et les modèles animaux. Source : Alemany-Ribes, M.; Semino, C.E. Bioengineering 3D Environments for Cancer Models. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2014, 79–80, 40–49, doi:10.1016/j.addr.2014.06.004.

cellules-cellules et cellules-matrice tridimensionnelles influencent la structure cellulaire, l'adhésion, la mécano-transduction et la signalisation intracellulaire en réponse à différents facteurs solubles, régulant ainsi de nombreuses fonctions cellulaires (Drost and Clevers, 2018).

Les derniers progrès apportés aux techniques de formation de cultures 3D ont principalement eu pour objectif de les intégrer dans des processus de criblage de médicaments à grande échelle en tant qu'outils prédictifs. En effet, ils peuvent contribuer à améliorer ce processus en permettant de réduire considérablement le nombre d'animaux dans les essais précliniques. D'autre part, ils permettent d'évaluer le potentiel d'un grand nombre de composés sur des modèles multicellulaires le plus tôt possible dans le processus de développement des médicaments. Cependant, leur principal intérêt est de réduire le fossé existant entre les modèles classiques de cultures cellulaires 2D en monocouche et les modèles animaux (Figure 34). Il s'agit de modèles plus complets et plus représentatifs de la physiologie tumorale que les cultures cellulaires classiques, et plus facilement productibles et utilisables à grande échelle que les modèles animaux (Alemany-Ribes and Semino, 2014). De plus, ils présentent un grand intérêt économique permettant d'éliminer précocement les candidats médicaments les moins pertinents, ainsi que de prédire leur efficacité et leur distribution tissulaire.

Les modèles de culture cellulaire 3D sont plus prédictifs de la réponse aux traitements que les modèles conventionnels 2D. En effet, il a été observé pour un grand nombre de composés, une perte d'efficacité thérapeutique dans les cultures 3D, notamment en raison de l'installation d'un gradient de pH ou des difficultés de la molécule à pénétrer dans les couches cellulaires (Dhiman et al., 2005). Cela souligne l'intérêt d'utiliser ce type de modèles, pour le « *screening* » à grande échelle.

Il existe une grande variété de modèles de cultures cellulaires 3D associée à des différentes terminologie précises. Les modèles les plus couramment utilisés sont les **sphéroïdes tumoraux multicellulaires**. Ces modèles sont formés à partir de suspensions de cellules tumorales (lignées tumorales) cultivées dans des conditions variées de non-adhérence à un support, principalement dans un milieu de culture supplémentés en sérum de veau fœtal (SVF) (Larsen, 2018; Weiswald et al., 2015), ou plus récemment dans des milieux de culture synthétiques (Dubois et al., 2019a). Le principal intérêt de ces sphéroïdes multicellulaires est leur applicabilité à un grand nombre de types cellulaires, même si certaines lignées tumorales ne permettent pas l'obtention d'agrégats compacts.

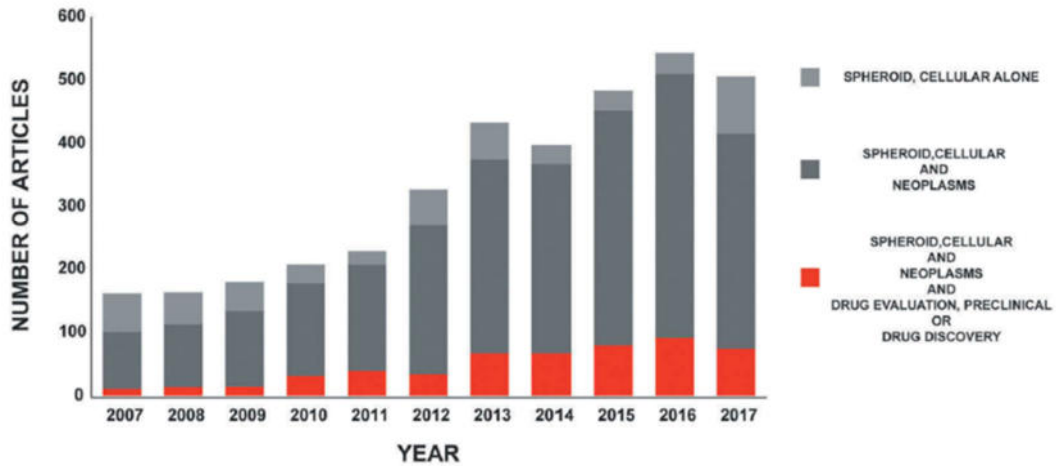


Figure 35 : Intérêt grandissant pour l'utilisation de sphéroïdes dans la Recherche contre le cancer. Ce graphique présente le nombre d'articles publiés chaque année et retrouvés sur la base données Pubmed en cherchant le mot clé « *Spheroid* » associé à « *Cellular* » uniquement (en gris clair), en cherchant « *Spheroid* » associé à « *Cellular* » et « *Neoplasms* » ou en cherchant « *Spheroid* » associé à « *Cellular* », « *Neoplasms* » et « *Drug Evaluation, Preclinical* » ou « *Drug Discovery* » (en rouge). Source : Zanoni, M.; Pignatta, S.; Arienti, C.; Bonafè, M.; Tesei, A. Anticancer Drug Discovery Using Multicellular Tumor Spheroid Models. Expert Opin Drug Discov 2019, 14, 289–301, doi:10.1080/17460441.2019.1570129.

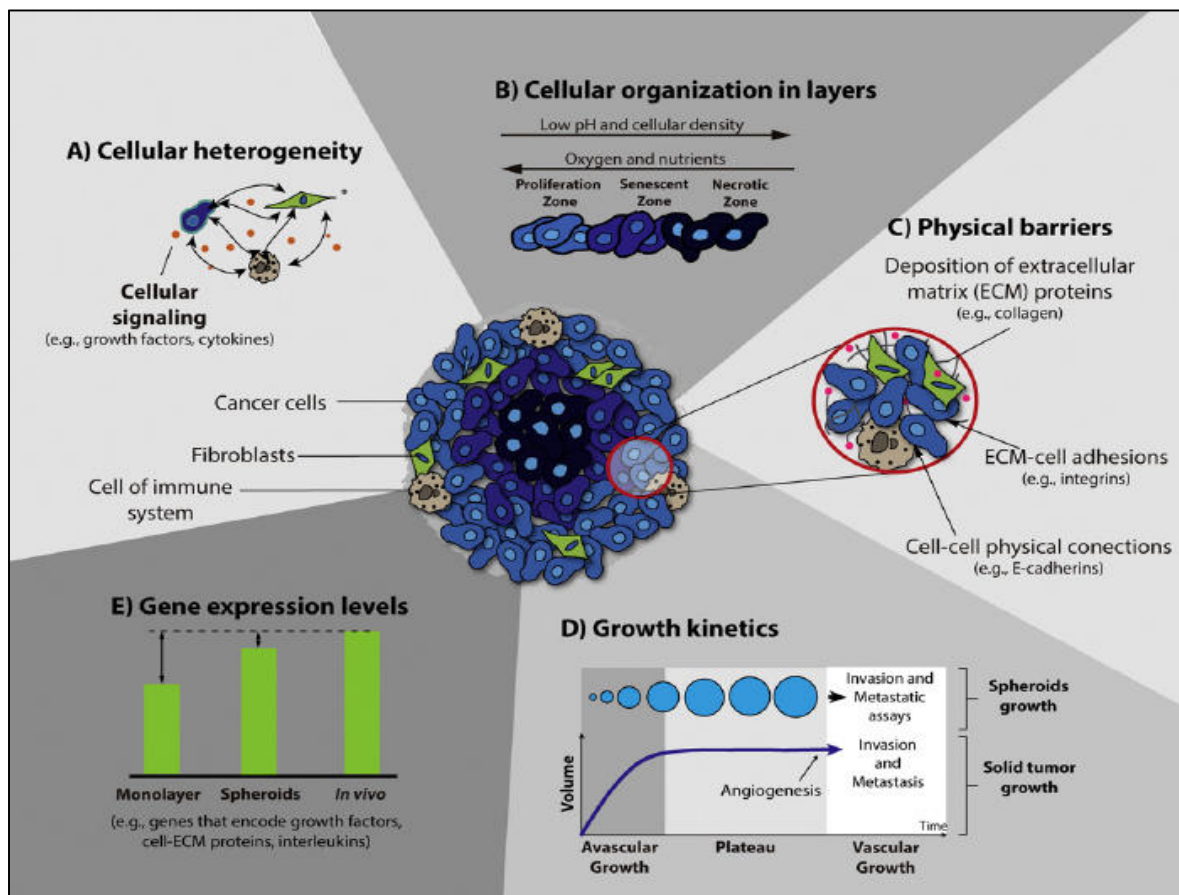


Figure 36 : Représentation des principales caractéristiques d'un sphéroïde. Les sphéroïdes présentent (A) une grande hétérogénéité cellulaire nécessaire pour mimer les communications intercellulaires, (B) une organisation en plusieurs couches permise grâce à (C) la forte adhésion des cellules entre elles, (D) une cinétique de croissance comparable aux tumeurs avasculaires et (E) un profil d'expression génique proche de la physiologie tumorale observée *in vivo*. Source : Costa et al. : 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. Biotechnol Advances -2016.

Dans le cadre de nos travaux, notre groupe de Recherche a développé des modèles de sphéroïdes tumoraux multicellulaires à partir de différentes lignées de CSTN (Dubois et al., 2017, 2019b). Notamment, la culture de ces sphéroïdes a été optimisée par l'utilisation d'un milieu de culture synthétique OptiPASS®, c'est-à-dire sans supplémentation avec un sérum d'origine animale (Dubois et al., 2019a). Ce développement a permis l'obtention de sphéroïdes hautement reproductibles et une amélioration de la prolifération cellulaire, en comparaison de la culture dans un milieu supplémenté en SVF (Dubois et al., 2019a).

II. Utilisation des sphéroïdes pour modéliser le Cancer du Sein Triple Négatif

Les sphéroïdes multicellulaires représentent le modèle 3D le plus polyvalent et le plus exploité. Ces agrégats cellulaires de petite taille peuvent être utilisés pour modéliser différents types de tissus. Aujourd'hui, il s'agit du modèle de référence pour modéliser des microrégions tumorales avasculaires (Zanoni et al., 2019). Durant les quinze dernières années, un véritable engouement est apparu pour l'utilisation de ces modèles dans le cadre du développement de médicaments anticancéreux soulignant ainsi leur grand intérêt dans ce domaine (Figure 35) (Zanoni et al., 2019).

II. 1. Le sphéroïde, un modèle *in vitro* de microtumeurs avasculaires

II. 1. a) *Mimétisme de l'organisation d'une microrégion tumorale avasculaire*

Les sphéroïdes présentant une taille appropriée (en général supérieure à 500 µm) présentent différentes aires ou couches spécifiques, chacune d'elles étant impliquée pour récapituler la complexité originale du tissu tumoral, et plus précisément de microrégions tumorales avasculaires.

En effet, l'organisation spontanée et la forte cohésion intercellulaire permet une organisation de la masse tumorale avec une hétérogénéité cellulaire relativement importante. Cette dernière permet la communication intercellulaire essentielle au développement tumoral sous la forme de molécules solubles et/ou par contact direct entre les cellules (Figure 36A) (Costa et al., 2014). Ceci est permis par l'importante promiscuité existant entre les cellules et par leur organisation en différentes couches avec des différences d'accès aux éléments extérieurs (Figure 36B) (Costa et al., 2016; Nunes et al., 2019a). Notamment, les zones périphériques représentent le front de prolifération tumoral grâce à un accès privilégié à l'oxygène et aux nutriments. Plus en profondeur au sein de la masse cellulaire, les zones intermédiaires sont majoritairement composées de cellules quiescentes et sénescents (Costa

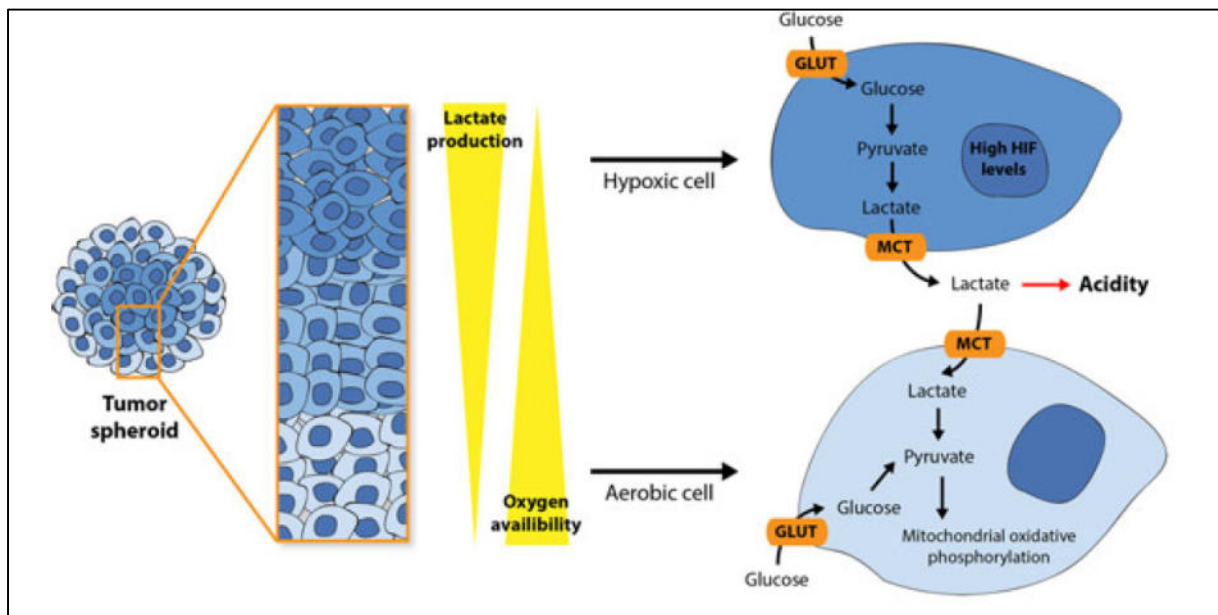


Figure 37 : Changements métaboliques observés dans des modèles de sphéroïdes tumoraux.

La forte densité cellulaire comprise dans les modèles de sphéroïdes permet la mise en place d'un gradient croissant d'accès à l'oxygène du centre vers la périphérie du sphéroïde. Ce gradient est à l'origine de changement de métabolisme cellulaire passant d'une chaîne respiratoire de phosphorylation oxydative pour les cellules périphériques à une glycolyse anaérobie chez les cellules des couches internes hypoxiques. Ce second métabolisme génère des lactates acidifiant le microenvironnement cellulaire expliquant les disparités de pH au sein du sphéroïde. Source : Nunes, A.S.; Barros, A.S.; Costa, E.C.; Moreira, A.F.; Correia, I.J. 3D Tumor Spheroids as in Vitro Models to Mimic in Vivo Human Solid Tumors Resistance to Therapeutic Drugs. *Biotechnol. Bioeng.* 2019, 116, 206–226, doi:10.1002/bit.26845.

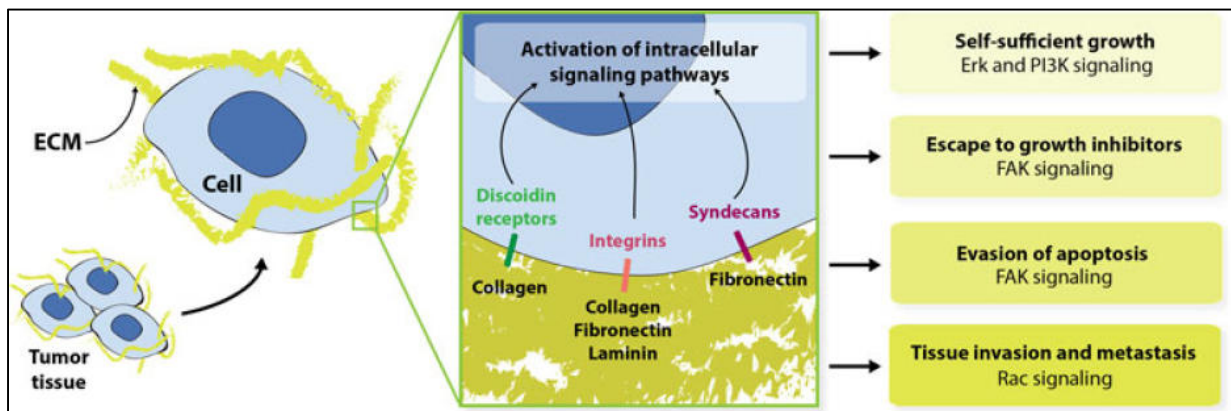


Figure 38 : Les interactions existantes entre les composants de la matrice extracellulaire (MEC) et les cellules cancéreuses au sein du tissu tumoral et recrées dans les modèles de sphéroïdes.

Dans le tissu tumoral, les constituants de la MEC (par exemple le collagène, la fibronectine et la laminine) interagissent directement avec des récepteurs membranaires (notamment des récepteurs à domaine discoïdine, des intégrines ou des syndécans). Cette communication permet l'activation de voies de signalisation intracellulaire impliquées dans la prolifération, l'échappement à l'apoptose et la capacité d'invasion tissulaire. Source : Nunes, A.S.; Barros, A.S.; Costa, E.C.; Moreira, A.F.; Correia, I.J. 3D Tumor Spheroids as in Vitro Models to Mimic in Vivo Human Solid Tumors Resistance to Therapeutic Drugs. *Biotechnol. Bioeng.* 2019, 116, 206–226, doi:10.1002/bit.26845.

et al., 2016; Nunes et al., 2019a). Enfin, le cœur central du sphéroïde présente une forte proportion de cellules apoptotiques/nécrotiques en raison d'un accès limité aux nutriments et à l'oxygène (Costa et al., 2016; Nunes et al., 2019a).

Les zones internes comportent une faible concentration en oxygène contraignant les cellules à réaliser un changement métabolique en passant d'une phosphorylation oxydative à une glycolyse anaérobie (Figure 37) (Costa et al., 2016; Nunes et al., 2019a). Cette capacité des cellules tumorales à consommer du glucose en absence d'oxygène est connue sous le nom d'effet de Warburg. Il engendre une forte activité de glycolyse assurant la conversion de pyruvate en lactate, suivie d'une fermentation d'acide lactique, générant ainsi de l'énergie pour la cellule cancéreuse (Warburg et al., 1927). L'accumulation de lactates dans les zones internes conduit à une acidification du microenvironnement (Costa et al., 2016; Nunes et al., 2019a). La mise en place de ces gradients est responsable du faible indice de prolifération des cellules présentes dans les couches internes (Nunes et al., 2019a). Toutes ces caractéristiques permettent de modéliser la biologie tumorale de microrégions non vascularisées. Notamment, les couches externes prolifératives représentent les cellules proches des vaisseaux sanguins, responsables de la progression de la maladie en recrutant la néo-angiogenèse (Costa et al., 2016; Nunes et al., 2019a). Les cellules des couches internes représentent des micro-zones hypoxiques ou anoxiques, moins prolifératives mais moins exposées aux facteurs exogènes et responsables de la résistance tumorale.

La formation d'agrégats cellulaires denses est influencée par différents mécanismes cellulaires. Notamment, l'adhésion entre les cellules est permise par l'E-cadhérine, des protéines de desmosomes DSG2 et DSC2 et des jonctions serrées (Saias et al., 2015) (Figure 36C). Au contraire, la tension exercée par le cytosquelette et les chaînes de myosine s'opposent à l'agrégation spontanée des cellules (Saias et al., 2015). De ce fait, les cellules sécrètent des protéoglycanes et des protéines de la MEC tels que le collagène, la fibronectine, des ténaescines et de la laminine afin de favoriser la compaction cellulaire. Plusieurs études ont démontré que les sphéroïdes présentent une augmentation de la sécrétion de protéines de la MEC tumorale, en comparaison des modèles de cultures cellulaires 2D (Bjerkvig et al., 1989; Longati et al., 2013; Yeon et al., 2013). Ces fortes interactions potentialisent la densité et la compaction des sphéroïdes, augmentant ainsi les forces de cisaillement internes (Zanoni et al., 2019). De plus, les interactions directes entre les protéines matricielles et les récepteurs présents à la surface des cellules tumorales permettent l'activation de voies de signalisation intracellulaires impliquées dans la prolifération cellulaire, l'échappement à l'apoptose et les capacités cancéreuses d'invasion et de dissémination métastatique (Figure 38) (Nunes et al.,

2019a). Ces interactions se font majoritairement avec des récepteurs à domaine discoïdine, des intégrines ou des syndécanes présents à la surface cellulaire.

D'autre part, les sphéroïdes miment la cinétique de croissance des tumeurs solides avasculaires (Figure 36D). Cette cinétique de croissance peut être résumée en deux phases principales. Tout d'abord, une phase initiale de croissance exponentielle est observée correspondant à la croissance avasculaire tumorale (Ward and King, 1999). Après cela, la prolifération cellulaire est maintenue à l'état de dormance en attendant le début de la phase de formation de nouveaux vaisseaux (néo-angiogenèse), après l'induction et le recrutement de facteurs pro-angiogéniques (Roose et al., 2007; Ward and King, 1999). Ainsi, les sphéroïdes présentent la même cinétique divisée en deux phases, une croissance exponentielle suivie par une stabilisation de la taille (appelée phase de plateau) (Zanoni et al., 2016). Durant cette seconde phase, la compaction cellulaire est fortement renforcée. Celle-ci est essentielle pour la structure complexe et l'organisation cellulaire à l'intérieur du sphéroïde, en différentes couches (Zanoni et al., 2016).

Enfin, les profils d'expression géniques des cellules présentes au sein de sphéroïdes sont plus proches de ceux retrouvés dans les tumeurs que pour des modèles de culture 2D (Figure 36E). En effet, le profil d'expression génique cellulaire est fortement influencé par l'organisation tridimensionnelle des cellules. En 2005, Ghosh et al. ont analysé et comparé les profils d'expression de 179 gènes codant pour des chimiokines, des facteurs pro-angiogéniques et des molécules impliquées dans l'adhésion cellulaire dans des cultures de cellules de mélanomes, cultivées en 2D ou en sphéroïdes 3D (Ghosh et al., 2005). Les résultats ont clairement montré une forte corrélation entre les gènes surexprimés dans les tumeurs et ceux des modèles de sphéroïdes. Au contraire, de nombreuses discordances ont été révélées avec celles exprimées dans les modèles cultivés en monocouche. Par ailleurs, les gènes surexprimés dans les sphéroïdes jouent souvent un rôle essentiel dans la progression tumorale et la dissémination métastatique. Des résultats similaires ont été observés pour des sphéroïdes de cellules de cancer colorectaux (Luca et al., 2013), hépatiques (Chang and Hughes-Fulford, 2009) ou de mésothéliomes (Kim et al., 2012).

II. 1. b) Modélisation de la résistance tumorale au traitement

Les modèles de sphéroïdes présentent des différences de réponse aux traitements en comparaison avec les modèles de cultures cellulaires 2D. Notamment, ils présentent une sensibilité plus faible vis-à-vis des anticancéreux que celle des modèles en monocouche (Costa et al., 2016). En effet, la viabilité cellulaire est nettement inférieure après traitement par thérapies ciblées ou chimiothérapies conventionnelles sur des modèles 2D que sur des

modèles de sphéroïdes (Imamura et al., 2015; Muguruma et al., 2020). Par exemple, des études de cytotoxicité menées sur des cellules de lignées de cancer de la prostate présentent une réponse à la doxorubicine plus faible sur des modèles de sphéroïdes avec une IC50 de 104,8 μM par rapport à la réponse de cultures cellulaires 2D avec une IC50 à 46,3 μM (Barros et al., 2018). La structure architecturale des sphéroïdes est responsable de leur réponse réduite aux médicaments comparée aux modèles de culture 2D. Différentes caractéristiques des sphéroïdes permettent d'expliquer ce phénomène.

Premièrement, la forte densité cellulaire et les interactions avec la MEC forment une barrière physique naturelle empêchant la pénétration et la distribution de thérapeutiques dans les couches internes du sphéroïde (Nunes et al., 2019a). Ceci limite notamment, l'action des médicaments ne pouvant accéder à leur cible thérapeutique.

De plus, la faible concentration en oxygène peut directement affecter l'efficacité de certains traitements, notamment le cisplatine ou la doxorubicine. Ceci est notamment causé par une diminution de production des ROS qui en conditions de normoxie occasionnent des cassures de l'ADN, potentialisant ainsi l'effet thérapeutique. D'autre part, l'hypoxie régnant à l'intérieur du sphéroïde permet une surexpression du facteur HIF-1 alpha, menant à l'activation de différentes voies de signalisation impliquées dans la résistance tumorale. Par exemple, l'hypoxie générée à l'intérieur des sphéroïdes confère une résistance cellulaire au Paclitaxel. En effet, la diminution de la pression en oxygène induit l'entrée de plusieurs cellules en phase G0, responsable de l'inefficacité d'agents chimiothérapeutiques actifs sur le cycle cellulaire (Imamura et al., 2015). Les zones internes renferment ainsi des cellules en dormance responsables de la résistance tumorale. D'autre part, les conditions hypoxiques augmentent l'expression de gènes impliqués dans les systèmes de réparation de l'ADN (Riffle et al., 2017). Notamment, il a été démontré que l'hypoxie entraîne une augmentation de l'expression de BRCA1 dans des couches internes de sphéroïdes de cancer de la prostate (Mathews et al., 2011). L'augmentation de l'activité de ces systèmes de réparation augmente la résistance des cellules aux traitements génotoxiques générant des cassures de l'ADN (Li et al., 2021). De plus, le facteur HIF-1alpha induit la surexpression de nombreuses protéines MDR et plus particulièrement la P-gp (MDR1) (Nunes et al., 2019b).

De nombreux travaux ont mis en lumière la surexpression de la P-gp et de la BCRP à l'intérieur des sphéroïdes (Breslin and O'Driscoll, 2016; Wartenberg et al., 2005). En 2021, Doublier et al. ont démontré la capacité d'HIF-1alpha, présent dans les couches internes de sphéroïdes de la lignée de cancer du sein MCF-7, à induire une surexpression de la P-gp dans ces modèles (Doublier et al., 2012). Cette augmentation d'expression de la P-gp est

responsable de l'acquisition d'une résistance à la doxorubicine. Ceci a aussi été démontré sur des sphéroïdes de lignées de cancer du sein avec également une expression augmentée de protéines impliquées dans la survie cellulaire (Breslin and O'Driscoll, 2016). De plus, la surexpression de protéines MDR est conjointe à l'augmentation de l'expression de cytochromes P450 responsables de la dégradation des médicaments (Breslin and O'Driscoll, 2016). En parallèle, l'acidité interne des sphéroïdes interfère avec l'efficacité de plusieurs anticancéreux comme le méthotrexate et la vinblastine, modifiant la charge et limitant l'absorption cellulaire de ces composés.

La réponse thérapeutique des modèles de sphéroïdes est également marquée par l'acquisition graduelle d'un phénotype tumoral résistant au sein du sphéroïde. Notamment, des travaux menés sur des sphéroïdes de CSTN ont montré que la mise en place de zones hypoxiques permet l'expression de gènes associés aux cellules souches cancéreuses dont les marqueurs CD133 et Nanog (Ham et al., 2016). De plus ces modèles présentent une surexpression de gènes impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse et la résistance aux traitements comparés aux cultures cellulaires 2D (Huang et al., 2020). Ces caractéristiques font des sphéroïdes multicellulaires un modèle d'intérêt pour prédire la réponse au traitement et assurer au mieux le transfert clinique de composés à potentiel thérapeutique. De plus, il s'agit de modèles pouvant être considérés comme essentiels pour le développement de nouveaux traitements ciblant les mécanismes de résistance tumorale. Cela peut notamment être le cas pour le développement de traitements ciblant les cellules souches tumorales ou la dormance cellulaire (Zanoni et al., 2016).

II. 2. Utilisation des sphéroïdes pour le *screening* de médicaments à grande échelle

Aujourd'hui, les sphéroïdes multicellulaires tumoraux sont des modèles précliniques considérés comme essentiels pour la modélisation de microrégions tumorales avasculaires. Dans ce cadre, ils présentent un très grand potentiel pour le *screening* à grande échelle de nouvelles thérapies anticancéreuses. Notamment le développement de chaînes de criblage de molécules à haut débit (*high through-put screening tests*) est en plein essor à l'heure actuelle et reste l'un des défis majeurs pour la découverte et la validation de nouvelles stratégies de traitement en Oncologie.

Ce développement à grandeur industrielle repose notamment sur l'optimisation de trois axes distincts (Han et al., 2021) :

- i) L'uniformité et la reproductibilité de production des modèles de sphéroïdes
- ii) Les méthodes d'analyse et d'évaluation de l'efficacité/résistance des candidats médicaments
- iii) L'intégration dans une plateforme de criblage à haut débit

II. 2. a) L'uniformité et la reproductibilité de production des modèles de sphéroïde

La structure et la forme des sphéroïdes dépendent principalement de la forme et de l'importance des interactions cellules-cellules et cellules-matrice. De plus, la formation de sphéroïdes dépend de plusieurs facteurs comme (i) le type cellulaire utilisé, (ii) la technique de formation, (iii) le volume de milieu de culture et (iv) la composition du milieu de culture et (v) la concentration cellulaire de départ (Han et al., 2021). Ces différents facteurs peuvent influencer sur la variabilité de taille et de structure des modèles de sphéroïdes et peuvent être optimisés afin de rendre leur production uniforme et reproductible.

A l'heure actuelle, la formation de sphéroïdes a été réalisée avec succès avec plusieurs lignées cellulaires tumorales. Certaines lignées forment spontanément des sphéroïdes compacts comme la lignée de cancer du sein MCF7 (Ivanov and Grabowska, 2017) ou la lignée de cancer gastrique RF-1 (Mayer et al., 2001). Pour d'autres lignées cellulaires, comme la lignée de CSTN MDA-MB-231, il y a une perte naturelle de l'agrégation cellulaire (Ivanov and Grabowska, 2017). Pour ces lignées, il est nécessaire d'ajouter des solutions commerciales de protéines de la MEC, de type Matrigel® ou Geltrex®, afin de favoriser les interactions entre cellules et obtenir des sphéroïdes compacts (Dubois et al., 2017). Les différences observées entre les lignées concernant la formation et la compaction en sphéroïde dépend notamment de leur phénotype. Il a été montré que les cellules avec un phénotype épithélial, exprimant la E-cadhérine, présentent une plus grande facilité à former de manière spontanée un sphéroïde compact. Au contraire, les cellules avec un profil mésenchymateux, exprimant la N-cadhérine, forment plutôt un agrégat cellulaire moins dense (Ivanov and Grabowska, 2017). Ceci souligne la nécessité d'adapter le protocole de formation des sphéroïdes en fonction du phénotype cellulaire.

L'homogénéité des modèles de sphéroïdes et la population cellulaire qu'ils comprennent sont des enjeux importants pour leur développement. Notamment, les modèles de monoculture avec une lignée cellulaire stable permettent de réduire les variations de

comportement des agrégats. De plus, une attention particulière peut être portée afin d'utiliser des milieux de culture avec peu de variations de composition. Notamment, les milieux supplémentés en sérums ou composants d'origine animale peuvent montrer de grandes disparités de composition entre les lots réactifs. Le SVF, largement utilisé en culture cellulaire, a de nombreux inconvénients en termes de qualité et de reproductibilité de composition (van der Valk et al., 2018). De ce fait, l'utilisation d'alternatives avec le développement de milieux de cultures synthétiques avec une formulation standardisée s'avère particulièrement intéressante. Dans ce cadre, notre équipe a développé des modèles de sphéroïdes de CSTN à partir des lignées cellulaires MDA-MB-231 et SUM1315 dans le milieu synthétique OptiPASS® (Dubois et al., 2019a). Ces travaux ont clairement montré une optimisation de la croissance et de la viabilité des modèles de sphéroïdes en comparaison des milieux de culture classiques supplémentés en SVF (Dubois et al., 2019a). De plus, le milieu OptiPASS® a permis une prolongation du temps de culture permettant d'allonger le temps des expériences sur ces modèles précliniques (Dubois et al., 2019a).

Le choix de la technique de formation de sphéroïde est également un paramètre essentiel afin d'optimiser la reproductibilité des modèles. La technique de *Liquid Overlay* est facilement automatisable et intégrable dans une chaîne de production et d'analyse à haut débit à l'aide d'automates d'ensemencement et d'analyses cellulaires automatisées (Costa et al., 2018b). De ce fait, il s'agit d'une technique particulièrement pertinente pour la production et l'analyse à haut débit de ces modèles à une échelle industrielle (Costa et al., 2018b; LaBarbera et al., 2012; Zanoni et al., 2019). La possibilité d'uniformiser les modèles de sphéroïdes en termes de forme et de taille permet d'obtenir des résultats reproductibles et robustes. D'autres techniques consistant à contrôler la taille des sphéroïdes en les formant dans des micro-puits peuvent être utilisées (Han et al., 2021). Ces techniques reposent sur la fabrication de puits par impression 3D afin de confiner les cellules dans un espace réduit permettant une fine maîtrise de leur structure (Han et al., 2021).

II. 2. b) Les méthodes d'analyse et d'évaluation de l'efficacité/résistance des candidats médicaments

Après avoir uniformisé la production de sphéroïdes, il est important de définir et d'optimiser les méthodes d'analyses et d'évaluation de ces modèles. Ces méthodes d'analyses peuvent être divisées en deux groupes, l'un permettant d'évaluer les caractéristiques de croissance du sphéroïde, l'autre d'évaluer l'efficacité/résistance par rapport à un traitement (Han et al., 2021).

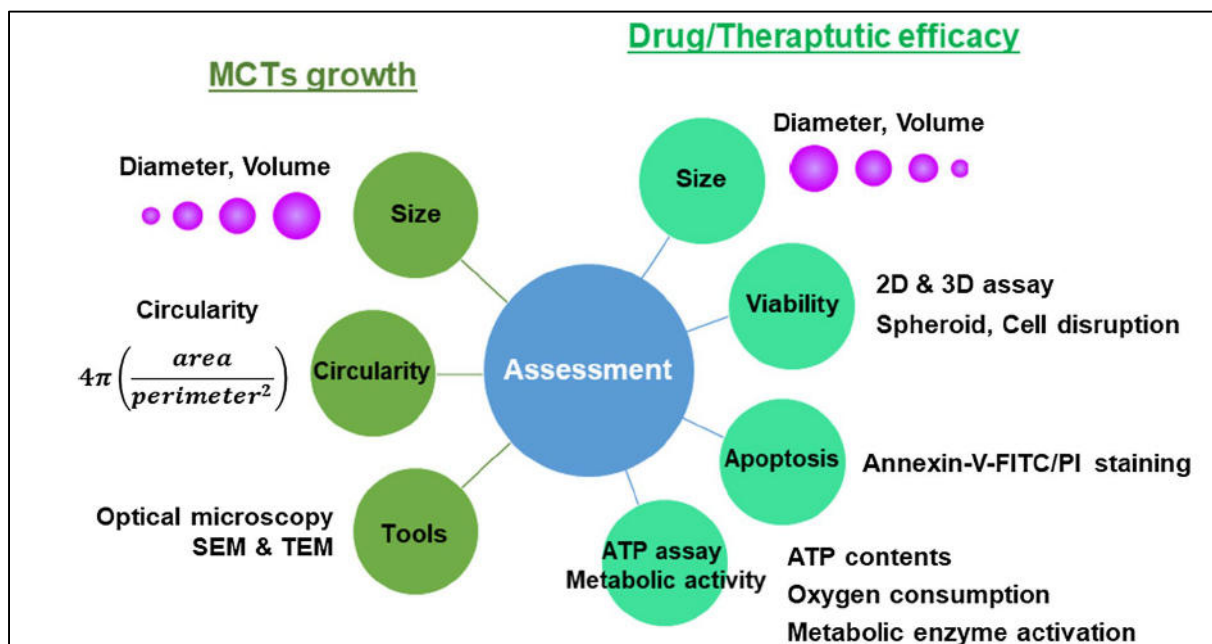


Figure 39 : Paramètres biologiques classiquement étudiés sur les modèles de sphéroïdes dans le cadre du criblage de médicaments à grande échelle.

Les modèles de sphéroïdes peuvent être analysés selon deux principaux objectifs. Le premier objectif est d'évaluer la croissance et la structure des sphéroïdes par détermination de la taille (*size*) et de la circularité (*circularity*), ou à l'aide de techniques de microscopie électronique à balayage (SEM) ou à transmission (TEM). Le second objectif est d'évaluer l'efficacité thérapeutique de médicaments. Pour cela, des changements dans la taille des sphéroïdes, la viabilité cellulaire (*viability*), l'apoptose cellulaire (*apoptosis*) ou l'activité métabolique (*metabolic activity*) sont le plus souvent évalués. Source : Han, S.J.; Kwon, S.; Kim, K.S. Challenges of Applying Multicellular Tumor Spheroids in Preclinical Phase. *Cancer Cell International* 2021, 21, 152, doi:10.1186/s12935-021-01853-8.

| Assay type | Culture model | Cancer cell | Drugs | Readout |
|-----------------------------|---------------|--|--|----------------|
| CellEvent Caspase-3/7 Green | 2D | Prostate cancer (VCaP, LNCaP) | MLN4924 | Spheroid |
| LysoTracker Deep Red | 2D | Prostate cancer (VCaP, LNCaP) | MLN4924 | Spheroid |
| <u>Annexin V-APC</u> | 2D | Breast cancer (MDA-MB-435S, MDAMB-468, MDA-MB-231, SK-BR-3) | - | Disassociation |
| MTT | 2D | Breast cancer (MCF-7) | Tamoxifen | Disassociation |
| LDH | 2D | Breast cancer (MCF-7) | Tamoxifen | Disassociation |
| AlamarBlue | 2D | Lung cancer (H460, A549, H1650) | Cisplatin, Gemcitabine 5-fluorouracil, Camptothecin | Disassociation |
| Live/Dead | 2D | Breast cancer (MCF-7) | Doxorubicin | Spheroid |
| | 2D | Breast cancer (MCF-7) | Doxorubicin | Spheroid |
| | 2D | Breast cancer (MCF-7) | - | Spheroid |
| Cultrex® 3D Colorimetric | 3D | Lung cancer (A549) | 4-HPR-HSA | Spheroid |
| CellTiter-Glo Luminescent | 3D | Glioblastoma (U-87 MG, KNS42) Oral squamous (LICR-LON-HN4) Breast carcinoma (MDA-MB-231) | HSP90 chaperone inhibitor PI3 kinase/mTOR inhibitor PLCg inhibitor | Spheroid |

Figure 40 : Principaux tests commerciaux utilisés pour déterminer l'efficacité de médicaments dans le cadre de criblage à haut débit sur des modèles de sphéroïdes.

Source : Han, S.J.; Kwon, S.; Kim, K.S. Challenges of Applying Multicellular Tumor Spheroids in Preclinical Phase. *Cancer Cell International* 2021, 21, 152, doi:10.1186/s12935-021-01853-8.

L'évaluation des caractéristiques de la croissance des sphéroïdes se fait principalement par mesure de la taille et de la forme à l'aide de méthodes d'imagerie. Dans ce cadre, les techniques de microscopie optique sont souvent utilisées (Han et al., 2021). Ces techniques associées à de l'analyse d'image permettent de calculer le diamètre, le volume et la circularité des agrégats cellulaires et ainsi suivre l'évolution de ces paramètres au cours du temps de culture (Figure 39). Notamment, elles permettent de déterminer la cinétique de croissance des sphéroïdes (Han et al., 2021). Ces analyses peuvent être complétées par de la microscopie électronique à balayage (*Scanning Electronic Microscopy* ou SEM), ou à transmission (*Transmission Electronic Microscopy* ou TEM) (Figure 39) (Dubois et al., 2017; Shichi et al., 2019). La compréhension de la dynamique de croissance des sphéroïdes ainsi que les différents facteurs pouvant l'influencer joue un rôle crucial pour le développement et l'utilisation de ces modèles, notamment pour évaluer l'efficacité de médicaments.

De nombreuses approches permettent d'évaluer l'efficacité de médicaments et la résistance tumorale à celui-ci sur des modèles de sphéroïdes tumoraux. Premièrement, l'approche la plus évidente est d'observer et analyser des changements de taille, de croissance ou de forme des sphéroïdes (Han et al., 2021). Au cours du traitement, l'effet thérapeutique entraîne une rupture des interactions entre les cellules et la MEC en raison de la cytotoxicité entraînant la désagrégation des sphéroïdes (Han et al., 2021). De ce fait, la taille des sphéroïdes décroît au cours du traitement de manière dose-dépendante en cas d'effet cytotoxique induit par le traitement étudié.

Deuxièmement, il existe de nombreuses approches permettant de mesurer la viabilité cellulaire des sphéroïdes et ainsi observer le potentiel effet cytotoxique du traitement étudié (Figures 39 & 40) (Han et al., 2021). Ces tests sont généralement des dosages colorimétriques, luminescents ou fluorescents utilisés déjà depuis plusieurs années sur les modèles de cultures cellulaires 2D (Han et al., 2021). L'un des tests le plus connu est le test de viabilité/mortalité fluorescents (*Live/Dead*[®]) associant la calcéine-AM marquant d'une fluorescence verte les cellules vivantes et de l'iodure de propidium ou bromure d'éthidium marquant d'une fluorescence rouge les noyaux des cellules mortes (Cribbes et al., 2017) (Figure 41). Une autre approche très répandue pour les tests de cytotoxicité consiste à quantifier l'activité métabolique des cellules. Différents dosages existent dont les tests de réduction du Tétrazolium (MTT) ou de la résazurine (ou tests AlamarBlue[®]) (Ivanov et al., 2017) (Figure 42) (Han et al., 2021). Ces tests fournissent des résultats reproductibles, sont faciles à maîtriser et à mettre en place, et permettent une détermination rapide de la viabilité globale du sphéroïde. L'apoptose cellulaire peut aussi être quantifiée par des tests de

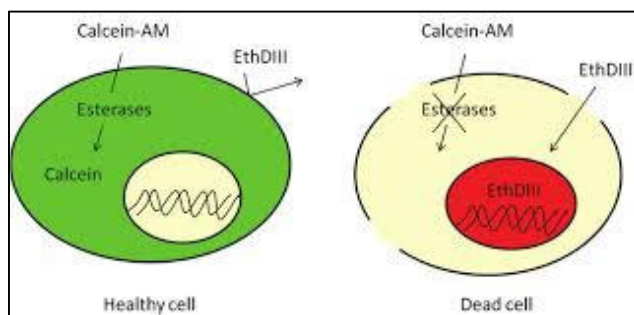


Figure 41 : Principe du test de viabilité cellulaire Live/Dead.

Le tests Live/Dead® combine le marquage cellulaire par deux sondes différentes. La Calcéine-AM est un composé non fluorescent perméable à la membrane cellulaire. Dans les cellules vivantes, elle est clivée par des estérases intracellulaires en Calcéine, un marqueur fluorescent vert. L’Ethidium (EthDIII) est un intercalant de l’ADN non pénétrants dans les cellules vivantes et émettant une fluorescence rouge. Il ne pourra marquer que les noyaux des cellules mortes. Ainsi ce test Live/Dead® associant ces deux marquages permettra de distinguer visuellement les cellules vivantes vertes et les cellules mortes rouges. Source : site internet https://www.ozyme.fr/gammes/btm/pdf/btm_flow_cytometry.pdf

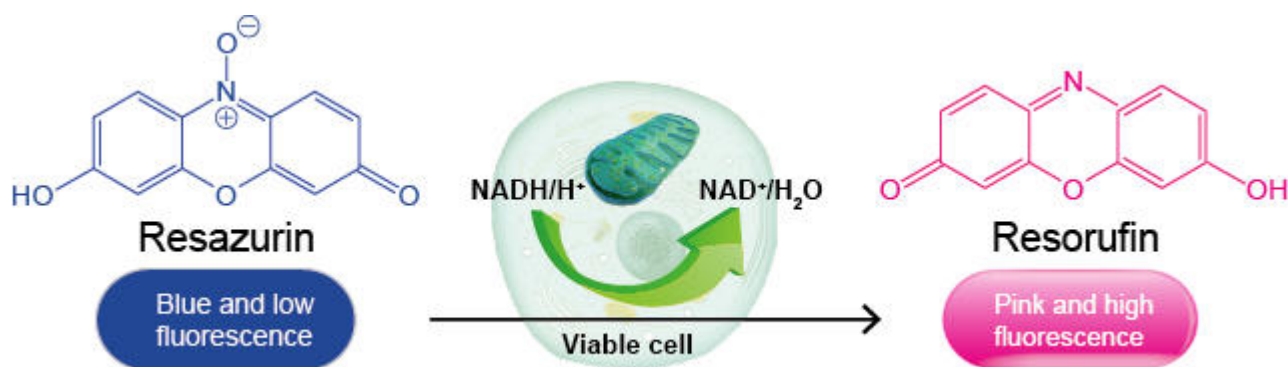


Figure 42 : Principe du test d’activité métabolique à la résazurine.

Le test d’activité métabolique à la résazurine est basée sur une réaction d’oxydo-réduction. En effet, après avoir pénétrée dans les cellules vivantes, la résazurine (bleue et peu fluorescente) est réduite en résorufine (rose et hautement fluorescente) par l’activité métabolique cellulaire. La concentration en résorufine mesurée par colorimétrie ou fluorimétrie est directement proportionnelle à l’activité métabolique cellulaire. Source : <https://www.abpbio.com/product/cell-viability-assay-based-on-metabolic-activity/>

cytométrie en flux combinant les deux marqueurs cellulaires annexine V et iodure de propidium. L'association de ces deux marqueurs permet de quantifier simultanément l'apoptose (à l'aide de l'annexine V) et la nécrose cellulaire (à l'aide de l'iodure de propidium) (Han et al., 2021). Cependant, cette technique nécessite préalablement la dissociation des cellules constituant le sphéroïde de manière à obtenir une suspension de cellules uniques (Han et al., 2021). La dissociation complète du sphéroïde sans altérer la viabilité cellulaire est un point critique pour cette approche et nécessite un protocole adapté, notamment par une dissociation enzymatique à l'Accutase™ (Han et al., 2021).

D'autre part, la viabilité cellulaire peut être quantifiée par mesure directe de la concentration intracellulaire en ATP (Han et al., 2021) (Figure 41). Ce type d'approche rencontre de nombreux soucis techniques liés aux caractéristiques physiques hétérogènes des sphéroïdes, tels que leur taille, leur hétérogénéité cellulaire et les difficultés de pénétration dans les couches internes des agrégats. Pourtant, une méthode adaptée pour les modèles de cultures cellulaires 3D a été développée en optimisant les conditions de lyse cellulaire selon des conditions déterminées de détergents (Fey and Wrzesinski, 2012). L'ATP est classiquement détectée par bioluminescence offrant des mesures suffisamment sensibles.

Il existe de nombreuses autres solutions commerciales permettant de déterminer des paramètres biologiques précis tels que le stress oxydatif ou l'hypoxie cellulaire (*ROS-ID® Hypoxia/Oxidative stress detection kit*) (Mittler et al., 2017). Pour finir, des profils d'expression géniques à grande échelle peuvent aussi être utilisés pour évaluer la réponse de sphéroïdes multicellulaires à différents traitements (Senkowski et al., 2016).

II. 2. c) L'intégration dans une plateforme de criblage à haut débit

Les avancées technologiques récentes ont permis le développement de grandes plateformes de *screening* de médicaments destinées à cribler de grandes gammes de molécules (Han et al., 2021). L'intégration de modèles de sphéroïdes reste encore limitée dans ce genre de structure mais suscite un intérêt grandissant au fil des années. Ceci nécessite notamment la production homogène et rapide de sphéroïdes pour être adaptée au processus de *screening* à haut-débit.

A l'heure actuelle, les systèmes de micro-fluidiques sont considérés comme des outils d'intérêt pour l'ingénierie tissulaire et le criblage de médicaments. Cette technologie consiste en la fabrication de dispositifs miniaturisés incluant de nombreuses chambres reliées entre elles par des réseaux fluidiques (Han et al., 2021). Ces structures géométriques sont conçues à l'aide de micro-puces gravées dans des moules de structure souple et permettent de

reproduire les flux d'entrée des nutriments et de sortie des déchets cellulaires. Ils s'avèrent notamment utiles afin de tester des gradients de concentration en médicaments permettant de balayer rapidement de larges gammes de concentrations (Han et al., 2021). De plus, ces systèmes sont particulièrement adaptés pour tester des combinaisons de traitements permettant de générer simultanément un large éventail de conditions avec différentes doses de plusieurs composés. Ces techniques nécessitent cependant une grande expertise et représentent un coût élevé.

En parallèle, d'importants progrès ont été réalisés pour automatiser l'ensemble du processus de production, de gestion et d'analyse des modèles de sphéroïdes dans le cadre de tests d'évaluation de médicaments. Ces approches ont notamment été développées pour l'utilisation de sphéroïdes maintenus dans des plaques de cultures multi-puits. En effet, de plus en plus de modèles de plaques multi-puits sont développés pour la culture cellulaire 3D. Ces plaques avec un grands nombres de puits (96, 384 ou 1 536 puits) permettent de tester un grand nombre de conditions de traitement différentes (Das et al., 2016). Le développement de chaînes automatisées comprend l'intégralité du processus de production et d'analyse en passant par l'ensemencement des cellules dans les plaques culture, la distribution de différents réactifs, leur maintien dans les conditions de culture appropriées et la gestion de leur analyse aux différents temps de culture (LaBarbera et al., 2012; Monjaret et al., 2016). Ces systèmes automatisés d'analyse permettent notamment de simplifier et d'accélérer les essais précliniques *in vitro* tout en augmentant le nombres de conditions testées. De plus, ces chaînes automatisées intègrent des systèmes de *screening* multiparamétriques (ou *High-Content Screening*) permettant l'évaluation d'un grand nombre de paramètres biologiques. Ceci repose sur différentes techniques d'imagerie, d'immunohistochimie, de tests de viabilité cellulaire et autres tests fonctionnels (Monjaret et al., 2016; Wenzel et al., 2014). Ce type de démarche, actuellement en plein essor, permet l'obtention d'un grand nombre de données, améliorant ainsi la qualité et l'efficacité des essais précliniques *in vitro* et participe ainsi à améliorer le transfert de médicaments en essais cliniques.

III. Les méthodologies de conservation des modèles multicellulaires

La production et l'utilisation à grande échelle de modèles de sphéroïdes nécessitent une gestion spécifique et surtout adaptée à ce type d'outils. Notamment, les stocks de sphéroïdes produits doivent être maîtrisés pour les faire correspondre aux capacités d'analyse possibles par la plateforme de *screening*. D'autre part, l'intérêt porté pour les modèles de

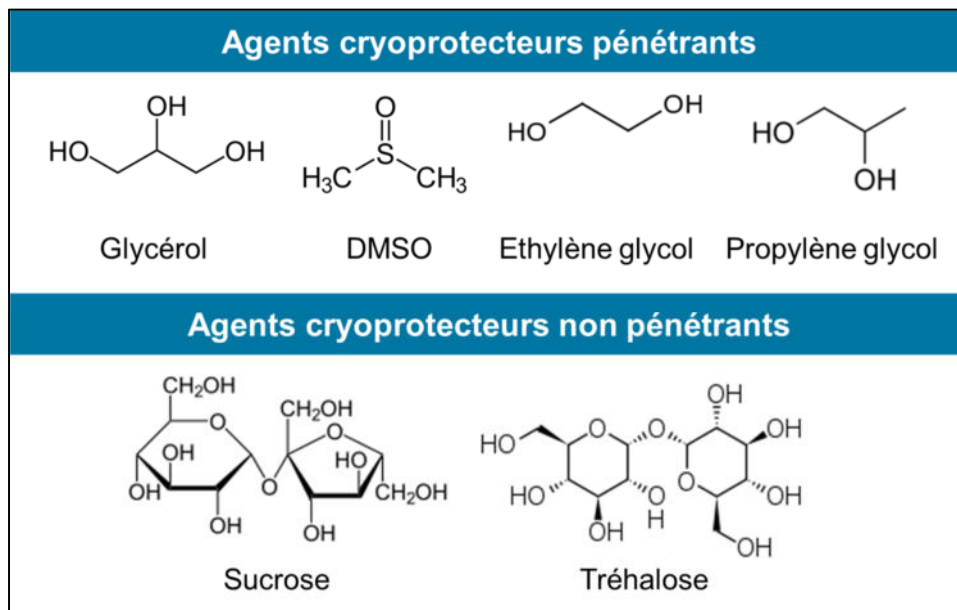


Figure 43 : Structures chimiques des principaux composés utilisés comme agents cryoprotecteurs. Structures chimiques issues du site internet <https://dictionnaire.acadpharm.org>.

sphéroïdes, peut nécessiter leur transport, afin d'assurer leur distribution aux laboratoires exploitant ces modèles. Dans ce cadre, le développement de méthodes permettant de conserver des modèles de sphéroïdes peut présenter un réel intérêt.

III. 1. Les techniques classiques de cryoconservation

La cryoconservation a été longtemps et reste encore la technique de référence pour conserver des échantillons biologiques à long terme. Elle consiste à conserver à très basse température les échantillons afin de stopper tout processus biologique pouvant entraîner leur modification ou dégradation (Trounson, 1990). Dans la plupart des cas, la conservation se fait à -196°C , dans de l'azote liquide, permettant de stopper tout phénomène biologique (Dalman et al., 2017). Elle peut également se faire à des températures moins basses de -80°C .

Le défi majeur que représentent ces techniques de cryoconservation est d'augmenter considérablement la résistance au froid de l'échantillon cellulaire. Cette dernière implique de limiter autant que possible la cristallisation de l'eau, à l'extérieur et à l'intérieur de la cellule, pouvant être à l'origine de lésions mécaniques (Levi-Setti et al., 2016). D'autre part, les techniques de cryopréservation visent à limiter les chocs thermiques pouvant intervenir aux moments de la congélation et de la décongélation, notamment à des températures proches du point de congélation (Dalman et al., 2017). Les chocs thermiques se produisent généralement lors d'un refroidissement trop brusque et peuvent entraîner diverses lésions cellulaires. Il peut s'agir notamment de contractions et de déchirements des composants membranaires, de fractures mécaniques ou de changements de conformations de la topographie membranaire (Levi-Setti et al., 2016). De ce fait, différents stratagèmes peuvent être utilisés afin d'atténuer les chocs thermiques, comme (i) ralentir la vitesse de refroidissement, (ii) exposer préalablement l'échantillon à des concentrations élevées en sel ou (iii) utiliser des agents cryoprotecteurs (Levi-Setti et al., 2016).

Les agents cryoprotecteurs sont des molécules permettant d'abaisser la valeur du point de congélation tout en augmentant la viscosité des milieux intra- et extracellulaire. Ainsi, au lieu de cristalliser, le milieu se solidifie de manière homogène donnant un aspect vitreux. Deux types d'agents cryoprotecteurs se distinguent : (i) les cryoprotecteurs pénétrants et (ii) les cryoprotecteurs non pénétrants (Levi-Setti et al., 2016) (Figure 43). Les premiers sont capables de pénétrer dans le cytoplasme de la cellule et préserver les structures intracellulaires par protection mécanique et biochimique. Leur rôle est de remplacer l'eau intracellulaire de manière à limiter la formation de cristaux et l'augmentation de concentration en sels (Levi-Setti et al., 2016). Il s'agit généralement de petites molécules solubles telles que

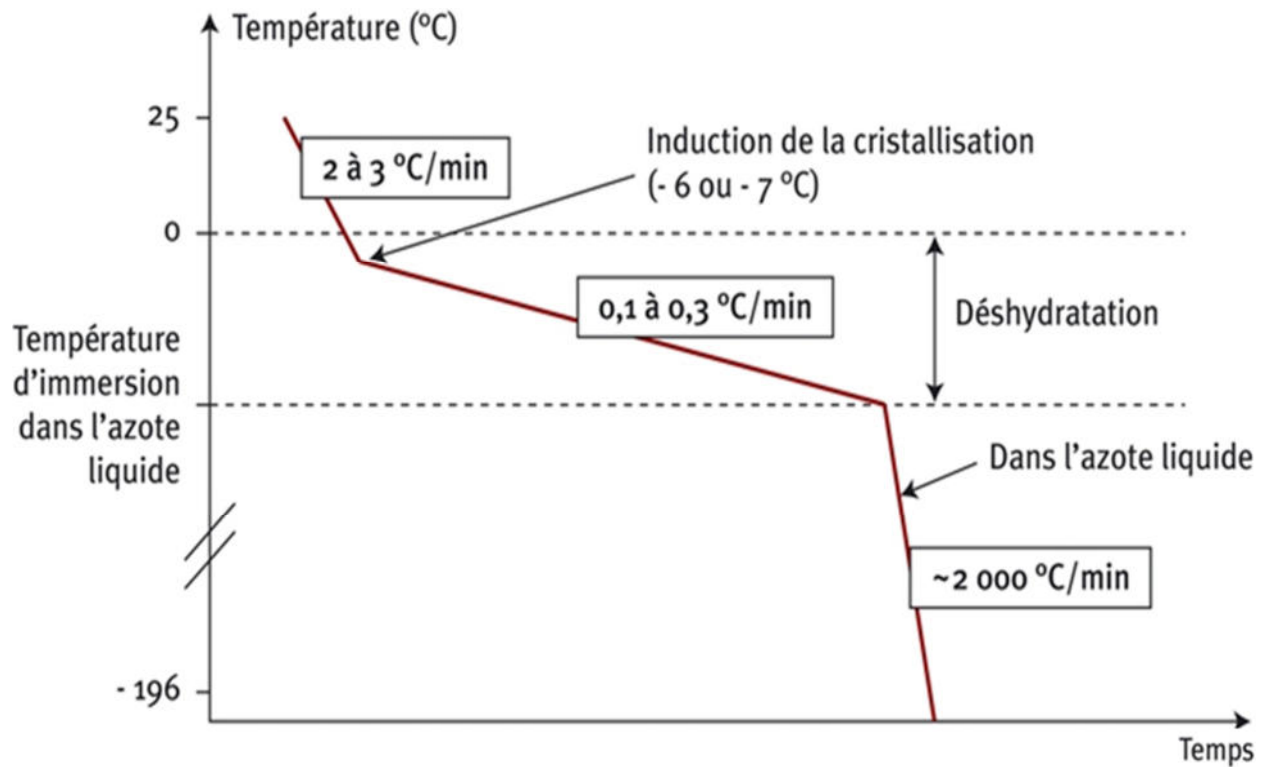


Figure 44 : Vitesse de refroidissement des échantillons biologiques cryopréservés par la technique de congélation lente. Les échantillons sont progressivement exposés à des températures décroissantes jusqu'à -6 °C ou -7 °C à une vitesse de descente de température de 2 à 3 °C/minute. Par la suite, la chute des températures est contrôlée de manière plus fine, à une vitesse de 0,1 à 0,3 °C/minute, jusqu'à solidification complète des échantillons. Pour finir, les échantillons sont ensuite plongés dans l'azote liquide (température de -196 °C).

Source : https://mediatheque.ifce.fr/doc_num.php?explnum_id=24073.

le glycérol, le diméthylsulfoxyde (DMSO), l'éthylène glycol ou le propylène glycol (Figure 43) (Levi-Setti et al., 2016). Cependant il s'agit de composés présentant une grande toxicité cellulaire qui nécessitent des manipulations particulières pour réduire le temps d'exposition des cellules avec l'agent à l'état liquide (Kang et al., 2017). Ces cryoprotecteurs pénétrants sont souvent utilisés en association avec des agents non pénétrants permettant ainsi de limiter la cristallisation du milieu extracellulaire et la déshydratation cellulaire. Les agents non pénétrants sont généralement de grosses molécules. Par exemple, des macromolécules tel que le ficoll, ou des sucres tels que le sucrose ou le tréhalose sont classiquement utilisés (Figure 43) (Levi-Setti et al., 2016). Ces agents présentent une toxicité cellulaire moindre mais doivent forcément être utilisés en parallèle d'agents pénétrants, afin de protéger le milieu intracellulaire (Levi-Setti et al., 2016).

Il existe différentes techniques de cryoconservation d'échantillons biologiques qui se distinguent principalement par leur vitesse de congélation (Levi-Setti et al., 2016). La technique utilisée depuis le plus longtemps est la congélation lente qui consiste à ralentir la vitesse de descente en température de l'ordre de 0,1 à 0,3 °C par minute, entre le point d'induction de la cristallisation et le moment où l'échantillon sera plongé dans l'azote liquide (Figure 44) (Levi-Setti et al., 2016). Cette diminution progressive de température permet de limiter la déshydratation de l'échantillon lors du passage dans la zone critique située entre -7 °C et -30 °C. Il s'agit d'une technique relativement simple mais longue à mettre en place (Levi-Setti et al., 2016). De plus, elle nécessite le plus souvent l'utilisation d'un appareil de congélation programmable afin de maîtriser la cinétique de congélation.

Depuis les années 2000, une autre technique de cryoconservation a été développée afin de réduire la formation de cristaux d'eau, appelée la vitrification. Cette technique consiste à diminuer le plus rapidement possible la température de l'échantillon en le plongeant directement dans l'azote liquide. Ainsi, l'eau présente dans les milieux extra- et intracellulaires n'a pas le temps de cristalliser et fige l'échantillon sans lésions mécaniques (Levi-Setti et al., 2016). Ceci crée un grand risque de déshydratation de l'échantillon et nécessite donc une utilisation d'agents cryoprotecteurs à des concentrations beaucoup plus importantes que les techniques de congélation lente. La technique de vitrification est particulièrement adaptée pour la préservation de cellules ou tissus riches en eau (Levi-Setti et al., 2016). Malgré sa rapidité d'exécution, elle reste une technique difficile à maîtriser et nécessite l'utilisation de dispositifs particuliers.

Durant les dernières années, différents protocoles de cryopréservation de modèles de sphéroïdes ont été testés par différentes équipes. Il s'agit notamment de techniques de

congélation lente. Par exemple, un développement a été réalisé pour la congélation lente de sphéroïdes de cancer colorectal ou de glioblastome dans un milieu contenant 90% de SVF et 10% de DMSO (Chong et al., 2009; Eini et al., 2020). D'autre part, une autre équipe a développé un protocole de congélation de sphéroïdes encapsulés d'hépatocytes maintenus dans un large volume de 2 litres de milieu (Kilbride et al., 2016). Cette technique a occasionné de grandes disparités de préservation en fonction de l'emplacement des cellules dans l'échantillon. En effet, les cellules dans les zones premièrement ou dernièrement solidifiées montrent des impacts majeurs sur leur fonction après décongélation (Kilbride et al., 2016). D'autres protocoles ont été testés pour la congélation de sphéroïdes de la lignée PC3 de cancer de la prostate ou de la lignée fibroblastique L929 dans des plus petits volumes de 1 mL dans des cryotubes (Ehrhart et al., 2009). Ce protocole utilisant un milieu commercial Liforlab® supplémenté avec des agents cryoprotecteurs tels que le DMSO ou du tréhalose a souligné l'importance des cryoprotecteurs extracellulaires pour les modèles multicellulaires (Barros et al., 2018). Néanmoins, ces protocoles n'ont permis qu'une préservation partielle des modèles multicellulaires avec un maintien de la viabilité cellulaire après décongélation ne dépassant pas 70%, pour les meilleures conditions. Des protocoles de vitrification ont également été développés pour des sphéroïdes de d'hépatocytes de porc, soulignant l'intérêt d'utiliser du sucrose comme agent cryoprotecteur pour ce genre d'échantillon, mais n'ont permis la préservation que de sphéroïdes de petite taille (inférieure à 100µm) (Chong et al., 2009; Magalhães et al., 2008).

Par conséquent, la cryopréservation de modèles de sphéroïdes reste encore un défi technologique important. Le développement de protocoles efficaces dans ce cadre reste encore limité par (i) la taille et la compaction des modèles 3D rendant difficile la pénétration des agents cryoprotecteurs dans les couches cellulaires internes, (ii) le manque de contenant adapté pour stocker un grand nombre d'échantillons, (iii) le travail fastidieux et le temps nécessaire pour développer ce type de méthodes, ainsi que (iv) les difficultés pour maintenir intégralement la viabilité des sphéroïdes. Ce dernier point est notamment dû à l'utilisation d'agents cryoprotecteurs, souvent cytotoxiques ne permettant qu'une conservation partielle de la structure des sphéroïdes et de la viabilité cellulaire (Arai et al., 2020). De plus, ces techniques montrent des difficultés pour limiter les chocs thermiques de manière homogène sur l'ensemble des cellules constitutives du sphéroïde lors de la descente ou de la remontée en température, notamment entre -7 °C et -30 °C lors de la congélation ou de la décongélation (Arai et al., 2020). De ce fait, le développement de méthodes alternatives plus simples à mettre

en place et n'utilisant pas d'agents cytotoxiques permettrait de contourner l'ensemble de ces limites.

III. 2. Les techniques alternatives à la cryoconservation

Depuis plusieurs années, différents protocoles de conservation sans étape de congélation ont été développés, permettant ainsi de maintenir pendant plusieurs jours la viabilité cellulaire (Robinson et al., 2014). Plusieurs conditions ont été testées, notamment à basse température comprise entre 4°C et 10°C. En effet l'abaissement des températures permet de réduire la cinétique de nombreuses réactions chimiques et le métabolisme cellulaire (Rubinsky, 2003). Pour la plupart des enzymes humaines, une diminution des températures de 37 °C à 0 °C permet de diminuer de 12 à 13 fois leur activité normale (Rubinsky, 2003). De ce fait, la conservation d'échantillons biologiques à basse température permet de stopper les processus biologiques cellulaires tout en limitant leur détérioration (Rubinsky, 2003). La préservation hypothermique d'échantillons biologiques est utilisée depuis longtemps pour la conservation d'organes entiers ou de tissus, alors que les techniques de cryopréservations sont majoritairement utilisées pour des échantillons cellulaires. Néanmoins, pour le transport ou une conservation à court terme, le choix d'une préservation hypothermique peut s'avérer plus pertinent (Robinson et al., 2014). En effet, la plupart des cellules de mammifères peuvent être maintenues sans dommages à basse température en l'absence de formation de cristaux de glace (Rubinsky, 2003). Par exemple, la conservation hypothermique d'organoïdes de cardiomyocytes a permis de restaurer plus de 70% de la viabilité cellulaire après 7 jours de conservation (Correia et al., 2016). De plus, cette étude a montré une amélioration de la préservation des cellules sous forme de culture cellulaire 3D plutôt qu'en cellules individuelles (Correia et al., 2016). Ce mode de conservation s'est avéré particulièrement intéressant pour des applications cliniques et des tests de *screening* médicamenteux, compatible avec une distribution mondiale de modèles cellulaires (Correia et al., 2016). Des résultats similaires ont pu être observés pour la conservation de cellules endothéliales ou hépatiques (Meng, 2003; Post et al., 2013).

Néanmoins, même pour une courte période de conservation, l'exposition des cellules au froid peut avoir des effets négatifs. Notamment, il existe un risque de séparation des lipides de l'ensemble des structures membranaires entraînant des déséquilibres de concentrations ioniques entre les milieux extra- et intracellulaires (Robinson et al., 2014). De plus, l'arrêt du métabolisme cellulaire entraîne l'interruption de l'activité des mécanismes de défense des

cellules, les rendant particulièrement vulnérables aux facteurs extérieurs (Rubinsky, 2003). Notamment, le stress oxydant peut être létal pour les cellules présentant un arrêt de leurs mécanismes de désoxydation. Ainsi, une préservation hypothermique efficace nécessite l'utilisation de solutions de préservation qui (i) fournissent des concentrations optimales d'ions pour maintenir l'équilibre ionique et osmotique, (ii) limitent la formation de radicaux libres et (iii) fournissent des substituts énergétiques pour les cellules (Correia et al., 2016). Différents milieux de conservation ont été utilisés tenant compte de ces considérations. Il s'agit majoritairement de milieux développés originellement pour la conservation d'organes ou de tissus entiers destinés à des transplantations. Par exemple, les milieux ViaSpan® (Université du Wisconsin), Celsior® (groupe IGL), Custodiol® HTK (histidine-tryptophane-ketoglutarate, Alsbach-Haenlien) et plus récemment Hypothermosol® (HTS, BioLife Solution) ont pu être testés (Menasché et al., 1994; Ostrowska et al., 2009; Stowe et al., 2007; Troisi et al., 2003). De manière générale, ces milieux sont synthétiques sans supplémentation en sérums animaux et de ce fait moins sensibles aux réactions d'oxydo-réduction. En effet, de par leur forte proportion en lipides, les sérums sont particulièrement sujets à l'oxydation et favorisent la formation de radicaux libres (Schnitzer et al., 1998). Ces milieux sans sérum animal ont permis avec succès la conservation hypothermique pendant quelques jours de cellules souches multipotentes mésenchymateuses, de cellules souches de la moelle osseuse et d'hépatocytes (Ginis et al., 2012; Ostrowska et al., 2009; Petrenko et al., 2019).

D'autre part, l'importante diminution de la pression en oxygène a également montré des effets bénéfiques pour améliorer la préservation d'échantillons cellulaires. Notamment, plusieurs travaux ont souligné l'impact positif des conditions anoxiques pour préserver la viabilité et la fonction de globules rouges (Yoshida and Shevkopyas, 2010; Yoshida et al., 2007). L'absence d'oxygène permet de stopper le stress oxydant ainsi qu'un grand nombre de réactions biologiques. Notamment, il a été montré que la pression en oxygène est un facteur limitant dans la croissance de sphéroïdes cancéreux (Gomes et al., 2016). Ainsi, en 2017, Gomes et al. ont réussi à induire un arrêt réversible de la croissance de sphéroïde de cellules de cancer colorectal en les plaçant en anoxie à l'aide d'un système absorbeur d'oxygène (Gomes et al., 2018). En effet, cette condition de conservation a permis de maintenir pendant 4 jours à 37°C et 18 jours à 4°C les principales caractéristiques de ces sphéroïdes tels que leur volume et leur activité métabolique. De plus, l'association de basses températures et de conditions anoxiques n'a pas montré de différence de réponse des sphéroïdes à la suite d'un traitement par de l'étoposide, entre des sphéroïdes conservés ou non conservés (Gomes et al., 2018).

De ce fait, l'association de plusieurs conditions de conservation, alliant des températures basses (proche de 4°C), des milieux de cultures cellulaires adaptés ne contenant pas de sérums animaux et une atmosphère anoxique, s'avère particulièrement intéressante pour la préservation de modèles de sphéroïdes tumoraux pendant quelques jours. Le développement de protocoles efficaces pour conserver ces modèles représenterait une avancée majeure afin de simplifier leur conservation, leur transport et leur utilisation dans le *screening* de médicaments à grande échelle.

Objectifs des travaux de thèse

La résistance des cellules tumorales est un problème majeur pour le traitement des cancers, notamment pour les sous-types tumoraux agressifs tel que le Cancer du Sein Triple Négatif (CSTN). En effet, elle représente la principale cause d'échecs thérapeutiques, de récurrence et de rechute.

Dans ce cadre, les travaux de recherche du groupe « Résistance » de l'UMR INSERM/UCA 1240 IMoST (Imagerie Moléculaire et Stratégies Théranostiques) sont orientés sur le développement de modèles et d'outils *in vitro* pertinents pour l'étude de la résistance tumorale aux traitements. En effet, dans le cadre de ces travaux, le groupe « Résistance » développe par pharmacomodulation des traceurs fluorescents spécifiques de la chimiorésistance cellulaire. Plus précisément, le groupe s'intéresse particulièrement à la résistance cellulaire instaurée par les transporteurs d'efflux « *Multidrug Resistance* », et notamment à la P-glycoprotéine. D'autre part, elle développe des modèles de sphéroïdes cancéreux, particulièrement intéressants pour modéliser *in vitro* la résistance tumorale et mimer de manière fidèle et prédictive la réponse aux traitements. Ces développements s'inscrivent directement dans une démarche d'optimisation du traitement du CSTN, par une approche de médecine personnalisée.

De plus, le fort partenariat créé avec les sociétés de biotechnologies BIOPASS SAS et BIOMARQUEURS SAS, au sein du consortium BIORCELL3D[®], a intégré ces développements dans une stratégie de Recherche Translationnelle de type public/privé. L'un des axes principaux des travaux de R&D de BIORCELL3D[®] vise à développer des tests de diagnostic *in vitro* d'intérêt en Oncologie, notamment pour la détection et la quantification de la résistance tumorale. D'autre part, le consortium BIORCELL3D[®] développe des modèles de sphéroïdes tumoraux à grande échelle intitulés Tumeurs Artificielles[®] pour la réalisation de tests d'efficacité/résistance des agents anticancéreux. En effet, les modèles de sphéroïdes sont particulièrement intéressants pour le criblage à haut débit de molécules à potentiel thérapeutique. Afin d'optimiser leur utilisation et leur transport, le développement de méthodologies de préservation de ces modèles est un des enjeux majeurs pour leur intégration au sein des grandes plateformes de *screening* médicamenteux.

Dans ce contexte, les travaux de recherche réalisés au cours de ma thèse ont été orientés sur le développement d'outils *in vitro* destinés à l'étude de la résistance tumorale aux traitements et au criblage à grande échelle de nouveaux médicaments anticancéreux. Ces travaux ont porté sur :

1. Le développement de **traceurs fluorescents comme outils innovants pour l'analyse de la résistance tumorale aux traitements par détection, localisation et quantification de la P-glycoprotéine**. Ces travaux ont fait l'objet d'un dépôt de brevet international, d'une publication en premier auteur parue dans la revue *Cancers*, et de la rédaction d'un article scientifique en premier auteur.
2. Le développement d'une **méthodologie innovante de préservation de modèles de sphéroïdes tumoraux, alternative à la cryoconservation, associant la conservation dans le milieu synthétique OptiPASS® en conditions anoxiques et à basse température**. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication en premier auteur dans la revue *Cancers*.

Résultats expérimentaux

I. Le développement de traceurs fluorescents innovants pour l'analyse de la résistance tumorale par détection et quantification directes de la P-gp

I. 1. Introduction

Les protéines « *Multidrug Resistance* » (MDR) font partie de la superfamille des transporteurs ABC. Ces protéines transmembranaires sont très ubiquitaires et sont retrouvées chez une très grande variété d'organismes vivants, procaryotes ou eucaryotes, tels que les bactéries, les protozoaires, les végétaux, les insectes, les poissons et les mammifères (Holland et al., 2003). En effet, elles ont été fortement conservées au cours de l'évolution, exerçant un rôle crucial dans la protection cellulaire contre les xénobiotiques. Ces transporteurs permettent notamment l'efflux d'une grande diversité de substrats, du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire, et représentent ainsi la première ligne de défense cellulaire contre des agents toxiques.

Durant les dernières décennies, les protéines MDR ont suscité un grand intérêt dans divers domaines. Par exemple, la détection de ces protéines à la surface des cellules d'insectes ou des globules rouges de poissons s'est avérée très pertinente comme biomarqueur de susceptibilité pour la détection et quantification de la pollution de l'air ou des cours d'eau (Vaché et al., 2006; Valton et al., 2013). En santé humaine, l'implication de ces protéines a également été mise en évidence dans diverses pathologies telle que la maladie d'Alzheimer. Cependant, le contexte dans lequel ces protéines sont plus souvent étudiées est la chimiorésistance des cellules tumorales (Gottesman, 2002). En effet, de nombreux agents de chimiothérapies conventionnelles ou de thérapies ciblées sont reconnus et pris en charge par les pompes d'efflux MDR, limitant ainsi leur effet thérapeutique. Ces transporteurs constituent un système particulièrement complexe décrit comme étant l'une des premières causes de la résistance croisée des cellules cancéreuses vis-à-vis des agents anticancéreux. En effet, ils sont naturellement surexprimés *de novo* dans de nombreux types tumoraux, ou de manière acquise après l'exposition des cellules cancéreuses aux traitements. Trois principales protéines MDR ont été identifiées comme ayant un impact clinique important dans la résistance tumorale : la P-glycoprotéine (P-gp/ABCB1), la *Breast Cancer Resistance Protein* (BCRP/ABCG2) et la *MDR-Associated Protein 7* (MRP7/ABCC10). Malgré le grand intérêt que peuvent représenter ces protéines sur le diagnostic et pronostic tumoral, leur expression reste encore peu étudiée en clinique, notamment en raison du manque d'outils efficace permettant de les détecter et de les quantifier (Robey et al., 2018).

Dans ce contexte, le groupe « Résistance » de l'UMR INSERM/UCA 1240 IMoST développe des traceurs fluorescents capables de détecter, localiser et quantifier spécifiquement les protéines MDR. Ces composés, développés par synthèse organique, sont capables de pénétrer dans la cellule ou les masses cellulaires et de se fixer de manière spécifique sur les protéines MDR. A l'heure actuel, les travaux de pharmaco-modulation de l'équipe se sont majoritairement focalisés sur le développement de traceurs fluorescents ciblant la P-gp. Dans ce cadre le premier objectif des travaux de recherche de ma thèse ont été orientés sur le développement de la preuve de concept des traceurs fluorescents LightSpot® sur des modèles tumoraux précliniques. Il consiste en l'utilisation des traceurs fluorescents LightSpot® comme outils innovants pour l'analyse de la résistance tumorale aux traitements par la détection, la localisation et la quantification spécifique de la P-glycoprotéine. Pour ce faire, j'ai réalisé la validation biologique des traceurs LightSpot® en utilisant des cultures cellulaires en deux et trois dimensions (cultures 2D et 3D) de lignée de CSTN comme modèles d'étude précliniques *in vitro*. L'ensemble de ces travaux ont permis :

- Le dépôt du **brevet LightSpot** revendiquant l'invention d'une méthode de détection, localisation et quantification des protéines MDR (Brevet UCA/INSERM/BIOMARQUEURS - n° **FR1911035** du 04 octobre 2019 - n° **PCT/EP2020/077694** du 02 Octobre 2020 – n° **WO 2021/064191** du 04 Avril 2021).
- Une publication en premier auteur dans le journal *Cancers* (*Impact Factor: 6,639*): **“LightSpot®-FL-1 fluorescent probe: an innovative tool for cancer drug resistance analysis by direct detection and quantification of the P-glycoprotein (P-gp) on monolayer culture and spheroid Triple Negative Breast Cancer models”** (DOI: 10.3390/cancers13164050) acceptée en Août 2021.
- La rédaction d'un deuxième article scientifique sur la sélection et validation biologique de 14 traceurs LightSpot® conçus au sein du Consortium BIORCELL3D®.

I. 2. Brevet LightSpot : Méthode de détection, localisation et quantification des protéines MDR

Le brevet LightSpot, co-déposé entre l'Université Clermont Auvergne, l'INSERM, la société BIOMARQUEURS et la société BIOPASS revendique l'invention d'une méthode *in vitro* de détection, localisation et/ou quantification de protéines de multirésistance MDR, exprimées par les cellules dans un échantillon biologique. Cette méthode repose sur l'utilisation de traceurs détectables capables de pénétrer dans les cellules et les masses cellulaires afin de marquer de manière spécifique une protéine MDR. La structure chimique de ces traceurs de petite taille répond à la formule suivante :

Traceur LightSpot = Ligand[MDR]-E-D

Dans cette formule, le **Ligand[MDR]** correspond à la partie ligand de la molécule capable de reconnaître et de cibler la protéine MDR d'intérêt. **E** correspond à la présence éventuelle d'un ou plusieurs espaceurs entre la partie ligand et l'élément détectable de la molécule, appelé **D**. Ce dernier correspond à l'élément détectable, pouvant être localisé et quantifier au sein de l'échantillon cellulaire. Cet élément est souvent un groupement chimique émettant de la fluorescence.

La méthode de détection et quantification spécifique des protéines MDR à l'aide des traceurs LightSpot® peut être appliquée aux divers domaines. Elle peut notamment être utilisée dans le domaine de la Recherche fondamentale et/ou recherche et développement afin d'étudier le niveau d'expression de protéines MDR dans des échantillons cellulaires en préclinique. Dans ce cadre, elle représente une méthode alternative aux techniques reposant sur l'utilisation d'anticorps pour cibler les protéines MDR. Cette approche peut aussi être complémentaire aux tests d'activité d'efflux des protéines MDR. Les traceurs LightSpot® peuvent également être utilisés dans le domaine de l'Environnement comme biomarqueur du niveau de pollution. Enfin, cette méthode suscite un intérêt important dans le domaine de l'Oncologie clinique, notamment pour l'évaluation de la chimiorésistance des cellules tumorales. En effet, les traceurs LightSpot® peuvent être considérés comme des outils de diagnostic *in vitro* d'évaluation de la résistance tumorale par détection des protéines MDR au sein d'échantillons biologiques issus de pièces opératoires. Dans ce cadre, les travaux de recherche et développement du groupe « Résistance » se sont principalement focalisés sur la synthèse et la validation de traceurs fluorescents pour la détection spécifique de la P-gp, la protéine MDR la plus fréquemment étudiée pour évaluer la résistance tumorale.

I. 3. Article publié : *LightSpot®-FL-1 fluorescent probe: an innovative tool for cancer drug resistance analysis by direct detection and quantification of the P-glycoprotein (P-gp) on monolayer culture and spheroid Triple Negative Breast Cancer models*

I. 3. a) *Présentation*

Les travaux publiés portent sur la validation du traceur fluorescent LightSpot®-FL-1 comme outil innovant permettant d'une manière sélective et sensible de détecter, localiser et quantifier la protéine de multirésistance P-gp dans des cellules ou des masses cellulaires. Pour ce faire, différentes lignées cellulaires du CSTN en condition de culture 2D et 3D ont été utilisées, comme modèles d'étude.



Tout d'abord la capacité du traceur LightSpot®-FL-1 à pénétrer et à persister dans les cellules a été vérifiée par la technique de cytométrie en flux sur des cellules en suspension issues des lignées de CSTN DU4475 et SUM1315. Les résultats obtenus ont montré une rapide pénétration du traceur dans les cellules, et le maintien d'un signal fluorescent détectable, même après une étape de lavage cellulaire. Ces données ont notamment permis d'établir un protocole de marquage cellulaire à l'aide du traceur LightSpot®-FL-1 permettant de détecter, localiser et quantifier la présence de la P-gp, en microscopie à fluorescence. Ce protocole a par ailleurs été validé sur les lignées cellulaires de CSTN DU4475 et SUM1315, présentant les mêmes performances de marquage sur des cellules vivantes ou fixées. Par la suite, le marquage de la P-gp obtenu à l'aide du traceur LightSpot®-FL-1 a été comparé à un immunomarquage spécifique de la P-gp, utilisé comme technique de référence. Ainsi, une forte colocalisation entre les deux marquages de la P-gp a pu être obtenue sur les cellules DU4475 et SUM1315. Ceci a notamment été mis en évidence sur la lignée DU4475, par le calcul de coefficients de corrélation de Pearson (92,1%) et de Mander's (100,0%). De plus, la comparaison des intensités de fluorescence des deux types de marquages LightSpot-FL1® et immunomarquage anti-P-gp réalisés sur cinq lignées de CSTN (DU4475, SUM1315, MDA-MB-231, SW527 et HCC1937) a montré une forte corrélation ($R^2=0,99$), démontrant ainsi la capacité du traceur LightSpot®-FL-1 à quantifier le niveau d'expression basal de la P-gp sur des échantillons cellulaires. D'autre part, l'habilité du traceur LightSpot®-FL-1 à détecter et à quantifier une induction du niveau d'expression de la P-gp a été démontrée suite à l'exposition de la lignée cellulaire SUM1315 en cultures 2D et 3D des doses croissantes de l'inhibiteur de PARP Olaparib. Pour finir, étant donné la capacité du traceur LightSpot®-FL-1 à pénétrer au sein de masses cellulaires, la détection et la quantification de la P-gp par ce nouvel outil a été validée sur des modèles de sphéroïdes issus de cellules de la lignée de CSTN SUM1315.

L'ensemble de ces travaux ont permis de valider le traceur LightSpot®-FL-1 pour la détection, la localisation et la quantification de la P-gp sur des modèles cellulaires précliniques *in vitro* de CSTN. Les résultats obtenus ont souligné l'avantage de cette méthode innovante de détection de la résistance tumorale aux traitements par rapport à celles classiques d'immunomarquage. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication en premier auteur dans la collection spéciale « *Drug Resistance and Novel Therapies in Cancers* » du journal *Cancers*, acceptée en Août 2021 (DOI : 10.3390/cancers13164050).

I. 3. b) Article publié

Article

LightSpot[®]-FL-1 Fluorescent Probe: An Innovative Tool for Cancer Drug Resistance Analysis by Direct Detection and Quantification of the P-glycoprotein (P-gp) on Monolayer Culture and Spheroid Triple Negative Breast Cancer Models

Antoine Goisnard ^{1,†}, Pierre Daumar ^{1,†} , Clémence Dubois ^{1,2}, Corinne Aubel ³, Manon Roux ², Marie Depresle ², Jean Gauthier ^{2,4}, Bernard Vidalinc ^{2,4}, Frédérique Penault-Llorca ⁵, Emmanuelle Mounetou ¹ and Mahchid Bamdad ^{1,*} 

¹ Institut Universitaire de Technologie, Université Clermont Auvergne, UMR INSERM-UCA, U1240, Imagerie Moléculaire et Stratégies Théranostiques, 63000 Clermont Ferrand, France; antoine.goisnard@uca.fr (A.G.); pierre.daumar@uca.fr (P.D.); clemence.dubois@uca.fr (C.D.); emmanuelle.mounetou@inserm.fr (E.M.)

² BIOMARQUEURS Company, 5 Avenue Blaise Pascal, 63178 Aubière, France; manon.roux@uca.fr (M.R.); marie.depresle@uca.fr (M.D.); jean.gauthier@uca.fr (J.G.); bernard.vidalinc@uca.fr (B.V.)

³ Faculté de Médecine, Université Clermont Auvergne, UMR INSERM-UCA, U1240, Imagerie Moléculaire et Stratégies Théranostiques, 63000 Clermont Ferrand, France; corinne.aubel@uca.fr

⁴ BIOPASS Company, 5 Avenue Blaise Pascal, 63178 Aubière, France

⁵ Centre de Lutte Contre le Cancer Jean Perrin, Université Clermont Auvergne, UMR INSERM-UCA, U1240, Imagerie Moléculaire et Stratégies Théranostiques, 63000 Clermont Ferrand, France; frederique.penault-llorca@clermont.unicancer.fr

* Correspondence: mahchid.bamdad@uca.fr; Tel.: +33-473-177-075

† These authors contributed equally to this work.



Citation: Goisnard, A.; Daumar, P.; Dubois, C.; Aubel, C.; Roux, M.; Depresle, M.; Gauthier, J.; Vidalinc, B.; Penault-Llorca, F.; Mounetou, E.; et al. LightSpot[®]-FL-1 Fluorescent Probe: An Innovative Tool for Cancer Drug Resistance Analysis by Direct Detection and Quantification of the P-glycoprotein (P-gp) on Monolayer Culture and Spheroid Triple Negative Breast Cancer Models. *Cancers* **2021**, *13*, 4050. <https://doi.org/10.3390/cancers13164050>

Academic Editor: David Brindley

Received: 12 July 2021

Accepted: 10 August 2021

Published: 11 August 2021

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



Copyright: © 2021 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 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: Tumoral drug resistance is mainly caused by multidrug resistance transporters (MDR), such as the P-gp, which presents high clinical interest. For this reason, the P-gp-mediated drug resistance diagnosis may be very relevant for optimizing anticancer treatment efficacy. However, the lack of effective analytical tools limits this clinical diagnostic approach. Therefore, our group has developed LightSpot[®]-FL-1, a new cell-permeant fluorescent probe able to specifically localize and quantify the P-gp inside unicellular, monolayer, and cellular mass models. The application of this innovative tool was firstly demonstrated in the preclinical field, using five triple-negative breast cancer (TNBC) cell models. The comparison between classical anti-P-gp immunostaining and LightSpot[®]-FL-1 P-gp staining highlighted a strong similarity with P-gp localization and expression level quantification. LightSpot[®]-FL-1 P-gp detection and quantification, using several fluorescence imaging methods, are easy, direct, and cost-effective and are, therefore, very promising for future clinical diagnosis development.

Abstract: P-gp is the most widely studied MDR protein conferring cellular resistance to many standard or targeted therapeutic agents. For this reason, P-gp chemoresistance evaluation, established before or during chemotherapy, can be very relevant in order to optimize the efficacy of treatments, particularly for aggressive tumoral subtypes such as triple-negative breast cancer (TNBC). In this context, our team developed an innovative cell-permeant fluorescent probe called the LightSpot[®]-FL-1, which is able to specifically localize and quantify the P-gp in cells or cell masses, as evidenced on different TNBC cell models. First, flow cytometry analysis showed LightSpot[®]-FL-1 cell penetration and persistence in time, in TNBC cells. Then, LightSpot[®]-FL-1 staining was compared to anti-P-gp immunostaining by fluorescence microscopy on five TNBC cell lines. Results showed a clear similarity of P-gp localization and expression level, confirmed by Pearson's and Mander's colocalization coefficients with 92.1% and 100.0%, and a strong correlation coefficient of $R^2 = 0.99$. In addition, the LightSpot[®]-FL-1 staining allowed the quantification of a P-gp induction (33% expression increase) following a 6-hour spheroid model exposure to the anti-PARP Olaparib. Thus, the new LightSpot[®]-FL-1 cell-permeant probe, targeting P-gp, appears to be an effective tool for drug resistance evaluation in preclinical models and shows promising possibilities for future use in clinical diagnosis.

Keywords: multidrug resistance; P-gp staining; LightSpot[®]-FL-1 cell-permeant fluorescent probe; triple-negative breast cancer

1. Introduction

The permeability-glycoprotein (P-gp) was discovered about forty years ago, initially as a membrane transporter at the origin of chemoresistance in cancer [1]. In reality, P-gp is part of a wide class of “ATP-binding cassette” (ABC) superfamily transporter proteins, called “multidrug resistance” (MDR). MDR proteins, and the P-gp in particular, were highly conserved during the evolutionary process and are ubiquitous. In fact, they are naturally expressed in a wide variety of living organisms from prokaryotes to eukaryotes, such as bacteria, protozoa, fish, *Drosophila* and mammals [2–6]. In humans, MDR proteins are commonly studied because of their involvement in tumoral multidrug resistance mechanisms [7,8]. Indeed, MDR proteins act as xenobiotic transmembrane efflux pumps, recognizing a large panel of substrates with different structures and properties, such as various pollutants and drugs [9–11]. These pumps establish a veritable cellular defense network, exhibiting a protective role against external aggressions. At present, MDR transporters are considered to be an essential part of the innate cellular defense system, also called the “chemoimmunity” network, that presents various characteristics reminiscent of classical immunology [12]. This system is particularly complex because a single MDR transporter can recognize a wide variety of substrates, and one anticancer agent can also be the target of several transporters. Thus, MDR proteins have been identified as one of the main causes of tumoral cell cross-resistance against anticancer drugs. Indeed, many conventional chemotherapeutic agents, such as anthracyclines, taxanes or vinca-alkaloids, and/or targeted therapeutics such as tyrosine kinase inhibitors or poly-ADP ribose polymerase inhibitors (anti-PARPs) are expelled from cells by MDR transporters [13–15], and many tumoral types overexpress several MDR transporters. The main identified MDR proteins presenting a clinical involvement are (i) the P-gp encoded by *ABCB1*, (ii) the MDR-associated proteins (MRP) encoded by *ABCC* genes, such as MRP1 (*ABCC1*) or MRP7 (*ABCC10*), and (iii) the breast cancer resistance protein (BCRP) encoded by the *ABCG2* gene [8,16].

Numerous biological mechanisms can lead to the development of chemoresistance, among which MDR-mediated drug efflux is the most frequently described [17]. Likewise, high expression of MDR proteins is often associated with aggressive subtypes and low disease-free survival rates in breast tumors [18]. Thereby, their clinical relevance resides in their predictive value on tumoral drug resistance, which is directly linked to the prognosis of the disease [19,20]. Thus, the importance of considering the P-gp expression level in tumors to optimize patients’ treatment orientation was highlighted in several studies [19,21,22]. However, the P-gp expression level is not frequently evaluated in clinical practice, which can in part be attributed to one specific issue, namely the lack of relevant analytical tools [8].

Triple-negative breast cancer (TNBC) is a breast cancer subtype that is immunohistochemically negative for the estrogen receptor (ER) and for the progesterone receptor (PR), and is also associated with the absence of HER2 protein overexpression and/or *HER2* gene amplification [23]. This heterogeneous and aggressive disease accounts for 15 to 20% of breast cancers and is associated with poor prognosis and drug resistance [17,24,25]. Despite colossal efforts made regarding TNBC treatments, only 20% of patients present a pathologically complete response after treatment, while others are most likely to present an early recurrence or develop a metastatic disease [26]. As a matter of fact, TNBC tumors are, at first, particularly sensitive to chemotherapy, but a high proportion becomes resistant during treatment and presents difficulties for achieving a complete pathological response. This phenomenon is called the “triple-negative paradox” and explains why TNBC represents a relevant study model for cancer-cell drug resistance [17,27].

In the last few years, the works of our research group were focused on optimizing TNBC treatment, in correlation with resistance mechanisms mediated by MDR proteins. Indeed, we highlighted the relay overexpression of BCRP and P-gp MDR proteins on SUM1315 monolayer TNBC cell cultures, after exposure to the PARP inhibitor Olaparib [28]. Our group has developed various *in vitro* preclinical tools, e.g., TNBC cancer spheroids mimicking avascular small-size micro-tumors [29–32], notably for realizing high-throughput drug screening or modeling the distribution of small molecules of interest inside these cell masses [33]. In parallel, through pharmaco-modulation approaches, we designed bio-active fluorescent compounds such as LightSpot[®] fluorescent tracers targeting P-gp [34].

In these present works, we report on the validation of the LightSpot[®]-FL-1 tracer as an innovative fluorescent probe for selective and sensitive detection, localization, and quantification of the P-gp in cells or cell masses. The proof of concept was established on several unicellular, monolayer or spheroid TNBC models and a microscopy-based methodology was performed to explore native or induced P-gp expression on those models.

2. Experimental Section

2.1. LightSpot[®]-FL-1 Chemical Synthesis Achievement

Commercially available reagents and solvents were used without further purification for the synthesis and characterization of LightSpot[®]-FL-1, as previously described [34]. Briefly, LightSpot[®]-FL-1 was obtained by coupling an amine-bearing P-gp inhibitor derivative with the commercial amine-reactive *N*-hydroxysuccinimidyl ester of the BODIPY-FL fluorophore (CAS 146616-66-2, Interchim, Montluçon, France). After the coupling reaction proceeded, a preparative High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) purification system (Shimadzu Inc., Kyoto, Japan) was performed to afford LightSpot[®]-FL-1 in good yield (>70%). LightSpot[®]-FL-1 was isolated at > 96% purity based on HPLC-UV-DAD analysis, and fully characterized by ¹H NMR, ¹³C NMR, 2-dimensional COSY and HSQC NMR, and high-resolution mass spectrometry. Excitation and emission maxima were determined from LightSpot[®]-FL-1 solutions in ethanol at 505 and 510 nm, respectively. Pure dry aliquots of LightSpot[®]-FL-1 were stored at −20 °C and were used to prepare 1.0 mM stock solutions in DMSO for biological experiments.

2.2. Monolayer Cell Culture and Spheroid Formation

Triple-negative breast cancer SUM1315 (MO2, ASTERAND), MDA-MB-231 (ATCC[®], HTB-26[™]), HCC1937 (ATCC[®] CRL-2336[™]), SW527 (ATCC[®] CRL-7940[™]) and DU4475 (ATCC[®], HTB-123[™]) cell lines were stored in the Biological Resource Center of the Jean Perrin Comprehensive Cancer Center, identified under No. BB-0033-00075 (Clermont-Ferrand, France). Each cell line was checked for the absence of mycoplasma contamination (MycoplasmaCheck[®] test, Eurofins Genomics, Luxembourg, Luxembourg) and maintained in their recommended cell culture media at 37 °C under 5% CO₂ in a humidified incubator. For monolayer cell culture, SUM1315 cells were cultured in Ham's F-12 medium (Gibco, Dublin, Ireland), supplemented with 5% FCS (fetal calf serum, Eurobio Scientific, Paris, France), 10 mM HEPES buffer (Sigma, Darmstadt, Germany), 4 µg/mL insulin (Novo Nordisk, Bagsværd, Denmark), 10 ng/mL epidermal growth factor (EGF, Sigma, Darmstadt, Germany) and 20 µg/mL gentamicin (Panpharma, Paris, France). MDA-MB-231, HCC1937 and DU4475 cells were cultured in RPMI 1640 medium (Gibco, Dublin, Ireland) supplemented with 10% decompartmented fetal calf serum and 20 µg/mL gentamicin. SW527 cells were cultured in DMEM high-glucose medium (Gibco, Dublin, Ireland) supplemented with 10% decompartmented fetal calf serum and 20 µg/mL gentamicin.

Spheroids were formed with the SUM1315 TNBC cell line, according to our previous works [29]. Briefly, cells in suspension were seeded in ultra-low-attachment round-bottom microplates in a prepared culture medium (Corning, New York, NY, USA, catalog #4520) at a concentration of 1000 cells/well. After 24 h, Geltrex[®] reduced growth factor basement membrane matrix (Gibco, Dublin, Ireland), diluted with cold medium, was dispensed in

each well for a final concentration of 2%. Microplates were then horizontally shaken for 20 min at 200 rpm, before being replaced in the incubator.

2.3. *LightSpot[®]-FL-1 Cellular Uptake and Outtake Analysis by Flow Cytometry*

Suspension DU4475 and monolayer SUM1315 cell cultures were used, according to the culture conditions described above. For SUM1315, cell detachment was achieved by trypsinization. Then, cellular suspensions containing 800,000 cells/mL were prepared in a culture medium for both cell lines. Cells maintained at 37 °C in the culture medium were then incubated with 1 µM fluorescent LightSpot[®]-FL-1 compound, dissolved in DMSO and diluted in the culture medium. The final DMSO concentration in all cell culture conditions was at 0.1%. Fluorescence intensity in cells was measured after 5, 15, 30, 45 and 60 min using a flow cytometer LSRII (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) with a blue excitation laser (488 nm, 20 mW) and FITC filter (530/30 nm). Cells were then centrifuged (125× g for 5 min) in order to be washed. For this process, the cell pellet was resuspended in the cell culture medium at 37 °C. Fluorescence intensity was then monitored after 5, 15, 60 and 120 min, following the washing step.

2.4. *LightSpot[®]-FL-1 Fluorescent Staining on Monolayer and Suspension Cell Cultures*

For the adherent SUM1315 cell line, cells were seeded in IbiTreat 8-well µ-Slides (Ibidi[®], Gräfelfing, Germany) at a concentration of 50,000 cells per well. Slides were maintained at 37 °C under 5% CO₂ in a humidified incubator until the cell carpet reached 60% of confluence. For the suspension DU4475 cell line, cells were directly harvested from the culture flask. In both cases, cells were either fixed with a 4% paraformaldehyde (PFA) solution or were maintained unfixed in culture conditions. For both fixed and unfixed cells, all subsequent experimental and imaging steps were achieved in the same experimental conditions. Cells were then incubated in a 1 µM LightSpot[®]-FL-1 D-PBS solution for one hour. Three successive washes of 20 min were then conducted in D-PBS to remove unspecific cell staining. Nuclear staining was carried out using 1 µg/mL bisbenzimidazole Hoechst33258 solution (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany, catalog #14530). Cells were finally imaged with a Cytation[™]3 MV (BioTek[®], Winooski, VT, USA) fluorescent microscopy module (M = 40, X-fluorescence filters = GFP, LED = 10, time exposure = 200 ms, gain = 10). The cells' mean fluorescence intensity was calculated with Gen5 3.08 software (BioTek[®], cellular analysis, threshold = 4000, minimal size = 5 µm, maximal size = 100 µm).

2.5. *LightSpot[®]-FL-1 and Anti-P-gp Co-staining Analysis on Monolayer and Suspension Cell Cultures*

LightSpot[®]-FL-1 staining was conducted as previously described for SUM1315, MDA-MB-231, HCC1937, SW527 and DU4475 cell lines, before completing the anti-P-gp immunostaining. For this, cells were incubated with clone F4 anti-P-gp monoclonal mouse antibody (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, catalog # MA5-13854, diluted at 1/75) for one hour. Three successive washes were then carried out in D-PBS before incubating cells with secondary goat anti-mouse Alexa Fluor[™] 647 nm antibody (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, catalog #A21236 diluted at 1/800). Cells were finally imaged with a Cytation[™]3 MV (BioTek[®], Winooski, VT, USA) fluorescent microscopy module (M = 40, X-fluorescence filters = GFP, LED = 10, time exposure = 200 ms, gain = 10/Cy 5, LED = 10, time exposure = 1840 ms, gain = 16). The GFP and Cy5 cells' mean fluorescence intensity were calculated with Gen5 3.08 software (BioTek[®], cellular analysis, primary mask set on GFP filter, threshold = 4000, minimal size = 5 µm, maximal size = 100 µm). For DU4475 cells presenting the strongest signals among tested cell lines, a colocalization study was made using the Coloc 2 plugin of ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA). This allowed us to calculate Pearson's correlation and Mander's overlap coefficients between the GFP- and Cy5-acquired images.

2.6. LightSpot[®]-FL-1 Fluorescent Staining on SUM1315 Spheroids

After 3 days of culture, the spheroids were harvested and fixed for 12 h in 4% PFA solution. They were then incubated for 90 min in 1 μ M LightSpot[®]-FL-1 solution. Then, spheroids were imaged with the Cytation[™]3 MV (BioTek[®], Winooski, VT, USA) fluorescent microscopy module (M = 4, X-fluorescence filters = GFP, LED = 10, time exposure = 150 ms, gain = 4) 30, 60, 90 and 120 min after the end of LightSpot[®]-FL-1 incubation. Between each observation, the spheroids were washed in D-PBS. The spheroid global fluorescent intensity was measured with Gen5 3.08 software (BioTek[®], cellular analysis on GFP filter, threshold = 5000, minimal size = 100 μ m, maximal size = 500 μ m).

2.7. P-gp Expression Level Measurement in SUM1315 Monolayer Cell Line and in Spheroid Models after Olaparib Treatment

Olaparib (Carbosynth, Compton, catalog #FO33122) was solubilized in DMSO to prepare a 50 mM stock solution. Dilutions were prepared in Ham's F-12 medium for final treatment concentrations of 0.5, 5 or 50 μ M. The final DMSO concentration remained constant at 0.1% in all tested conditions.

For the SUM1315 monolayer culture, cells were seeded in IbiTreat 8-well μ -Slides (Ibidi[®], Gräfelfing, Germany) at a concentration of 50,000 cells per well and maintained in a humid incubator until 60% of confluency. Cells were exposed for 3 h to 0.5, 5 or 50 μ M of Olaparib and then fixed for 10 min with PFA at 4%. This drug was solubilized in DMSO, and the final DMSO concentration was maintained at 0.1% in both treated and untreated conditions. For each Olaparib concentration, the PFA-fixed cells were then stained with 1 μ M LightSpot[®]-FL-1 or with anti-P-gp immunostaining, as previously described above. For the immunostaining, goat anti-mouse primary antibody (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, catalog #MA5-13854, diluted at 1/75) was coupled with Alexa Fluor[™] 568 nm (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Images were acquired with a Cytation[™]3 MV (BioTek[®], Winooski, VT, USA) fluorescent microscopy module (M = 40, X-fluorescence filters = GFP, LED = 10, time exposure = 200 ms, gain = 10/Texas Red, LED = 10, time exposure = 2200 ms, gain = 16). The fluorescence intensities of GFP and Texas Red signals were calculated using the Gen5 3.08 software (BioTek[®], cellular analysis, threshold = 4000 for GFP signal and 3100 for Texas Red signal, minimal size = 50 μ m, maximal size = 100 μ m).

SUM1315 spheroids were exposed for 3 or 6 h with 0.5, 5 or 50 μ M of Olaparib. In parallel, 0.1% DMSO controls were also performed. After treatment, spheroids were fixed in 4%PFA solution and incubated for 90 min with LightSpot[®]-FL-1 diluted at 1 μ M. They were then washed for 90 min in D-PBS and were observed with a Cytation[™]3 MV (BioTek[®], Winooski, VT, USA) fluorescent microscopy module (M = 4, X-fluorescence filter = GFP, LED = 10, time exposure = 150 ms, Gain = 4). Spheroid global fluorescent intensity was measured using Gen5 3.08 software (BioTek[®], cellular analysis on GFP filter, threshold = 5000, minimal size = 100 μ m, maximal size = 500 μ m).

2.8. Statistical Analysis

Results were presented as mean \pm standard deviation. All experiments were performed independently on at least three separate occasions. Unpaired 2-sided Student's *t*-test or ANOVA and Tukey's multiple comparison test were used to evaluate statistical significance. Results were considered statistically different when $p < 0.05$ (*). The strongest differences were noted as follows: $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***), $p < 0.0001$ (****) and $p < 0.00001$ (*****). Non-significant results were noted as "ns".

3. Results

3.1. Synthesis and Characterization of the LightSpot[®]-FL-1 Probe

The structure of LightSpot[®]-FL-1 presents a peptidic moiety that acts as a P-gp ligand, conjugated via an amide bond to the cell-permeant, bright, and photostable BODIPY-FL fluorophore (Figure 1). The amide bond was formed by the reaction of an amine-bearing peptidic P-gp ligand with BODIPY-FL succinimidyl ester. Subsequent HPLC purification

led to LightSpot[®]-FL-1, with a good yield (>70%) and excellent purity (>96%). After full characterization, the excitation and emission maxima were determined from LightSpot[®]-FL-1 solutions in ethanol at 505 and 510 nm, respectively.

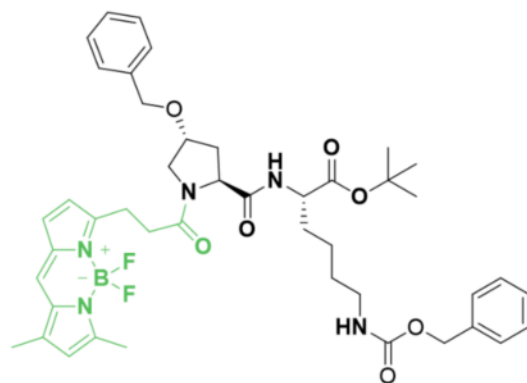


Figure 1. Chemical structure of LightSpot[®]-FL-1: a peptidic P-gp ligand (black) conjugated to the BODIPY-FL fluorophore (green).

3.2. LightSpot[®]-FL-1 Fluorescent Probe Selectively Targets P-gp in the DU4475 and SUM1315 TNBC Cell Line

3.2.1. LightSpot[®]-FL-1 Kinetic Uptake by Flow Cytometry

To assess the impact of the BODIPY-FL conjugation on the ligand moiety spatiotemporal cellular distribution, the ability of LightSpot[®]-FL-1 to penetrate and subsist in cells was evaluated by flow cytometry.

For this, two TNBC cell line models were used, the suspension DU4475 and the monolayer SUM1315 cell cultures in which the P-gp is naturally overexpressed [28,35]. Both cell lines were exposed to 1 μ M LightSpot[®]-FL-1 for 1 h. LightSpot[®]-FL-1 intracellular fluorescence intensity was measured over time, during cell exposure, and after washes to remove the unbound LightSpot[®]-FL-1 (Figure 2a,b). In both cell lines, a rapid LightSpot[®]-FL-1 uptake was detected in the first 15 min, with a mean fluorescence intensity from 127 FU to 5.0×10^3 FU, and from 8 FU to 39.5×10^3 FU for DU4475 and SUM1315 cells, respectively. Then, the intracellular LightSpot[®]-FL-1 rate was stabilized in both cells, with 4.8×10^3 FU for DU4475 cells (Figure 2a) and 46.4×10^3 FU for SUM1315 after 60 min (Figure 2b). After LightSpot[®]-FL-1 rate stabilization, cells were washed to eliminate unbound LightSpot[®]-FL-1. After this step, intracellular LightSpot[®]-FL-1 fluorescence was again measured in each cell line, corresponding to the intracellular LightSpot[®]-FL-1 specifically bound on its P-gp target. Thereafter, a clear decrease of LightSpot[®]-FL-1 fluorescence intensity was detected in both cell lines with 2.9×10^3 FU for DU4475 cells and 23.2×10^3 FU for SUM1315 cells, 5 min after the wash step. The LightSpot[®]-FL-1 maintenance in the cells was then followed in each cell line. In DU4475 cells, the linked LightSpot[®]-FL-1 rate remained relatively stable over time, with 1.9×10^3 FU after 1 h and 1.6×10^3 FU after 2 h (Figure 2a). However, for SUM1315 cells, the intracellular LightSpot[®]-FL-1 rate continued to decrease to 12.9×10^3 FU after 1 h, and to 6.3×10^3 FU after 2 h (Figure 2b). These results showed that the intracellular fluorophore LightSpot[®]-FL-1 was maintained in both cell lines over time.

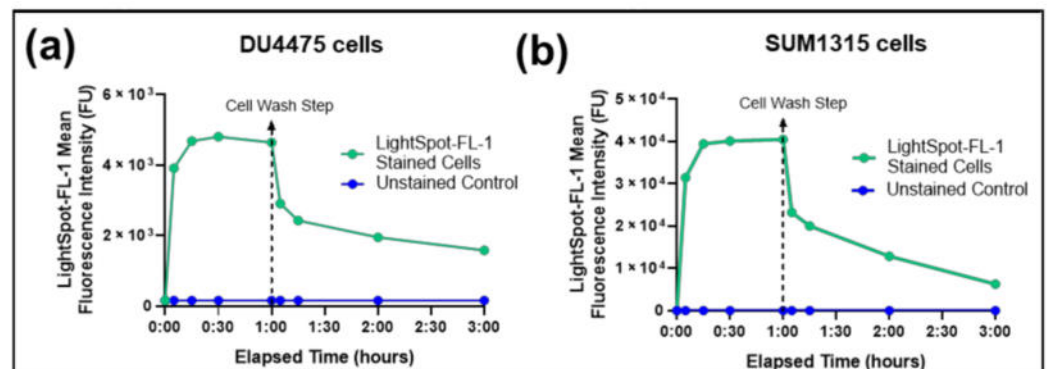


Figure 2. LightSpot®-FL-1 kinetic uptake in DU4475 and SUM1315 TNBC cell lines. DU4475 (a) and SUM1315 (b) TNBC cells were exposed to a 1 μ M LightSpot®-FL-1 fluorescent probe and the cellular fluorescence intensity (fluorescence units: FU) was measured at different times by flow cytometry analysis. After 1 h of exposure, DU4475 (a) and SUM1315 (b) cells were washed with culture medium (cell wash step) and the cellular fluorescence intensity was again measured at different times by flow cytometry, 2 h after the cell-wash step. During the entire experiment time, unstained cells were analyzed in parallel as control values.

Lightspot®-FL-1 Staining Intensity Comparison between Living or Fixed Cells by Fluorescence Imaging

The LightSpot®-FL-1 staining efficiency was then analyzed and compared between living and fixed cells. For these experiments, living cells or PFA-fixed cells were incubated with 1 μ M LightSpot®-FL-1 solution for 1 h before being washed. In the acquired images, DU4475 (Figure 3a–c) and SUM1315 (Figure 3d–f) cells presented the same LightSpot®-FL-1 green fluorescent staining profiles between living or fixed conditions. Moreover, no similarities with blue Hoechst33258 staining were observed (Figure 3c,f) indicating an absence of LightSpot®-FL-1 compound accumulation in the cell nuclei (Figure 3e,f). LightSpot®-FL-1 staining intensity was then quantified and was $20.8 \pm 2.9 \times 10^3$ FU and of $20.7 \pm 3.7 \times 10^3$ FU for living and fixed DU4475 cells, respectively ($p = 0.94$; Figure 3g). For the SUM1315 cell line, the staining intensity was $8.4 \pm 1.3 \times 10^3$ FU and $8.9 \pm 0.8 \times 10^3$ FU for living and fixed cells, respectively ($p = 0.17$; Figure 3g). These results showed that the intensity of the LightSpot®-FL-1 staining was similar on living or fixed cells with similar staining parameters, in terms of distribution and intensity. Therefore, for the following experiments, only fixed-cell models were used.

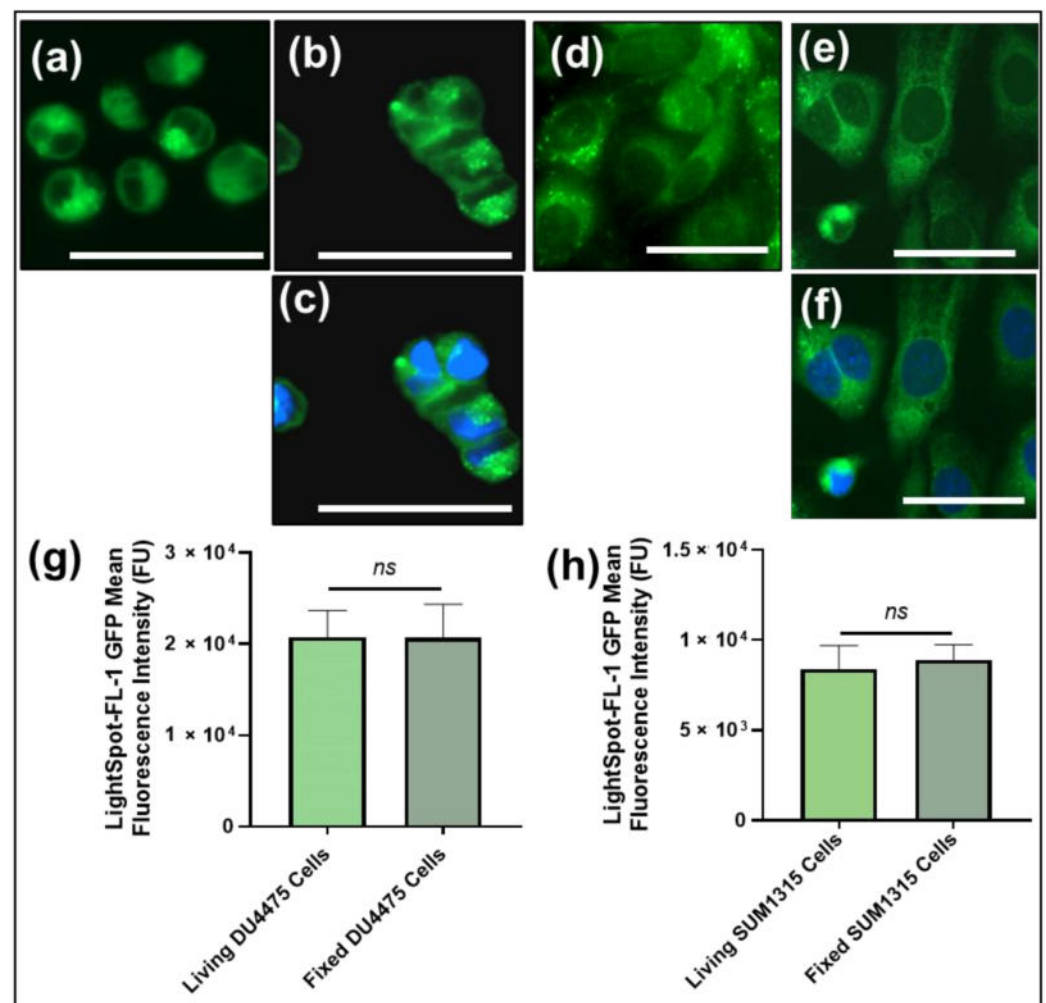


Figure 3. LightSpot®-FL-1 staining comparison between living and fixed DU4475 and SUM1315 TNBC cell lines. Living (a) or fixed (b) DU4475 cells and living (d) or fixed (e) SUM1315 cells were stained with the LightSpot®-FL-1 probe at 1 μ M (green signal). In parallel, a nuclear counterstaining was also carried out using Hoechst33258 for fixed DU4475 (c) and SUM1315 (f) cell conditions (merged pictures presenting LightSpot®-FL-1 signal in green and nuclear staining in blue). All pictures were acquired with the Cytation™3 MV (BioTek®, M = 4 X, scale bar = 50 μ m). For each experimental condition, LightSpot®-FL-1 global cell fluorescent intensity was measured with Gen5 software (BioTek®) for DU4475 (g) and SUM1315 (h) cells. Significances between living and fixed conditions were indicated as ns (not significant; $p > 0.05$).

P-gp Co-Staining with LightSpot-FL-1 and Immunostaining

For the analysis of P-gp targeting by the LightSpot®-FL-1 fluorescent probe, the distribution of this intracellular tracer (green signal) was compared to specific immunostaining, combining anti-P-gp mouse antibody (F4 clone) and a goat anti-mouse secondary antibody coupled to Alexa Fluor™ 647 (red signal). For this, co-staining was carried out on both DU4475 and SUM1315 BLTN models. In the unicellular DU4475 cell line (Figure 4a,b,e), a clear similarity of localization was detected between the LightSpot®-FL-1 probe labeling (Figure 4a) and the anti-P-gp immunostaining (Figure 4b). On SUM1315, similar staining profiles were obtained (Figure 4c,d,f). These staining similarities were highlighted by line profiles drawn on the DU4475 and SUM1315 merged picture (Figure 4e,f,g,h). Moreover, the colocalization of LightSpot®-FL-1 and anti-P-gp staining on DU4475 was also confirmed by Pearson's correlation coefficient analysis, reaching 92.1%, and by Mander's overlap coefficient, reaching 100.0%, attesting to similar signal distribution.

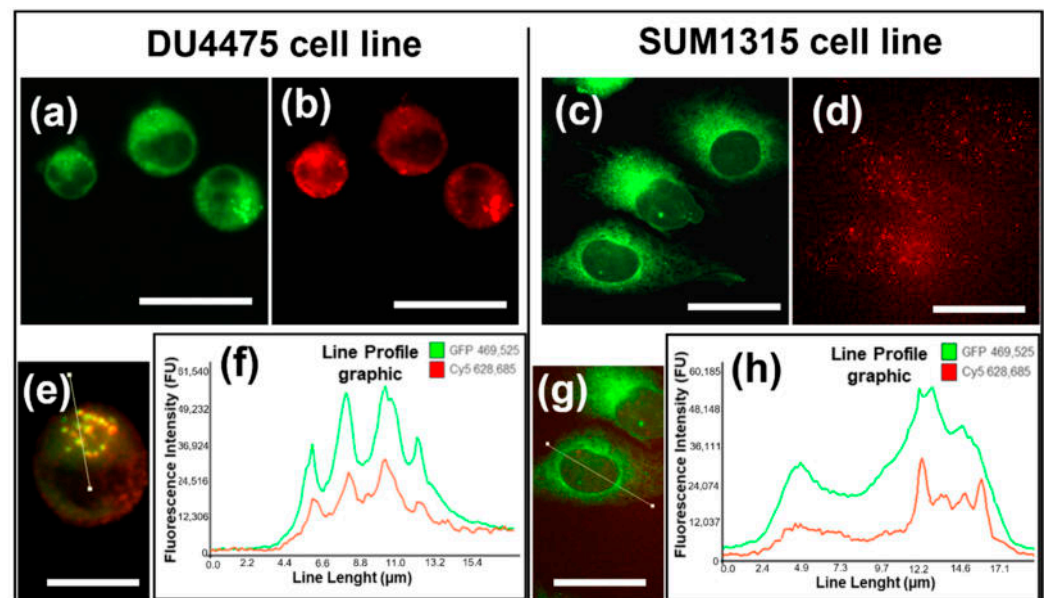


Figure 4. P-gp targeting comparison between LightSpot[®]-FL-1 staining and anti-P-gp immunostaining on DU4475 and SUM1315 TNBC cell lines. Co-staining was carried out, combining LightSpot[®]-FL-1 with anti-P-gp immunostaining. Pictures of LightSpot[®]-FL-1 labeling (green GFP signal) are presented for DU4475 (a) and SUM1315 cells (c). Similarly, immunostaining pictures (red Cy5 signal) are presented for DU4475 (b) and SUM1315 cells (d). Merged pictures are presented for DU4475 (e) and SUM1315 (g) cells. A line profile was drawn on merged pictures, superimposing both LightSpot[®]-FL-1 and anti-Pgp immunostaining signals. The fluorescence intensity spectra across the line profile are shown with the line profile graphic on DU4475 cells (f) and SUM1315 cells (h). All pictures were acquired with the Cytation[™]3 MV (BioTek[®], M = 4 X, scale bar = 25 µm).

3.3. LightSpot[®]-FL-1 Allows Sensitive Detection and Quantification of Basal P-gp Expression Level in Various TNBC Cell Lines

The performance of the cell-permeant fluorescent probe LightSpot[®]-FL-1 was then checked by the quantification of P-gp expression level on five various TNBC cell lines, DU4475, SW527, HCC1937, MDA-MB-231 and SUM1315, in comparison with the anti-P-gp immunostaining reference method (Figure 4).

In all TNBC studied models, P-gp signal quantification was proportional between LightSpot[®]-FL-1 labeling and anti-P-gp labeling (Figure 5a). Indeed, the fluorescence intensities of LightSpot[®]-FL-1 labeling were $20.7 \pm 3.1 \times 10^3$ FU, $11.7 \pm 2.9 \times 10^3$ FU, $7.6 \pm 1.7 \times 10^3$ FU, $8.4 \pm 1.1 \times 10^3$ FU, $7.4 \pm 1.1 \times 10^3$ FU for DU4475, SW527, HCC1937, MDA-MB-231 and SUM1315 cell lines, respectively (Figure 5a). Likewise, anti-P-gp immunofluorescence intensities were $19.9 \pm 4.2 \times 10^3$ FU, $10.6 \pm 1.8 \times 10^3$ FU, $8.5 \pm 0.6 \times 10^3$ FU, $6.9 \pm 0.8 \times 10^3$ FU, and $6.9 \pm 0.9 \times 10^3$ FU for DU4475, SW527, HCC1937, MDA-MB-231 and SUM1315 cell lines, respectively (Figure 5a). Moreover, the fluorescence signal intensities correlation was studied for all cell lines, giving an R^2 determination coefficient of 0.9943, attesting to a strong correspondence between the intensities of the LightSpot[®]-FL-1 tracer and anti-P-gp signals (Figure 5b). These results showed a strong intensity correlation between the LightSpot[®]-FL-1 staining and the anti-P-gp immunostaining, clearly highlighting the LightSpot[®]-FL-1 probe performance in terms of detection sensitivity for P-gp expression levels in all TNBC models studied.

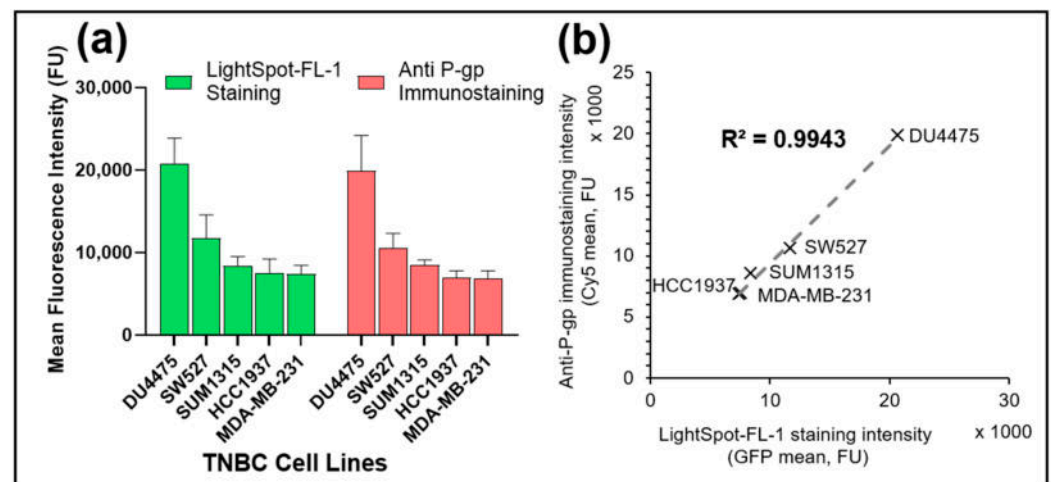


Figure 5. P-gp level quantification comparison after co-staining with LightSpot[®]-FL-1 staining and anti-P-gp immunostaining on several triple-negative breast cancer cell lines. Co-staining was carried out by combining LightSpot[®]-FL-1 staining with anti-P-gp immunostaining on five different TNBC cell lines i.e., DU4475, SW527, HCC1937, MDA-MB-231 and SUM1315. For each cell line, (a) both LightSpot-FL staining (green bars) and anti-P-gp immunostaining (red bars) fluorescence intensities were measured using the Gen5 software (BioTek[®]). Correlation between both stainings was evaluated (b) with the correlation line and the R^2 coefficient of determination.

3.4. LightSpot[®]-FL-1 Detects and Quantifies Olaparib-induced P-gp expression Level on SUM1315 Monolayer Cultures

Thereafter, the sensitivity of LightSpot[®]-FL-1 fluorescent staining for the quantification of the P-gp expression level was checked, in comparison with anti-P-gp immunostaining on SUM1315 cell lines. For this study, the SUM1315 cells cultured in monolayer were treated for 3 h with increasing concentrations of Olaparib (10, 50 or 100 μ M), a PARP inhibitor used for TNBC treatment. For these experiments, Olaparib was dissolved in DMSO. The final concentration of this solvent was always 0.1% in all cell-culture conditions (Figure 6). The fluorescence intensities were normalized to DMSO control values as a basal P-gp expression level. The results showed that, with anti-P-gp immunostaining, the basal P-gp expression level was $3.5 \pm 0.2 \times 10^3$ FU for the control 0.1% DMSO cells (Figure 6a,e). After 10 μ M Olaparib treatment, the P-gp expression remained similar to control, with $3.6 \pm 0.2 \times 10^3$ FU (Figure 6b,e). In contrast, with 50 and 100 μ M Olaparib, a significant increase in P-gp expression level was detected, with $3.9 \pm 0.2 \times 10^3$ FU and $3.9 \pm 0.1 \times 10^3$ FU, respectively ($p = 10^{-15}$ & 10^{-15} , Figure 6c–e), compared to 0.1% DMSO control cells. Very interestingly, a similar P-gp expression level evolution was detected with LightSpot[®]-FL-1 staining (green signal) in the same experimental conditions (Figure 6f–i). Indeed, 10 μ M Olaparib-treated cells presented a similar P-gp expression level, with $17.4 \pm 4.3 \times 10^3$ FU compared to the 0.1% DMSO control presenting $16.1 \pm 5.3 \times 10^3$ FU ($p = 0.77$, Figure 6f,g,j). In contrast, after 50 and 100 μ M Olaparib cell treatment, significantly increased P-gp expression levels were measured with $27.0 \pm 8.6 \times 10^3$ FU and $25.5 \pm 7.7 \times 10^3$ FU, respectively ($p = 10^{-14}$ & 10^{-11} , Figure 6h–j), compared to 0.1 % DMSO controls. These results clearly highlighted the fact that the LightSpot[®]-FL-1 fluorescent probe presented the same P-gp detection and quantification level efficiency as anti-P-gp immunostaining.

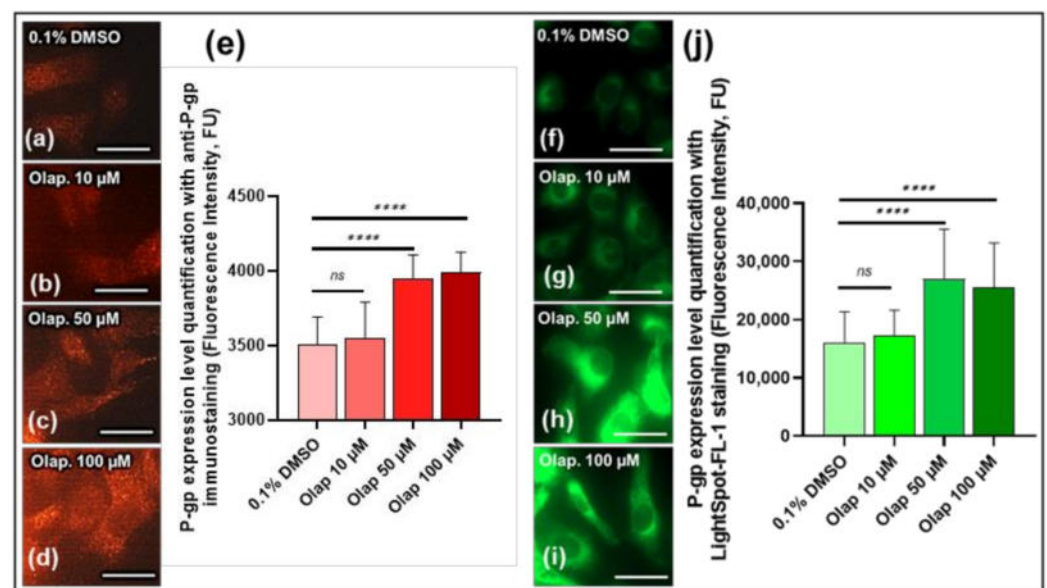


Figure 6. Comparison between anti-P-gp immunostaining and LightSpot®-FL-1 fluorescent probe staining for P-gp level expression measure on the SUM1315 cell line in monolayer culture condition after increased Olaparib concentration exposure. SUM1315 cells were treated with 10, 50 or 100 µM Olaparib for 3 h. Cells were then fixed and immunostained, combining anti-P-gp mouse antibody (F4 clone) and a goat anti-mouse secondary antibody, coupled to Alexa Fluor™ 568 (red signal) for each dose (a–d), and the signal was quantified using Gen5 software (BioTek®) (e). LightSpot®-FL-1 staining (green signal) was also utilized for the same experimental conditions (f–i), and quantified using Gen5 software (j). All pictures were acquired with the Cytation™3 MV (BioTek®, M = 4 X, scale bar = 50 µm). Significances between conditions were indicated as ns (not significant; $p > 0.05$), and **** $p < 0.0001$.

3.5. The Cell-permeant LightSpot®-FL-1 Detects and Quantifies Basal and Induced P-gp Expression in SUM1315 Spheroid Cell Mass Models

The LightSpot®-FL-1 fluorescent probe is able to penetrate into cells and cell masses. Thus, its performance for the detection and quantification of P-gp levels was also analyzed in SUM1315 models. Firstly, to develop a LightSpot®-FL-1 staining protocol with this model, SUM1315 spheroids were incubated with 1 µM LightSpot®-FL-1 fluorescent probe for 2 h. Then, four washes in D-PBS were carried out to remove the unfixed and unspecific fluorescent compound from the spheroids. At the end of LightSpot®-FL-1 incubation, the mean signal fluorescence intensity quantified in spheroids was $49.7 \pm 7.7 \times 10^3$ FU (Figure 7f). Then, green-fluorescent intensity staining decreased across each washing (Figure 7a–e). Indeed, the mean fluorescent LightSpot®-FL-1 intensity significantly decreased to $36.3 \pm 10.2 \times 10^3$ FU after 1 wash ($p = 10^{-6}$, compared to values before washes), to $21.9 \pm 11.8 \times 10^3$ FU after 2 washes ($p = 10^{-6}$, compared to values after 1 wash), to $13.4 \pm 7.2 \times 10^3$ FU after 3 washes ($p = 10^{-4}$, compared to values after 2 washes) and stabilized to $10.7 \pm 2.2 \times 10^3$ FU after 4 washes ($p = 0.1$, compared to values after 2 washes). These results suggested that, with these spheroid models, at least 3 washes are required after LightSpot®-FL-1 staining to remove the excess and unspecific fluorescent compound.

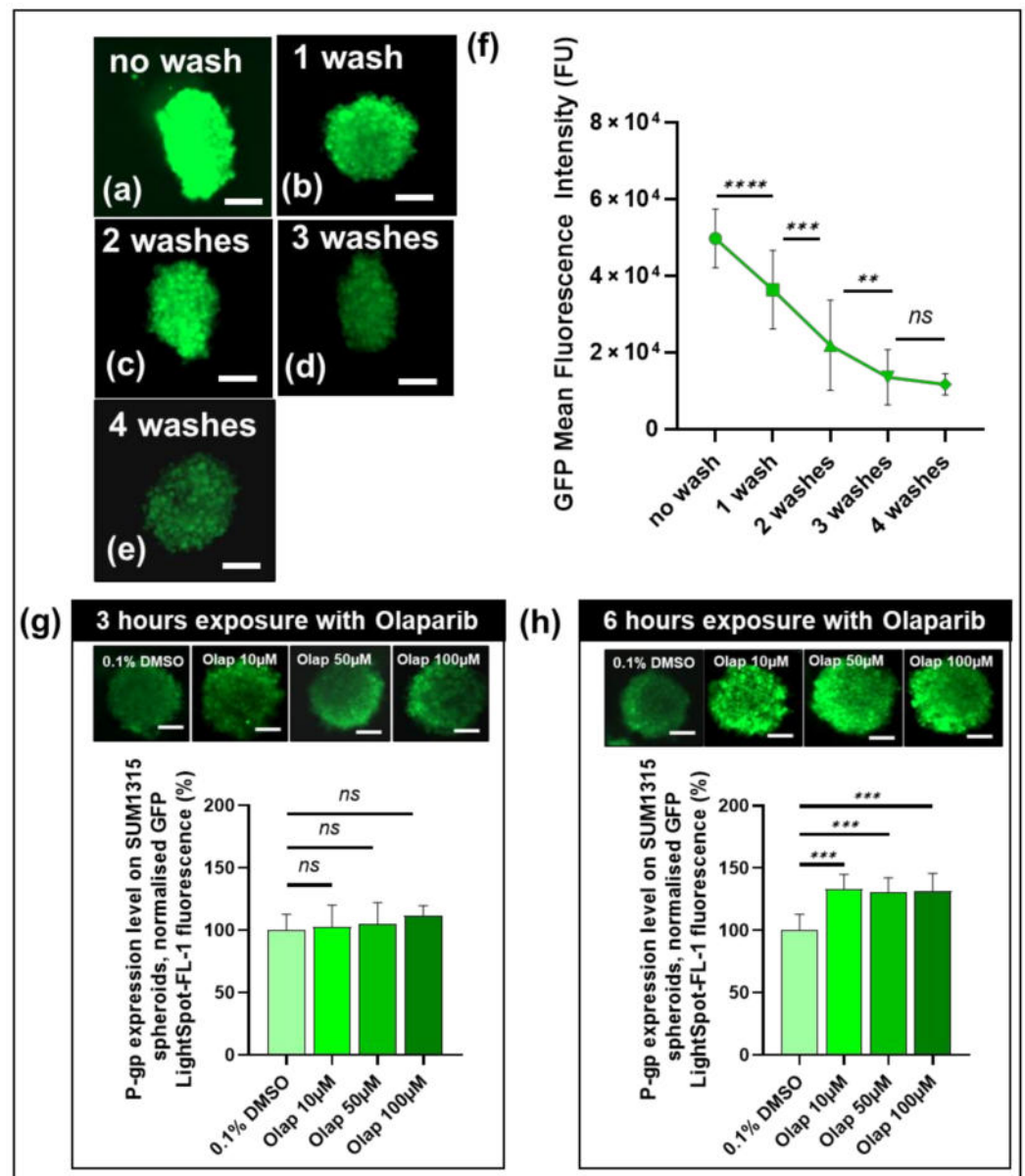


Figure 7. Development of LightSpot®-FL-1 staining on SUM1315 spheroids. SUM1315 spheroids (about 200 µm diameter) were incubated with LightSpot®-FL-1 at 1 µM and washed several times in D-PBS. Before and between each wash of 30 min, pictures of spheroids were made (a) for no wash, (b) for 1 wash, (c) for 2 washes, (d) for 3 washes, and (e) for 4 washes. For each wash number condition, spheroid global fluorescent intensity was quantified using Gen5 software (BioTek®) (f). Otherwise, SUM1315 spheroids were exposed with increasing Olaparib concentrations for 3 h (g) or for 6 h (h). After the LightSpot®-FL-1 staining, pictures were made for each dose for 3 (g) and 6 h (h) of Olaparib exposure. For each condition, spheroid global LightSpot®-FL-1 fluorescent intensity was quantified for 3 h of Olaparib-exposed spheroids (g) and for 6 h Olaparib-exposed spheroids (h). All pictures were acquired with the Cytation™3 MV (BioTek®, M = 4 X, scale bar = 50 µm). Significances between conditions were indicated as ns (not significant; $p > 0.05$), ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, and **** $p < 0.0001$.

Secondly, after P-gp staining and methodology development in spheroids with LightSpot®-FL-1 tracer, experiments for P-gp level quantification were carried out with this model. As previously carried out on monolayer cultures, SUM1315 spheroids were exposed to increasing Olaparib concentrations, i.e., 10, 50 or 100 µM, for 3 h or 6 h, before being stained with a LightSpot®-FL-1 fluorescent probe. In parallel, controls with 0.1%

DMSO spheroids were conducted. For all experiments, measured fluorescent intensities were normalized by 0.1% DMSO control spheroid values. After 3 h of Olaparib exposure, no P-gp expression level difference was detected between the 0.1% DMSO control with $100.0 \pm 12.7\%$ and the other Olaparib treated spheroids, with $102.5 \pm 17.5\%$, $105.0 \pm 17.1\%$ and $111.4 \pm 8.2\%$ for 10, 50 and 100 μM , respectively ($p = 0.95, 0.62$ & 0.08 , Figure 7g). In contrast, after 6 h of anti-PARP exposure, an increase in P-gp level expression was detected with $133.3 \pm 11.6\%$, $130.7 \pm 11.4\%$ and $131.4 \pm 14.4\%$ for 10, 50 and 100 μM Olaparib, respectively ($p = 10^{-10}, 10^{-10}$ & 10^{-10} , Figure 7h) than 0.1% DMSO control spheroids with $100.0 \pm 12.8\%$. These results highlighted the performance and sensitivity of the LightSpot[®]-FL-1 fluorescent probe to detect and quantify P-gp overexpression in SUM1315 spheroids, after their exposure to an anti-PARP-targeted therapy.

4. Discussion

The development of a tumoral multidrug resistance profile represents a real obstacle in cancer treatment, frequently leading to therapeutic failure [8]. This is a phenomenon in which tumor cells become resistant to multiple structurally and functionally different drugs during treatment [36]. This profile generally appears after initial tumoral exposure to anticancer agents, and mostly requires increasing treatment doses or adapting the treatment strategy [37]. Various molecular mechanisms are involved in multidrug resistance, including membrane efflux triggered by MDR proteins [7]. In particular, the P-gp is the most widely studied member of this family and is associated with tumoral resistance to a wide range of anticancer drugs. Indeed, its expression is often upregulated in tumors, conferring to cancer cells the ability to expulse therapeutic agents and thus limit/evade chemotherapy-mediated cell death. That is why the study of tumoral chemoresistance, established by the P-gp, is a relevant field as a way to optimize cancer treatment and limit therapeutic failure risks [20]. Indeed, the relationship between P-gp expression and treatment efficacy is widely validated for a large variety of cancer types, such as lung, bladder, ovarian, and breast cancers. This is especially of interest for aggressive and challenging tumoral subtypes, such as TNBC. This breast cancer sub-group is commonly associated with a high rate of residual disease after treatment, which increases the risk of relapse in the first 5 years after treatment [38]. One principal cause of therapeutic failure in TNBC treatment is a primary or acquired multidrug resistance profile that can include chemoresistance conferred by the P-gp [39]. Several studies have already demonstrated significant P-gp overexpression after neo-adjuvant chemotherapy that was higher for patients presenting an uncompleted pathological response [40,41]. In addition, it has been highlighted that the upregulation of P-gp expression after the neo-adjuvant chemotherapy of breast-cancer patients was associated with the metastatic spread of lymph nodes [42]. Moreover, other studies had already described the P-gp as a predictive factor of treatment outcomes [21,22]. However, this protein is very rarely used in clinics as a predictive biomarker for the prognosis of the pathology, primarily because of the lack of efficient tools allowing the detection of its presence in clinical samples.

Nowadays, two approaches allow us to evaluate the P-gp expression level at the pre-clinical step. Firstly, the evaluation of the P-gp involvement in xenobiotic efflux mechanisms can be indirectly studied via competitive fluorescent P-gp substrates, such as rhodamine 123, among many others [43,44]. For this approach, flow cytometry is mainly used, expressly requiring living cells in suspension. Secondly, direct P-gp quantification can be made with enzyme-linked immunosorbent assays, specific antibody immunostaining using Western blotting, immunocytochemistry or immunohistochemistry methodologies [5,45]. These approaches can be applied to cells in suspension, in monolayers, or on tissue sections, and allowed us to specifically detect and localize the P-gp. However, these approaches present difficulties regarding antibody penetration inside cells and/or cell masses and imply expensive and time-consuming experimentation. Thus, they only target extracellular-membrane P-gp, and not the intracellular part [45]. Indeed, the P-gp located on organelle membranes, such as the endoplasmic reticulum and lysosomes, also plays an important

role in cellular drug resistance that must not be underestimated [46,47]. Therefore, all of these methodologies present limited interest for routine clinical applications. For this reason, the simple, direct, reliable, and cost-effective detection and quantification of P-gp in tumor cells, and more particularly in tumoral masses, represents a relevant challenge for optimizing treatment efficacy and patient care while limiting the risk of therapeutic failure.

Fluorescence microscopy, based on molecularly targeted imaging agents, may have the potential to overcome such a challenge. Indeed, it provides a way to assess protein location and expression level in biological samples, with subcellular resolution and good sensitivity. As a consequence, over the last decade, there has been a remarkable growth in the development and use of small-molecule fluorescent probes in the biological sciences, particularly in oncology for cancer detection, staging and characterization. In particular, it is well documented that this approach could complement biopsy-based histopathological diagnosis [48]. Small-molecule fluorescent probes typically consist of a target-specific ligand, conjugated through a linker to a small organic fluorophore, for detection in the biological sample. Thus, considering the construction of a P-gp-targeted fluorescent probe, we designed LightSpot[®]-FL-1, a peptidic P-gp inhibitor derivative conjugated to the cell-permeant, bright, and photostable BODIPY-FL fluorophore (Figure 1). This peptidic moiety derives from a series of peptidomimetic P-gp ligands, previously identified as potent and selective non-competitive inhibitors, which reversibly bind to the intracellular domain of the P-gp [49]. From there, we reasoned that such ligands were good candidates to yield an efficient P-gp fluorescent probe after conjugation with a fluorophore.

LightSpot[®]-FL-1 was designed to penetrate inside cells and/or cell masses to specifically label P-gp, thus allowing its direct localization and quantification. Different TNBC cell models were used to evaluate LightSpot[®]-FL-1 as an efficient P-gp probe: DU4475 in a suspension cell line, SW527, HCC1937, MDA-MB-231 and SUM1315 monolayer cell lines, and SUM1315 spheroids.

Firstly, the ability of LightSpot[®]-FL-1 to penetrate and subsist inside cells was checked by flow cytometry analysis, using TNBC SUM1315 and DU4475 cells. Of particular interest, within the first 15 min after cell exposure to the fluorescent probe, a cellular fluorescence intensity 40-fold increase for DU4475 and 5000-fold increase for SUM1315 cells was observed, followed by a stabilization of the fluorescent signal in both cell lines (Figure 2). This suggests rapid LightSpot[®]-FL-1 uptake and binding to its P-gp target. Then, the cell-washing step led to the successful removal of the non-specifically bound LightSpot[®]-FL-1 part. Indeed, after 5 min of washing, a clear decrease of cell fluorescence intensity of 30.9% for DU4475, and of 50.0% for SUM1315 cells, was detected. However, part of the fluorescent LightSpot[®]-FL-1 probe was clearly retained in cells, even after two hours of washing. This part corresponds to 33.3% and 13.6% of the fluorescent tracer signal measured before the washing step, for DU4475 and SUM1315 cells, respectively (Figure 2). These results indicated that the Light-Spot[®]-FL-1 fluorescent probe quickly penetrates and specifically persists in cells.

Thereafter, the P-gp's selective localization, detection, and quantification by LightSpot[®]-FL-1 staining were demonstrated by fluorescence microscopy. For this demonstration, both TNBC cell models DU4475 and SUM1315 (living or fixed) were exposed to 1 μ M of the fluorescent probe for one hour, before a D-PBS wash for another hour, in order to expel excess markers out of the cells. This staining, applied to both living and fixed TNBC cells, highlighted the same membrane and cytoplasmic distribution of the LightSpot[®]-FL-1 compound, with an absence of cell nucleus accumulation (Figure 3). In addition, these results showed 99.5% and 94.4% fluorescent staining intensity similarities between living and fixed cell conditions, for DU4475 and SUM1315 cells, respectively (Figure 3). This demonstrated that LightSpot[®]-FL-1 staining can be carried out on both fresh or fixed cells, giving the same signal distribution and intensity. This property may turn out to be of particular interest for the staining of precious clinical samples. The following experiments were carried out on fixed TNBC cell models.

In order to validate P-gp-sensitive detection and quantification with the LightSpot[®]-FL-1 probe, the FL-1 marking was compared to anti-P-gp immunofluorescent staining using anti-P-gp F4 clone antibodies. These experiments were firstly conducted on DU4475 and SUM1315 cells and highlighted a similar staining signal and cellular distribution on both TNBC models (Figure 4). Strong colocalization between the two sets of labeling was also obtained on DU4475 cells, with a Pearson's coefficient of 92.1% and a Mander's overlap coefficient of 100.0%, which highlighted a strong spatial correlation between the two signals. Then, signal fluorescent intensities of both labeling sets were also compared for other TNBC cell lines. The correlation between the two signals for the five TNBC cell lines presented a coefficient determination R^2 of 0.99 (Figure 5). All these results demonstrated strong similarities between LightSpot[®]-FL-1 staining and anti-P-gp immunostaining signal localizations and intensities. These experiments allowed us to stratify several TNBC cell lines according to their P-gp level of expression, and they are consistent with the literature [35]. Thus, this innovative fluorescent probe transpires to be very efficient for the localization and quantification of P-gp on TNBC monolayer cell cultures.

In addition, the ability of the LightSpot[®]-FL-1 fluorescent probe to quantify the P-gp induction of expression was also checked. Indeed, our previous works had already highlighted the induction of P-gp expression in the SUM1315 cell line after exposure to 50 μ M of Olaparib PARP inhibitor, using the Western blotting methodology [28]. Therefore, for these experiments, the TNBC SUM1315 cell line, cultured in monolayer, was also used as a model after their exposure to increasing Olaparib doses (10, 50 and 100 μ M) over 3 h. As previously, the LightSpot[®]-FL-1 staining was achieved alongside anti-P-gp immunostaining. Firstly, a non-significant increase in P-gp expression level was noted after 10 μ M of Olaparib exposure, with a 2.8% and 5.7% increase for immunostaining and LightSpot[®]-FL-1 staining, respectively, in comparison to the DMSO control (Figure 6). In contrast, in the presence of 50 and 100 μ M of Olaparib, a significant increase in P-gp level was measured with the two methodologies. Indeed, regarding the immunostaining, this increase was 11.4% for both 50 and 100 μ M Olaparib concentrations, compared to the DMSO control. In contrast, for the LightSpot[®]-FL-1 staining, the P-gp level increased more strongly up to 55.1% after high-concentration Olaparib exposure, compared to 0.1% in the DMSO control (Figure 6). These results suggest that the LightSpot[®]-FL-1 seems to be more sensitive in the detection of the P-gp overexpression level, in comparison to the immunostaining method. This increased sensitivity permitted by the cell-permeant LightSpot[®]-FL-1 tracer might probably be due to the quantification of P-gp expressed on intracellular organelles, such as lysosomes [50].

This innovative LightSpot[®]-FL-1 tracer presents the ability to penetrate a cell mass. Thus, its performance for P-gp detection and quantification in cell masses was analyzed using SUM1315 spheroid models. Firstly, the P-gp staining method for SUM1315 spheroids was developed. Indeed, after 90 min of SUM1315 spheroid incubation with a 1 μ M LightSpot[®]-FL-1 probe, homogeneous distribution of an intense green signal was detected on all spheroid areas. In order to remove unspecific tracer accumulation, spheroids were then severally washed allowing a clear drop of spheroid green-fluorescent signal of 27.0% after one wash, 66.1% after two washes, and 73.0% after 3 washes (Figure 7). Interestingly, upon this step, a stable signal persisted inside the spheroid models, with a similarity of 80.0% (no significant difference observed), despite an additional fourth washing step. Thus, these data allowed us to determine optimal conditions to directly detect and quantify the P-gp expression level inside SUM1315 spheroid models. As previously seen on monolayer cell cultures, the LightSpot[®]-FL-1 probe's ability to detect changes in P-gp expression level after drug exposure was assessed on SUM1315 spheroids. In these conditions, no significant increase in P-gp expression level was detected after a 3 h short-term Olaparib exposure, with 2.4%, 4.8, and 10.2% of P-gp expression variation for 10, 50, and 100 μ M Olaparib doses, respectively, in comparison to DMSO controls (Figure 7). However, after a longer Olaparib exposure of 6 h, the LightSpot[®]-FL-1 compound allowed us to detect a significant P-gp expression level increase of 33.3%, 30.7%, and 30.7% for 10, 50, and

100 μ M Olaparib, respectively, in comparison to DMSO controls (Figure 7). These results highlighted the added value of the LightSpot[®]-FL-1 tracer to detect and quantify drug-induced overexpression of P-gp in fixed cell masses such as spheroid models.

The present works allowed the development of the new LightSpot[®]-FL-1 fluorescent probe for the specific localization and quantification of the P-gp chemoresistance protein, inside in vitro preclinical TNBC models. In particular, this innovative tool turned out to be very effective for directly detecting and measuring the basal or induced expression level of the P-gp on both monolayer cultures and spheroid models. One of the added values of the LightSpot[®]-FL-1 is its ability to specifically detect the P-gp on fresh and also fixed cell models. This ability would be particularly interesting regarding precious biological samples and would allow the elimination of P-gp expression level modifications during experiments. Moreover, we demonstrated that this new approach is more sensitive for the detection of P-gp expression level changes than classic immunofluorescence methods. This performance may probably be due to the ability of the LightSpot[®]-FL-1 probe to detect not only the plasma membrane P-gp but also the intracellular P-gp expressed at the membrane organelles [46,47]. Indeed, the P-gp is expressed not only at the plasmid membrane level, but, according to the literature, it is also transiently present on intracellular organelle membranes, such as endoplasmic reticulum, Golgi apparatus and endosome/lysosome vesicles [46]. In fact, all these organelles are involved during the synthesis and traffic of the P-gp. However, the P-gp is maintained on the lysosome membrane, playing an important role in tumoral chemoresistance via lysosomal drug sequestration and degradation [50,51]. Therefore, this approach would be more complete for the detection of the global P-gp cell expression level. For this, other works are currently in progress to characterize more precisely the intracellular LightSpot[®]-FL-1 staining. All these characteristics make the LightSpot[®]-FL-1 probe very effective for the quantification and localization of the P-gp inside multicellular biological structures. In particular, this innovative tool is very promising for improving studies of the P-gp and for the clinical diagnosis of tumoral chemoresistance established by this protein. More specifically, the LightSpot[®]-FL-1 may help to re-introduce the tumoral P-gp expression level as a predictive biomarker of therapeutic failure or cancer relapse. This new clinical approach may turn out to be very useful as a way to improve tumor treatment that is all the most important in challenging cancer subtypes such as TNBC. In this field, our current works are focused on the development of the LightSpot[®]-FL-1 probe on clinical samples for the evaluation of tumoral chemoresistance.

5. Patents

These present works follow the international patent filing # PCT/EP2020/077694 from 2 October 2020, by UCA/INSERM/BIOMARQUEURS [34].

Author Contributions: Conceptualization, A.G., P.D., C.D., E.M. and M.B.; Data curation, A.G., P.D. and M.R.; Formal analysis, A.G., P.D. and M.R.; Funding acquisition, P.D. and M.B.; Investigation, A.G., P.D. and M.R.; Methodology, A.G., P.D., C.D., E.M. and M.B.; Validation, A.G., P.D., C.D., E.M. and M.B.; Writing—original draft, A.G., P.D. and M.B.; Writing—review & editing, A.G., P.D., C.D., C.A., M.D., J.G., B.V., F.P.-L., E.M. and M.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: These works were partially funded by I-SITE CAP 20-25 Hub Innovergne-Clermont Auvergne University “ResLight project”-2021.

Institutional Review Board Statement: Not applicable because this study did not involve humans or animals.

Informed Consent Statement: Not applicable because this study did not involve humans.

Data Availability Statement: The data presented in this study are not publicly available and are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: Our thanks to the CICS (Centre d’Imagerie Cellulaire Santé) from Clermont Auvergne University for the flow cytometry analysis, and to the Biological Resource Center of Jean Perrin Comprehensive Cancer Center for the nitrogen storage of all cell lines used in these works.

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

References

1. Juliano, R.L.; Ling, V.A. Surface Glycoprotein Modulating Drug Permeability in Chinese Hamster Ovary Cell Mutants. *Biochim. Biophys. Acta.* **1976**, *455*, 152–162. [[CrossRef](#)]
2. Holland, I.B.; Cole, S.P.C.; Kuchler, K.; Higgins, C.F. Chapter 1—Phylogenetic and Functional Classification of ABC (ATP-Binding Cassette) Systems. In *ABC Proteins: From Bacteria to Man*; Academic Press Inc., Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2003; pp. 3–35.
3. Bamdad, M.; Brousseau, P.; Denizeau, F. Identification of a Multidrug Resistance-like System in Tetrahymena Pyriformis: Evidence for a New Detoxication Mechanism in Freshwater Ciliates. *FEBS Lett.* **1999**, *456*, 389–393. [[CrossRef](#)]
4. Bamdad, M.; Reader, S.; Grolière, C.A.; Bohatier, J.; Denizeau, F. Uptake and Efflux of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Tetrahymena Pyriformis: Evidence for a Resistance Mechanism. *Cytometry* **1997**, *28*, 170–175. [[CrossRef](#)]
5. Vache, C.; Camares, O.; Cardoso-Ferreira, M.-C.; Dastugue, B.; Creveaux, I.; Vauray, C.; Bamdad, M. A Potential Genomic Biomarker for the Detection of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Pollutants: Multidrug Resistance Gene 49 in *Drosophila Melanogaster*. *Environ. Toxicol. Chem.* **2007**, *26*, 1418–1424. [[CrossRef](#)]
6. Valton, E.; Wawrzyniak, I.; Amblard, C.; Combourieu, B.; Bayle, M.-L.; Desmolles, F.; Kwiatkowski, F.; Penault-Llorca, F.; Bamdad, M. P-Gp Expression Levels in the Erythrocytes of Brown Trout: A New Tool for Aquatic Sentinel Biomarker Development. *Biomarkers* **2017**, *22*, 566–574. [[CrossRef](#)]
7. Gottesman, M.M. Mechanisms of Cancer Drug Resistance. *Annu. Rev. Med.* **2002**, *53*, 615–627. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Robey, R.W.; Pluchino, K.M.; Hall, M.D.; Fojo, A.T.; Bates, S.E.; Gottesman, M.M. Revisiting the Role of ABC Transporters in Multidrug-Resistant Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2018**, *18*, 452–464. [[CrossRef](#)]
9. Theodoulou, F.L.; Kerr, I.D. ABC Transporter Research: Going Strong 40 Years On. *Biochem. Soc. Trans.* **2015**, *43*, 1033–1040. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Silverman, J.A. Multidrug-Resistance Transporters. *Pharm. Biotechnol.* **1999**, *12*, 353–386. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Zheng, H.-C. The Molecular Mechanisms of Chemoresistance in Cancers. *Oncotarget* **2017**, *8*, 59950–59964. [[CrossRef](#)]
12. Sarkadi, B.; Homolya, L.; Szakács, G.; Váradi, A. Human Multidrug Resistance ABCB and ABCG Transporters: Participation in a Chemoimmunity Defense System. *Physiol. Rev.* **2006**, *86*, 1179–1236. [[CrossRef](#)]
13. Leonard, G.D.; Fojo, T.; Bates, S.E. The Role of ABC Transporters in Clinical Practice. *Oncologist* **2003**, *8*, 411–424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Lawlor, D.; Martin, P.; Busschots, S.; Thery, J.; O’Leary, J.J.; Hennessy, B.T.; Stordal, B. PARP Inhibitors as P-Glycoprotein Substrates. *J. Pharm. Sci.* **2014**, *103*, 1913–1920. [[CrossRef](#)]
15. Azzariti, A.; Porcelli, L.; Simone, G.M.; Quatrala, A.E.; Colabufo, N.A.; Berardi, F.; Perrone, R.; Zucchetti, M.; D’Incalci, M.; Xu, J.M.; et al. Tyrosine Kinase Inhibitors and Multidrug Resistance Proteins: Interactions and Biological Consequences. *Cancer Chemoth. Pharm.* **2010**, *65*, 335–346. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Pérez-Tomás, R. Multidrug Resistance: Retrospect and Prospects in Anti-Cancer Drug Treatment. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 1859–1876. [[CrossRef](#)]
17. Nedeljković, M.; Damjanović, A. Mechanisms of Chemotherapy Resistance in Triple-Negative Breast Cancer—How We Can Rise to the Challenge. *Cells* **2019**, *8*, 957. [[CrossRef](#)]
18. Yamada, A.; Ishikawa, T.; Ota, I.; Kimura, M.; Shimizu, D.; Tanabe, M.; Chishima, T.; Sasaki, T.; Ichikawa, Y.; Morita, S.; et al. High Expression of ATP-Binding Cassette Transporter ABCC11 in Breast Tumors Is Associated with Aggressive Subtypes and Low Disease-Free Survival. *Breast Cancer Res. Treat.* **2013**, *137*, 773–782. [[CrossRef](#)]
19. Linn, S.C.; Giaccone, G.; van Diest, P.J.; Blokhuis, W.M.D.; van der Valk, P.; van Kalken, C.K.; Kuiper, C.M.; Pinedo, H.M.; Baak, J.P.A. Prognostic Relevance of P-Glycoprotein Expression in Breast Cancer. *Ann. Oncol.* **1995**, *6*, 679–685. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Robinson, K.; Tiriveedhi, V. Perplexing Role of P-Glycoprotein in Tumor Microenvironment. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Baekelandt, M.M.; Holm, R.; Nesland, J.M.; Tropé, C.G.; Kristensen, G.B. P-Glycoprotein Expression Is a Marker for Chemotherapy Resistance and Prognosis in Advanced Ovarian Cancer. *Anticancer Res.* **2000**, *20*, 1061–1067.
22. Verrelle, P.; Frédéric, M.; Fonck, Y.; Feillel, V.; Dionet, C.; Kwiatkowski, F.; Plagne, R.; Chassagne, J. Clinical Relevance of Immunohistochemical Detection of Multidrug Resistance P-Glycoprotein in Breast Carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **1991**, *83*, 111–116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Irvin, W.J.; Carey, L.A. What Is Triple-Negative Breast Cancer? *Eur. J. Cancer* **2008**, *44*, 2799–2805. [[CrossRef](#)]
24. Prat, A.; Pineda, E.; Adamo, B.; Galván, P.; Fernández, A.; Gaba, L.; Díez, M.; Viladot, M.; Arance, A.; Muñoz, M. Clinical Implications of the Intrinsic Molecular Subtypes of Breast Cancer. *Breast* **2015**, *24* (Suppl. 2), S26–S35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Yin, L.; Duan, J.-J.; Bian, X.-W.; Yu, S.-C. Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtyping and Treatment Progress. *Breast Cancer Res.* **2020**, *22*, 61. [[CrossRef](#)]

26. Liedtke, C.; Mazouni, C.; Hess, K.R.; André, F.; Tordai, A.; Mejia, J.A.; Symmans, W.F.; Gonzalez-Angulo, A.M.; Hennessy, B.; Green, M.; et al. Response to Neoadjuvant Therapy and Long-Term Survival in Patients with Triple-Negative Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2008**, *26*, 1275–1281. [[CrossRef](#)]
27. Carey, L.A.; Dees, E.C.; Sawyer, L.; Gatti, L.; Moore, D.T.; Collichio, F.; Ollila, D.W.; Sartor, C.I.; Graham, M.L.; Perou, C.M. The Triple Negative Paradox: Primary Tumor Chemosensitivity of Breast Cancer Subtypes. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 2329–2334. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Dufour, R.; Daumar, P.; Mounetou, E.; Aubel, C.; Kwiatkowski, F.; Abrial, C.; Vatoux, C.; Penault-Llorca, F.; Bamdad, M. BCRP and P-Gp Relay Overexpression in Triple Negative Basal-like Breast Cancer Cell Line: A Prospective Role in Resistance to Olaparib. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 12670. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Dubois, C.; Dufour, R.; Daumar, P.; Aubel, C.; Szczepaniak, C.; Blavignac, C.; Mounetou, E.; Penault-Llorca, F.; Bamdad, M. Development and Cytotoxic Response of Two Proliferative MDA-MB-231 and Non-Proliferative SUM1315 Three-Dimensional Cell Culture Models of Triple-Negative Basal-like Breast Cancer Cell Lines. *Oncotarget* **2017**, *8*, 95316–95331. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Dubois, C.; Daumar, P.; Aubel, C.; Gauthier, J.; Vidalinc, B.; Mounetou, E.; Penault-Llorca, F.; Bamdad, M. The New Synthetic Serum-Free Medium OptiPASS Promotes High Proliferation and Drug Efficacy Prediction on Spheroids from MDA-MB-231 and SUM1315 Triple-Negative Breast Cancer Cell Lines. *J. Clin. Med. Res.* **2019**, *8*, 397. [[CrossRef](#)]
31. Dubois, C.; Martin, F.; Hassel, C.; Magnier, F.; Daumar, P.; Aubel, C.; Guerder, S.; Mounetou, E.; Penault-Llorca, F.; Bamdad, M. Low-Dose and Long-Term Olaparib Treatment Sensitizes MDA-MB-231 and SUM1315 Triple-Negative Breast Cancers Spheroids to Fractionated Radiotherapy. *J. Clin. Med.* **2019**, *9*, 64. [[CrossRef](#)]
32. Goisnard, A.; Dubois, C.; Daumar, P.; Aubel, C.; Depresle, M.; Gauthier, J.; Vidalinc, B.; Penault-Llorca, F.; Mounetou, E.; Bamdad, M. The New Serum-Free OptiPASS[®] Medium in Cold and Oxygen-Free Conditions: An Innovative Conservation Method for the Preservation of MDA-MB-231 Triple Negative Breast Cancer Spheroids. *Cancers* **2021**, *13*, 1945. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Booi, T.H.; Price, L.S.; Danen, E.H.J. 3D Cell-Based Assays for Drug Screens: Challenges in Imaging, Image Analysis, and High-Content Analysis. *SLAS Discov.* **2019**, *24*, 615–627. [[CrossRef](#)]
34. Bamdad, M.; Daumar, P.; Dubois, C.; Gauthier, J.; Goisnard, A.; Mounetou, E.; Penault-Llorca, F.; Vidalinc, B. LightSpot Patent: Method for Detecting, Localising and Quantifying MDR Proteins. International Patent Application WO 2021/064191 A1, 8 April 2021.
35. Bush, T.L.; Payton, M.; Heller, S.; Chung, G.; Hanestad, K.; Rottman, J.B.; Loberg, R.; Friberg, G.; Kendall, R.L.; Saffran, D.; et al. AMG 900, a Small-Molecule Inhibitor of Aurora Kinases, Potentiates the Activity of Microtubule-Targeting Agents in Human Metastatic Breast Cancer Models. *Mol. Cancer Ther.* **2013**, *12*, 2356–2366. [[CrossRef](#)]
36. Kumar, A.; Jaitak, V. Natural Products as Multidrug Resistance Modulators in Cancer. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *176*, 268–291. [[CrossRef](#)]
37. Kartal-Yandim, M.; Adan-Gokbulut, A.; Baran, Y. Molecular Mechanisms of Drug Resistance and Its Reversal in Cancer. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2016**, *36*, 716–726. [[CrossRef](#)]
38. Dent, R.; Trudeau, M.; Pritchard, K.I.; Hanna, W.M.; Kahn, H.K.; Sawka, C.A.; Lickley, L.A.; Rawlinson, E.; Sun, P.; Narod, S.A. Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Features and Patterns of Recurrence. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 4429–4434. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. André, F.; Zielinski, C.C. Optimal Strategies for the Treatment of Metastatic Triple-Negative Breast Cancer with Currently Approved Agents. *Ann. Oncol.* **2012**, *23*, vi46–vi51. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Kim, B.; Fatayer, H.; Hanby, A.M.; Horgan, K.; Perry, S.L.; Valleley, E.M.A.; Verghese, E.T.; Williams, B.J.; Thorne, J.L.; Hughes, T.A. Neoadjuvant Chemotherapy Induces Expression Levels of Breast Cancer Resistance Protein That Predict Disease-Free Survival in Breast Cancer. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e62766. [[CrossRef](#)]
41. Zhang, Z.; Zhang, W.; Jin, Y.; Wang, H.; Gu, F.; Zhou, J.; Lao, Z.; Xu, Z.; Tang, F.; Zou, L.; et al. Evaluating the Response of Neoadjuvant Chemotherapy for Treatment of Breast Cancer: Are Tumor Biomarkers and Dynamic Contrast Enhanced MR Images Useful Predictive Tools? *J. Thorac. Dis.* **2014**, *6*, 785–794. [[CrossRef](#)]
42. Rudas, M.; Filipits, M.; Taucher, S.; Stranzl, T.; Steger, G.G.; Jakesz, R.; Pirker, R.; Pohl, G. Expression of MRP1, LRP and Pgp in Breast Carcinoma Patients Treated with Preoperative Chemotherapy. *Breast Cancer Res. Treat.* **2003**, *81*, 149–157. [[CrossRef](#)]
43. Saaby, L.; Brodin, B. A Critical View on In Vitro Analysis of P-Glycoprotein (P-Gp) Transport Kinetics. *J. Pharm. Sci.* **2017**, *106*, 2257–2264. [[CrossRef](#)]
44. Jouan, E.; Le Vée, M.; Mayati, A.; Denizot, C.; Parmentier, Y.; Fardel, O. Evaluation of P-Glycoprotein Inhibitory Potential Using a Rhodamine 123 Accumulation. *Pharmaceutics* **2016**, *8*, 12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Hamrang, Z.; Arthanari, Y.; Clarke, D.; Pluen, A. Quantitative Assessment of P-Glycoprotein Expression and Function Using Confocal Image Analysis. *Microsc. Microanal.* **2014**, *20*, 1329–1339. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Fu, D.; Arias, I.M. Intracellular Trafficking of P-Glycoprotein. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2012**, *44*, 461–464. [[CrossRef](#)]
47. Zhitomirsky, B.; Assaraf, Y.G. Lysosomal Sequestration of Hydrophobic Weak Base Chemotherapeutics Triggers Lysosomal Biogenesis and Lysosome-Dependent Cancer Multidrug Resistance. *Oncotarget* **2015**, *6*, 1143–1156. [[CrossRef](#)]
48. Garland, M.; Yim, J.J.; Bogoy, M. A Bright Future for Precision Medicine: Advances in Fluorescent Chemical Probe Design and Their Clinical Application. *Cell Chem. Biol.* **2016**, *23*, 122–136. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

49. Arnaud, O.; Koubeissi, A.; Ettouati, L.; Terreux, R.; Alamé, G.; Grenot, C.; Dumontet, C.; Di Pietro, A.; Paris, J.; Falson, P. Potent and Fully Noncompetitive Peptidomimetic Inhibitor of Multidrug Resistance P-Glycoprotein. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 6720–6729. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Yamagishi, T.; Sahni, S.; Sharp, D.M.; Arvind, A.; Jansson, P.J.; Richardson, D.R. P-Glycoprotein Mediates Drug Resistance via a Novel Mechanism Involving Lysosomal Sequestration. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 31761–31771. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Hraběta, J.; Belhajová, M.; Šubrtová, H.; Merlos Rodrigo, M.A.; Heger, Z.; Eckschlager, T. Drug Sequestration in Lysosomes as One of the Mechanisms of Chemoresistance of Cancer Cells and the Possibilities of Its Inhibition. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 392. [[CrossRef](#)]

I. 4. Article Rédigé : LightSpot® fluorescent probes present different staining profiles in Triple Negative Breast Cancer cells, for the labelling of the P-gp multidrug resistance protein

I. 4. a) *Présentation*

Les travaux précédents ont permis la validation du traceur fluorescent LightSpot®-FL-1, pour spécifiquement détecter et quantifier la P-gp sur des modèles cellulaires précliniques de CSTN. Dans cette même optique de développer des traceurs fluorescents permettant la détection de la P-gp dans des échantillons biologiques, quatorze autres traceurs fluorescents LightSpot® ont été développés par les pharmaco-chimistes du groupe Résistance *via* des approches de pharmaco-modulation. Cette série de traceurs LightSpot® comprend des dérivés de deux inhibiteurs peptidiques de la P-gp, rendus fluorescents par couplages avec différents fluorophores (BODIPY-FL, SulfoCyanine3 et BODIPY-X). Dans ce cadre, l'objectif de ces travaux a été d'explorer le potentiel de marquage cellulaire d'une série de 14 traceurs LightSpot® conçus pour la détection de la P-gp. Pour ce faire des protocoles de marquages cellulaires avec ces composés ont été développés sur les lignées cellulaires de CSTN SUM1315 et DU4475, et analysés par imagerie de microscopie à fluorescence.

Ces travaux ont notamment permis de distinguer deux types de profils de marquage cellulaire. Le premier profil observé pour l'ensemble des composés conçus avec les sondes fluorescentes BODIPY-FL et BODIPY-X, est caractérisé par une accumulation du signal fluorescent au niveau de la membrane plasmique, du cytoplasme, ou de points intracellulaires présentant un signal particulièrement brillant. Des expériences de co-marquage incluant un marquage avec le traceur LightSpot®-FL-1, comme exemple, et un marqueur lysosomal de référence ont permis de valider l'accumulation de ce composé dans les lysosomes, correspondant au signal intense observé sous forme de points intracellulaires. Le second profil de marquage cellulaire, obtenu avec les traceurs conçus avec le fluorophore SulfoCyanine3, est caractérisé par une accumulation du traceur au niveau de la membrane plasmique et de structures filamenteuses intracellulaires. Des expériences de co-marquage incluant un marquage avec le traceur LightSpot®-SCy-1, comme exemple, et un marqueur mitochondrial de référence ont permis de valider l'accumulation de ce composé dans les mitochondries, correspondant aux structures filamenteuses intracellulaires, préalablement observées.

Ces travaux ont fait l'objet de la rédaction d'un article scientifique en premier auteur (article en cours de soumission).

I. 4. b) Article rédigé

LightSpot® fluorescent probes present different staining profiles in Triple Negative Breast Cancer cells, for the labelling of the P-gp multidrug resistance protein

Antoine Goisnard¹, Pierre Daumar¹, Clémence Dubois^{1,4}, Corinne Aube², Manon Roux⁴, Marie Depresle⁴, Jean Gauthier^{4,5}, Bernard Vidalin^{4,5}, Frédérique Penault-Llorca³, Emmanuelle Mounetou¹, Mahchid Bamdad^{1,*}

¹ Université Clermont Auvergne, Institut Universitaire de Technologie, UMR INSERM-UCA, U1240, Imagerie Moléculaire et Stratégies Théranostiques, F-63000 Clermont Ferrand, France

10 ² Université Clermont Auvergne, Faculté de médecine, UMR INSERM-UCA, U1240, Imagerie Moléculaire et Stratégies Théranostiques, F-63000 Clermont Ferrand, France

³ Université Clermont Auvergne, Centre de Lutte Contre le Cancer Jean Perrin, UMR INSERM-UCA, U1240, Imagerie Moléculaire et Stratégies Théranostiques, F-63000 Clermont Ferrand, France

⁴ BIOMARQUEURS Company, 5 avenue Blaise Pascal, 63178 Aubière, France

⁵ BIOPASS Company, 5 avenue Blaise Pascal, 63178 Aubière, France

* Corresponding author: mahchid.bamdad@uca.fr

Abstract:

20 Cancer drug resistance is the principal cause of therapeutic failure in Oncology. This phenomenon involves different molecular mechanisms including membrane efflux transporters called Multidrug Resistance (MDR) proteins. These transmembrane proteins target a large panel of xenobiotics including almost all of anticancer drugs and expulse them out of cells. The Permeability-glycoprotein (P-gp) is one of the major MDR proteins with high clinical interest. Indeed, this transporter confers natural or acquired cellular resistance to many chemotherapeutic or targeted therapy agents. Thereby, the diagnosis of cancer drug resistance established by the P-gp is relevant to optimize anticancer treatments, especially for aggressive tumoral subtypes such as Triple Negative Breast Cancer (TNBC). In this context, we develop LightSpot® fluorescent probes for the specific detection of the P-gp, from peptide P-gp ligand compounds, making them detectable by coupling with several fluorophores. The present works aimed to evaluate the cell staining potential of 14 different cell-permeant LightSpot® fluorescent probes. For this, staining protocols were developed on SUM1315 and DU4475 TNBC cells. 30 Obtained results allowed to distinguish two types of staining profiles. The first profile obtained for probes developed with BODIPY-FL or BODIPY-X fluorophores supplied staining at cell membrane and lysosomal level. In contrast, the second profile obtained for probes developed with SulfoCyanine3 fluorophore supplied labelling at cell membrane and lysosomal level. Thus, all studied LightSpot® probes present great potential for the detection of the P-gp, especially to target the P-gp present on intracellular organelles membranes.

Key words: Multidrug Resistance proteins, P-gp staining, LightSpot® cell-permeant fluorescent probes, Triple Negative Breast Cancer.

1. Introduction

MDR (Multidrug Resistance) proteins are part of the “ATP-binding cassette” (ABC) transporter superfamily that are extremely ubiquitous and found in a wide variety of living organisms [1,2]. They have a major role in cell protection against xenobiotics, by translocating a large range of substrates across cellular membrane [3]. By this property, they constitute a complex membrane efflux system which is one the major cause of cancer drug resistance. Indeed, MDR proteins recognise a large variety of anticancer agents and are at the base of tumor cross resistance. The most studied MDR protein is the Permeability-glycoprotein (P-gp), discovered in 1976 as a surface glycoprotein reducing sensitivity to anticancer drugs in cancer cells [4]. This protein has a structurally broad range of substrates including various chemotherapeutic agents such as anthracyclines, taxanes and vinca alkaloids, as well as many targeted therapeutics such as Tyrosine Kinase Inhibitors or anti-PARP1 (Poly ADP Ribose Polymerase) [5–7]. The overexpression of P-gp in cancer can be either inherent or induced after the exposition of tumor cells with anticancer drugs. In both cases, this overexpression confers drug resistance by limiting sufficient accumulation of the drug inside cells, and thus reduce therapeutic effect. This important factor in cancer drug resistance often results in therapeutic failure [8]. Moreover, P-gp overexpression is associated with tumoral aggressiveness and low disease-free survival in breast cancer [9]. Thus, the P-gp expression level presents an important interest as a predictive factor on cancer drug resistance. However, this clinical relevance is limited by the lack of efficient tools allowing to easily detect the presence of the P-gp, in clinical diagnosis routine [10].

In this context, through pharmaco-modulation approaches, our group develops bio-active fluorescent compounds such as LightSpot® fluorescent probes targeting the P-gp[11]. Our previous works already validated the use of LightSpot-FL-1® fluorescent probe for the detection, the localization, and the quantification of the P-gp in preclinical *in vitro* models [12]. Indeed, this innovant cell-permeant detection tool presented higher performances than immunostaining methodology, to detect and quantify *de novo* or induced P-gp expression level, on monolayer cell cultures or spheroid models, at fresh or fixed state [12]. For this, we used Triple Negative Breast Cancer (TNBC) cell lines as study model of tumoral resistance and aggressiveness. TNBC is an heterogeneous and aggressive breast cancer subtype defined by the absence of oestrogen and progesterone receptors expression, and associated with the absence of HER2 protein overexpression and/or *HER2* gene amplification [13]. This subtype accounts for 15 to 20% of breast cancers and is associated with poor prognosis, high early relapses and drug failure, in direct correlation with cancer drug resistance [14–16]. Thus, TNBC represents a relevant study model for cancer cell drug resistance [17].

As part of our pharmaco-modulation works, we have developed a series of 14 innovant LightSpot® fluorescent probes for the specific detection, localisation, and quantification of the P-gp [11]. After, the previous validation of one of these probes, the LightSpot®-FL-1® [12], these present works aimed to explore the specific P-gp labelling potential of these 14 fluorescent tracers. For this, LightSpot® compounds staining protocols were developed on SUM1315 and DU4475 TNBC cell models and analysed by fluorescence microscopy-based methodology.

2. Methods

80 a. LightSpot® Fluorescent probes

LightSpot® series fluorescent probes were obtained by organic synthesis, as previously described [11]. Briefly, 14 fluorescent compounds were obtained by coupling two P-gp ligand parent compounds with different commercially available fluorophores (**Table 1**). All probes structure corresponds to the following formula:

$$\text{LightSpot® fluorescent probe} = \text{Pgp ligand} - \text{fluorophore}$$

We used two different P-gp inhibitor derivatives as P-gp ligands parent molecules (P-gp ligand parent #1 and P-gp ligand parent #2). LightSpot®-FL-1, LightSpot®-FL-2, LightSpot®-FL-3, LightSpot®-SCy-1, LightSpot®-SCy-2, LightSpot®-BRX-1, and LightSpot®-BRX-2 probes were synthesised from the P-gp ligand parent #1 (**Table 1**). LightSpot®-FL-4, LightSpot®-FL-5, LightSpot®-FL-6, LightSpot®-SCy-3, LightSpot®-SCy-4, LightSpot®-BRX-3, and LightSpot®-BRX-4 were synthesised from the P-gp inhibitor derivative parent compound #2 (**Table 1**). All fluorescent compounds chemical structures are distinguished from each other by used coupling fluorophore, the coupling site on the molecule, or the possible presence of a spacer between P-gp ligand and fluorophore. LightSpot®-FL-1, LightSpot®-FL-2, LightSpot®-FL-3, LightSpot®-FL-4, LightSpot®-FL-5, and LightSpot®-FL-6 were obtain by coupling the P-gp ligand parent compound with the commercial amine-reactive N-HydroxySuccinimidyl (NHS) ester of the BODIPY-FL fluorophore (CAS 146616-66-2, Interchim, Montluçon, France) (**Table 1**). LightSpot®-SCy-1, LightSpot®-SCy-2, LightSpot®-SCy-3, and LightSpot®-SCy-4, 6 were obtain by coupling the P-gp ligand parent compound with the commercial amine-reactive NHS ester of the Sulfo-Cyanine3 (CAS 235439-04-0, Lumiprobe, Hannover, Germany) (**Table 1**). LightSpot®-BRX-1, LightSpot®-BRX-2, LightSpot®-BRX-3, and LightSpot®-BRX-4 were obtain by coupling the P-gp ligand parent compound with the commercial amine-reactive NHS ester of the BODIPY 650/665 X (CAS 1424150-38-8, Lumiprobe, Hannover, Germany) (**Table 1**). Pure dry aliquots of each LightSpot® probe were stored at -20 °C and were used to prepare 1.0 mM stock solutions in Dimethyl-Sulfoxide (DMSO) for biological experiments.

| P-gp inhibitor ligand parent #1 | | P-gp inhibitor derivative Parent #2 | |
|---------------------------------|--|-------------------------------------|--|
| LightSpot® Compound | Fluorophore | LightSpot® Compound | Fluorophore |
| LightSpot®-FL-1 | BODIPY-FL (CAS 146616-66-2) | LightSpot®-FL-4 | BODIPY-FL (CAS 146616-66-2) |
| LightSpot®-FL-2 | | LightSpot®-FL-5 | |
| LightSpot®-FL-3 | | LightSpot®-FL-6 | |
| LightSpot®-SCy-1 | Sulfo-Cyanine3 (CAS 1424150-38-8) | LightSpot®-SCy-3 | Sulfo-Cyanine3 (CAS 1424150-38-8) |
| LightSpot®-SCy-2 | | LightSpot®-SCy-4 | |
| LightSpot®-BRX-1 | BODIPY-X 650/665 (CAS 235439-04-0) | LightSpot®-BRX-3 | BODIPY-X 650/665 (CAS 235439-04-0) |
| LightSpot®-BRX-2 | | LightSpot®-BRX-4 | |

Table 1: LightSpot® fluorescent probes series and their coupling fluorophore.

b. Cell Culture

Triple-negative breast cancer SUM1315 (MO2) and DU4475 (HTB-123™) cell lines were obtained from ASTERAND (Detroit, Alabama, USA) and the ATCC® (Manassas, Virginia, USA), respectively. Both cell lines were stored in the Biological Resource Center of the Jean Perrin Comprehensive Cancer Center, identified under No. BB-0033-00075 (Clermont-Ferrand, France). Each cell line was checked for the absence of mycoplasma contamination (MycoplasmaCheck® test, Eurofins Genomics, Luxembourg, Luxembourg) and maintained in their recommended cell culture media at 37 °C under 5% CO₂ in a humidified incubator. SUM1315 cells were cultured in Ham's F-12 medium (Gibco, Dublin, Ireland), supplemented with 5% FCS (fetal calf serum, Eurobio Scientific, Paris, France), 10 mM HEPES buffer (Sigma, Darmstadt, Germany), 4 µg/mL insulin (Novo Nordisk, Bagsværd, Denmark), 10 ng/mL epidermal growth factor (EGF, Sigma, Darmstadt, Germany) and 20 µg/mL gentamicin (Panpharma, Paris, France). DU4475 cells were cultured in RPMI 1640 medium (Gibco, Dublin, Ireland) supplemented with 10% decompemented FCS and 20 µg/mL gentamicin.

c. TNBC cells exposure with non-fluorescent P-gp ligand parent compounds or uncoupled commercial fluorophores

For the adherent SUM1315 cell line, cells were seeded in IbiTreat 8-well µ-Slides (Ibidi®, Gräfelfing, Germany) at a concentration of 50,000 cells per well. Slides were maintained at 37 °C under 5% CO₂ in a humidified incubator until the cell carpet reached 60% of confluence. For the suspension DU4475 cell line, cells were directly harvested from the culture flask. In both cases, cells were fixed with a 4% paraformaldehyde (PFA) solution. Fixed cells were then incubated during 1 hour with either P-gp ligand parent #1, P-gp ligand parent #1, the uncoupled NHS ester of the BODIPY-FL fluorophore, the uncoupled NHS ester of the Sulfo-Cyanine3 or the uncoupled NHS ester of the BODIPY-X 650/665. For this, each reagent in solution in DMSO at 1.0 mM was diluted in D-PBS (Dubelco-Phosphate Buffer Saline) at 1.0 µM for final DMSO concentration of 0.1%. Three successive washes of 20 min were then conducted in D-PBS to remove unspecific cell staining. In parallel, nuclear staining was carried out using 1 µg/mL bisbenzimidazole Hoechst33258 solution (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany, catalog #14530). Cells were finally imaged with a Cytation™3 MV (BioTek®, Winooski, VT, USA) fluorescent microscopy module (M = 40x, fluorescence filters = DAPI, GFP, RFP and Cy5).

d. LightSpot® fluorescent probes staining on fixed TNBC cells

For the adherent SUM1315 cell line, cells were seeded in IbiTreat 8-well µ-Slides (Ibidi®, Gräfelfing, Germany) at a concentration of 50,000 cells per well. Slides were maintained at 37 °C under 5% CO₂ in a humidified incubator until the cell carpet reached 60% of confluence. For the suspension DU4475 cell line, cells were directly harvested from the culture flask. In both cases, cells were fixed with a 4% paraformaldehyde (PFA) solution. Fixed cells were then incubated during 1 hour with each LightSpot® compound diluted at 1µM. For this, each tracer in solution in DMSO at 1.0 mM was diluted in D-PBS (Dubelco-Phosphate Buffer Saline) at 1.0 µM for final DMSO concentration of 0.1%. Three successive washes of 20 min were then conducted in D-PBS to remove unspecific cell staining. In parallel, nuclear staining was carried out using 1 µg/mL bisbenzimidazole Hoechst33258 solution (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany, catalog #14530). Cells were finally imaged with a Cytation™3 MV (BioTek®, Winooski, VT, USA) fluorescent microscopy module (M = 40x, fluorescence filters = GFP, RFP and Cy5). For BODIPY-

FL coupled LightSpot® compounds, cell staining was imaged with GFP fluorescence filter. For Sulfo-Cyanine3 coupled LightSpot® compounds, cell staining was imaged with RFP fluorescence filter. For BODIPY-X 650/665 coupled LightSpot® compounds, cell staining was imaged with Cy5 fluorescence filter.

150 e. *LightSpot®-FL-1 and lysosomal co-staining on SUM1315 cells*

LightSpot®-FL-1 staining was realised as previously seen on TNBC SUM1315 cells. In addition, Lysosomal staining was carried out with Cytopainter™ Lysosomal Staining Kit (Abcam, Cambridge, U.K., #ab112135). For this, cells were incubated during 2 hours with the blue reagent of the kit diluted in 2% HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) buffer as preconised by the supplier. Cells were then washed with D-PBS solution before being imaged with the Cytation™3MV (M=40x, fluorescence filters = DAPI and GFP).

f. *LightSpot®-SCy-1 and mitochondrial co-staining on SUM1315 cells*

160 LightSpot®-SCy-1 staining was realised as previously seen on TNBC SUM1315 cells. In addition, Mitochondrial staining was carried out with Cytopainter™ Mitochondrial Staining Kit (Abcam, Cambridge, U.K., #ab219940). For this, cells were incubated during 2 hours with the blue reagent of the kit diluted in 2% HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) buffer as preconised by the supplier. Cells were then washed with D-PBS solution before being imaged with the Cytation™3MV (M=40x, fluorescence filters = DAPI and GFP).

3. Results

a. *Uncoupled P-gp ligand parent compounds are not detectable by fluorescence microscopy on SUM1315 and DU4475 cells*

170 All compounds we developed in the LightSpot® probes series are derivatives from two peptide P-gp inhibitors that constitute the P-gp ligand moiety of LightSpot® compounds. These two ligands are called P-gp Ligand parent 1 and P-gp Ligand 2 in this study to distinguish them. In order to assess the natural detection of both P-gp ligand parents, unbounded to any detectable agent, fixed SUM1315 and DU4475 TNBC cells were incubated with this compound and imaged with different classic fluorescence filters.

180 On SUM1315 cells, no specific signal that coming out of the background noise could be detected after cell exposure with P-gp ligand parent 1 (**Figure 1A**) or P-gp ligand parent 2 (**Figure 1B**), with either GFP, RFP or Cy5 fluorescence filters. Similarly, on DU4475, no signal could be detected after cell exposure with P-gp ligand parent 1 (**Figure 1C**) or P-gp ligand parent 2 (**Figure 1D**) with either of the three filters. Thus, P-gp ligand parent molecules used during our pharmaco-modulation developments are not naturally detectable by fluorescence microscopy, with classic filters, and require the coupling with detectable fluorophores.

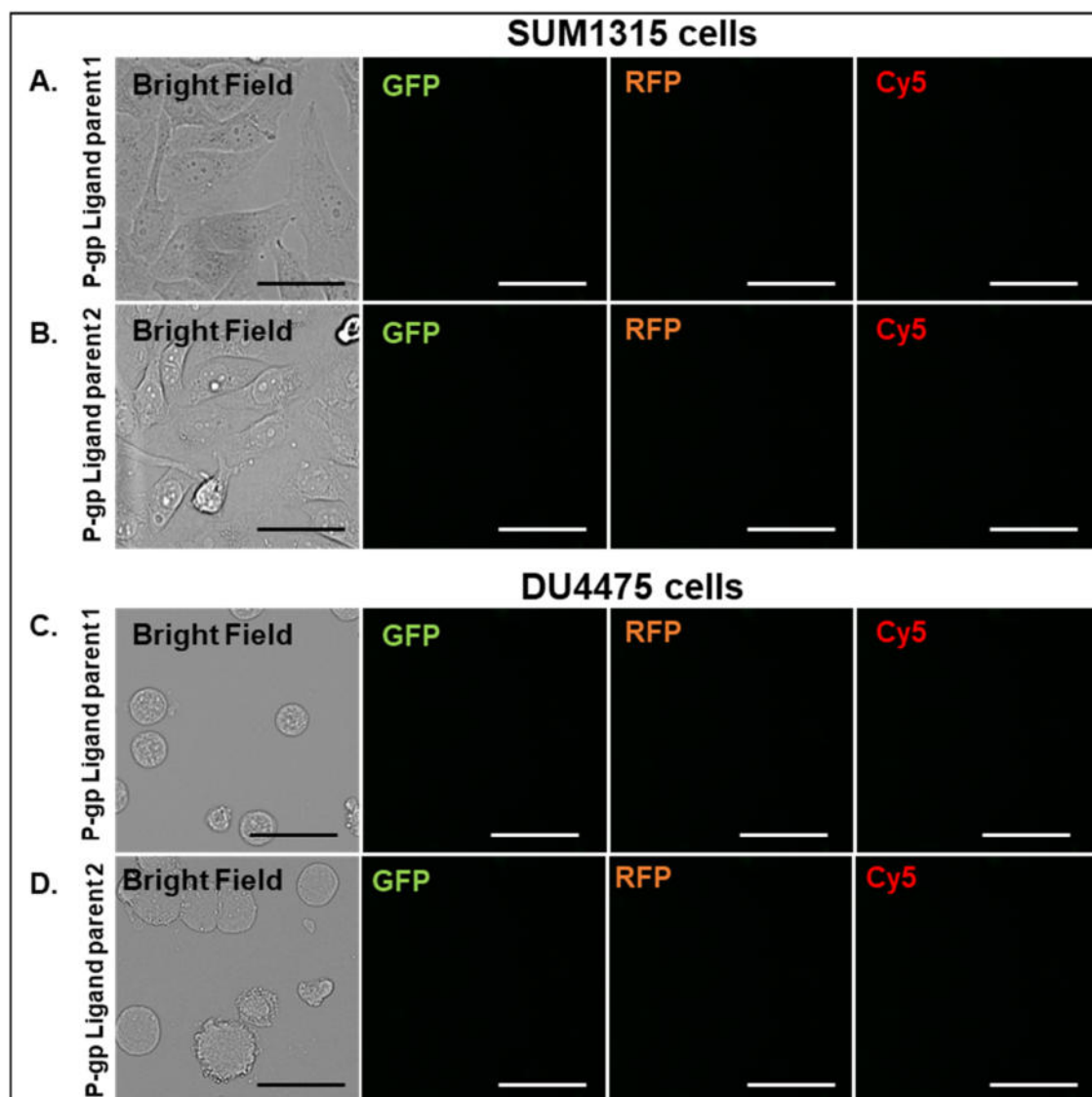


Figure 1 : SUM1315 and DU4475 TNBC cells exposure with P-gp Ligand parent molecules. Fixed SUM1315 and DU4475 cells were incubated during 1 hour with either P-gp ligand parent #1 (SUM1315 cells **A**, DU4475 cells **B**) or P-gp ligand parent #2 (SUM1315 cells **C**, DU4475 cells **D**) diluted at $1\mu\text{M}$. After several washes in D-PBS, cells were imaged with the Cytation™3 MV (BioTek®, $M = 40 \times$, Bright Field or Fluorescence Filters = GFP, RFP or Cy5, scale bar = $50 \mu\text{m}$).

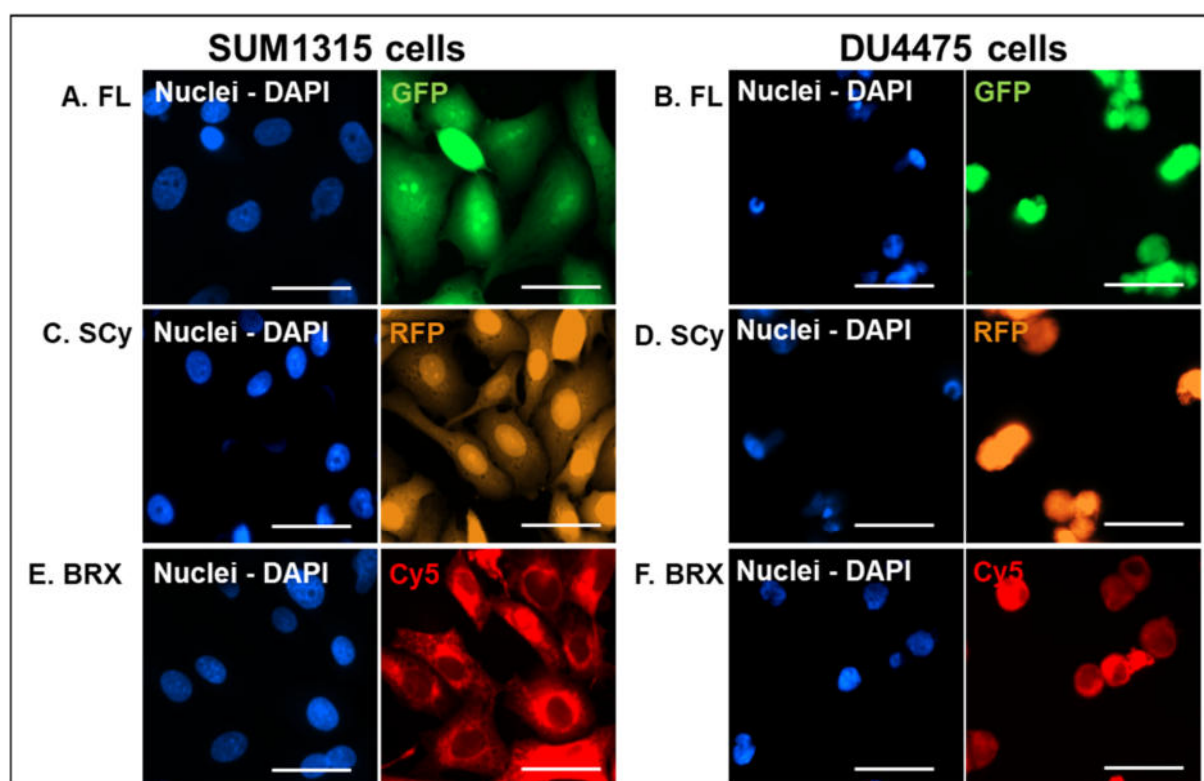
b. Unbounded BODIPY-FL, SulfoCyanine3 and BODIPY-X fluorophores forgive detectable and homogeneous stainings on SUM1315 and DU4475 cells

LightSpot® probes are constituted of a fluorescent detectable moiety that can be either the BODIPY-FL, the SulfoCyanine3, or the BODIPY-X. In order to assess their detection by fluorescence microscopy, NHS esters of these three fluorophores were applied on fixed SUM1315 and DU4475 cells.

Firstly, BODIPY-FL fluorophore forgives a detectable and photostable signal with the GFP fluorescence filter on SUM1315 and DU4475 cells (**Figures 2A and 2B**). This signal was distributed on all cellular surfaces, with a clear accumulation in the centre of cells particularly visible on SUM1315 cells (**Figure 2A**). This accumulation appeared to correspond to blue bisbenzimidazole nuclear staining demonstrating a strong accumulation of BODIPY-FL in cell nuclei. Similarly, signal issued by

200 SulfoCyanine3 fluorophore presented a distribution on all cell surface, but clearly much intense in the centre of cells, corresponding to nuclei staining (**Figure 2C and 2D**). In contrast, red signal obtained with Cy5 filter after SUM1315 and DU4475 cells exposure with BODIPY-X fluorophore, showed the accumulation of the signal at cell membrane or cytoplasmic level, but an absence of accumulation at nuclear level (**Figures 2E and F**).

These results revealed that the three BODIPY-FL, SulfoCyanine3 and BODIPY-X fluorophores, used as coupling detectable agents for the development of LightSpot® probes, were easily and sufficiently detectable with usual fluorescence microscopy filters. Indeed, these fluorophores forgive bright signal homogeneously distributed at cell level, with or without accumulation in cell nuclei.



210 **Figure 2 : SUM1315 and DU4475 TNBC cells exposure with unbounded commercial fluorophore.** Fixed SUM1315 cells were incubated during 1 hour with either green BODIPY-FL (FL - **A**), orange SulfoCyanine3 (SCy - **C**), or red BODIPY-X (BRX - **E**) unbounded fluorophores diluted at 1 μ M in D-PBS. Similarly, Fixed DU4475 cells were incubated during 1 hour with either green BODIPY-FL (FL - **B**), orange SulfoCyanine3 (SCy - **D**), or red BODIPY-X (BRX - **F**) unbounded fluorophores diluted at 1 μ M in D-PBS. In parallel, blue nuclear staining was realised using 1 μ g/mL bisbenzimidazole Hoechst33258 solution. After several washes in D-PBS, cells were imaged with the Cytation™ 3 MV (BioTek®, M = 40 X, Fluorescence Filters = DAPI, GFP, RFP, and Cy5, scale bar = 50 μ m).

c. *LightSpot® fluorescent probes forgive different cell staining profiles on SUM1315 and DU4475 cells*

220 In order to evaluate LightSpot® series cellular staining potential, SUM1315 and DU4475 cells were exposed with the 14 different LightSpot® fluorescent probes according to staining protocol previously developed [12]. Briefly, fixed cells were exposed during one-hour with the LightSpot® fluorescent probe diluted at 1.0 μ M before being washed three times in D-PBS and imaged.

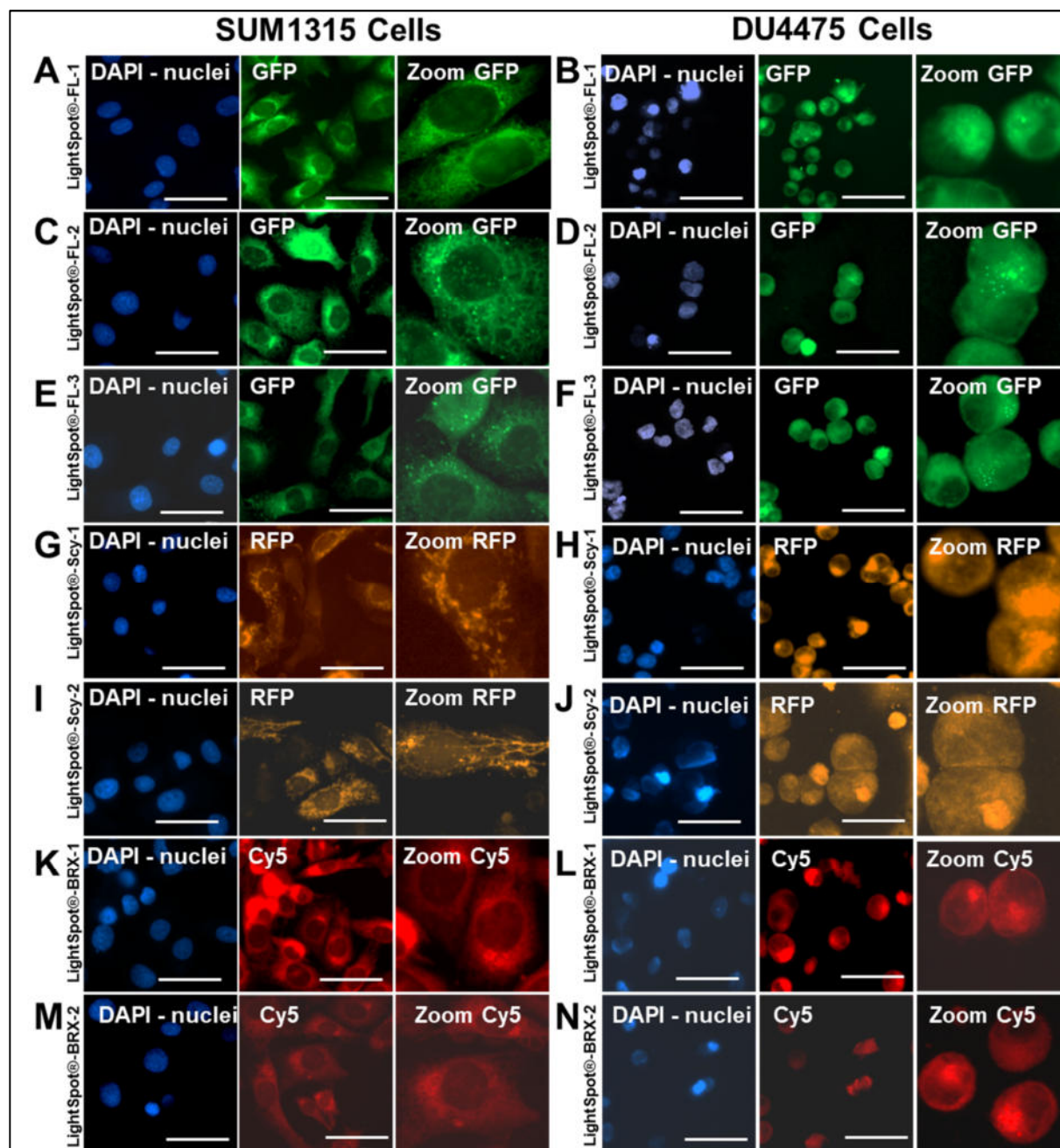


Figure 3 : Staining profiles provided by LightSpot® fluorescent probes deriving from P-gp ligand parent compound #1 on SUM1315 and DU4475 cells. Fixed SUM1315 and DU4475 TNBC cells were incubated with each LightSpot® fluorescent probes deriving from P-gp ligand parent compound #1 during one-hour à 1 μ M. Cell stainings are presented for LightSpot®-FL-1 (A), LightSpot®-FL-2 (C), LightSpot®-FL-3 (E), LightSpot®-SCy-1 (G), LightSpot®-SCy-2 (I), LightSpot®-BRX-1 (K), and LightSpot®-BRX-2 (M) probes on SUM1315 cells. Cell stainings are presented for LightSpot®-FL-1 (B), LightSpot®-FL-2 (D), LightSpot®-FL-3 (F), LightSpot®-SCy-1 (H), LightSpot®-SCy-2 (J), LightSpot®-BRX-1 (L), and LightSpot®-BRX-2 (N) probes on DU4475 cells. In parallel, blue nuclear staining was realised using 1 μ g/mL bisbenzimidazole Hoechst33258 solution. All pictures were acquired with the Cytation™ 3 MV (BioTek®, M = 40 X, Fluorescence Filters = DAPI, GFP, RFP or Cy5, scale bar = 50 μ m). For each experimental condition, a zoom picture is presented.

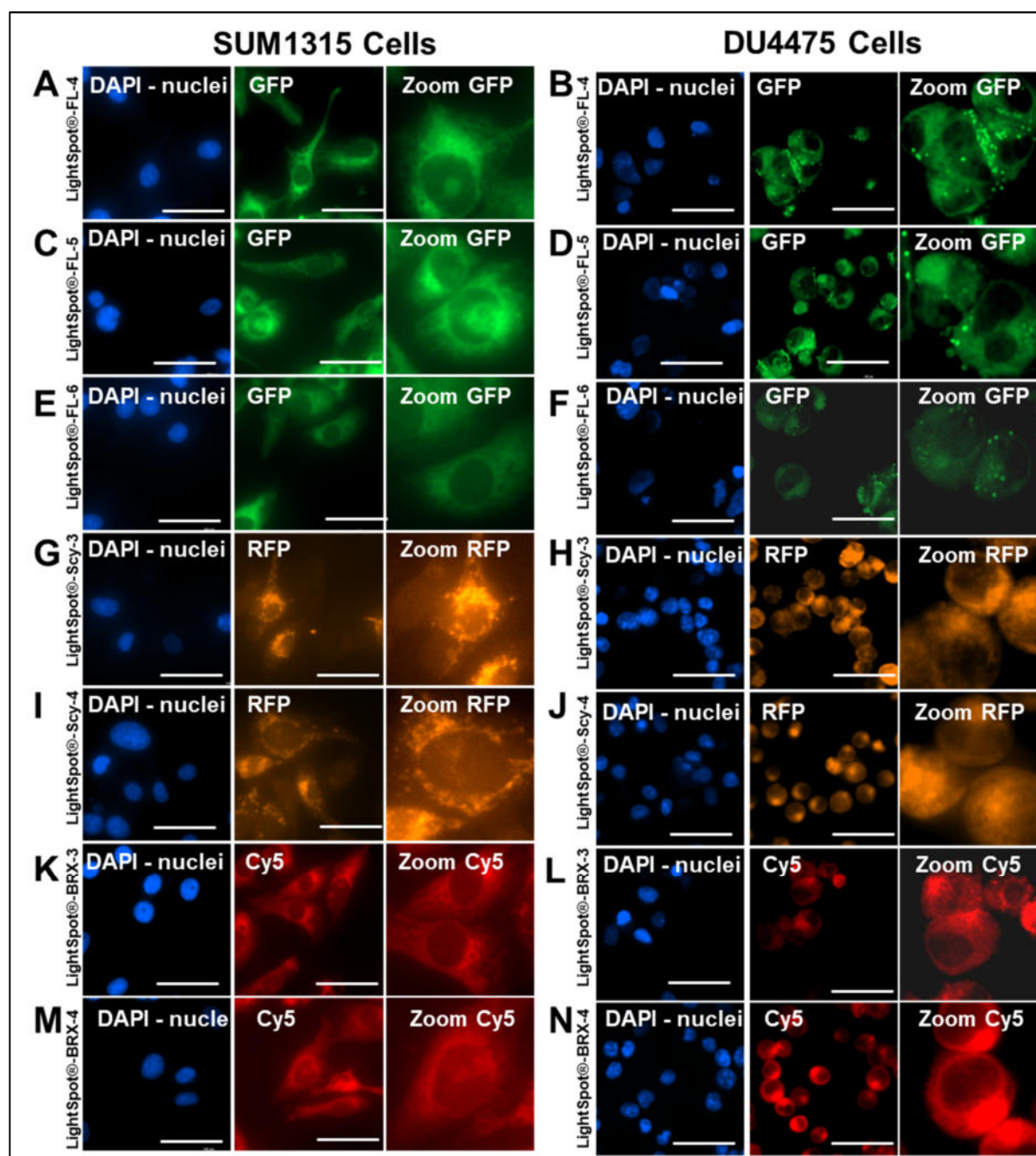
Stainings were firstly conducted with LightSpot® compounds deriving from P-gp ligand parent #1. After exposition of SUM1315 cells with LightSpot®-FL-1, LightSpot®-FL-2 and LightSpot®-FL-3, specific green signal could be detected with GFP fluorescence filter (**Figure 3 A, C, E**). At cellular level, this green signal was distributed at cell membrane and/or cytoplasmic level for all compounds. Otherwise, the comparison with blue nuclear staining attested of the absence of accumulation in cell nuclei (**Figure 4 A, C, E**). Moreover, membrane/cytoplasmic staining presented bright intense points.

240 Similar staining profiles were obtained after fixed DU4475 cells exposure with LightSpot®-FL-1, LightSpot®-FL-2 and LightSpot®-FL-3 probes (**Figure 3 B, D, F**). In contrast, LightSpot®-SCy-1 and LightSpot®-SCy-2 supplied another type of staining profiles on SUM1315 and DU4475 cells with low orange signal on all cell surface, and a bright intense orange signal accumulated on filamentous structures inside cells, detectable with RFP fluorescence filter (**Figure 3 G, H, I, J**). This distribution was particularly visible on adherent SUM1315 cells (**Figure 3 G, I**). The comparison with blue nuclear staining allowed to confirm the absence of LightSpot®-SCy-1 and LightSpot®-SCy-2 probes accumulation inside cell nuclei. In parallel, LightSpot®-BRX-1 and LightSpot®-BRX-2 probes presented bright red signal on SUM1315 and DU4475 cells, detectable with Cy5 fluorescence filter (**Figure 3 K, L, M, N**). Interestingly, the cellular distribution of this signal looked like distribution obtained with

250 LightSpot®-FL-1, showing a membrane/cytoplasmic accumulation, and the eventual presence of intense bright points (**Figure 3 K, L, M, N**). As previously, the absence of signal at nuclear level was confirmed by the absence of correspondence with blue nuclear staining.

Same cell labelling protocol was used to assess cell staining potential of LightSpot® fluorescent probes deriving from P-gp ligand parent #2. Very interestingly, LightSpot®-FL-4, LightSpot®-FL-5 and LightSpot®-FL-6 fluorescent probes presented similar staining profiles than LightSpot®-FL-1, LightSpot®-FL-2 and LightSpot®-FL-3 on SUM1315 and DU4475 cell lines (**Figure 4 A, B, C, D, E, F**). Indeed, after cell labelling with these compounds, an intense green signal was detectable on cell membrane and/or cytoplasm, associated with the eventual presence of bright points and with the absence of accumulation in cell nuclei. These green intense signal points seemed to be more visible on

260 DU4475 cells (**Figure 4 B, D, F**). Otherwise, LightSpot®-SCy-3 and LightSpot®-SCy-4 probes presented same cell labelling profile than LightSpot®-SCy-1 and LightSpot®-SCy-2 probes on SUM1315 and DU4475 cells. Indeed, these both compounds provided orange diffused signal, detectable with RFP fluorescence filter, and associated with accumulation on filamentous structures inside cells (**Figure 4 G, H, I, J**). Finally, LightSpot®-BRX-3 and LightSpot®-BRX-4 stainings obtained on SUM1315 and DU4475 cells were similar to those obtained with LightSpot®-BRX-1 and LightSpot®-BRX-2 probes (**Figure 4 K, L, M, N**). These both fluorescence probes supplied red signal at cell membrane/cytoplasmic level, with the presence of some bright points and no distribution inside cell nuclei.



270

Figure 4 : Staining profiles provided by LightSpot® fluorescent probes deriving from P-gp ligand parent compound #2 on SUM1315 and DU4475 cells. Fixed SUM1315 and DU4475 TNBC cells were incubated with each LightSpot® fluorescent probes deriving from P-gp ligand parent compound #2 during one-hour à 1 μ M. Cell stainings are presented for LightSpot®-FL-4 (A), LightSpot®-FL-5 (C), LightSpot®-FL-6 (E), LightSpot®-SCy-3 (G), LightSpot®-SCy-4 (I), LightSpot®-BRX-3 (K), and LightSpot®-BRX-4 (M) probes on SUM1315 cells. Cell stainings are presented for LightSpot®-FL-4 (B), LightSpot®-FL-5 (D), LightSpot®-FL-6 (F), LightSpot®-SCy-3 (H), LightSpot®-SCy-4 (J), LightSpot®-BRX-5 (L), and LightSpot®-BRX-6 (N) probes on DU4475 cells. In parallel, blue nuclear staining was realised using 1 μ g/mL bisbenzimidazole Hoechst33258 solution. All pictures were acquired with the Cytation™3 MV (BioTek®, M = 40 X, Fluorescence Filters = DAPI, GFP, RFP or Cy5, scale bar = 50 μ m). For each experimental condition, a zoom picture is presented.

280

All these results highlighted that all 14 fluorescent probes developed in the LightSpot® series, for the detection of the P-gp, supplied sufficiently detectable and bright fluorescence signals on SUM1315 and DU4475 cell lines. All observed stainings, were principally distributed at cell membrane and cytoplasmic level, with an absence of accumulation un cell nuclei. These distributions are in agreement with cellular localisation sites of the P-gp. Very interestingly, all these cell stainings, obtained

with different LightSpot® probes, can be divided in two distinguishable labelling profiles. Indeed, LightSpot® probes developed with BODIPY-FL (namely LightSpot®-FL-1, LightSpot®-FL-2, LightSpot®-FL-3, LightSpot®-FL-4, LightSpot®-FL-5, and LightSpot®-FL-6) and BODIPY-X (namely LightSpot®-BRX-1, LightSpot®-BRX-2, LightSpot®-BRX-3, and LightSpot®-BRX-4) fluorophores presented intense stainings distributed at cell membrane/cytoplasmic level with the eventual presence of bright fluorescence points. This staining profile is similar to the one obtained and validated for the detection, the localisation, and the quantification of the P-gp with LightSpot®-FL-1 probe in previous works [12]. In contrast, other LightSpot® fluorescent probes developed with SulfoCyanine3 fluorophore (namely LightSpot®-SCy-1, LightSpot®-SCy-2, LightSpot®-SCy-3, and LightSpot®-SCy-4) provided different staining profile, presenting a low diffused signal on all cell surface, and a signal accumulation on intracellular filamentous structures.

d. LightSpot® -FL-1 fluorescent probe presents a lysosomal accumulation in SUM1315 TNBC cells

In order to precise the cell staining profiles obtained with LightSpot® fluorescent probes developed with BODIPY-FL and BODIPY-X, and especially bright points previously observed with these compounds, a co-staining was realised with reference lysosomal labelling carried out with Cytopainter™ kit (abcam, #ab112135). Indeed, these points possibly correspond to intracellular small size vesicles such as lysosomes. This co-staining experiment was realised with LightSpot®-FL-1 as example of probe supplying membrane/cytoplasmic with points staining profiles, because of its bright and easily visible signal, and its previous validation in published works [12]. Adherent SUM1315 cell model was used because of its sprawl on culture support, facilitating different cell compartment observations.

As previously seen, P-gp LightSpot®-FL-1 fluorescent staining on SUM1315 presented green intense points in addition to cell membrane/cytoplasmic labelling (**Figure 5A**). In parallel, blue Cytopainter™ staining allowed to obtain specific fluorescent points corresponding to lysosomes (**Figure 5B**). A strong correspondence is visible on the spatial distribution of both green and blue points. In order to confirm this correspondence, a line profile was drawn on the merged picture (**Figure 5C**). Fluorescence intensity along this line allowed to observe a strong superposition of different fluorescence peaks, each of them corresponding to a lysosome. Thus, these results demonstrated the accumulation of LightSpot®-FL-1 in lysosomes, in addition to a cell membrane labelling.

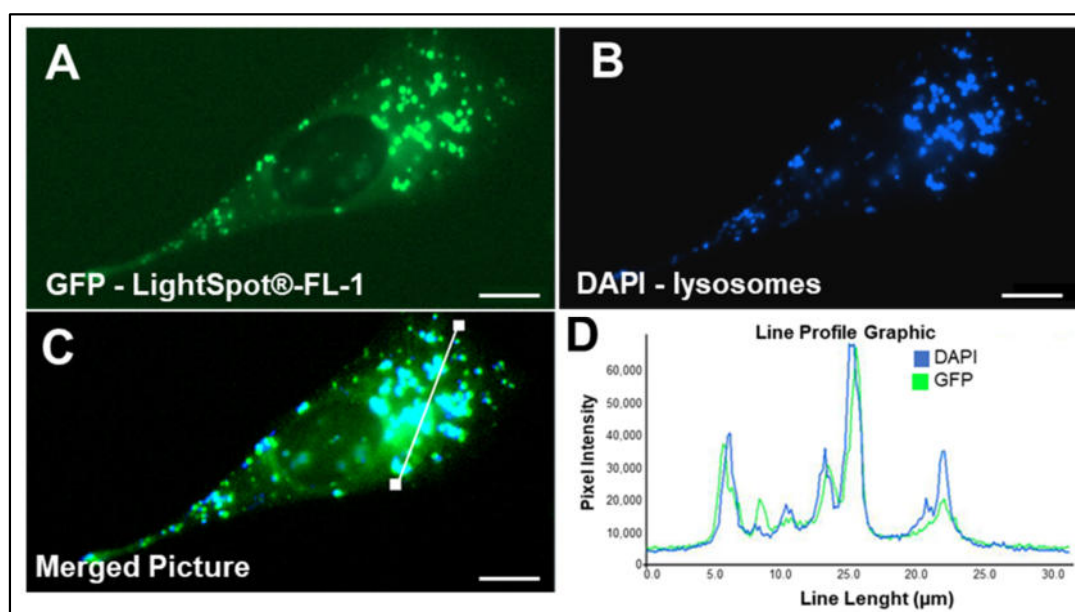


Figure 5: LightSpot®-FL-1 and reference lysosomal staining comparisons on SUM1315 cells. SUM1315 cells were incubated during one-hour with LightSpot®-FL-1 probe diluted at 1 μ M. Cells were then stained with the Cytopainter™ Lysosomal staining kit (abcam, #ab112135) for two hours before being imaged with the Cytation™ 3 MV (BioTek®, M = 40 X, scale bar = 10 μ m). Green fluorescent LightSpot®-FL-1 signal was acquired with GFP filter (A). Blue Cytopainter™ Lysosomal signal was acquired with DAPI filter (B). A line profile was drawn on the merged picture (C), allowing to visualize fluorescence intensity along the line with the Line Profile Graphic (D).

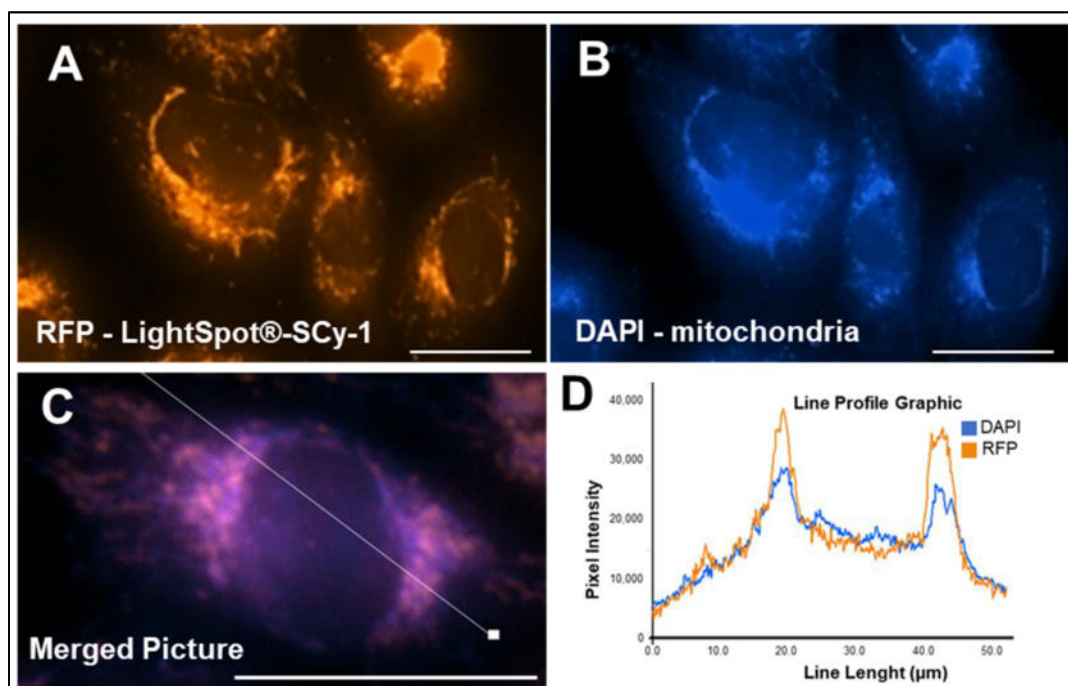
320

e. *LightSpot® -SCy-1 fluorescent probe presents a mitochondrial accumulation in SUM1315 TNBC cells*

Previous results showed that LightSpot® probes developed SulfoCyanine3 fluorophore presented a particular accumulation in intracellular filamentous structure on DU4475 and SUM1315 TNBC cells. These staining profiles look alike labelling of mitochondria, grouping in chains, at the origin of this filamentous structures [18]. In order to evaluate the accumulation of LightSpot® probes developed SulfoCyanine3 fluorophore on these organelles, a co-staining was carried out with reference Cytopainter™ mitochondrial staining kit (abcam, # ab219940). For this, LightSpot® -SCy-1 probe was used as example on SUM1315 TNBC cells.

330

Orange fluorescent staining was obtained on filamentous structures inside SUM1315 cells with LightSpot®-SCy-1 probe, as previously seen (Figure 6A). In parallel, blue reference mitochondrial staining also supply signal accumulation on filamentous structures (Figure 6B). A strong correspondence can be observed between two orange and blue signals, particularly visible on merged picture (Figure 6C). Moreover, this correspondence was confirmed with a line profile graphic on merged picture showing a clear superposition of signal (Figure 6D). These results confirmed the accumulation of LightSpot®-SCy-1 fluorescent probe at mitochondrial level.



340 **Figure 6: LightSpot®-SCy-1 and reference mitochondrial stainings comparison on SUM1315 cells.** SUM1315 cells were incubated during one-hour with LightSpot®-SCy-1 probe diluted at 1 μ M. Cells were then stained with the CytosPainter™ Mitochondrial staining kit (abcam, #ab219940) for two hours before being imaged with the Cytation™ 3 MV (BioTek®, M = 40 X, scale bar = 10 μ m). Orange fluorescent LightSpot®-SCy-1 signal was acquired with RFP filter (A). Blue CytosPainter™ Mitochondrial signal was acquired with DAPI filter (B). A line profile was drawn on the merged picture (C), allowing to visualize fluorescence intensity along the line with the Line Profile Graphic (D).

4. Discussion

350 Cancer multidrug resistance is a phenomenon in which tumoral cells present resistance to a large panel of anticancer drugs [19]. This resistance can be intrinsic in the tumor or acquired following cancer exposure with anticancer agents [19]. Various biological mechanisms are involved in this phenomenon, including ATP-dependant drug efflux established by MDR proteins [20]. These transmembrane proteins, members of the ABC-transporters superfamily, are found in a large diversity of living organisms and play a major role in cell protection against xenobiotics, by translocating them out of cells [10]. MDR proteins are frequently overexpressed in tumors and provide cancer drug resistance against a wide panel of anticancer agents. Especially, the P-gp is one of the principal MDR proteins that recognize a large number of structurally different anticancer drugs such as anthracyclines, vinca-alkaloids, or PARP inhibitors targeted therapeutics [21]. Thus, P-gp represent a particular clinical interest directly linked with drug resistance and cancer aggressiveness [21]. Indeed, tumor P-gp overexpression is frequently associated with therapeutic failure and difficulties to achieve complete pathologic response after neo-adjunct chemotherapy [22,23]. Moreover, several studies correlated the P-gp overexpression with a higher risk of residual disease, and cancer relapse or recurrence [24,25]. Thus, the study of tumoral chemoresistance, established by the P-gp, is a relevant field as a predictive factor of treatment outcomes or to assess cancer relapse or recurrence risks [26]. This is all the more important for aggressive tumoral subtypes such as TNBC.

360

In this context, the development of new *in vitro* tools allowing to specifically detect and quantify the P-gp expression level inside biological samples, present a great potential for optimize cancer treatment. For this reason, we designed by pharmaco-modulation approaches, a series of LightSpot® fluorescent probes [11]. These innovant fluorescent tools are designed from two peptide P-gp inhibitors previously described to reversibly bind to the intracellular domain of the P-gp [27]. These latter constitute good candidates as P-gp ligand moiety and were conjugated to different detectable and cell-permeant fluorophores. Our previous works already allowed to validate the use of one of these compounds, the LightSpot®-FL-1 probe, for a specific detection, localisation, and quantification of the P-gp on TNBC preclinical *in vitro* models [12]. Especially, our results demonstrated the added value of the cell-permeant LightSpot®-FL-1 fluorescent probe to detect and quantify *de novo* or induced P-gp expression level, on monolayer cell cultures or spheroid models, at fresh or fixed state. Since these works, 13 new LightSpot® fluorescent probes were added in the series. The aim of these present works was to explore the specific P-gp labelling potential of these 14 fluorescent tracers. For this we developed LightSpot® probes stainings on SUM1315 and DU4475 TNBC cell models and analysed them by fluorescence microscopy-based methodology.

Firstly, we ensured that P-gp ligand moiety parent compounds are not naturally detectable by conventional fluorescence microscopy approaches. For this, SUM1315 and DU4475 were exposed for one-hour with both parent molecules (entitled P-gp Ligand parent 1 and P-gp Ligand 2). After this, step, no specific fluorescence signal could be detected with classic fluorescence filters (**Figure 1**). These results attested to the impossibility to detect uncoupled P-gp ligand parent compounds by fluorescence microscopy, and to the necessity of coupling them with detectable fluorophores. In this way, three different cell-permeant and photostable commercial fluorophores were used to design 14 different LightSpot® probes, namely BODIPY-FL, SulfoCyanine3 and BODIPY-X (**Table 1**). We then tested to detect these uncoupled NHS ester form of these three fluorophores, incubating them on SUM1315 and DU4475 TNBC cells. BODIPY-FL probe provided a bright green signal detectable with GFP fluorescence filter, while SulfoCyanine3 probe provided an orange intense signal detectable with RFP filter, and BODIPY-X supplied red bright signal detectable with Cy5 filter (**Figure 2**). BODIPY-FL and SulfoCyanine3 signals were reparteed on all cell surfaces, with a higher fluorescence intensity inside cell nuclei. This is probably due to the high reactive and cell-permeant properties of NHS ester forms of fluorophore, explaining their multiple bindings on various cell compartments. BODIPY-X probe also presented a homogenous signal on cell surfaces, but an absence of distribution inside cell nuclei. However, according to available literature data, it is not expected to detect the P-gp protein inside cell nucleus [28]. Thus, the absence of nuclear penetration ability of BODIPY-X probe would not be a limiting factor for the development of LightSpot® fluorescent probes with this fluorophore.

After these validation steps, our focused on the development of cell staining with the different fluorescent probes of the LightSpot® series, on adherent SUM1315 and in suspension DU4475 TNBC cell lines. All tested LightSpot® probes supplied sufficiently bright signal with adapted fluorescence filters and optimized imaging parameters, with low fluorescence background (**Figures 3 & 4**). Moreover, obtained staining profiles on SUM1315 and DU4475 cells were clearly different from those obtained with free NHS ester fluorophore forms (**Figure 2**). Indeed, for all LightSpot® compounds, an absence of

distribution inside cell nuclei was observed, in contrast to staining observed with free NHS ester BODIPY-FL and SulfoCyanine3 probes. For LightSpot® probes developed with BODIPY-X (namely LightSpot®-BRX-1, LightSpot®-BRX-2, LightSpot®-BRX-3, and LightSpot®-BRX-4), obtained staining profiles presented comparable global cell distribution in cell membrane and cytoplasm than free-NHS ester BODIPY-X. But, looking more closely these staining profiles, LightSpot® probes labelling appeared to be less homogeneous and partially focused on intracellular structures, in comparison with labelling obtained with uncoupled BODIPY-X form. These observations allow to argue that LightSpot® probes cellular distribution is certainly directed by the ligand moiety of compound, for the specific targeting of the P-gp.

Otherwise, obtained LightSpot® cellular stainings allowed to distinguish two types staining profiles in a very relevant way, on SUM1315 and DU4475 cells. This distinction seemed to principally depends on the used fluorophore for the design of LightSpot® probe. Indeed, the first staining profile was observed for all LightSpot® probes developed with BODIPY-FL (namely LightSpot®-FL-1, LightSpot®-FL-2, LightSpot®-FL-3, LightSpot®-FL-4, LightSpot®-FL-5, and LightSpot®-FL-6) and BODIPY-X (namely LightSpot®-BRX-1, LightSpot®-BRX-2, LightSpot®-BRX-3, and LightSpot®-BRX-4) fluorophores (**Figures 3 & 4**). This first staining profile was characterized by a LightSpot® probe distribution at cell membrane and/or cytoplasmic levels, associated with the recurrent presence of intense bright fluorescent points. This staining profile was already validated for the detection and the quantification of the P-gp on TNBC in previous works, with LightSpot®-FL-1 probe [12]. Thus, it is very likely that all LightSpot® compounds presenting this first staining profile are efficient for the detection of the P-gp, in the same way that LightSpot®-FL-1 probe. The second staining profile was rather obtained with LightSpot® fluorescent probes developed with SulfoCyanine3 fluorophore (namely LightSpot®-SCy-1, LightSpot®-SCy-2, LightSpot®-SCy-3, and LightSpot®-SCy-4) (**Figures 3 & 4**). This second profile was characterised by a diffused low staining on cell membrane/cytoplasm and the high accumulation of fluorescent signal on filamentous intracellular structures.

The rest of our works aimed to better qualify the LightSpot® fluorescent probes accumulation in (1) bright fluorescent points according to the first observed staining profile, or (2) filamentous intracellular structures according to the second staining profile.

Especially, we hypothesised that bright fluorescent points may correspond to intracellular vesicles, such as lysosomes. Indeed, LightSpot® fluorescent probes were designed to penetrate inside cells and cell masses to specifically label the P-gp. In order to consider this hypothesis, we realised a co-staining including LightSpot®-FL-1 probe staining, as example, and a reference lysosomal labelling thanks to blue Cytopainter™ staining kit (abcam, #ab112135), on adherent SUM1315 cell line. Results showed great similarities between both stainings, especially visible with fluorescence intensity spectra on the line profile graphic (**Figure 5**). Thus, we confirmed the intracellular staining of lysosomes with the LightSpot®-FL-1 probe, in addition its P-gp targeting at cell membrane level. Others LightSpot® fluorescent presenting staining profiles with bright fluorescent points probably also stain lysosomal vesicles. This point highlights an important added-value brought by cell-permeant LightSpot® probes. Indeed, they allow to detect not only the plasma membrane P-gp, but also the intracellular P-gp present

on the membrane of different organelles. Many studies have already demonstrated the presence of the P-gp on the lysosomal membrane, playing an important role in tumoral chemoresistance via lysosomal drug sequestration and degradation [29,30]. Therefore, these innovant probes provide complete P-gp expression level evaluation, more precisely than antibody-based methodologies partially and uniquely targeting cell membrane P-gp.

450 Furthermore, we hypothesised that stainings of filamentous intracellular structures observed with LightSpot® fluorescent probes developed with SulfoCyanine3 fluorophore may correspond to mitochondrial staining. Indeed, according to the literature, mitochondria frequently group in intracellular chains, creating filamentous structures [18]. In order to confirm this, we conducted a co-staining including LightSpot®-SCy-1 probe staining, as example, and a reference mitochondrial labelling thanks to blue Cytopainter™ staining kit (abcam, # ab219940), on adherent SUM1315 cell line. Results showed correspondence a high correspondence between both stainings, confirmed with the superposition of fluorescence intensity spectra on the line profile graphic (**Figure 6**). Thus, we were able to validate the accumulation of LightSpot®-SCy-1 at mitochondrial level on SUM1315 TNBC cells. Other LightSpot®-SCy-2, LightSpot®-SCy-3, and LightSpot®-SCy-4 may certainly present similar mitochondrial
460 accumulation properties. In the literature, there is no clear consensus affirming the presence of the P-gp in mitochondria, in mammals' cells. Indeed, some studies affirm that the P-gp is presence in mitochondria membrane, playing a role in cancer drug resistance [31–33], while others affirm the absence of the glycoprotein on these organelles [29,34,35]. Supplementary works should be led in order to explore more precisely the presence of the P-gp at mitochondrial level inside cancer cells, and to validate the P-gp targeting by LightSpot® probes at this level.

To conclude, this works allowed to explore the cell staining potential of a series of 14 innovant LightSpot® fluorescent probes, designed for the specific detection and quantification of the P-gp. These probes are issued from the coupling of two peptide P-gp ligand derivatives with different cell-permeant fluorophores, making them detectable by fluorescence microscopy imaging approach. All 14 LightSpot®
470 probes supplied satisfying cell stainings, at cell membrane/cytoplasm level. Moreover, obtained results allowed to distinguish two types of staining profiles, the first presenting cell membrane and lysosomal labelling, and the second presenting cell membrane and mitochondrial labelling. The first staining profiles correspond to the one observed in previous works with LightSpot®-FL-1 probe and already validated for the detection of the P-gp [12]. Interestingly, the second staining profile does not look like expected cellular P-gp labelling but may represent a potential marker of the P-gp present in mitochondrial membrane. This approach has never been yet developed in the past and may constitute a great innovation for the improvement of P-gp expression studies. Supplementary works should be led to validate the effective P-gp targeting by all LightSpot® fluorescent probes, especially for the detection and the quantification of the *de novo* or induced P-gp expression level inside cell and/or cell masses, at
480 fresh or fixed state, in a similar development process than the one already used for LightSpot®-FL-1 [12]. The validation and the evaluation of several LightSpot® probes will allow us to screen most promising candidate compounds, presenting the best performances for the detection of the P-gp. In particular, these innovative tools are very promising for the development of new cancer chemoresistance clinical diagnosis *in vitro* tests. In this field, we are currently developing the clinical use of LightSpot®

probes, for the evaluation of tumoral chemoresistance established by the P-gp. This diagnosis approach may turn out to be very useful to optimize anticancer treatments, by predicting therapeutic failure or cancer relapse risks.

Patents: These present works follow the International Patent Application WO 2021/064191 A1, 8 April 2021, by University Clermont Auvergne/INSERM/BIOMARQUEURS.

490

Acknowledgments: Our thanks to the Biological Resource Centre of Jean Perrin Comprehensive Cancer Centre for the nitrogen storage of all cell lines used in these works. Thanks also to Florian Martin, Master student in the team, for its technical support in these works.

Author Contributions: Conceptualization, A.G., P.D., C.D., E.M. and M.B.; Data curation, A.G., P.D. and M.R.; Formal analysis, A.G., P.D. and M.R.; Funding acquisition, P.D. and M.B.; Investigation, A.G., P.D. and M.R.; Methodology, A.G., P.D., C.D., E.M. and M.B.; Validation, A.G., P.D., C.D., E.M. and M.B.; Writing-original draft, A.G., P.D. and M.B.; Writing-review & editing, A.G., P.D., C.D., C.A., M.D., J.G., B.V., F.P.-L., E.M. and M.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

500

5. References

1. Theodoulou, F.L.; Kerr, I.D. ABC Transporter Research: Going Strong 40 Years On. *Biochem Soc Trans* **2015**, *43*, 1033–1040, doi:10.1042/BST20150139.
2. Holland, I.B.; P.C. Cole, S.; Kuchler, K.; F. Higgins, C. *ABC Proteins From Bacteria to Man*; Academic Press Inc, 2003; ISBN 978-0-12-352551-2.
3. Silverman, J.A. Multidrug-Resistance Transporters. *Pharm Biotechnol* **1999**, *12*, 353–386, doi:10.1007/0-306-46812-3_13.
4. Juliano, R.L.; Ling, V. A Surface Glycoprotein Modulating Drug Permeability in Chinese Hamster Ovary Cell Mutants. *Biochim Biophys Acta* **1976**, *455*, 152–162, doi:10.1016/0005-2736(76)90160-7.
5. Leonard, G.D.; Fojo, T.; Bates, S.E. The Role of ABC Transporters in Clinical Practice. *Oncologist* **2003**, *8*, 411–424, doi:10.1634/theoncologist.8-5-411.
6. Lawlor, D.; Martin, P.; Busschots, S.; Thery, J.; O'Leary, J.J.; Hennessy, B.T.; Stordal, B. PARP Inhibitors as P-Glycoprotein Substrates. *J Pharm Sci* **2014**, *103*, 1913–1920, doi:10.1002/jps.23952.
7. Azzariti, A.; Porcelli, L.; Simone, G.M.; Quatrala, A.E.; Colabufo, N.A.; Berardi, F.; Perrone, R.; Zucchetti, M.; D'Incalci, M.; Xu, J.M.; et al. Tyrosine Kinase Inhibitors and Multidrug Resistance Proteins: Interactions and Biological Consequences. *Cancer Chemother Pharmacol* **2010**, *65*, 335–346, doi:10.1007/s00280-009-1039-0.
8. Sarkadi, B.; Homolya, L.; Szakács, G.; Váradi, A. Human Multidrug Resistance ABCB and ABCG Transporters: Participation in a Chemoinmunity Defense System. *Physiol Rev* **2006**, *86*, 1179–1236, doi:10.1152/physrev.00037.2005.
9. Yamada, A.; Ishikawa, T.; Ota, I.; Kimura, M.; Shimizu, D.; Tanabe, M.; Chishima, T.; Sasaki, T.; Ichikawa, Y.; Morita, S.; et al. High Expression of ATP-Binding Cassette Transporter ABCC11 in Breast Tumors Is Associated with Aggressive Subtypes and Low Disease-Free Survival. *Breast Cancer Res Treat* **2013**, *137*, 773–782, doi:10.1007/s10549-012-2398-5.
10. Robey, R.W.; Pluchino, K.M.; Hall, M.D.; Fojo, A.T.; Bates, S.E.; Gottesman, M.M. Revisiting the Role of ABC Transporters in Multidrug-Resistant Cancer. *Nat Rev Cancer* **2018**, *18*, 452–464, doi:10.1038/s41568-018-0005-8.
11. Bamdad, M.; Daumar, P.; Dubois, C.; Gauthier, J.; Goisnard, A.; Mounetou, E.; Penault-Llorca, F.; Vidalinc, B. LightSpot Patent: Method for Detecting, Localising and Quantifying MDR Proteins 2021.
12. Goisnard, A.; Daumar, P.; Dubois, C.; Aubel, C.; Roux, M.; Depresle, M.; Gauthier, J.; Vidalinc, B.; Penault-Llorca, F.; Mounetou, E.; et al. LightSpot@-FL-1 Fluorescent Probe: An Innovative Tool for Cancer Drug Resistance Analysis by Direct Detection and Quantification of the P-Glycoprotein (P-Gp) on Monolayer Culture and Spheroid Triple Negative Breast Cancer Models. *Cancers* **2021**, *13*, 4050, doi:10.3390/cancers13164050.
13. Irvin, W.J.; Carey, L.A. What Is Triple-Negative Breast Cancer? *Eur J Cancer* **2008**, *44*, 2799–2805, doi:10.1016/j.ejca.2008.09.034.

530

14. Prat, A.; Pineda, E.; Adamo, B.; Galván, P.; Fernández, A.; Gaba, L.; Díez, M.; Viladot, M.; Arance, A.; Muñoz, M. Clinical Implications of the Intrinsic Molecular Subtypes of Breast Cancer. *Breast* **2015**, *24 Suppl 2*, S26-35, doi:10.1016/j.breast.2015.07.008.
15. Yin, L.; Duan, J.-J.; Bian, X.-W.; Yu, S.-C. Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtyping and Treatment Progress. *Breast Cancer Res* **2020**, *22*, 61, doi:10.1186/s13058-020-01296-5.
- 540 16. Nedeljković, M.; Damjanović, A. Mechanisms of Chemotherapy Resistance in Triple-Negative Breast Cancer-How We Can Rise to the Challenge. *Cells* **2019**, *8*, doi:10.3390/cells8090957.
17. Dubois, C.; Martin, F.; Hassel, C.; Magnier, F.; Daumar, P.; Aubel, C.; Guerder, S.; Mounetou, E.; Penault-Lorca, F.; Bamdad, M. Low-Dose and Long-Term Olaparib Treatment Sensitizes MDA-MB-231 and SUM1315 Triple-Negative Breast Cancers Spheroids to Fractioned Radiotherapy. *J Clin Med* **2019**, *9*, doi:10.3390/jcm9010064.
18. Snyder, D.S.; Small, P.L.C. Staining of Cellular Mitochondria with LDS-751. *Journal of Immunological Methods* **2001**, *257*, 35–40, doi:10.1016/S0022-1759(01)00440-9.
19. Gottesman, M.M.; Lavi, O.; Hall, M.D.; Gillet, J.-P. Toward a Better Understanding of the Complexity of Cancer Drug Resistance. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **2016**, *56*, 85–102, doi:10.1146/annurev-pharmtox-010715-103111.
- 550 20. Dean, M.; Annilo, T. Evolution of the ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily in Vertebrates. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **2005**, *6*, 123–142, doi:10.1146/annurev.genom.6.080604.162122.
21. Robinson, K.; Tiriveedhi, V. Perplexing Role of P-Glycoprotein in Tumor Microenvironment. *Front Oncol* **2020**, *10*, 265, doi:10.3389/fonc.2020.00265.
22. Kim, B.; Fatayer, H.; Hanby, A.M.; Horgan, K.; Perry, S.L.; Valleley, E.M.A.; Verghese, E.T.; Williams, B.J.; Thorne, J.L.; Hughes, T.A. Neoadjuvant Chemotherapy Induces Expression Levels of Breast Cancer Resistance Protein That Predict Disease-Free Survival in Breast Cancer. *PLoS One* **2013**, *8*, e62766, doi:10.1371/journal.pone.0062766.
23. Zhang, Z.; Zhang, W.; Jin, Y.; Wang, H.; Gu, F.; Zhou, J.; Lao, Z.; Xu, Z.; Tang, F.; Zou, L.; et al. Evaluating the Response of Neoadjuvant Chemotherapy for Treatment of Breast Cancer: Are Tumor Biomarkers and Dynamic Contrast Enhanced MR Images Useful Predictive Tools? *J Thorac Dis* **2014**, *6*, 785–794, doi:10.3978/j.issn.2072-1439.2014.04.28.
- 560 24. Dent, R.; Trudeau, M.; Pritchard, K.I.; Hanna, W.M.; Kahn, H.K.; Sawka, C.A.; Lickley, L.A.; Rawlinson, E.; Sun, P.; Narod, S.A. Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Features and Patterns of Recurrence. *Clin Cancer Res* **2007**, *13*, 4429–4434, doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-3045.
25. Rudas, M.; Filipits, M.; Taucher, S.; Stranzl, T.; Steger, G.G.; Jakesz, R.; Pirker, R.; Pohl, G. Expression of MRP1, LRP and Pgp in Breast Carcinoma Patients Treated with Preoperative Chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat* **2003**, *81*, 149–157, doi:10.1023/A:1025751631115.
26. Verrelle, P.; Frédéric, M.; Fonck, Y.; Feillel, V.; Dionet, C.; Kwiatkowski, F.; Plagne, R.; Chassagne, J. Clinical Relevance of Immunohistochemical Detection of Multidrug Resistance P-Glycoprotein in Breast Carcinoma. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **1991**, *83*, 111–116, doi:10.1093/jnci/83.2.111.
- 570 27. Arnaud, O.; Koubeissi, A.; Ettouati, L.; Terreux, R.; Alamé, G.; Grenot, C.; Dumontet, C.; Di Pietro, A.; Paris, J.; Falson, P. Potent and Fully Noncompetitive Peptidomimetic Inhibitor of Multidrug Resistance P-Glycoprotein. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 6720–6729, doi:10.1021/jm100839w.
28. Fu, D. Where Is It and How Does It Get There - Intracellular Localization and Traffic of P-Glycoprotein. *Front Oncol* **2013**, *3*, 321, doi:10.3389/fonc.2013.00321.
29. Yamagishi, T.; Sahni, S.; Sharp, D.M.; Arvind, A.; Jansson, P.J.; Richardson, D.R. P-Glycoprotein Mediates Drug Resistance via a Novel Mechanism Involving Lysosomal Sequestration. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 31761–31771, doi:10.1074/jbc.M113.514091.
- 580 30. Zhitomirsky, B.; Assaraf, Y.G. Lysosomal Sequestration of Hydrophobic Weak Base Chemotherapeutics Triggers Lysosomal Biogenesis and Lysosome-Dependent Cancer Multidrug Resistance. *Oncotarget* **2015**, *6*, 1143–1156, doi:10.18632/oncotarget.2732.
31. Zhang, Y.-H.; Li, J.; Yang, W.-Z.; Xian, Z.-H.; Feng, Q.-T.; Ruan, X.-C. Mitochondrial Expression and Activity of P-Glycoprotein under Oxidative Stress in Outer Blood-Retinal Barrier. *Int J Ophthalmol* **2017**, *10*, 1055–1063, doi:10.18240/ijo.2017.07.06.
32. Ling, X.; He, Y.; Zhang, G.; Zhou, Y.; Yan, B. Increased P-Glycoprotein Expression in Mitochondria Is Related to Acquired Multidrug Resistance in Human Hepatoma Cells Depleted of Mitochondrial DNA. *Int J Oncol* **2012**, *40*, 109–118, doi:10.3892/ijo.2011.1181.

- 590 33. Munteanu, E.; Verdier, M.; Grandjean-Forestier, F.; Stenger, C.; Jayat-Vignoles, C.; Huet, S.; Robert, J.; Ratinaud, M.-H. Mitochondrial Localization and Activity of P-Glycoprotein in Doxorubicin-Resistant K562 Cells. *Biochem Pharmacol* **2006**, *71*, 1162–1174, doi:10.1016/j.bcp.2006.01.006.
34. Paterson, J.K.; Gottesman, M.M. P-GLYCOPROTEIN IS NOT PRESENT IN MITOCHONDRIAL MEMBRANES. *Exp Cell Res* **2007**, *313*, 3100–3105, doi:10.1016/j.yexcr.2007.04.019.
35. Al-Akra, L.; Bae, D.-H.; Sahni, S.; Huang, M.L.H.; Park, K.C.; Lane, D.J.R.; Jansson, P.J.; Richardson, D.R. Tumor Stressors Induce Two Mechanisms of Intracellular P-Glycoprotein-Mediated Resistance That Are Overcome by Lysosomal-Targeted Thiosemicarbazones. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 3562–3587, doi:10.1074/jbc.M116.772699.

II. Le développement d'un concept innovant de préservation de sphéroïdes de Cancer du Sein Triple Négatif MDA-MB-231 dans le milieu synthétique OptiPASS®

II. 1. Introduction

Le processus de développement des médicaments est long, fastidieux et présente un faible rendement. En effet, il nécessite le criblage d'un nombre considérable de molécules afin d'obtenir un médicament présentant un ratio bénéfice/risque favorable pour une validation clinique (Wong et al., 2019). Ce criblage ou *screening* des médicaments se décline en plusieurs étapes précliniques, puis cliniques permettant de sélectionner au fur et à mesure les meilleurs candidats médicaments. Dans le schéma classique des essais précliniques, les médicaments sont d'abord testés sur des modèles de cultures cellulaires en monocouches avant d'être testés sur des modèles animaux. Or, ce schéma comporte de nombreux inconvénients entraînant un manque de prédictivité de la réponse cellulaire aux traitements et un faible taux de transfert des composés vers les essais cliniques (Belfiore et al., 2021). En effet, un fossé de représentation existe entre les cultures cellulaires conventionnelles et les modèles animaux, expliqué par le manque de représentation de la réalité physiologique des cultures cellulaires en monocouches. De plus, les considérations éthiques portées par l'expérimentation animale contraignent de plus en plus les tests menés sur les modèles animaux (Adams, 2012). De ce fait, l'utilisation de modèles alternatifs tels que les sphéroïdes multicellulaires est de plus en plus sollicitée afin d'améliorer les essais précliniques dans le cadre du *screening* de nouvelles thérapies anticancéreux.

En effet, les modèles de sphéroïdes sont des cultures cellulaires en trois dimensions (cultures 3D) représentant de manière fidèle les interactions entre les cellules et avec les éléments de la matrice extracellulaire (MEC) (Costa et al., 2016). Les avancées technologiques ont permis de rendre accessible et reproductible la production de ces modèles. Des travaux antérieurs menés dans notre équipe de recherche a notamment montré l'amélioration des performances de criblage et de reproductibilité des modèles de sphéroïdes de CSTN, grâce à la culture dans le milieu synthétique OptiPASS® (Dubois et al., 2019a). Ainsi, les sphéroïdes représentent un modèle de choix dans le cadre du *screening* de

médicament à grande échelle. Leur intégration dans des grandes plateformes de criblage de composés a mis en lumière leurs performances pour trier de grands panels de candidats médicaments (Han et al., 2021). Cependant, quelques défis majeurs subsistent pour optimiser leur utilisation à grande échelle. Notamment, le développement de protocoles permettant de les préserver de manière efficace afin d'améliorer leurs conditions de transport inter-laboratoire. Dans ce cadre, les techniques classiques de cryopréservation ont montré plusieurs limites techniques, pour assurer la conservation de ces modèles. Afin de contourner ces limites, le développement de protocoles alternatifs, permettant de préserver les modèles de sphéroïdes pendant plusieurs jours, sans passer par des étapes de congélation, représente un fort intérêt.

Dans ce contexte, le second objectif de mes travaux de thèse a porté sur le développement d'une méthodologie innovante de préservations de modèles de sphéroïdes tumoraux, alternative à la cryoconservation, associant la conservation dans le milieu synthétique OptiPASS® en conditions anoxiques et à basse température. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication en premier auteur dans l'édition spéciale « *Three-Dimensional Culture Systems in Cancer Research* » du journal *Cancers*, acceptée en Avril 2021 (DOI : 10.3390/cancers13081945).

II. 2. Article publié : The New Serum-Free OptiPASS® Medium in Cold and Oxygen-Free Conditions: An Innovative Conservation Method for the Preservation of MDA-MB-231 Triple Negative Breast Cancer Spheroids

II. 2. a) Présentation

Dans le but de développer un nouveau concept de conservation de modèles de cultures cellulaires 3D, les travaux publiés dans cet article se sont orientés sur le développement d'une méthodologie de préservation de sphéroïdes, en utilisant la comme modèle, la lignée de CSTN MDA-MB-231. Ces travaux ont été réalisés avec le nouveau milieu synthétique OptiPASS®, développé au sein du consortium BIORCELL3D®, en comparaison avec le milieu RPMI supplémenté en sérum de veau fœtal, préconisé pour cette lignée cellulaire.

Pour ce faire, les sphéroïdes ont été formés et cultivés pendant 3 jours dans les deux conditions de milieux testées (milieu OptiPASS® ou milieu RPMI). Par la suite, les sphéroïdes ont été conservés à 4°C, en conditions normoxiques ou anoxiques, pendant 1, 3, 5, 7, 14 ou

30 jours consécutifs. Après cette étape de conservation, les sphéroïdes ont été replacés en conditions classiques de culture cellulaire (37°C, 5% CO₂) pour être cultivés pendant 10 jours supplémentaires. La préservation des sphéroïdes a été étudiée selon différents paramètres. En effet, la taille, la structure, la cinétique de croissance, la viabilité cellulaire et l'activité métabolique au sein des sphéroïdes ont été évaluée à différents temps de culture. L'ensemble de ces paramètres ont été comparés à ceux obtenus pour des sphéroïdes contrôles n'ayant pas subi d'étape de conservation.

Les premiers résultats obtenus ont montré l'amélioration de la préservation des sphéroïdes MDA-MB-231 pendant 3 jours à 4°C en normoxie dans le OptiPASS®, en comparaison des sphéroïdes conservés dans les mêmes conditions dans le milieu RPMI. Cependant, ces conditions n'ont permis de conserver que de manière partielle la structure, la croissance, la viabilité et l'activité métabolique des cellules au sein des sphéroïdes, par rapport aux sphéroïdes contrôles. Afin d'améliorer la préservation des modèles, ces derniers ont été placés pendant 3 jours à 4°C en anoxie dans le milieu OptiPASS®. Cette condition de conservation a permis de maintenir intégralement l'ensemble des paramètres évalués sur les sphéroïdes, par rapport aux sphéroïdes contrôles.

De plus, les travaux menés ont permis de mettre en évidence la possibilité de conserver de manière plus longtemps les sphéroïdes MDA-MB-231 selon ces mêmes conditions, c'est-à-dire dans le milieu OptiPASS®, à 4°C, en anoxie. En effet, les résultats obtenus que des sphéroïdes conservés pendant 5 ou 7 jours dans ces conditions présentent les mêmes paramètres de structure, de croissance, de viabilité cellulaire et d'activité métabolique que des sphéroïdes contrôles non conservés. En revanche, une conservation plus longue de 14 ou 30 jours dans ces conditions ne permet pas de maintenir intégralement ces paramètres de cultures des sphéroïdes MDA-MB-231. De ce fait, ce développement de protocole a permis de sélectionner des conditions optimales pour la préservation de modèles de sphéroïdes de la lignée de CSTN MDA-MB-231. Ces conditions impliquent de conserver jusqu'à 7 jours consécutifs ces modèles dans le milieu OptiPASS®, à 4°C, en anoxie.




Par la suite, nous avons analysé (1) l'expression du marqueur de prolifération cellulaire Ki67, (2) le niveau d'hypoxie au sein du sphéroïde et (3) le profil de réponse à différents anticancéreux, après l'étape de conservation des sphéroïdes. L'ensemble de ces paramètres était similaire entre les sphéroïdes conservés et les sphéroïdes contrôles non conservés. En effet, de manière très intéressante, après conservation dans le milieu OptiPASS®, les sphéroïdes ont présenté les mêmes profils de réponse à deux agents classiques de

chimiothérapie (Epirubicine et Cisplatine) et deux agents de thérapies ciblées anti-PARP (Olaparib et Véliparib).

II. 2. b) Article publié

Article

The New Serum-Free OptiPASS[®] Medium in Cold and Oxygen-Free Conditions: An Innovative Conservation Method for the Preservation of MDA-MB-231 Triple Negative Breast Cancer Spheroids

Antoine Goisnard ¹, Clémence Dubois ^{1,2}, Pierre Daumar ^{1,†}, Corinne Aubel ^{3,†}, Marie Depresle ², Jean Gauthier ^{2,4}, Bernard Vidalinc ^{2,4}, Frédérique Penault-Llorca ⁵, Emmanuelle Mounetou ¹ and Mahchid Bamdad ^{1,*}



Citation: Goisnard, A.; Dubois, C.; Daumar, P.; Aubel, C.; Depresle, M.; Gauthier, J.; Vidalinc, B.; Penault-Llorca, F.; Mounetou, E.; Bamdad, M. The New Serum-Free OptiPASS[®] Medium in Cold and Oxygen-Free Conditions: An Innovative Conservation Method for the Preservation of MDA-MB-231 Triple Negative Breast Cancer Spheroids. *Cancers* **2021**, *13*, 1945. <https://doi.org/10.3390/cancers13081945>

Academic Editors: Teresa Puig Miquel, Joaquim Ciurana Gay and Anupama Munshi

Received: 26 March 2021
Accepted: 14 April 2021
Published: 18 April 2021

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



Copyright: © 2021 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 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- ¹ Imagerie Moléculaire et Stratégies Théranostiques, Institut Universitaire de Technologie, Université Clermont Auvergne, UMR INSERM-UCA, U1240, 63000 Clermont Ferrand, France; antoine.goisnard@uca.fr (A.G.); clemence.dubois@uca.fr (C.D.); pierre.daumar@uca.fr (P.D.); emmanuelle.mounetou@inserm.fr (E.M.)
 - ² BIOMARQUEURS Company, 5 Avenue Blaise Pascal, 63178 Aubière, France; marie.depresle@uca.fr (M.D.); jean.gauthier@uca.fr (J.G.); bernard.vidalinc@uca.fr (B.V.)
 - ³ Imagerie Moléculaire et Stratégies Théranostiques, Faculté de Médecine, Université Clermont Auvergne, UMR INSERM-UCA, U1240, 63000 Clermont Ferrand, France; corinne.aubel@uca.fr
 - ⁴ BIOPASS Company, 5 Avenue Blaise Pascal, 63178 Aubière, France
 - ⁵ Imagerie Moléculaire et Stratégies Théranostiques, Centre de Lutte Contre le Cancer Jean Perrin, Université Clermont Auvergne, UMR INSERM-UCA, U1240, 63000 Clermont Ferrand, France; frederique.penault-llorca@clermont.unicancer.fr
- * Correspondence: mahchid.bamdad@uca.fr; Tel.: +33-473-177-075
† These authors contributed equally to this work.

Simple Summary: Cancer spheroids are reproducible and relevant multicellular in vitro preclinical models. Thus, their use is required more and more for drug development processes in oncology in order to improve the prediction of anticancer drugs responses. Moreover, spheroid models allow for the reduction in animal experimentation, in accordance with the rule of Reduce, Refine, Replace (3Rs). In order to optimize and extend the use of these spheroid models, this work was focused on the development of an original methodology to keep these cancer spheroids in the long term. This innovative concept is based on a cold storage for up to 7 days of Triple-Negative Breast Cancer (TNBC) spheroids cultured in the synthetic serum-free OptiPASS[®] culture medium. Major spheroid characteristics could be preserved with this new conservation method, allowing their use in high throughput screening tests.

Abstract: Cancer spheroids are very effective preclinical models to improve anticancer drug screening. In order to optimize and extend the use of spheroid models, these works were focused on the development of a new storage concept to maintain these models in the longer term using the Triple-Negative Breast Cancer MDA-MB-231 spheroid models. The results highlight that the combination of a temperature of 4 °C and oxygen-free conditions allowed the spheroid characteristics of OptiPASS[®] serum-free culture medium to preserve the spheroid characteristics during 3-, 5- or 7-day-long storage. Indeed, after storage they were returned to normal culture conditions, with recovered spheroids presenting similar growth rates (recovery = 96.2%), viability (Live/Dead[®] profiles) and metabolic activities (recovery = 90.4%) compared to nonstored control spheroids. Likewise, both recovered spheroids (after storage) and nonstored controls presented the same response profiles as two conventional drugs, i.e., epirubicin and cisplatin, and two anti-PARP1 targeted drugs—i.e., olaparib and veliparib. This new original storage concept seems to induce a temporary stop in spheroid growth while maintaining their principal characteristics for further use. In this way, this innovative and simple storage concept may instigate future biological sample preservation strategies.

Keywords: triple-negative breast cancer; preclinical spheroid models; MDA-MB-231 spheroids; new spheroid storage concept; drug screening

1. Introduction

Cancer remains a global health care issue, with 18.1 million new diagnosed cases and 9.6 million deaths worldwide in 2018 [1]. Particularly, the Triple-Negative Breast Cancer (TNBC) subtype is characterized by an absence of estrogen and progesterone receptor expression and the absence of epidermal growth factor receptor-2 (HER2) overexpression [2]. This very heterogeneous pathology has a poor prognosis due to a high aggressiveness and a frequent rate of local and metastatic recurrences [3]. Recently, precision medicine has introduced targeted therapies to improve the treatment of these tumors, such as the Poly ADP-Ribose Polymerase (PARP) inhibitors family [4]. However, only 30% of TNBCs present a BRCAness phenotype, generating heterogeneity in the sensitivity of PARP inhibitors [5]. This is why drug discovery studies need to be carried out with the objective of TNBC treatment optimization [6], implying explorations of preclinical models. One major limitation in the pharmaceutical research field is the significant failure rate of anticancer drugs validation during clinical trials [7,8]. To improve the oncological drug development process and reduce time and costs spent in inconclusive trials, it is essential to increase the effectiveness and the prediction of the drug response in patients [9]. This is why, during the last decade, efforts have been made to develop preclinical predictive models in order to improve cancer development studies and anticancer treatments, especially for aggressive tumoral subtypes [8].

In this context, three-dimensional (3D) cell cultures models appeared as a pertinent *in vitro* option. More precisely, multicellular spheroids are compact round cell aggregates generated from cancer cell lines [10,11]. Their principal asset is to reproduce important cell–cell and cell–extracellular matrix interactions in the avascular tumorigenesis phase. Indeed, these interactions are major elements of the cancer microenvironment, indispensable for the maintenance of intercellular communications and mechanical forces [12,13]. Spheroid compaction is also at the origin of an avascular tumor-like cell organization with the generation of nutrient, oxygen, pH and metabolic waste removal gradients. Tumoral cells thus form different metabolic layers with a hypoxic core enriched with necrotic cells, middle layers of quiescent cells and a proliferative front at the periphery. All these characteristics allow cell metabolic heterogeneity and a gene expression profile close to those observed in *in vivo* avascular solid tumors to be recreated [14,15]. Thereby, in the drug development process, spheroid models are filling the gap between the proof of concept made for classic monolayer cell cultures and the preclinical final validation for animal models [16]. Indeed, they more precisely recapitulate *in vivo* solid tumor characteristics than classic cell cultures and discard some animal experimentation limitations linked with experiment number, costs and ethical issues [17,18].

The predictability and reproducibility of the 3D culture models' drug responses depend on various parameters, such as the composition of the culture medium [19,20]. The majority of cell culture media are supplemented with fetal calf serum (FCS), which presents several disadvantages in terms of reproducibility [21,22]. The use of a chemically defined serum-free synthetic media in cell culture systems appears now to be a key element for reproducibility of *in vitro* models. In our previous works, two spheroid models obtained from two TNBC cell lines, MDA-MB-231 and SUM1315, were developed in the serum-free OptiPASS[®] medium [23]. These works presented clearly optimized spheroid growth and viability for OptiPASS[®] cultured models compared to others cultured in the serum-supplemented medium. Moreover, OptiPASS[®] medium improved the spheroids' drug sensibility threshold and also allowed a prolonged culture of spheroids. Alongside this, other studies recently highlighted an innovative approach to store colorectal multicellular tumor spheroids under cold (4 °C) and anoxic conditions [24]. This methodology allowed

spheroid integrity to be maintained for 18 days without changing the response to anticancer treatment.

In the context of the development and optimization of predictive preclinical models in oncology, this work aimed to evaluate the potential of using the synthetic OptiPASS[®] medium in combination with anoxia and cold storage conditions, for the preservation of TNBC MDA-MB-231 spheroids, over time.

2. Materials and Methods

2.1. Maintenance of Cell Cultures

The triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cell line (ATCC[®], HTB26[™]) was stored in the Biological Resource Center of Jean Perrin Comprehensive Cancer Center under the No. BB-0033-00075 (Clermont-Ferrand, France). After absence of mycoplasma contamination check (MycoplasmaCheck test, Eurofins Genomics, Luxembourg), MDA-MB-231 cells were cultured in RPMI 1640 medium (Gibco, Dublin, Ireland) supplemented with 10% decomplexed fetal calf serum (Eurobio Scientific, Paris, France) and 20 µg/mL Gentamycin (Panpharma, Paris, France) at 37 °C under 5% CO₂ in humid incubator.

2.2. Spheroids Formation, Culture and Storage

MDA-MB-231 spheroids were formed as previously described [23,25]. Briefly, cells in suspension in RPMI 1640 (Gibco) or OptiPASS[®] (BIOPASS Society, Aubière, France) were seeded in ultralow attachment round-bottom microplates (Corning, New-York, NY, USA, catalogue #4520) at a concentration of 1000 cells/well. After 24 h at 37 °C in humid incubator, Geltrex LDEV-Free Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix (Gibco, Dublin, Ireland, catalogue #A1413202) diluted in cold RPMI1640 or cold OptiPASS[®] culture medium was dispensed in each well for a final concentration of 2%. Microplates were then shaken for 20 min at 200rpm to promote the formation of a unique cell aggregate per well. The day after, compact spheroids were observable in bright field microscopy.

For both conditions, spheroid size and integrity were measured by bright field microscopy at days D1, D3, D4, D7, D10 and D14. Spheroid viability was assessed at D3, D4, D7 and D14 using Live/Dead[®] fluorescence microscopy test. Metabolism activity of spheroids was also quantified at D3, D7 and D14 with resazurin metabolic activity test.

After 3 days of culture, microplates were stored for different times at 4 °C or remained in the incubator in normal culture conditions (control). For the oxygen-free storage condition, microplates were packed in a hermetically closed plastic bag (Flo[™], Marcilly, France, catalogue #763783) with anaerobic gas generating AnaeroGen[™] 2.5L (Oxoid[™], Dardilly, France, catalogue #AG0025A) before being kept at 4 °C for storage period of 1, 3, 5, 7, 14 or 30 days (Figure 1). The confirmation of the anaerobic atmosphere (0% O₂) was checked with monogaz O₂ detector (Honeywell, Charlotte, NC, USA) (Appendix A) and Resazurin Anaerobic Indicator (Oxoid[™], Dardilly, France, catalogue #BR0055B). After each storage time, microplates were taken out of the bags and 20 µL of RPMI1640 or OptiPASS[®] culture medium was added to each well, before replacing microplates in normal cell culture conditions (37 °C, 5% CO₂ in humid incubator) for 11 other days, giving a total culture time of 14 days (Figure 1). For control nonstored condition, microplates were maintained continuously for 14 days in normal culture conditions with a 20 µL RPMI1640 or OptiPASS[®] culture medium addition per well at the 4th culture day.

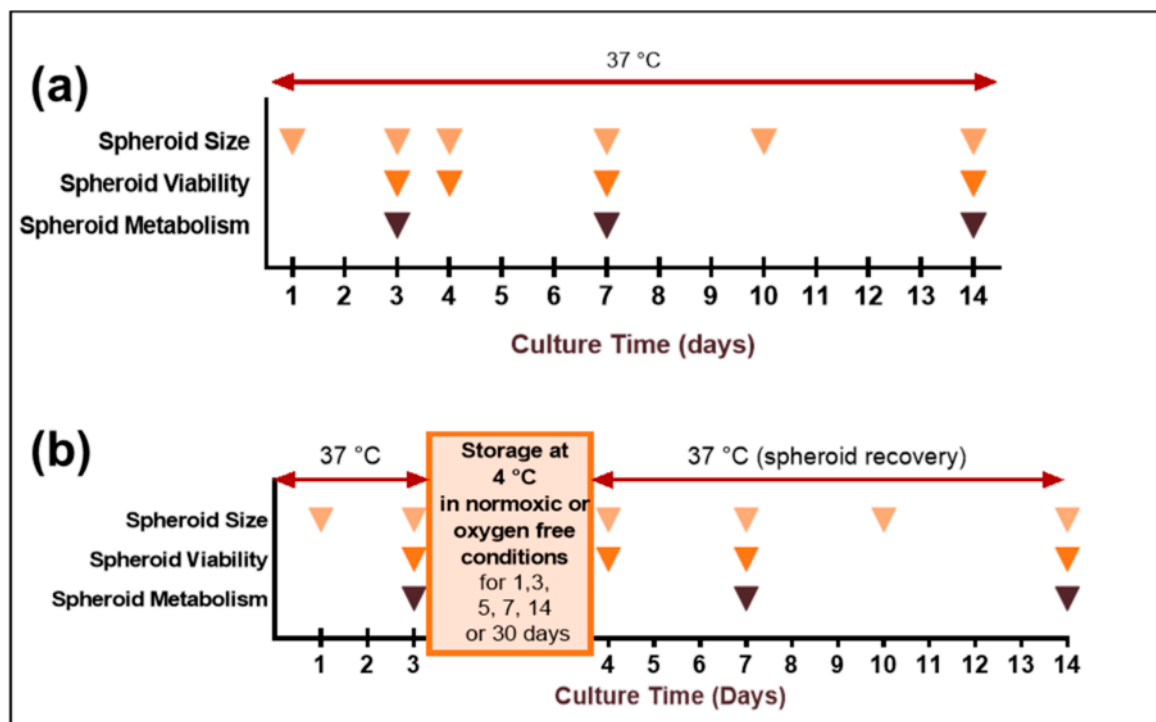


Figure 1. Schematic representation of MDA-MB-231 spheroids cold storage experiments. MDA-MB-231 spheroids were cultured in RPMI 1640 fetal calf serum-supplemented or OptiPASS[®] medium and maintained in classic cell culture conditions (humid incubator, 37 °C, 5% CO₂). (a) For nonstored control condition, spheroids were continuously maintained at 37 °C, i.e., in classic culture conditions, for 14 days. (b) For storage experiments, after 3 days of culture, the spheroids in microplates were stored at 4 °C in normoxic or oxygen-free conditions for 1, 3, 5, 7, 14 or 30 days. After storage, spheroids in microplates were replaced in classic culture conditions for 10 supplemental days—i.e., between the 4th and the 14th days of culture.

2.3. Spheroids Growth Evaluation

Each spheroid of the microplates was automatically imaged using bright field microscopy module of the Cytation[™]3MV cell analyzer (Biotek[®]-M = 4X) coupled with Gen5 3.08 software (Biotek[®], Winooski, VT, USA). The “Cellular analysis” tool was applied to a stitched picture to calculate the object size of each well (threshold = 20,000, background = light, min. object size = 150 μm, max. object size = 1000 μm). Spheroid size was recorded for each condition on the 1st, 3rd, 4th, 7th, 10th, and 14th days of culture (D1, D3, D4, D7, D10 and D14) allowing growth kinetic curves to be set. Growth curve slopes were calculated for each spheroid condition between the 4th and the 14th culture days (corresponding to the poststorage period) [26].

2.4. Spheroids Viability Assessment

The spheroid cell viability was monitored after 3, 4, 7 and 14 days of culture (D3, D4, D7 and D14) using Live/Dead[®] fluorescent microscopy kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, catalogue #L3224). Spheroids were incubated for 30 min at room temperature in a working solution containing 1 μM calcein-AM and 2 μM ethd-D1 in D-PBS (Sigma, Saint-louis, MI, USA, catalogue #D8537). They were then transferred to a μ-Slide 8 Well (Ibidi, catalogue #μ-Slide 8 Well) to be imaged using the fluorescent microscopy module of the Cytation[™]3MV cell analyzer (Biotek[®]-M = 4X-fluorescence filters = green fluorescent protein and propidium iodide).

2.5. Spheroid Metabolic Activity Assay

Additionally, global spheroid metabolic activity was measured at days 3, 7 and 14 (D3, D7 and D14) by transferring each spheroid to 100 μL of a sterile 60 μM resazurin solution in D-PBS (ACROS Organics[™], Waltham, MA, USA, catalogue # 189900010). This test

was based on the transformation of resazurin to resorufin by the mitochondrial respiration chain in living cells. The resorufin concentration, which can be measurable by fluorimetry, was directly proportional to the metabolic activity in spheroids [27]. After 17 h incubation at 37 °C, the fluorescence intensity of resorufin (593 nm) was measured using Cytation™3MV fluorimetry module (gain = 70). Blank subtraction was applied to data obtained from spheroid-free wells.

2.6. Spheroid Tumoral Proliferation Gradient Analysis

Spheroids cultured in OptiPASS® medium without storage (control spheroids) or stored for 3, 5 or 7 days at 4 °C in oxygen-free conditions were harvested at days 4, 7 and 14.

For ki67 immunostaining, after a 12 h fixation in paraformaldehyde 4% (Sigma-Aldrich catalogue #P6148), spheroids were successively incubated in 15 and 30% sucrose D-PBS solutions to be dehydrated. Spheroids were then placed in cryostat embedding medium to be quickly frozen in liquid nitrogen and cut into 10 µm sections with a cryostat device (CICS, Université Clermont Auvergne, France). Obtained slides were then incubated in saturation/permeabilization solution (PBS, 1%BSA, 0.5X Triton) for 1 h. They were then incubated with PBS 0.1% BSA diluted primary antibodies anti-ki67 (polyclonal rabbit, 1/250, Merck, Darmstadt, Germany, catalogue #AB9260), or Mouse IgG1 isotypic control for 1 h. After three washes in PBS, slides were incubated with PBS 0.1% BSA diluted secondary fluorescent antibodies antirabbit (Donkey anti-Rabbit IgG coupled to Alexa Fluor™568, 1/800, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, catalogue # A10042) for 1 h, followed by a nuclear counterstaining with Hoechst33258 (Sigma, Saint-Louis, MI, USA, catalogue #B2883; 1 µg/mL) for 5 min. Negative controls with no primary antibodies were also performed. Slides were mounted with Prolong Diamond Antifade (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, catalogue # P36970) and imaged with Cytation™3MV fluorescent microscopy module (M = 10X-fluorescence filters = Texas Red and DAPI). Thanks to the “cellular analysis” algorithm of Gen5 3.08 software, nuclei were detected and localized on DAPI channel (threshold = 5000, background = dark, min. object size = 5 µm, max. object size = 50 µm). For ki67 staining, some nuclei presented intense and specific staining compared to other ones, agreeing with an on/off activation of the transcription factor expression depending on cell cycle. Thereby, adapted algorithm was used to select nuclei subpopulation presenting activated ki67 expression (Texas Red fluorescent intensity > 3000). For the quantification of ki67 expression in each spheroid, the following formula was applied:

$$\begin{aligned} & \text{Global marker expression in the spheroid} \\ & = \% \text{ ki67 positive nuclei per spheroid} \times \text{mean fluorescent intensity of positive nuclei} \end{aligned} \quad (1)$$

2.7. Spheroid Hypoxia Level Analysis

For spheroid global hypoxia level evaluation, ROS-ID® orange reagent (EnzoLife-Sciences, Farmingdale, NY, USA, catalogue #ENZ-51042) was used. This probe was attached to a nitro group that was specifically reduced by nitro reductase activity in hypoxic cells, releasing an orange fluorescence. Spheroids were exposed with Hypoxia Red reagent at a concentration of 250 µM diluted in OptiPASS® medium for 4 h in humid incubator at 37 °C and 5% CO₂ (Figure S1). They were then transferred to a µ-Slide 8 Well (Ibidi, Gräfelfing, Germany, catalogue #µ-Slide 8 Well) to be imaged using the fluorescent microscopy module of the Cytation™3MV cell analyzer (Biotek®, Winooski, VT, USA, M = 4X, fluorescence filter = Texas Red). Mean fluorescence intensity of spheroids was calculated with “cellular analysis” algorithm of Gen5 3.08 software (threshold = 9000, background = dark, min. object size = 100 µm, max. object size = 1000 µm).

2.8. Anticancer Drugs Solubilization and Exposure

Epirubicin (Carbosynth, Compton, UK, catalogue #FE22741) and cisplatin (Carbosynth, Compton, UK, catalogue #FC20460) were solubilized in distilled water and DMSO, respectively, to prepare 10 mM stock solution. Adapted dilutions were prepared in OptiPASS®

medium for final treatment concentrations of 0.1, 1 or 10 μM . Olaparib (Carbosynth Compton, UK, catalogue #FO33122) and veliparib (BOC sciences[®], Noy York, NY, USA, catalogue #912445-05-7) were solubilized in DMSO to prepare 50 mM stock solution. Adapted dilutions were prepared in OptiPASS[®] medium for final treatment concentrations of 0.5, 5 or 50 μM . With the exception of epirubicin treated samples, the final DMSO concentration remained constant at 0.1% in all treated spheroid conditions.

2.9. Spheroids Anticancer Drug Treatments

MDA-MB-231 spheroids cultured in OptiPASS[®] medium without the storage step or stored for 3, 5 or 7 days at 4 °C in oxygen-free conditions were treated for 5 days (between the 5th and the 10th culture days), with increased concentrations of selected anticancer drugs. The size of the untreated control and treated spheroids was monitored daily using Cytation[™]5MV (Biotek[®], Winooski, VT, USA) coupled with BioSpa[™] automated cell incubator (Biotek[®], Winooski, VT, USA) and Gen5 3.08 software (Biotek[®], Winooski, VT, USA). Growth curve slopes were calculated for each spheroid between the 5th and the 10th culture days. At the end of the treatment, spheroid viability was assessed by the Live/Dead[®] and resazurin tests as described previously. Normalized viability was determined by the percentage of treated spheroids resorufin values on untreated control values.

2.10. Statistical Analysis

Results were presented as mean \pm standard deviation. All experiments were performed independently on at least three separate occasions. An unpaired 2-sided Student's *t*-test or two-way ANOVA (confidence interval = 95%, Dunnett's multiple comparison) was used to evaluate statistical significance. Results were considered statistically different when $p < 0.05$ (*). Stronger differences were noted as follows: $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***), $p < 0.0001$ (****) and $p < 0.00001$ (*****). Nonsignificant results were noted as "ns".

3. Results

3.1. Normoxic and Cold Storage Action on MDA-MB-231 Spheroid Preservation in RPMI1640 and OptiPASS[®] Culture Media

MDA-MB-231 spheroid models cultured for three days in RPMI1640 or OptiPASS[®] medium were firstly stored in normoxic conditions at 4 °C, for one to three days. Then, 3D cell cultures were then exposed to standard cell culture conditions—i.e., at 37 °C under 5% CO₂ [23]. Recovery was analyzed for 11 days using several cell culture parameters such as spheroid integrity, spheroid growth, cell viability/mortality and cell metabolic activity in comparison to nonstored control spheroids cultured in RPMI 1640 medium or OptiPASS[®] medium, respectively.

In RPMI 1640 culture medium, the integrity, compaction level and size of spheroids were followed over time. For spheroids stored for one or three days, a translucent and less cohesive aspect was detected at day 4, in comparison to nonstored control spheroids (Figure 2a). In contrast, after 14 days of culture, the spheroids previously stored for one and three days at 4 °C presented the same aspects as nonstored controls (Figure 2a). However, at D14 spheroid size after one day ($374.3 \pm 66.7 \mu\text{m}$) and three days ($478.2 \pm 37.1 \mu\text{m}$) of 4 °C storage remained greatly lower compared to nonstored control cells at $890.9 \pm 45.4 \mu\text{m}$ ($p = 10^{-113}$ and 10^{-86} , 2-sided *t*-test). Then, spheroid cell proliferation was analyzed between the 4th and the 14th days of culture by a growth curve slope analysis. Slopes of nonstored control spheroids were 47.3 ± 10.9 and clearly superior to one- or three-day storage conditions, at 3.0 ± 7.2 ($p = 10^{-72}$, 2-sided *t*-test) and 14.7 ± 8.6 ($p = 10^{-37}$, 2-sided *t*-test), respectively (Figure 2b). The viability analysis of poststorage spheroids, using the Live/Dead[®] fluorescent imaging kit, showed a large part of red dead cells located in the periphery of the spheroids for both storage conditions at day 4 (Figure 2c). Similarly, at the 14th day of culture, only a poor or absent viable green cells population remained in spheroids. In contrast, nonstored control spheroids presented cohesive viable green cell masses at D4 and D14 (Figure 2c). Finally, the metabolic activity of spheroids was monitored for each storage condition at D3, D7 and D14 using the resazurin test. For nonstored

control spheroids, the metabolic activity increased regularly over time, with $16.1 \pm 4.5 \times 10^3$ UF (fluorescence intensity units) at D3 to $21.4 \pm 2.8 \times 10^3$ UF at D7 and to $52.0 \pm 5.5 \times 10^3$ UF at D14 (Figure 2d). In contrast, after one and three days of cold storage, the metabolic activity of spheroids decreased dramatically at D7 ($0.3 \pm 0.5 \times 10^3$ UF) and D14 ($0.2 \pm 0.1 \times 10^3$ UF) ($p = 10^{-3}$, 2-sided *t*-test) compared to $16.1 \pm 4.5 \times 10^3$ UF at D3 (before storage) (Figure 2d).

In OptiPASS[®] culture medium, after one day of cold storage, the spheroid compaction aspect was similar to controls at day 4 and day 14 (Figure 2e). Interestingly, for this condition, spheroid size was close to those of nonstored controls at day 14 ($816.1 \pm 58.8 \mu\text{m}$ compared to $908 \pm 52.1 \mu\text{m}$; $p = 10^{-15}$, 2-sided *t*-test) (Figure 2e). In contrast, after three days of cold storage in OptiPASS[®] medium, spheroids were less compact and significantly smaller than nonstored spheroid controls at day 14 ($483.4 \pm 34.6 \mu\text{m}$ compared to $908 \pm 52.1 \mu\text{m}$; $p = 10^{-108}$, 2-sided *t*-test) (Figure 2e). For growth curve slope parameter analysis, after one day of spheroid storage in OptiPASS[®] medium, the slopes were significantly lower (30.5 ± 8.3) than controls (43.1 ± 11.6) ($p = 10^{-17}$, 2-sided *t*-test) (Figure 2f). For spheroids stored for three days, the growth curve slopes were negative with -7.6 ± 3.1 and clearly lower to those of nonstored spheroids ($p = 10^{-198}$, 2-sided *t*-test) (Figure 2f). The spheroid viability profiles in OptiPASS[®] medium stored for one day presented similar viability/mortality profiles to nonstored controls with mainly green cells at day 4 and day 14 (Figure 2g). In contrast, for the cultures stored for three days, spheroids presented a noncohesive and rare viable green cell population, for both days (day 4 and day 14) (Figure 2g). Finally, in OptiPASS[®] medium, spheroid controls presented an increasing metabolic activity over time, with $16.1 \pm 1.6 \times 10^3$ UF at day 3, $22.4 \pm 3.4 \times 10^3$ UF at day 7 and $38.9 \pm 4.5 \times 10^3$ UF at day 14 ($p = 10^{-3}$ and 10^{-6}) (Figure 2h). Similarly, spheroids stored for one day presented an increasing metabolic activity during the culture time— $16.1 \pm 1.6 \times 10^3$ UF, $21.3 \pm 8.1 \times 10^3$ UF and $22.5 \pm 11.6 \times 10^3$ UF at D3, D7 and D14, respectively (Figure 2h). In contrast, after three days of cold and normoxic storage, OptiPASS[®] cultured spheroids presented a decreased metabolic activity at $7.8 \pm 1.3 \times 10^3$ UF at D14 compared to $16.1 \pm 1.6 \times 10^3$ UF, before the storage step (Figure 2h).

All these results suggest a clear loss of spheroid proliferation capacity, cell viability and cell metabolic activity, after one- or three-day cold and normoxic storage in RPMI 1640 medium. In contrast, in OptiPASS[®] medium culture, these parameters seemed to be partially preserved for only one day of cold and normoxic storage of MDA-MB-231 spheroids.

3.2. Oxygen-Free and Cold Storage Combination Impact on MDA-MB-231 Spheroid Preservation in RPMI1640 and OptiPASS[®] Culture Media

In order to achieve cold and oxygen-free conditions, spheroids in microplates were first cultured for 3 days under normal conditions in both RPMI1640 and OptiPASS[®] media and were then hermetically packed using the Anaerogen[™] oxygen-consumer. Spheroids were then stored for three days at 4 °C. Then, microplates were incubated in 37 °C and 5% CO₂ and spheroid recovery was analyzed in the same conditions as previously presented.

In RPMI 1640 medium, oxygen-free spheroids that were cold-stored for 3 days presented less cohesive structures than nonstored spheroids at D4 (Figure 3a). These spheroids evolved to a more compact aspect than controls at D14. However, the mean size of oxygen-free cold-stored spheroids ($654.6 \pm 212.2 \mu\text{m}$) was significantly lower than nonstored controls at D14 at $913.2 \pm 73.3 \mu\text{m}$ ($p = 10^{-10}$, 2-sided *t*-test). Viability/mortality spheroid cell analysis by live/dead tests showed, for oxygen-free cold-stored spheroids, an absence of viable green cells at D4 and a low proportion of viable green cells at D14 (Figure 3a). In contrast, for nonstored spheroid controls compact green spheroids were detected at D4 and D14 (Figure 3a). In parallel, the growth curve slope for oxygen-free cold-stored spheroids in RPMI1640 was lower than nonstored controls at 36.6 ± 18.5 (compared to 47.3 ± 10.8 , $p = 10^{-8}$, two-sided *t*-test) (Figure 3b). Finally, metabolic activities of spheroids, assessed with resazurin tests after the oxygen-free cold storage, were $12.4 \pm 5.2 \times 10^3$ UF at D7 and of $36.8 \pm 2.0 \times 10^3$ UF at D14 (Figure 3c). These values remained lower than those

obtained for nonstored controls equal to $21.4 \pm 2.8 \times 10^3$ UF at D7 and $52.0 \pm 5.5 \times 10^3$ UF at D14 ($p = 10^{-2}$ and 10^{-3} , 2-sided *t*-test).

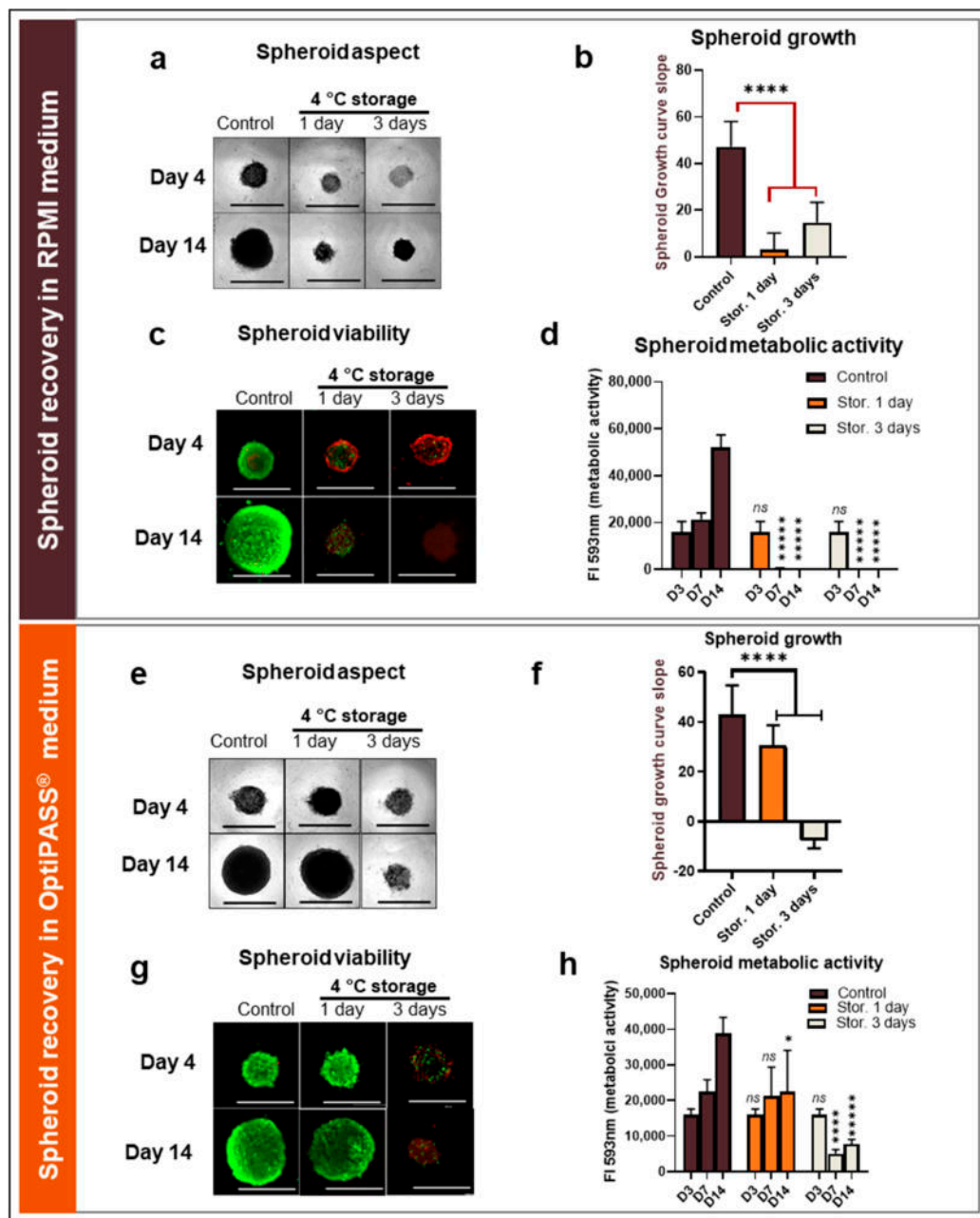


Figure 2. MDA-MB-231 spheroid preservation analysis after 4 °C storage in RPMI1640 and OptiPASS® media culture. Three-day-old spheroids were placed for 1 or 3 days at 4 °C before being exposed to normal culture conditions—i.e., 37 °C, 5% CO₂ in both RPMI1640 and OptiPASS® medium cultures. Spheroid integrity aspect and size (a) in RPMI and (e) in OptiPASS® were analyzed with bright field microscopy and object size algorithm (Cytation™3MV, Gen5, BioTek®-M = 4X, scale bar = 1000 µm). Spheroid cell proliferation was measured by the analysis of growth curve slopes between D4 and D14 (b) in RPMI and (f) in OptiPASS®, reflecting proliferation capacities and recovery of cell spheroids after storage step. Spheroid cell viability after storage was analyzed by Live/Dead® tests (c) in RPMI and (g) in OptiPASS® with green fluorescence for viable cells and red fluorescence for dead cells, using Cytation™3MV equipped with GFP and IP fluorescence cubes (M = 4X, scale bar = 1000 µm). Spheroid cell metabolic activity change after storage was quantified using the resazurin test (d) in RPMI and (h) in OptiPASS®, at D3, D7 and D14 with normalized 593 nm Fluorescence Intensity (FI) measures. For each storage condition, significances compared to nonstored condition were indicated as ns (not significant; $p > 0.05$), * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$, ***** $p < 0.00001$.

In OptiPASS[®] culture medium, after an oxygen-free 3-day long cold storage step, compact and cohesive spheroids, comparable to nonstored controls, were detected with bright field microscopy at D4 and D14 (Figure 3d). The mean sizes of stored OptiPASS[®] cultured spheroids were $473.2 \pm 50.2 \mu\text{m}$ at D4 and $881.5 \pm 50.5 \mu\text{m}$ at D14. These results were in the same value range as nonstored controls sizes with sizes of $508.3 \pm 101.1 \mu\text{m}$ at D4 and $913.2 \pm 73.3 \mu\text{m}$ at D14 ($p = 10^{-7}$ and 10^{-3} , 2-sided *t*-test). Live/Dead[®] tests showed a vast majority of green/viable cells giving similar viability profiles to nonstored controls (Figure 3d). Growth curve slopes between D4 and D14 were 41.7 ± 8.5 for oxygen-free cold-stored spheroids and comparable to nonstored controls at 43.1 ± 11.6 ($p = 0.3$, 2-sided *t*-test), showing similar proliferation rates between the two conditions (Figure 3e). Similarly, the metabolic activity evolution for oxygen-free cold storage, with $24.8 \pm 3.0 \times 10^3$ UF at D7 and $35.6 \pm 4.5 \times 10^3$ UF at D14, remained close to nonstored control spheroids, with $22.4 \pm 3.4 \times 10^3$ UF at D4 and $38.9 \pm 4.5 \times 10^3$ UF at D14 ($p = 0.3$ and 0.3 , 2-sided *t*-test).

All these results showed that in OptiPASS[®] medium, the combination of oxygen-free and cold storage over 3 days made it possible to preserve the properties of the MDA-MB-231 spheroids in comparison to nonstored controls. This last condition for the storage of MDA-MB-231 spheroids had no impact on these culture parameters, and longer storages in OptiPASS[®] medium were then studied.

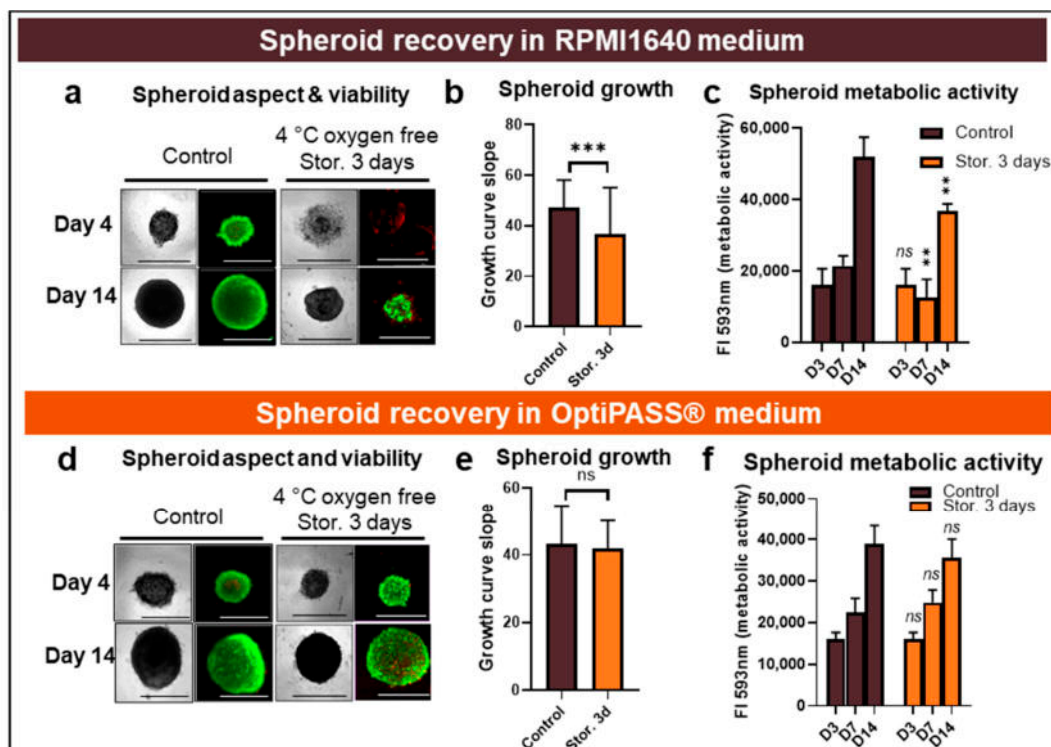


Figure 3. MDA-MB-231 spheroid preservation study after three-day storage at 4 °C and oxygen-free conditions in RPMI1640 and OptiPASS[®] media culture. Three-day-old spheroids cultured in normal culture conditions, i.e., 37 °C, 5% CO₂ in RPMI1640 or OptiPASS[®] media culture, were exposed to oxygen-free conditions for 3 days at 4 °C. Then, the cultures were exposed again to normal culture conditions in which spheroid recovery was analyzed at day 3, day 4 and day 14. Spheroid integrity aspect and size (a) in RPMI and (d) in OptiPASS[®] were analyzed with bright field microscopy and object size algorithm (Cytation[™]3MV, Gen5, BioTek[®], M = 4X, scale bar = 1000 μm). Spheroid cell viability after storage was studied by Live/Dead[®] tests (a) in RPMI and (d) in OptiPASS[®] with green fluorescence, for viable cells and red fluorescence, as well as for dead cells, using Cytation[™]3MV equipped with GFP and IP fluorescence cubes (M = 4X, scale bar = 1000 μm). Spheroid cell proliferation was measured by the growth curve slope analysis between D4 and D14 (b) in RPMI and (e) in OptiPASS[®]. Spheroid metabolic activity after storage (c) in RPMI and (f) in OptiPASS[®] medium culture was quantified using the resazurin tests. For each storage condition, significances compared to nonstored condition were indicated as ns (not significant; $p > 0.05$), ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.3. OptiPASS[®] Synthetic Medium Allows Longer Cold and Oxygen-Free Storage of MDA-MB-231 Spheroids without Changing Model's Phenotype

OptiPASS[®] medium cultured MDA-MB-231 spheroids were maintained for 3 days under normal conditions and then exposed to oxygen-free conditions at 4 °C for 5, 7, 14 or 30 days. After each storage, microplates were exposed to 37 °C and 5% CO₂. This is the same as previous parameters—i.e., spheroid integrity, growth, viability/mortality profile, metabolic activity and also ki67 proliferation marker expression—and spheroid hypoxia levels were analyzed at different times in comparison to nonstored spheroid controls.

First, concerning spheroid topology in terms of cell mass cohesion and cellular compaction, no difference was detected at D4 between the spheroids stored for 5 and 7 days and the nonstored controls with compact and ovoid spheroids (Figure 4a). In contrast, the spheroids stored for 14 and 30 days presented less cohesive shapes than the control nonstored spheroids with less regular borders (Figure 4a). Mean sizes of spheroids at D4 (just after return in culture conditions) were $466.3 \pm 3.5 \mu\text{m}$, $449.7 \pm 29.9 \mu\text{m}$, $367.2 \pm 35.8 \mu\text{m}$ and $465.1 \pm 64.9 \mu\text{m}$ for spheroids stored for 5, 7, 14 and 30 days, respectively, compared to $508 \pm 101.1 \mu\text{m}$ for nonstored controls ($p = 10^{-9}$, 10^{-18} , 10^{-44} and 10^{-7} , 2-sided *t*-test). Otherwise, at D14, the spheroids stored for 5, 7 and 14 days showed regularly round and cohesive shapes with a mean size in the same range as nonstored controls— $831.3 \pm 51.3 \mu\text{m}$, $845.0 \pm 70.8 \mu\text{m}$ and $825.5 \pm 140.2 \mu\text{m}$, respectively, compared to $908.1 \pm 52.1 \mu\text{m}$ for controls ($p = 10^{-24}$, 10^{-13} and 10^{-8} , 2-sided *t*-test). For 30-day storage, spheroids presented a compaction loss aspect (Figure 4a) with a mean size greatly inferior to control values at day 14 (421.0 ± 54.9 , $p = 10^{-227}$, 2-sided *t*-test).

Then, to characterize spheroids' proliferation poststorage recovery, the growth curve slopes were analyzed from D4 to D14. For spheroids stored for 5 and 7 days, slopes were 41.5 ± 5.5 and 41.3 ± 9.5 , respectively, similar to the nonstored control value of 43.1 ± 11.6 ($p = 0.09$ and 0.07 , 2-sided *t*-test) (Figure 4b). However, significant differences were detected between control values and slopes of spheroids stored for 14 days (31.5 ± 10.9 , $p = 10^{-12}$, 2-sided *t*-test) and of spheroids stored for 30 days (-3.7 ± 4.3 , $p = 10^{-208}$, 2-sided *t*-test) (Figure 4b). In parallel, Live/Dead[®] tests carried out at D4 and D14 revealed a majority of green fluorescent viable cells comparable to nonstored controls after 5 and 7 days of cold storage (Figure 4c). For experiments with longer storage times (14 and 30 days), red dead cells combined with a persistent green cell population were detected for spheroids stored for 14 days and exclusively read dead cells for samples stored for 30 days (Figure 4c).

These viability profiles were then confirmed with the resazurin metabolic activity test performed on D3, D7 and D14. The spheroids stored for 5 and 7 days presented metabolic activity evolutions similar to nonstored controls (Figure 4d), with fluorescent intensities of $23.0 \pm 3.0 \times 10^3$ at D7 and $34.4 \pm 3.0 \times 10^3$ at D14 for spheroids stored for 5 days compared to $22.4 \pm 3.4 \times 10^3$ and $38.9 \pm 4.5 \times 10^3$ for nonstored spheroid controls ($p = 0.82$ and 0.13 , 2-sided *t*-test). However, the spheroids stored for 14 days showed significantly decreased metabolic activity, with $11.1 \pm 2.4 \times 10^3$ at D7 and $17.6 \pm 3.0 \times 10^3$ at D14 ($p = 10^{-4}$ and 10^{-5} , 2-sided *t*-test). Finally, the results obtained for the spheroids stored for 30 days were dramatically lower than those of nonstored control and close to blank background ($0.3 \pm 0.5 \times 10^3$ and $0.4 \pm 0.3 \times 10^3$ for D7 and D14, respectively, $p = 10^{-4}$ and 10^{-5} , 2-sided *t*-test), presenting an almost total loss of spheroid viability after the storage step.

Regarding the absence of an impact of 3-, 5- and 7-day-long cold and oxygen-free storage on OptiPASS[®] cultured MDA-MB-231 spheroids in terms of proliferation, viability and metabolic activity, phenotypic characterization was then studied for these three storage conditions in comparison to nonstored control conditions.

Firstly, ki67 expression was analyzed by immunostaining on spheroid cuts. For all tested conditions, specific staining was achieved showing the presence of orange intense ki67-positive nuclei (Figure 4e). Ki67-positive nuclei were distributed in all spheroid areas at D3 and D7, while they were rather located in spheroid borders at D14 (Figure 4e). The spheroid ki67 global expression (% ki67-positive cells \times fluorescence inten-

sity) was then analyzed (Figure 4f). For nonstored controls, ki67 expression decreased from $25.4 \pm 9.4 \times 10^2$ UF at D4, to $9.2 \pm 5.7 \times 10^2$ UF at D7 and to $0.2 \pm 0.2 \times 10^2$ UF at D14. This evolution was similar to those seen for spheroids stored for 3 days, with values of $22.2 \pm 6.0 \times 10^2$ UF at D4 ($p = 0.4$, 2-sided t -test), $9.4 \pm 1.1 \times 10^2$ UF at D7 ($p = 0.9$, 2-sided t -test) and $6.2 \pm 4.3 \times 10^2$ UF at D14 ($p = 0.01$, 2-sided t -test). These results were also similar for spheroids stored for 5 and 7 days spheroids (Figure 4f). Secondly, the spheroid hypoxia level was evaluated using a ROS-ID[®] fluorescence kit. For all tested conditions, fluorescent staining was homogeneously distributed on all spheroid surfaces (Figure 4g). The spheroid hypoxia level remained relatively stable over time for nonstored controls with a mean of $30.0 \pm 3.3 \times 10^3$ UF at D3, of $37.8 \pm 7.8 \times 10^3$ UF at D4 and of $36.6 \pm 3.8 \times 10^3$ UF at D14 (Figure 4h). Similar values were obtained after spheroid storage with $42.1 \pm 4.2 \times 10^3$ UF, $34.5 \pm 5.5 \times 10^3$ UF and $37.8 \pm 2.0 \times 10^3$ UF at D4 for 3-, 5- and 7-day-long storage conditions, respectively ($p = 0.20, 0.40$ and 0.99 , 2-sided t -test) (Figure 4h). In the same way, at D14, the stored spheroids' hypoxia levels were similar to those obtained for nonstored control with $38.5 \pm 5.0 \times 10^3$ UF, $35.9 \pm 4.8 \times 10^3$ UF and $33.1 \pm 1.5 \times 10^3$ UF for 3-, 5- and 7-day-long storage conditions, respectively ($p = 0.80, 0.98$ and 0.35 , 2-sided t -test) (Figure 4h).

These results suggest that OptiPASS[®] synthetic medium in oxygen-free and cold conditions had the ability to preserve MDA-MB-231 spheroids for a maximum time of 7 days. For the studied parameters, under these storage conditions, spheroids would have the same characteristics as nonstored control spheroids in terms of proliferation, viability metabolic activity, ki67 expression rate and hypoxia level.

3.4. Anticancer Drug Sensitivity Evaluation of MDA-MB-231 Spheroids After Cold and Oxygen-Free Storage in OptiPASS[®] Medium Culture

In order to evaluate the drug sensitivity of MDA-MB-231 spheroids after oxygen-free 4 °C storage for 3, 5 or 7 days in OptiPASS[®] medium, these spheroids were treated with two conventional chemotherapeutics—i.e., epirubicin and cisplatin at 0.1, 1 and 10 µM or two anti-PARP targeted chemotherapeutics—i.e., olaparib and veliparib at 0.5, 5 and 50 µM. Drug cytotoxicity action on spheroids was assessed by the analysis of growth curve slopes, spheroid viability/mortality profile and cell metabolic activity in comparison with nonstored control spheroids.

When the epirubicin concentration increased, dose-dependent decreases in growth curve slopes was detected for nonstored spheroids with 54.8 ± 4.7 for control, 47.5 ± 3.3 for 0.1 µM, 36.9 ± 3.7 for 1 µM and 23.3 ± 3.3 for 10 µM of epirubicin, respectively (Figure 5a). The same decreases in growth of curve slopes were observed for spheroids cold-stored for 3, 5 and 7 days with pooled data of 57.3 ± 2.2 , of 47.1 ± 2.7 , of 37.9 ± 2.7 and of 20.1 ± 3.6 for control, 0.1, 1 and 10 µM epirubicin concentrations, respectively ($p \geq 0.9, >0.9, 0.9$ and >0.9 , ANOVA) (Figure 5a). In parallel, for the three storage conditions similar spheroid viability/mortality profiles were observed with a majority of viable green cells after 0.1 and 1 µM epirubicin treatments and a large proportion of red dead cells after 10 µM epirubicin treatment (Figure 5b). The same profiles were observed for nonstored controls. For the metabolic activity parameter, a dose-dependent decrease was also detected in presence of increasing epirubicin concentration. Indeed, the nonstored epirubicin treated spheroids presented metabolic activities of $95.8 \pm 5.4\%$ with 0.1 µm, of $73.9 \pm 5.5\%$ with 1 µM and of $10.4 \pm 3.6\%$ with 10 µM of this drug (Figure 5c). Pooled data of spheroids stored for 3, 5 or 7 days also presented the same metabolic activity evolutions as nonstored spheroids, with $96.6 \pm 10.5\%$, $75.0 \pm 9.0\%$ and $10.2 \pm 5.5\%$ for 0.1, 1 and 10 µM epirubicin, respectively ($p \geq 0.9$, ANOVA). Similarly, the epirubicin IC₅₀ values were 2.19 µM for nonstored spheroid controls and 2.29, 2.20 and 2.29 µM for 3-, 5- and 7-day-long storage conditions, respectively.

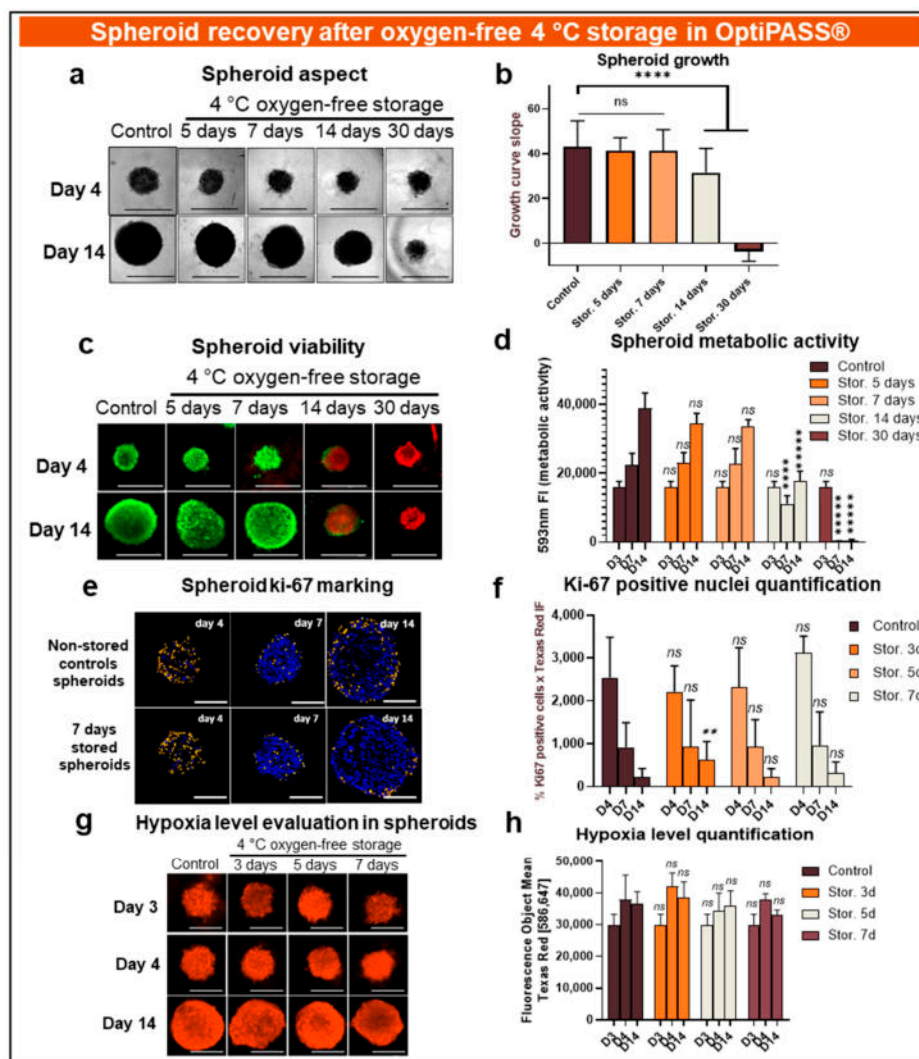


Figure 4. MDA-MB-231 spheroid preservation analysis after several days of storage in oxygen-free and 4 °C storage in OptiPASS® medium culture. Three-day-old spheroids cultured in normal culture conditions, i.e., 37 °C, 5% CO₂ in OptiPASS® medium culture were exposed to oxygen-free conditions at 4 °C for 5, 7, 14 or 30 days. After each storage time, spheroid recovery was analyzed in comparison to nonstored control spheroids. Samples' integrity aspects and sizes (a) were studied with bright field microscopy and object size algorithm (Cytation™3MV, Gen5, BioTek®, M = 4X, scale bar = 1000 µm). Growth curve slopes were calculated using spheroids' size values between the 4th and the 14th days of culture, reflecting recovery of proliferation capacities after storage step (b). Spheroid viability after storage was assessed by Live/Dead® tests showing viable cells (green fluorescence) and dead cells (red fluorescence) using Cytation™3MV equipped with GFP and IP fluorescence cubes (M = 4X, scale bar = 1000 µm) (c). Complementary to this, spheroid metabolic activity was quantified using resazurin tests (d). Otherwise, spheroid tumoral proliferation gradient analysis was carried out by ki67 immunostaining at D4, D7 and D14 and imaged with Texas Red filter (M = 10X, scale bar = 200 µm) on Cytation™3MV instrument (BioTek®). Ki67-positive nuclei (in orange) were identified among other nuclei (in blue) with adapted algorithm on Gen5 software (BioTek®, pictures showed for nonstored controls and spheroids stored for 7 days) (e). Global ki67-expression was quantified and compared between nonstored controls and 3-, 5- and 7-day-long cold and oxygen-free storage conditions in OptiPASS® medium (f). Finally, spheroid hypoxia level was studied using ROS-ID® kit staining at D3, D4 and D14 (g,h). Spheroids were imaged with Cytation™3MV equipped with Texas Red fluorescence cube (M = 4X, scale bar = 500 µm) (g). Hypoxia level was quantified by acquired fluorescent signal intensity with Gen5 software (BioTek®) (h). For each storage condition, significances compared to nonstored condition were indicated as ns (not significant; $p > 0.05$), ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$, ***** $p < 0.00001$.

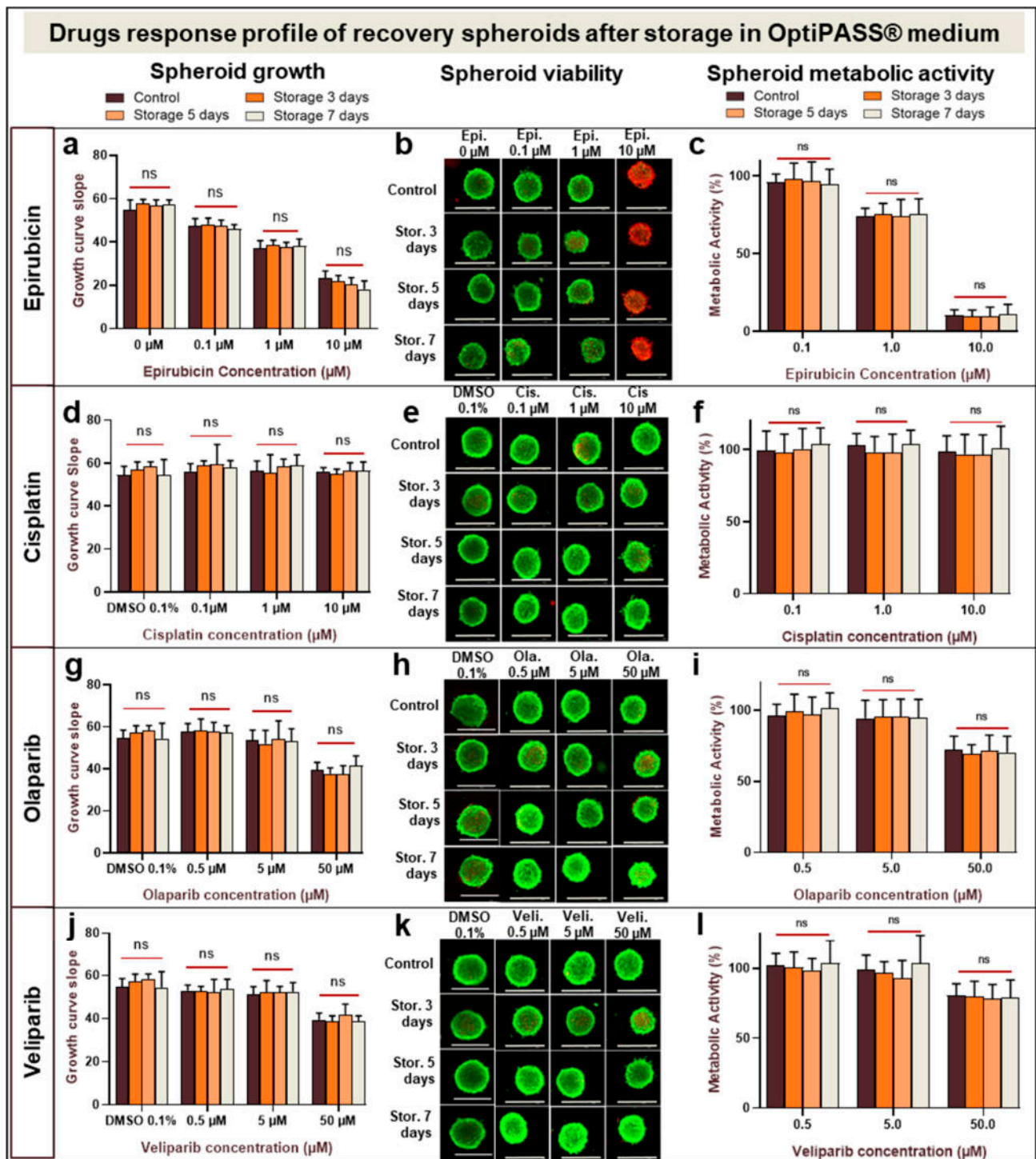


Figure 5. Anticancer drug sensitivity evaluation on recovered MDA-MB-231 spheroids after 4 °C and oxygen-free storage in OptiPASS® medium. Three-day-old spheroids cultured in normal culture conditions, i.e., 37 °C, 5% CO₂ in OptiPASS® medium culture, were stored at 4 °C in oxygen-free conditions for 3, 5 or 7 days. After returning to normal culture conditions for 2 days, spheroids were treated with epirubicin (0.1, 1 or 10 μM), cisplatin (0.1, 1 or 10 μM), olaparib (0.5, 5 or 50 μM) or veliparib (0.5, 5 or 50 μM) up to D10. For each condition, growth curve slopes during treatment were calculated for epirubicin (a), cisplatin (d), olaparib (g) and veliparib (j). Live/Dead® test profiles were imaged with plate reader Cytation™3 MV (GFP and IP filters-M = 4X) for epirubicin (b), cisplatin (e), olaparib (h) and veliparib (k). Metabolic activity rates were evaluated with resazurin test (Cytation™3MV-fluorimetry 593nm) for epirubicin (c), cisplatin (f), olaparib (i) and veliparib (l). ns = $p > 0.05$.

After 0.1, 1 and 10 μM cisplatin treatments of nonstored spheroids, the curve slopes remained unchanged at 56.2 ± 3.6 , 56.4 ± 4.6 , and 56.3 ± 1.7 , respectively, similar to the 0.1% DMSO control spheroids at 54.6 ± 4.0 ($p = 0.68, 0.74$ and 0.56 , ANOVA (Figure 5d)). Comparable curve slopes were also obtained for spheroids stored for 3, 5 and 7 days, with pooled data of 56.6 ± 5.1 , 58.8 ± 5.6 , 57.7 ± 6.0 and 56.0 ± 3.5 for 0.1% DMSO control and 0.1, 1 and 10 μM cisplatin, respectively ($p \geq 0.9$, ANOVA) (Figure 5d). Likewise, for nonstored spheroids and all stored spheroid conditions, the same Live/Dead[®] test profiles with compact and viable cell masses were detected (Figure 5e). For metabolic activity analysis, no difference was detected between cisplatin treated nonstored spheroid controls and cisplatin treated spheroids stored for 3, 5 and 7 days. Pooled data were $100.8 \pm 12.6\%$, $100.0 \pm 11.3\%$ and $98.2 \pm 14.0\%$ for 0.1, 1 and 10 μM cisplatin, respectively ($p \geq 0.9$, ANOVA) (Figure 5f).

In presence of increasing olaparib concentrations, the growth curve slopes of MDA-MB-231 nonstored spheroids were 57.9 ± 3.7 for 0.5 μM and of 53.5 ± 5.0 for 5 μM , similar to 0.1% DMSO treated nonstored control spheroids at 54.6 ± 4.0 ($p = 0.36$ and 0.93 , ANOVA). In contrast, with 50 μM anti-PARP1 growth curve slopes decreased significantly to 39.4 ± 3.7 ($p = 10^{-5}$, ANOVA) compared to DMSO control (Figure 5g). The same results were observed with spheroids stored for 3, 5 and 7 days with pooled data of 56.6 ± 5.1 , 57.7 ± 4.5 , 53.1 ± 7.0 and 39.0 ± 4.4 after treatment with 0.1% DMSO control and 0.5, 5 and 50 μM olaparib, respectively ($p \geq 0.9$, ANOVA) (Figure 5g). Live/Dead[®] fluorescent analysis presented the same green compact cell masses in stored and nonstored as well as treated or nontreated conditions (Figure 5h). After olaparib treatment of nonstored spheroids, metabolic activity rates were similar for 0.5 and 5 μM , at $96.0 \pm 8.4\%$ and $94.4 \pm 12.8\%$ ($p = 0.91$, ANOVA). Otherwise, for 50 μM olaparib metabolic activity decreased significantly to $72.3 \pm 9.7\%$ ($p = 10^{-3}$, ANOVA) (Figure 5i). Comparable results were obtained for spheroids stored for 3, 5 and 7 days with pooled data of $99.5 \pm 11.6\%$, $95.0 \pm 12.3\%$ and $70.3 \pm 9.8\%$ after 0.5, 5 and 50 μM anti-PARP1 treatments, respectively ($p \geq 0.9$, ANOVA) (Figure 5i). These data allowed us to estimate the Olaparib IC_{50} doses, which were 127.9, 111.3, 123.8 and 117.9 μM for nonstored controls and spheroids stored for 3, 5 and 7 days, respectively.

Finally, after veliparib treatment, nonstored spheroid growth curve slopes were 54.6 ± 4.0 for 0.1% DMSO control and similar to 52.9 ± 2.6 with 0.5 μM ($p = 0.46$, ANOVA) and to 51.4 ± 3.5 with 5 μM ($p = 0.21$, ANOVA). For 50 μM of this anti-PARP1, growth curve slopes decreased significantly to 39.4 ± 3.1 ($p = 10^{-5}$, ANOVA) (Figure 5j). Then, Live/Dead[®] tests of veliparib treated spheroids presented viable green cell masses for all concentrations and all storage conditions (Figure 5k). The nonstored spheroid metabolic activity rates were $101.7 \pm 8.8\%$ for 0.5 μM , of $99.0 \pm 10.4\%$ for 5 μM and of $80.7 \pm 8.2\%$ for 50 μM . They were comparable to the values obtained for 3-, 5- and 7-day-long storage conditions with pooled data of $101.1 \pm 12.0\%$, $97.8 \pm 14.8\%$ and $78.9 \pm 11.0\%$ after 0.5, 5 and 50 μM veliparib treatments, respectively ($p = >0.9$, ANOVA) (Figure 5l). Close values of estimated veliparib IC_{50} doses were obtained with 212.0, 197.6, 173.6 and 195.8 μM for nonstored controls and spheroids stored for 3, 5 and 7 days, respectively.

These results indicated different MDA-MB-231 spheroid drug responses according to the selected anticancer agent. Indeed, a strong cytotoxic effect was detected after epirubicin treatment, while no effect was detected after cisplatin treatment. For both anti-PARP1 targeted therapy drugs, only the highest-tested concentration had an impact on spheroid growth and metabolism activity. Otherwise, and very interestingly, spheroid drug responses were similar between nonstored spheroids and 3-, 5- or 7-day-long oxygen-free cold-stored spheroids cultured in OptiPASS[®]. This suggests that selected spheroids storage conditions in OptiPASS[®] medium do not impact MDA-MB-231 spheroids' anticancer drug sensitivity.

4. Discussion

Spheroid in vitro models remain particularly relevant for preclinical evaluation of anticancer treatments, combining production reproducibility and predictivity of response at the same time [28]. Their use is more and more solicited in the drug development process, especially for aggressive tumoral types such as TNBCs [29]. They allow rapid investigation of drug response in terms of heterogeneity of metabolic cell layers and drug penetration inside cell masses [14]. In addition, these models are of great interest as they allow the use of animals to be reduced, refined and replaced (rule of 3Rs) during the long, expensive and exhausting drug development process [17,30]. Moreover, recent advances in 3D culture formation have enabled scientists to replicate models of avascular tumor in high number with acceptable reproducibility applicable for scalable and large range preclinical trials. Another key factor for in vitro modeling using 3D models is the culture medium [19]. In this way, our previous works focused on the development of two TNBC spheroid models using MDA-MB-231 and SUM1315 cell lines in the new serum-free culture medium entitled OptiPASS[®] [23]. Our results highlighted a clear repeatability and reproducibility of spheroid formation in these experimental conditions. Furthermore, cell proliferation, viability, and drug sensibility, for both MDA-MB-231 and SUM1315 models, were clearly optimized in OptiPASS[®] medium. These results also highlight the key role of the culture medium in the optimization of the culture model's predictive response [23]. This approach is relevant for improving drug sensibility threshold in spheroids, thereby making drug screening more efficient.

To optimize the use of a high number of 3D culture models in high throughput screening assays, a concept of spheroid storage should be considered. In this field, cryopreservation methods represented the gold standard to maintain the viability/integrity of biological samples for several years or decades. However, in the case of 3D culture models, these techniques are time consuming, difficult to apply and often require specific equipment. Moreover, the compulsory use of cytotoxic cryoprotectants causes a partial cell viability recovery after thawing [31,32]. Thereby, in the last few years, other alternative methodologies such as hypothermia, hypoxia and synthetic serum-free medium conditions, leading to biological properties preservation of various cell types, have been developed. Indeed, hypothermic storage, i.e., cold temperature close to 4 °C, was successfully used to preserve pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes, bone marrow-derived mesenchymal stem cells or hepatocytes. In fact, hypothermia allows the majority of biological processes to be stopped and thus force cells to enter dormant states. This phenomenon is crucial to limit cell damages and arrest their evolution during the storage time [33–35]. Hypoxia was also described to prevent oxidative stress and the formation of ROS in the culture medium at 4 °C to preserve red blood cells [36]. Likewise, synthetic serum-free media have been shown to play a role in preservation of multipotent mesenchymal stromal cells at 4 °C [37]. More recent works carried out on 3D cell culture models also showed that the combination of cold (4 °C) and anoxic storage conditions, but in presence of serum-supplemented culture medium, allowed the preservation of colorectal multicellular tumor spheroids for 18 days [24]. These works revealed the importance of the decrease in oxygen pressure to reversibly arrest spheroid growth while maintaining their principal characteristics [38].

In this context, with the objective of developing a new storage concept of 3D cell culture models, our works were focused on the development of a spheroid storage methodology using the TNBC MDA-MB-231 cell line as a model in the new synthetic OptiPASS[®] medium, in comparison with RPMI FBS-supplemented medium preconized for this cell line.

For this, several culture conditions were studied. Indeed, the spheroids were cultured in both tested medium cultures in microplates under conventional conditions at 37 °C in each culture medium for 3 days. Then, they were stored at 4 °C with or without anoxia for 1, 3, 5, 7, 14 or 30 days. After each conservation period, spheroids were placed back under 5% CO₂ conditions at 37 °C. Spheroid recovery was evaluated with several parameters

such as (i) spheroid growth via spheroid growth curve slopes between day 4 and day 14, (ii) cell viability via live/dead test and (iii) metabolic activity via resazurin test.

Firstly, the 3-day storage at 4 °C in normoxic conditions in both RPMI1640 and OptiPASS[®] culture medium led to an incomplete preservation of spheroid growth curve slopes (decreases of 93.7 and 101.5%) and metabolic activity (restoration values of 1.9 and 20.1%), respectively. Indeed, the cold-only storage condition is far from sufficient to obtain usable spheroids for further experiments.

Secondly, in order to optimize the spheroid storage step in both media, spheroids were placed in an oxygen-free environment at 4 °C for 3 days, according to previous works of Gomes et al. [24]. The results showed that this condition led to an improvement of spheroid integrity in RPMI medium for 14 days. However, the cell proliferation and cell metabolic activity were only partially restored (recoveries of 77.4 and 70.8%, respectively). In contrast, 3 days of cold (4 °C) and oxygen-free storage in OptiPASS[®] medium preserved the properties of the MDA-MB-231 spheroids. Indeed, in this condition, between day 4 and day 14, no impacts on spheroid integrity in growth curve slopes (recovery of 96.8%) and cell metabolic activity (preservation of 91.5%) were detected. All these results show that the properties of the MDA-MB-231 spheroids can be preserved after their storage for 3 days in OptiPASS[®] medium at 4 °C and under oxygen-free conditions for further recovery.

Then, in order to optimize the conservation in OptiPASS[®] medium at 4 °C and in oxygen-free conditions, longer storage times of 5, 7, 14 and 30 days were analyzed in this medium. Interestingly, after 5- and 7-day-long cold and oxygen-free storage in OptiPASS[®], the spheroid growth curve slopes (recoveries of 96.2 and 95.6%, respectively) and the metabolic activity (recoveries of 91.3 and 88.4%, respectively) were preserved compared to nonstored controls, confirming an absence of impact on this spheroid growth parameter. In contrast, the longer storage times, i.e., 14 and 30 days, did not allow spheroid growth curve slopes (recoveries of 73.1 and −0.1%, respectively) and metabolic activity (decreases of 45.2 and 99.9%, respectively) to be maintained compared to nonstored controls. Therefore, in MDA-MB-231 spheroid models, cell proliferation, cell viability and cell metabolic activity parameters may be preserved after storage times of 3, 5 or 7 days in OptiPASS[®] medium at 4 °C and in oxygen-free conditions. This conservation methodology was then selected for the following experiments.

MDA-MB-231 spheroid recovery performances were then assessed with ki67 expression rate and spheroid global hypoxia level analyses, reflecting the cell proliferation capacity and global hypoxia status [30,31]. After 3, 5, and 7 days of storage, the ki67 expression rate recoveries on spheroids at day 4 were 87.2, 90.9 and 122.5%, respectively, in comparison to nonstored controls. Similarly, spheroid hypoxia level was not disturbed by the storage step with hypoxia rate recovery at day 14 of 111.4, 91.2 and 99.8%, respectively. These results suggest that-tested storage conditions had no influence on these parameters and thus on tumoral proliferation gradients and hypoxia levels of MDA-MB-231 spheroid models. Indeed, the maintenance of these parameters was significant as they may influence the spheroid response in drug screening.

Thereafter, to ensure that the storage step did not affect spheroids sensibility threshold to anticancer drugs, the spheroid drug response was analyzed. For this, MDA-MB-231 spheroids, after 3, 5 and 7 days of storage in OptiPASS[®] medium at 4 °C and in oxygen-free conditions, were treated with increasing concentrations of two classic chemotherapies, i.e., epirubicin or cisplatin, and two PARP1 inhibitors—i.e., olaparib or veliparib. In presence of various drugs, whatever the storage conditions, recovered spheroids presented similar cell proliferation decreases (57.5 and 64.1% with 10 µM epirubicin, 0.2 and 1.1% with 10 µM cisplatin, 32.0 and 32.6% with 50 µM olaparib and 23.7 and 27.8% with 50 µM veliparib) and cell metabolic activity decreases (96.2 and 89.4% with 10 µM epirubicin, 2.6% and 0.3% with 10 µM cisplatin, 29.7 and 27.7% with 50 µM olaparib and 20.6 and 22.4% with 50 µM veliparib) compared to nonstored controls. All these results indicate that this new methodology combining a spheroid storage at 4 °C and oxygen-free atmosphere in OptiPASS[®] medium does not influence spheroid responses to various drugs in terms of

growth, viability, and metabolic activity. In terms of the unchanged model's behavior and drug sensitivity profiles, stored spheroids can be used in drug screening tests the same way as nonstored spheroids.

In our experimental conditions, the comparison of both media culture performances highlighted that our innovative spheroid storage concept is principally permitted thanks to the new OptiPASS[®] serum-free medium, in comparison to serum-supplemented media. This culture medium with an original confidential formulation (developed by BIOPASS company) probably plays a major role in the spheroid recovery process. Indeed, serum-free media enriched in antioxidants substrates have already been described as improving the preservation of stromal stem cell monolayer cultures at 4 °C [37]. Otherwise, other parameters specific to cell type models such as energy metabolism may also play a role to conserve biological characteristics. Indeed, energy metabolism reprogramming is a significant hallmark of cancer cells [39]. For basal-like cancer cell line models, such as MDA-MB-231, mitochondrial defects are described compared to other breast cancer subtypes [40]. This glycolytic switch is the origin of the differences in metabolism between tumoral and nontumoral cell lines. However, cold and oxygen-free conditions have been already used successfully for the conservation of different cell types such as cardiomyocytes and mesenchymal stem cells presenting upregulated mitochondrial respiration [33,34,37].

Furthermore, this new methodology of storage spheroids was relatively simple to apply and did not require expensive specific equipment. Especially, there is no need to transfer spheroid models to different supports or to change the cell culture medium. This point may be very important, especially for high added-value models, allowing the reduction in spheroid manipulations and thus limiting spheroid disturbances or losses. Moreover, the oxygen-free atmosphere generating device allows the induction of anoxic conditions very quickly and reproducibly. Indeed, once the system is closed, oxygen pressure decreases to 0% after less than 20 min (Appendix A). This concept could be easily applied to spheroids from others cancer cell lines. Moreover, another great interest of this methodology is that during optimized storage conditions, spheroid size did not evolve during storage time in OptiPASS[®] medium. Indeed, the spheroid size ratio measured between the day when spheroids were placed at 4 °C and the day after their return in culture incubator was close to 1 (1.02 ± 0.09 , 0.94 ± 0.08 and 1.05 ± 0.15 for 3, 5 and 7 days of storage, respectively), while it was of 1.22 ± 0.18 for nonstored controls ($p < 0.0001$). Thereby, this methodology allowed the cessation of spheroid growth while maintaining their ability to restart after their return to normal cell culture conditions. It should be considered as a break in spheroid culture time, allowing the MDA-MB-231 model to be preserved for up to 7 days. This mechanism can be related to the tumoral cellular quiescence phenomenon. Indeed, the stress caused by cold and oxygen-free conditions may have induced spheroid cell entry in dormancy, which is at the origin of a reversible arrest of spheroid growth. Moreover, cellular quiescence generally occurs in response to stress or to a hostile environment and drives cancer cells to enter in a dormant state, corresponding to a reversible cell cycle arrest in order to survive and being reactivated in favorable conditions [41]. This mechanism is known in cancer biology to initiate metastases and generate resistance mechanism to anticancer therapies [42,43]. This approach could turn out to be very relevant for modelling cancer dormancy. Indeed, it can represent a way to artificially recreate avascular tumor-like dormant cell masses useful for testing dormancy-targeting drugs in development. For example, several epigenetic-targeting drugs, including inhibitors of histone lysine demethylase, have been developed to eradicate tumoral dormant cells [44]. This storage concept may be the starting point for the development of future cancer dormancy study models.

Otherwise, in our previous studies, the serum-free OptiPASS[®] medium had already demonstrated the improvement in growth of TNBC spheroids while maintaining their drug sensitivity in normal culture conditions [23]. Moreover, these specific works highlight the capacity of this medium to (i) preserve and (ii) relevantly recover spheroid models similarly to nonstored spheroids. These properties represent an innovative added value

considering the use of this medium for preclinical models. Thus, this alternative concept to cryoconservation could be adapted to other tumoral or nontumoral multicellular models and also various clinical samples.

Therefore, this concept opens the way (i) to the development of new tumor dormancy models, (ii) to the preservation of precious biological materials in the laboratory, and also (iii) to easy handling during interlaboratory transport for several days. These works are currently underway.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers13081945/s1>, Figure S1: Validation of the staining with the ROS-ID orange reagent (EnzoLifeSciences catalogue #ENZ-51042) to evaluate MDA-MB-231 spheroid hypoxia level.

Author Contributions: Conceptualization, A.G., C.D. and M.B.; methodology, A.G., and C.D.; validation, A.G., C.D., M.B., P.D., C.A., M.D., E.M., J.G., B.V. and F.P.-L.; formal analysis, A.G., C.D. and M.B.; investigation, A.G., C.D., and M.D.; data curation, A.G., C.D. and M.B.; writing—original draft preparation, A.G. and M.B.; writing—review and editing C.D., P.D. and E.M.; funding acquisition, M.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Clermont Auvergne Métropole.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are not publicly available and are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: Our thanks to the BIOPASS society for kindly providing us with the OptiPASS® synthetic serum-free cell culture medium.

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

Appendix A

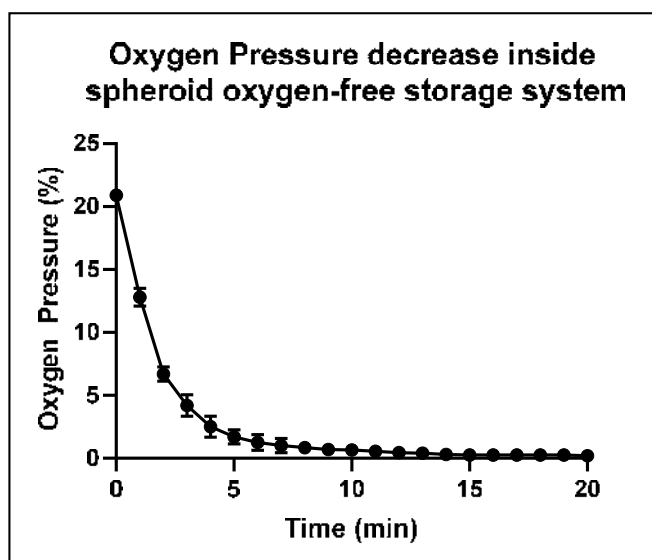


Figure A1. Validation of the oxygen-free atmosphere generating system.

In order to validate oxygen-free atmosphere generating system for spheroid storage, a microplate containing culture medium was packed in hermetically closed plastic bag (Flo™, Marcilly, France, catalogue #763783) with anaerobic gas generating AnaeroGen™ 2.5L (Oxoid™, Dardilly, France, catalogue #AG0025A) at 4 °C. Oxygen pressure was measured with a monogaz O2 detector (Honeywell, Charlotte, NC, USA) every minute for 20 min. Once the system was closed, the oxygen pressure rapidly decreased in the system,

falling from $20.9 \pm 0.0\%$ at T0 (0 min) to $0.7 \pm 0.4\%$ after 10 min and to $0.1\% \pm 0.0\%$ after 20 min. These values validate this system for artificially creating oxygen-free conditions for the storage of MDA-MB-231 spheroids.

References

1. Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.L.; Torre, L.A.; Jemal, A. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J. Clin.* **2018**, *68*, 394–424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Schmadeka, R.; Harmon, B.E.; Singh, M. Triple-Negative Breast Carcinoma: Current and Emerging Concepts. *Am. J. Clin. Pathol.* **2014**, *141*, 462–477. [[CrossRef](#)]
3. Palma, G.; Frasci, G.; Chirico, A.; Esposito, E.; Siani, C.; Saturnino, C.; Arra, C.; Ciliberto, G.; Giordano, A.; D’Aiuto, M. Triple Negative Breast Cancer: Looking for the Missing Link between Biology and Treatments. *Oncotarget* **2015**, *6*, 26560–26574. [[CrossRef](#)]
4. Bryant, H.E.; Schultz, N.; Thomas, H.D.; Parker, K.M.; Flower, D.; Lopez, E.; Kyle, S.; Meuth, M.; Curtin, N.J.; Helleday, T. Specific Killing of BRCA2-Deficient Tumours with Inhibitors of Poly(ADP-Ribose) Polymerase. *Nature* **2005**, *434*, 913–917. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Lin, P.-H.; Chen, M.; Tsai, L.-W.; Lo, C.; Yen, T.-C.; Huang, T.Y.; Chen, C.-K.; Fan, S.-C.; Kuo, S.-H.; Huang, C.-S. Using Next-Generation Sequencing to Redefine BRCAness in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Sci.* **2020**, *111*, 1375–1384. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Gadi, V.K.; Davidson, N.E. Practical Approach to Triple-Negative Breast Cancer. *J. Oncol. Pract.* **2017**, *13*, 293–300. [[CrossRef](#)]
7. Arrowsmith, J.; Miller, P. Trial Watch: Phase II and Phase III Attrition Rates 2011–2012. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12*, 569. [[CrossRef](#)]
8. Lee, I.-C. Cancer-on-a-Chip for Drug Screening. *Curr. Pharm. Des.* **2018**, *24*, 5407–5418. [[CrossRef](#)]
9. Ibarrola-Villava, M.; Cervantes, A.; Bardelli, A. Preclinical Models for Precision Oncology. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* **2018**, *1870*, 239–246. [[CrossRef](#)]
10. Weiswald, L.-B.; Bellet, D.; Dangles-Marie, V. Spherical Cancer Models in Tumor Biology. *Neoplasia* **2015**, *17*, 1–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Ravi, M.; Ramesh, A.; Patabhi, A. Contributions of 3D Cell Cultures for Cancer Research. *J. Cell. Physiol.* **2017**, *232*, 2679–2697. [[CrossRef](#)]
12. Patel, N.R.; Aryasomayajula, B.; Abouzeid, A.H.; Torchilin, V.P. Cancer Cell Spheroids for Screening of Chemotherapeutics and Drug-Delivery Systems. *Ther. Deliv.* **2015**, *6*, 509–520. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Leroy-Lerêtre, M.; Dimarco, G.; Cazales, M.; Boizeau, M.-L.; Ducommun, B.; Lobjois, V.; Degond, P. Are Tumor Cell Lineages Solely Shaped by Mechanical Forces? *Bull. Math. Biol.* **2017**, *79*, 2356–2393. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Breslin, S.; O’Driscoll, L. The Relevance of Using 3D Cell Cultures, in Addition to 2D Monolayer Cultures, When Evaluating Breast Cancer Drug Sensitivity and Resistance. *Oncotarget* **2016**, *7*, 45745–45756. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Nath, S.; Devi, G.R. Three-Dimensional Culture Systems in Cancer Research: Focus on Tumor Spheroid Model. *Pharmacol. Ther.* **2016**, *163*, 94–108. [[CrossRef](#)]
16. Yamada, K.M.; Cukierman, E. Modeling Tissue Morphogenesis and Cancer in 3D. *Cell* **2007**, *130*, 601–610. [[CrossRef](#)]
17. LaBarbera, D.V.; Reid, B.G.; Yoo, B.H. The Multicellular Tumor Spheroid Model for High-Throughput Cancer Drug Discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **2012**, *7*, 819–830. [[CrossRef](#)]
18. Gencoglu, M.F.; Barney, L.E.; Hall, C.L.; Brooks, E.A.; Schwartz, A.D.; Corbett, D.C.; Stevens, K.R.; Peyton, S.R. Comparative Study of Multicellular Tumor Spheroid Formation Methods and Implications for Drug Screening. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2018**, *4*, 410–420. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Christensen, K.; Aaberg-Jessen, C.; Andersen, C.; Goplen, D.; Bjerkvig, R.; Kristensen, B.W. Immunohistochemical Expression of Stem Cell, Endothelial Cell, and Chemosensitivity Markers in Primary Glioma Spheroids Cultured in Serum-Containing and Serum-Free Medium. *Neurosurgery* **2010**, *66*, 933–947. [[CrossRef](#)]
20. Froehlich, K.; Haeger, J.-D.; Heger, J.; Pastuschek, J.; Photini, S.M.; Yan, Y.; Lupp, A.; Pfarrer, C.; Mrowka, R.; Schleußner, E.; et al. Generation of Multicellular Breast Cancer Tumor Spheroids: Comparison of Different Protocols. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **2016**, *21*, 89–98. [[CrossRef](#)]
21. van der Valk, J.; Bieback, K.; Buta, C.; Cochrane, B.; Dirks, W.G.; Fu, J.; Hickman, J.J.; Hohensee, C.; Kolar, R.; Liebsch, M.; et al. Fetal Bovine Serum (FBS): Past-Present-Future. *ALTEX* **2018**, *35*, 99–118. [[CrossRef](#)]
22. Gstraunthaler, G. Alternatives to the Use of Fetal Bovine Serum: Serum-Free Cell Culture. *ALTEX* **2003**, *20*, 275–281. [[PubMed](#)]
23. Dubois, C.; Daumar, P.; Aubel, C.; Gauthier, J.; Vidalinc, B.; Mounetou, E.; Penault-Llorca, F.; Bamdad, M. The New Synthetic Serum-Free Medium OptiPASS Promotes High Proliferation and Drug Efficacy Prediction on Spheroids from MDA-MB-231 and SUM1315 Triple-Negative Breast Cancer Cell Lines. *J. Clin. Med. Res.* **2019**, *8*, 397. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Gomes, A.; Defaux, M.; Lemee, R.M.; Lobjois, V.; Ducommun, B. Reversible Growth Arrest of 3D Tumor Spheroids Stored in Oxygen Absorber-Induced Anoxia. *Oncol. Lett.* **2018**, *15*, 2006–2009. [[CrossRef](#)]
25. Dubois, C.; Dufour, R.; Daumar, P.; Aubel, C.; Szczepaniak, C.; Blavignac, C.; Mounetou, E.; Penault-Llorca, F.; Bamdad, M. Development and Cytotoxic Response of Two Proliferative MDA-MB-231 and Non-Proliferative SUM1315 Three-Dimensional Cell Culture Models of Triple-Negative Basal-like Breast Cancer Cell Lines. *Oncotarget* **2017**, *8*, 95316–95331. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

26. González, M.M.; Joa, J.A.G.; Cabrales, L.E.B.; Pupo, A.E.B.; Schneider, B.; Kondakci, S.; Ciria, H.M.C.; Reyes, J.B.; Jarque, M.V.; Mateus, M.A.O.; et al. Is Cancer a Pure Growth Curve or Does It Follow a Kinetics of Dynamical Structural Transformation? *BMC Cancer* **2017**, *17*, 174. [[CrossRef](#)]
27. Präbst, K.; Engelhardt, H.; Ringgeler, S.; Hübner, H. Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. *Methods Mol. Biol.* **2017**, *1601*, 1–17. [[CrossRef](#)]
28. Sant, S.; Johnston, P.A. The Production of 3D Tumor Spheroids for Cancer Drug Discovery. *Drug Discov. Today Technol.* **2017**, *23*, 27–36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Ham, S.L.; Joshi, R.; Luker, G.D.; Tavana, H. Engineered Breast Cancer Cell Spheroids Reproduce Biologic Properties of Solid Tumors. *Adv. Healthc. Mater.* **2016**, *5*, 2788–2798. [[CrossRef](#)]
30. Directive 201063EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the Protection of Animals Used for Scientific Purposes. 2010. Available online: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:en:PDF> (accessed on 20 October 2010).
31. Alnemari, R.; Sukumar, P.; Deliorman, M.; Qasaimeh, M.A. Paper-Based Cell Cryopreservation. *Adv. Biosyst.* **2020**, *4*, e1900203. [[CrossRef](#)]
32. Ehrhart, F.; Schulz, J.C.; Katsen-Globa, A.; Shirley, S.G.; Reuter, D.; Bach, F.; Zimmermann, U.; Zimmermann, H. A Comparative Study of Freezing Single Cells and Spheroids: Towards a New Model System for Optimizing Freezing Protocols for Cryobanking of Human Tumours. *Cryobiology* **2009**, *58*, 119–127. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Correia, C.; Koshkin, A.; Carido, M.; Espinha, N.; Šarić, T.; Lima, P.A.; Serra, M.; Alves, P.M. Effective Hypothermic Storage of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Compatible With Global Distribution of Cells for Clinical Applications and Toxicology Testing. *Stem Cells Transl. Med.* **2016**, *5*, 658–669. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Ginis, I.; Grinblat, B.; Shirvan, M.H. Evaluation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells after Cryopreservation and Hypothermic Storage in Clinically Safe Medium. *Tissue Eng. Part C Methods* **2012**, *18*, 453–463. [[CrossRef](#)]
35. Ostrowska, A.; Gu, K.; Bode, D.C.; Van Buskirk, R.G. Hypothermic Storage of Isolated Human Hepatocytes: A Comparison between University of Wisconsin Solution and a Hypothermosol Platform. *Arch. Toxicol.* **2009**, *83*, 493–502. [[CrossRef](#)]
36. Yoshida, T.; AuBuchon, J.P.; Tryzelaar, L.; Foster, K.Y.; Bitensky, M.W. Extended Storage of Red Blood Cells under Anaerobic Conditions. *Vox Sang.* **2007**, *92*, 22–31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Petrenko, Y.; Chudickova, M.; Vackova, I.; Groh, T.; Kosnarova, E.; Cejkova, J.; Turnovcova, K.; Petrenko, A.; Sykova, E.; Kubinova, S. Clinically Relevant Solution for the Hypothermic Storage and Transportation of Human Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cells Int.* **2019**, *2019*, 5909524. [[CrossRef](#)]
38. Gomes, A.; Guillaume, L.; Grimes, D.R.; Fehrenbach, J.; Lobjois, V.; Ducommun, B. Oxygen Partial Pressure Is a Rate-Limiting Parameter for Cell Proliferation in 3D Spheroids Grown in Physioxic Culture Condition. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0161239. [[CrossRef](#)]
39. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of Cancer: The next Generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674. [[CrossRef](#)]
40. Lunetti, P.; Di Giacomo, M.; Vergara, D.; De Domenico, S.; Maffia, M.; Zara, V.; Capobianco, L.; Ferramosca, A. Metabolic Reprogramming in Breast Cancer Results in Distinct Mitochondrial Bioenergetics between Luminal and Basal Subtypes. *FEBS J.* **2019**, *286*, 688–709. [[CrossRef](#)]
41. Dittmer, J. Mechanisms Governing Metastatic Dormancy in Breast Cancer. *Semin. Cancer Biol.* **2017**, *44*, 72–82. [[CrossRef](#)]
42. Recasens, A.; Munoz, L. Targeting Cancer Cell Dormancy. *Trends Pharmacol. Sci.* **2019**, *40*, 128–141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Sosa, M.S.; Bragado, P.; Aguirre-Ghiso, J.A. Mechanisms of Disseminated Cancer Cell Dormancy: An Awakening Field. *Nat. Rev. Cancer* **2014**, *14*, 611–622. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. McGrath, J.; Trojer, P. Targeting Histone Lysine Methylation in Cancer. *Pharmacol. Ther.* **2015**, *150*, 1–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Conclusion générale et perspectives

Mes travaux de thèse réalisés au sein du groupe « Résistance » de l'UMR INSERM/UCA 1240 IMoST, faisant partie du consortium BIORCELL3D®, ont porté sur le développement d'outils précliniques en Biotechnologie appliqués en Santé Humaine, notamment pour optimiser le traitement des cancers. Cet axe est abordé par l'étude de la résistance des cellules tumorales aux traitements médiée par les protéines « Multidrug Resistance » (MDR). Le modèle d'étude utilisé pour ces travaux est principalement le Cancer du Sein Triple Négatif (CSTN). C'est dans ce contexte que mes travaux de recherche ont permis :

- (1) D'établir la preuve de concept de marquage de la P-gp à l'aide de nouveaux traceurs fluorescents LightSpot® (conçus par les pharmaco-chimistes du groupe Résistance) sur des modèles précliniques en monocouche et de sphéroïdes.
- (2) De développer un concept innovant de conservation de modèles de sphéroïdes à plus long terme dans un nouveau milieu de culture OptiPASS® (développé au sein du consortium BIORCELL3D®), en condition d'anoxie à 4°C.

Le premier objectif de mes travaux de thèse a permis la **validation biologique d'une approche innovante d'évaluation de la chimiorésistance tumorale par la détection et quantification directe de la P-gp à l'aide de traceurs LightSpot®**. Ces composés fluorescents de petite taille sont capables de pénétrer à l'intérieur de cellules et/ou de masses cellulaires afin de détecter, localiser et quantifier les protéines de multirésistance MDR. Ces travaux ont fait l'objet du dépôt d'un brevet international n° PCT/EP2020/077694 concernant une méthode de détection, localisation et quantification des protéines MDR. En raison du fort potentiel que présente cette méthode de détection innovante dans le domaine de l'Oncologie, les travaux de l'équipe se sont focalisés dans un premier temps sur le développement du traceur LightSpot®-FL-1, ciblant spécifiquement la P-gp, la protéine MDR la plus fréquemment étudiée pour évaluer la résistance tumorale.

Mes travaux menés sur plusieurs types de modèles précliniques *in vitro* de CSTN ont clairement mis en évidence la valeur ajoutée de ces traceurs en comparaison d'approches classiques par immunomarquage. Notamment, le traceur LightSpot®-FL-1 permet de détecter et de quantifier l'expression basale ou induite de la P-gp, sur des cultures cellulaires en monocouches ou de sphéroïdes, de manière plus complète et très sensible. Les performances de ce traceur sont probablement dues à sa capacité de détection de la P-gp présente dans la membrane de différents organites intracellulaires tels que les endosomes et les lysosomes, jouant un rôle dans la chimiorésistance tumorale, au même titre que la P-gp présente dans la membrane plasmique (Yamagishi et al., 2013). De plus, ce nouvel outil permet de localiser la

P-gp sur plusieurs types d'échantillons cellulaires en deux ou trois dimensions et à l'état frais ou fixé. Cette caractéristique permet d'étendre le champ d'application du traceur LightSpot®-FL-1 en diagnostic clinique, sur des coupes de biopsie de tumeurs chez les patients avant et au cours du traitement. D'ailleurs, à l'heure actuelle le développement d'un protocole de marquage est en cours de développement dans l'équipe, sur des coupes histologiques de tumeurs mammaires ou pulmonaires. Ces travaux ont pour perspective de développer l'application du traceur LightSpot®-FL-1 ainsi que les autres traceurs développés au sein du groupe sur des échantillons cliniques. Ils seront très probablement suivis par l'intégration de ce nouvel outil dans un essai clinique, afin d'évaluer l'intérêt de la détection de la P-gp pour le diagnostic et le suivi de la résistance tumorale aux traitements. L'ensemble de ce développement et de validation d'une technique de détection innovante pourrait permettre à réintroduire l'évaluation de la résistance instaurée par la P-gp dans le diagnostic clinique de routine en Oncologie.

De plus, le traceur LightSpot®-FL-1, permettant d'analyser de manière plus sensible et complète l'expression de la P-gp dans la cellule ou la masse cellulaire, en comparaison des immunomarquages, présente un fort potentiel pour le développement nouveaux médicaments à grande échelle. En effet, l'évaluation de la prise en charge de nouveaux composés par la P-gp est aujourd'hui fortement préconisé par les autorités de Santé, le plus tôt possible dans le processus de développement, selon le concept ADMET (Prachayasittikul and Prachayasittikul, 2016). L'utilisation du traceur LightSpot®-FL-1 pourrait ainsi permettre d'améliorer l'étude de l'efflux et de la résistance tumorale au nouveau médicament, médiée par la P-gp. Ceci pourrait notamment limiter l'autorisation de mise sur le marché de nouveaux agents thérapeutiques trop sensibles aux mécanismes d'efflux porté par la P-gp et/ou induisant une augmentation de l'expression de cette glycoprotéine.

La suite de mes travaux, concernant les traceurs LightSpot®, s'est focalisée sur le développement du marquage de la P-gp sur les cellules de CSTN SUM1315 et DU4475 à l'aide d'une série de 14 traceurs fluorescent différents. Notamment, les résultats obtenus ont mis en évidence l'obtention de deux profils de marquages cellulaires différents, dépendants de la structure chimique du traceur et du fluorophore auquel il est couplé. Notamment, en plus du marquage de la P-gp au niveau de la membrane cellulaire, certains de ces composés fluorescents ont la capacité de marquer la P-gp au niveau des lysosomes ou des mitochondries. Selon la littérature, ces organites intracellulaires sont décrits comme étant des sites potentiels de présence de la P-gp (Fu, 2013; Munteanu et al., 2006). Nos travaux futurs permettront de valider l'utilisation de ces traceurs pour une détection spécifique de la P-gp,

selon un schéma similaire à celui utilisé précédemment pour le traceur LightSpot®-FL-1. Notamment, ces différences de marquage pourraient potentiellement permettre de cibler de manière différentielle la P-gp selon sa localisation précise dans la cellule. Nos travaux à venir, auront également pour objectif de sélectionner les traceurs LightSpot® présentant les meilleures performances de marquage de la P-gp, en termes de spécificité et de robustesse de détection, de localisation et de quantification.

D'autre part, l'ensemble de ces travaux de développement ont permis de valoriser le brevet LightSpot® pour une méthode de détection et de quantification des protéines MDR, sur l'axe d'oncologie. Cependant, la P-gp étant une protéine MDR très ubiquitaire (de procaryote à l'homme) le champ d'application du brevet LightSpot® peut largement s'élargir à d'autres domaines tels que l'Environnement et la Virologie. A titre d'exemple, notre équipe a déjà exploité l'intérêt de la détection de la P-gp comme biomarqueur sentinelle de la pollution des rivières (Valton et al., 2017). L'application des traceurs LightSpot® pourraient être étendue au développement de biomarqueurs. D'autre part, nous avons pu identifier des applications très prometteuses dans le domaine de la Virologie. En effet, l'implication des protéines MDR dans (1) le processus d'infection virale et notamment dans la relation hôte-pathogène et (2) dans l'efflux et la distribution de nombreux agents antiviraux a été grandement mise en évidence dans la littérature (Huisman et al., 2001; Turriziani et al., 2000). De ce fait, le développement des traceurs LightSpot® pour une utilisation dans le domaine de la Virologie a récemment débuté dans le groupe « Résistance ». Cette perspective fera l'objet du développement de mes futurs travaux au sein du consortium BIORCELL3D® sous l'intitulé Projet « Revilight » soutenu par l'action France Relance.

Le second objectif de mes travaux de thèse a permis le développement d'un **concept innovant de conservation de modèles de sphéroïdes, alternatif aux techniques classiques de cryopréservation**. Pour ce faire, ces travaux ont été focalisés sur la comparaison des performances d'un milieu de culture cellulaire standard (RPMI) avec celles du milieu synthétique sans sérum OptiPASS® (conçu et commercialisé au sein du consortium BIORCELL3D®) pour la préservation de modèles de sphéroïdes de CSTN MDA-MB-231. La conservation de ces modèles a par ailleurs été optimisée par des conditions anoxiques et hypothermiques (4°C) selon les données accessibles dans la littérature (Gomes et al., 2018). Ainsi, ce travail de développement de ce nouveau concept a permis de sélectionner les meilleures conditions de conservation des sphéroïdes MDA-MB-231 consistant à maintenir jusqu'à 7 jours ces modèles dans le milieu OptiPASS®, en anoxie et à 4°C. Les travaux menés ont permis de vérifier que ces conditions permettent de préserver des paramètres similaires

des sphéroïdes MDA-MB-231 conservés en comparaison de sphéroïdes contrôles non conservés. En effet, la conservation n'a présenté aucun impact sur la structure, la croissance, la viabilité cellulaire et l'activité métabolique des sphéroïdes. De plus, après l'étape de conservation, les sphéroïdes ont présenté les mêmes niveaux d'hypoxie et d'expression du marqueur de prolifération cellulaire que les sphéroïdes non conservés. Enfin, de manière de très intéressante, la réponse des sphéroïdes MDA-MB-231 vis-à-vis de deux agents de chimiothérapie conventionnelle (Epirubicine et Cisplatine) et à deux thérapies ciblées anti-PARP (Olaparib et Véliparib) n'a pas été modifiée par l'étape de conservation. **L'ensemble de ces résultats a permis de valider un nouveau concept innovant pour la préservation pendant quelques jours de sphéroïdes MDA-MB-231, comme une alternative aux techniques de cryoconservation.** Les performances de préservation cellulaire apportées par le milieu OptiPASS® sont probablement expliquées par l'absence de composés d'origine animale figurant dans sa composition, lui conférant un pouvoir de protection contre le stress oxydant. Ce concept relativement simple à mettre en place nécessite peu de matériel spécifique. Particulièrement, il nécessite peu de manipulations sur les sphéroïdes et ne requiert pas de les changer de milieu ou de support de culture. Ce point est relativement important afin de limiter les perturbations et le stress cellulaire, notamment pour des modèles à haute valeur ajoutée. D'autre part, ce protocole peut facilement être transposé pour d'autres modèles de sphéroïdes. En effet, d'autres travaux menés au sein du groupe « Résistance » basés sur ce nouveau concept ont permis d'étendre l'application de ce protocole pour la préservation d'autres sphéroïdes de cancer du sein SUM1315 et BT474, et de cancer pulmonaire NCI-H1975. De ce fait, ce concept de conservation de sphéroïdes peut facilement être intégré pour le *screening* à grande échelle de médicaments. En effet, il permet d'optimiser la gestion et le transport de ces modèles de culture 3D, facilitant ainsi leur utilisation pour des essais précliniques de grande ampleur.

De plus, un autre grand intérêt de ce concept innovant de préservation de sphéroïdes est sa capacité à induire un arrêt réversible de la prolifération cellulaire au sein du sphéroïde, sans impacter la viabilité cellulaire. Ce phénomène peut s'expliquer probablement par la sortie des cellules tumorales du cycle cellulaire en phase de quiescence (G0) pendant le temps de conservation. Des travaux complémentaires dans l'équipe permettront sans doute de mettre en évidence la capacité de ces conditions de conservation à induire l'entrée de cellules en quiescence. Cette nouvelle perspective s'avère particulièrement intéressante afin de développer un nouveau modèle préclinique de dormance tumorale. En effet, l'entrée de cellules cancéreuses en quiescence, en réponse à un stress, constitue une forme tumorale

dormante, particulièrement résistante à de nombreux traitements et pouvant se réactiver sous la forme de rechute ou de récurrence. Aujourd'hui, de nombreuses équipes dans le monde cherchent à développer de nouvelles stratégies thérapeutiques anticancéreuses afin de cibler la dormance tumorale ou la maladie résiduelle (Recasens and Munoz, 2019). A titre d'exemple, plusieurs médicaments épigénétiques, incluant des inhibiteurs d'histone-lysine-déméthylase, sont en cours de développement (McGrath and Trojer, 2015). Le nouveau concept de préservation de sphéroïdes développé au cours de ma thèse pourrait constituer une nouvelle approche de modélisation *in vitro*, pour optimiser la validation préclinique de nouvelles thérapies ciblant la dormance tumorale.

Enfin ce concept de conservation de sphéroïdes dans le milieu OptiPASS® pourrait inspirer le développement de nouveaux protocoles de conservation d'autres échantillons biologiques multicellulaires. Particulièrement, cette approche pourrait probablement permettre de préserver pendant plusieurs jours des échantillons cliniques à haute valeur ajoutée, tels que des fragments de tissus sains ou tumoraux. A ce titre, le groupe « Résistance », en collaboration avec le Centre Hospitalo-Universitaire de Clermont-Ferrand, du service hématologie biologique du CHU Estaing a débuté des travaux visant à conserver des greffons de moelle osseuse selon ce protocole de conservation. La validation de protocole de préservation dans ce cadre précis représenterait une grande opportunité pour améliorer la conservation de ces échantillons biologiques précieux.

L'ensemble des travaux menés au cours de ma thèse a permis de renforcer la forte collaboration de type public/privé, initiée depuis déjà 2017 avec les sociétés BIOPASS et BIOMARQUEURS. Ce partenariat a notamment été concrétisé par la création du Consortium BIORCELL3D® visant à commercialiser différentes solutions biotechnologiques, principalement dans le domaine de la Santé Humaine. L'importante chaîne de valorisation créée au sein de ce Consortium permet notamment un transfert direct des innovations issues de la Recherche et Développement vers une application industrielle, et également la commercialisation des produits finis. Notamment, la valorisation apportée par le brevet LightSpot® ainsi que le développement et la validation de ces traceurs fluorescents, favorisent grandement la commercialisation de ces nouveaux produits. De plus, le développement de la technique de préservation de modèles de sphéroïdes dans le milieu OptiPASS® participe (1) à faciliter l'utilisation, le transport et la commercialisation de modèles de sphéroïdes par les sociétés (projet Opit3D) et (2) à valoriser l'utilisation du milieu OptiPASS® pour la culture et la préservation de sphéroïdes. Dans ce contexte, j'aurai l'opportunité de poursuivre les

différentes pistes de Recherche & Développement évoquées par une embauche au sein du Consortium BIORCELL3D®.

Références Bibliographiques

Abd El-Aziz, Y.S., Spillane, A.J., Jansson, P.J., and Sahni, S. (2021). Role of ABCB1 in mediating chemoresistance of triple-negative breast cancers. *Biosci Rep* 41.

Adams, D.J. (2012). The Valley of Death in anticancer drug development: a reassessment. *Trends Pharmacol Sci* 33, 173–180.

Al-Akra, L., Bae, D.-H., Sahni, S., Huang, M.L.H., Park, K.C., Lane, D.J.R., Jansson, P.J., and Richardson, D.R. (2018). Tumor stressors induce two mechanisms of intracellular P-glycoprotein-mediated resistance that are overcome by lysosomal-targeted thiosemicarbazones. *J. Biol. Chem.* 293, 3562–3587.

Aleman-Ribes, M., and Semino, C.E. (2014). Bioengineering 3D environments for cancer models. *Advanced Drug Delivery Reviews* 79–80, 40–49.

Aller, S.G., Yu, J., Ward, A., Weng, Y., Chittaboina, S., Zhuo, R., Harrell, P.M., Trinh, Y.T., Zhang, Q., Urbatsch, I.L., et al. (2009). Structure of P-glycoprotein Reveals a Molecular Basis for Poly-Specific Drug Binding. *Science* 323, 1718–1722.

Al-Mahmood, S., Sapiezynski, J., Garbuzenko, O.B., and Minko, T. (2018). Metastatic and triple-negative breast cancer: challenges and treatment options. *Drug Deliv Transl Res* 8, 1483–1507.

Amat, S., Penault-Llorca, F., Cure, H., Le Bouedec, G., Achard, J.-L., Van Praagh, I., Feillel, V., Mouret-Reynier, M.-A., Dauplat, J., and Chollet, P. (2002). Scarff-Bloom-Richardson (SBR) grading: a pleiotropic marker of chemosensitivity in invasive ductal breast carcinomas treated by neoadjuvant chemotherapy. *Int J Oncol* 20, 791–796.

Antoniou, P., Ziogas, D.E., Vlachioti, A., Lykoudis, E.G., Mitsis, M., and Roukos, D.H. (2019). Genomic and transcriptional heterogeneity-based precision in personalized treatment for breast cancer. *Per Med* 16, 361–364.

Antoszczak, M., Markowska, A., Markowska, J., and Huczyński, A. (2020). Old wine in new bottles: Drug repurposing in oncology. *Eur J Pharmacol* 866, 172784.

Arai, K., Murata, D., Takao, S., Verissimo, A.R., and Nakayama, K. (2020). Cryopreservation method for spheroids and fabrication of scaffold-free tubular constructs. *PLOS ONE* 15, e0230428.

Arpino, G., Bardou, V.J., Clark, G.M., and Elledge, R.M. (2004). Infiltrating lobular carcinoma of the breast: tumor characteristics and clinical outcome. *Breast Cancer Res* 6, R149–R156.

Badowska-Kozakiewicz, A.M., Sobol, M., and Patera, J. (2017). Expression of multidrug resistance protein P-glycoprotein in correlation with markers of hypoxia (HIF-1 α , EPO, EPO-R) in invasive breast cancer with metastasis to lymph nodes. *Arch Med Sci* 13, 1303–1314.

Badve, S., Dabbs, D.J., Schnitt, S.J., Baehner, F.L., Decker, T., Eusebi, V., Fox, S.B., Ichihara, S., Jacquemier, J., Lakhani, S.R., et al. (2011). Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Mod Pathol* 24, 157–167.

Bai, X., Ni, J., Beretov, J., Graham, P., and Li, Y. (2018). Cancer stem cell in breast cancer therapeutic resistance. *Cancer Treat. Rev.* 69, 152–163.

- Bai, X., Ni, J., Beretov, J., Graham, P., and Li, Y. (2021). Triple-negative breast cancer therapeutic resistance: Where is the Achilles' heel? *Cancer Lett* 497, 100–111.
- Bamdad, M., Reader, S., Grolière, C.A., Bohatier, J., and Denizeau, F. (1997). Uptake and efflux of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Tetrahymena pyriformis*: evidence for a resistance mechanism. *Cytometry* 28, 170–175.
- Bamdad, M., Brousseau, P., and Denizeau, F. (1999). Identification of a multidrug resistance-like system in *Tetrahymena pyriformis*: evidence for a new detoxication mechanism in freshwater ciliates. *FEBS Lett.* 456, 389–393.
- Barros, A.S., Costa, E.C., Nunes, A.S., de Melo-Diogo, D., and Correia, I.J. (2018). Comparative study of the therapeutic effect of Doxorubicin and Resveratrol combination on 2D and 3D (spheroids) cell culture models. *Int J Pharm* 551, 76–83.
- Batlle, E., and Clevers, H. (2017). Cancer stem cells revisited. *Nat. Med.* 23, 1124–1134.
- Beck, W.T., Grogan, T.M., Willman, C.L., Cordon-Cardo, C., Parham, D.M., Kuttesch, J.F., Andreeff, M., Bates, S.E., Berard, C.W., Boyett, J.M., et al. (1996). Methods to Detect P-Glycoprotein-associated Multidrug Resistance in Patients' Tumors: Consensus Recommendations. *Cancer Res* 56, 3010–3020.
- Beis, K. (2015). Structural basis for the mechanism of ABC transporters. *Biochem Soc Trans* 43, 889–893.
- Belfiore, L., Aghaei, B., Law, A.M.K., Dobrowolski, J.C., Raftery, L.J., Tjandra, A.D., Yee, C., Piloni, A., Volkerling, A., Ferris, C.J., et al. (2021). Generation and analysis of 3D cell culture models for drug discovery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 163, 105876.
- Bergin, A.R.T., and Loi, S. (2019). Triple-negative breast cancer: recent treatment advances. *F1000Res* 8.
- Bertucci, F., Finetti, P., Cervera, N., Esterni, B., Hermitte, F., Viens, P., and Birnbaum, D. (2008). How basal are triple-negative breast cancers? *International Journal of Cancer* 123, 236–240.
- Binkhathlan, Z., and Lavasanifar, A. (2013). P-glycoprotein inhibition as a therapeutic approach for overcoming multidrug resistance in cancer: current status and future perspectives. *Curr Cancer Drug Targets* 13, 326–346.
- Bissell, M.J., Hall, H.G., and Parry, G. (1982). How does the extracellular matrix direct gene expression? *Journal of Theoretical Biology* 99, 31–68.
- Bjerkvig, R., Laerum, O.D., and Rucklidge, G.J. (1989). Immunocytochemical characterization of extracellular matrix proteins expressed by cultured glioma cells. *Cancer Res* 49, 5424–5428.
- Blomqvist, C., Elomaa, I., Rissanen, P., Hietanen, P., Nevasaari, K., and Helle, L. (1992). FEC (5-fluorouracil-epirubicin-cyclophosphamide) monthly versus FEC weekly in metastatic breast cancer. First results of a randomized trial. *Acta Oncol* 31, 231–236.
- Borri, F., and Granaglia, A. (2020). Pathology of triple negative breast cancer. *Semin Cancer Biol.*

Bottova, I., Hehl, A.B., Stefanić, S., Fabriàs, G., Casas, J., Schraner, E., Pieters, J., and Sonda, S. (2009). Host cell P-glycoprotein is essential for cholesterol uptake and replication of *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* *284*, 17438–17448.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., and Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* *68*, 394–424.

Breslin, S., and O'Driscoll, L. (2016). The relevance of using 3D cell cultures, in addition to 2D monolayer cultures, when evaluating breast cancer drug sensitivity and resistance. *Oncotarget* *7*, 45745–45756.

Brody, J.G., Moysich, K.B., Humblet, O., Attfield, K.R., Beehler, G.P., and Rudel, R.A. (2007). Environmental pollutants and breast cancer: epidemiologic studies. *Cancer* *109*, 2667–2711.

Bryant, H.E., Schultz, N., Thomas, H.D., Parker, K.M., Flower, D., Lopez, E., Kyle, S., Meuth, M., Curtin, N.J., and Helleday, T. (2005). Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* *434*, 913–917.

Bugde, P., Biswas, R., Merien, F., Lu, J., Liu, D.-X., Chen, M., Zhou, S., and Li, Y. (2017). The therapeutic potential of targeting ABC transporters to combat multi-drug resistance. *Expert Opin Ther Targets* *21*, 511–530.

Burger, H., Foekens, J.A., Look, M.P., Meijer-van Gelder, M.E., Klijn, J.G.M., Wiemer, E.A.C., Stoter, G., and Nooter, K. (2003). RNA expression of breast cancer resistance protein, lung resistance-related protein, multidrug resistance-associated proteins 1 and 2, and multidrug resistance gene 1 in breast cancer: correlation with chemotherapeutic response. *Clin Cancer Res* *9*, 827–836.

Byrne, A.T., Alférez, D.G., Amant, F., Annibaldi, D., Arribas, J., Biankin, A.V., Bruna, A., Budinská, E., Caldas, C., Chang, D.K., et al. (2017). Interrogating open issues in cancer precision medicine with patient-derived xenografts. *Nat Rev Cancer* *17*, 254–268.

Byrski, T., Huzarski, T., Dent, R., Gronwald, J., Zuziak, D., Cybulski, C., Kladny, J., Gorski, B., Lubinski, J., and Narod, S.A. (2009). Response to neoadjuvant therapy with cisplatin in BRCA1-positive breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* *115*, 359–363.

Camares, O., F, D., and Bamdad, M. (2004). *Tetrahymena pyriformis* partial *mdr1* gene for putative P-glycoprotein.

Cameron, D.A., Gabra, H., and Leonard, R.C. (1994). Continuous 5-fluorouracil in the treatment of breast cancer. *Br J Cancer* *70*, 120–124.

Cancer Genome Atlas Network (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* *490*, 61–70.

Caramelo, O., Silva, C., Caramelo, F., Frutuoso, C., and Almeida-Santos, T. (2019). The effect of neoadjuvant platinum-based chemotherapy in BRCA mutated triple negative breast cancers -systematic review and meta-analysis. *Hered Cancer Clin Pract* *17*, 11.

Carey, L.A., Dees, E.C., Sawyer, L., Gatti, L., Moore, D.T., Collichio, F., Ollila, D.W., Sartor, C.I., Graham, M.L., and Perou, C.M. (2007). The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res* *13*, 2329–2334.

- Chang, T.T., and Hughes-Fulford, M. (2009). Monolayer and spheroid culture of human liver hepatocellular carcinoma cell line cells demonstrate distinct global gene expression patterns and functional phenotypes. *Tissue Eng Part A* 15, 559–567.
- Chen, X., Li, J., Gray, W.H., Lehmann, B.D., Bauer, J.A., Shyr, Y., and Pietenpol, J.A. (2012). TNBCtype: A Subtyping Tool for Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Inform* 11, 147–156.
- Chong, Y.-K., Toh, T.-B., Zaiden, N., Poonepalli, A., Leong, S.H., Ong, C.E.L., Yu, Y., Tan, P.B., See, S.-J., Ng, W.-H., et al. (2009). Cryopreservation of neurospheres derived from human glioblastoma multiforme. *Stem Cells* 27, 29–39.
- Chun, K.-H., Park, J.H., and Fan, S. (2017). Predicting and Overcoming Chemotherapeutic Resistance in Breast Cancer. *Adv Exp Med Biol* 1026, 59–104.
- Clarke, R., Leonessa, F., and Trock, B. (2005). Multidrug Resistance/P-Glycoprotein and Breast Cancer: Review and Meta-Analysis. *Seminars in Oncology* 32, 9–15.
- Correia, C., Koshkin, A., Carido, M., Espinha, N., Šarić, T., Lima, P.A., Serra, M., and Alves, P.M. (2016). Effective Hypothermic Storage of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Compatible With Global Distribution of Cells for Clinical Applications and Toxicology Testing. *Stem Cells Transl Med* 5, 658–669.
- Costa, A., Kieffer, Y., Scholer-Dahirel, A., Pelon, F., Bourachot, B., Cardon, M., Sirven, P., Magagna, I., Fuhrmann, L., Bernard, C., et al. (2018a). Fibroblast Heterogeneity and Immunosuppressive Environment in Human Breast Cancer. *Cancer Cell* 33, 463-479.e10.
- Costa, E.C., Gaspar, V.M., Coutinho, P., and Correia, I.J. (2014). Optimization of liquid overlay technique to formulate heterogenic 3D co-cultures models. *Biotechnol. Bioeng.* 111, 1672–1685.
- Costa, E.C., Moreira, A.F., de Melo-Diogo, D., Gaspar, V.M., Carvalho, M.P., and Correia, I.J. (2016). 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. *Biotechnol. Adv.* 34, 1427–1441.
- Costa, E.C., de Melo-Diogo, D., Moreira, A.F., Carvalho, M.P., and Correia, I.J. (2018b). Spheroids Formation on Non-Adhesive Surfaces by Liquid Overlay Technique: Considerations and Practical Approaches. *Biotechnol J* 13.
- Couch, F.J., Hart, S.N., Sharma, P., Toland, A.E., Wang, X., Miron, P., Olson, J.E., Godwin, A.K., Pankratz, V.S., Olswold, C., et al. (2015). Inherited mutations in 17 breast cancer susceptibility genes among a large triple-negative breast cancer cohort unselected for family history of breast cancer. *J Clin Oncol* 33, 304–311.
- Coughlin, S.S. (2019). Epidemiology of Breast Cancer in Women. *Adv Exp Med Biol* 1152, 9–29.
- Cregunta Nicolae, A., Letitia Arsen, A., Vlad, V., and Popa, D. (2016). In vitro P-gp expression after administration of CNS active drugs. *Farmacica* 64, 844–850.
- de Cremoux, P. (2011). Hormonothérapie des cancers du sein. *Bulletin du Cancer* 98, 1311–1319.

Cribbes, S., Kessel, S., McMenemy, S., Qiu, J., and Chan, L.L.-Y. (2017). A Novel Multiparametric Drug-Scoring Method for High-Throughput Screening of 3D Multicellular Tumor Spheroids Using the Celigo Image Cytometer. *SLAS Discov* 22, 547–557.

Cronstein, B.N. (1997). The mechanism of action of methotrexate. *Rheum Dis Clin North Am* 23, 739–755.

Cserni, G. (2020). Histological type and typing of breast carcinomas and the WHO classification changes over time. *Pathologica* 112, 25–41.

Cserni, G., Chmielik, E., Cserni, B., and Tot, T. (2018). The new TNM-based staging of breast cancer. *Virchows Arch* 472, 697–703.

Dalman, A., Deheshkar Gooneh Farahani, N.S., Totonchi, M., Pirjani, R., Ebrahimi, B., and Rezazadeh Valojerdi, M. (2017). Slow freezing versus vitrification technique for human ovarian tissue cryopreservation: An evaluation of histological changes, WNT signaling pathway and apoptotic genes expression. *Cryobiology* 79, 29–36.

Das, V., Fürst, T., Gurská, S., Džubák, P., and Hajdúch, M. (2016). Reproducibility of Uniform Spheroid Formation in 384-Well Plates: The Effect of Medium Evaporation. *J Biomol Screen* 21, 923–930.

De Lange, E.C.M., Vd Berg, D.J., Bellanti, F., Voskuyl, R.A., and Syvänen, S. (2018). P-glycoprotein protein expression versus functionality at the blood-brain barrier using immunohistochemistry, microdialysis and mathematical modeling. *Eur J Pharm Sci* 124, 61–70.

Dean, M., and Annilo, T. (2005). Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 6, 123–142.

Dewanjee, S., Dua, T.K., Bhattacharjee, N., Das, A., Gangopadhyay, M., Khanra, R., Joardar, S., Riaz, M., Feo, V.D., and Zia-Ul-Haq, M. (2017). Natural Products as Alternative Choices for P-Glycoprotein (P-gp) Inhibition. *Molecules* 22, 871.

Dhesy-Thind, B., Pritchard, K.I., Messersmith, H., O'Malley, F., Elavathil, L., and Trudeau, M. (2008). HER2/neu in systemic therapy for women with breast cancer: a systematic review. *Breast Cancer Res Treat* 109, 209–229.

Dhiman, H.K., Ray, A.R., and Panda, A.K. (2005). Three-dimensional chitosan scaffold-based MCF-7 cell culture for the determination of the cytotoxicity of tamoxifen. *Biomaterials* 26, 979–986.

Doublier, S., Belisario, D.C., Polimeni, M., Annaratone, L., Riganti, C., Allia, E., Ghigo, D., Bosia, A., and Sapino, A. (2012). HIF-1 activation induces doxorubicin resistance in MCF7 3-D spheroids via P-glycoprotein expression: a potential model of the chemo-resistance of invasive micropapillary carcinoma of the breast. *BMC Cancer* 12, 4.

Drabløs, F., Feyzi, E., Aas, P.A., Vaagbø, C.B., Kavli, B., Bratlie, M.S., Peña-Díaz, J., Otterlei, M., Slupphaug, G., and Krokan, H.E. (2004). Alkylation damage in DNA and RNA--repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair (Amst)* 3, 1389–1407.

Drăgănescu, M., and Carmocan, C. (2017). Hormone Therapy in Breast Cancer. *Chirurgia (Bucur)* 112, 413–417.

- Drost, J., and Clevers, H. (2018). Organoids in cancer research. *Nat Rev Cancer* 18, 407–418.
- Dubois, C., Dufour, R., Daumar, P., Aubel, C., Szczepaniak, C., Blavignac, C., Mounetou, E., Penault-Llorca, F., and Bamdad, M. (2017). Development and cytotoxic response of two proliferative MDA-MB-231 and non-proliferative SUM1315 three-dimensional cell culture models of triple-negative basal-like breast cancer cell lines. *Oncotarget* 8, 95316–95331.
- Dubois, C., Daumar, P., Aubel, C., Gauthier, J., Vidalinc, B., Mounetou, E., Penault-Llorca, F., and Bamdad, M. (2019a). The New Synthetic Serum-Free Medium OptiPASS Promotes High Proliferation and Drug Efficacy Prediction on Spheroids from MDA-MB-231 and SUM1315 Triple-Negative Breast Cancer Cell Lines. *Journal of Clinical Medicine Research* 8, 397.
- Dubois, C., Martin, F., Hassel, C., Magnier, F., Daumar, P., Aubel, C., Guerder, S., Mounetou, E., Penault-Lorca, F., and Bamdad, M. (2019b). Low-Dose and Long-Term Olaparib Treatment Sensitizes MDA-MB-231 and SUM1315 Triple-Negative Breast Cancers Spheroids to Fractionated Radiotherapy. *J Clin Med* 9.
- Dudler, R., and Sidler, M. (1998). Arabidopsis MDR genes: molecular cloning and protein chemical aspects. *Meth. Enzymol.* 292, 162–173.
- Dufour, R., Daumar, P., Mounetou, E., Aubel, C., Kwiatkowski, F., Abrial, C., Vatoux, C., Penault-Llorca, F., and Bamdad, M. (2015). BCRP and P-gp relay overexpression in triple negative basal-like breast cancer cell line: a prospective role in resistance to Olaparib. *Sci Rep* 5, 12670.
- Duval, K., Grover, H., Han, L.-H., Mou, Y., Pegoraro, A.F., Fredberg, J., and Chen, Z. (2017). Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology (Bethesda)* 32, 266–277.
- e-cancer.fr (2020). Le cancer du sein - Les cancers les plus fréquents.
- Ehrhart, F., Schulz, J.C., Katsen-Globa, A., Shirley, S.G., Reuter, D., Bach, F., Zimmermann, U., and Zimmermann, H. (2009). A comparative study of freezing single cells and spheroids: towards a new model system for optimizing freezing protocols for cryobanking of human tumours. *Cryobiology* 58, 119–127.
- Eini, L., Naseri, M., Karimi-Busheri, F., Bozorgmehr, M., Ghods, R., and Madjd, Z. (2020). Primary colonospheres maintain stem cell-like key features after cryopreservation. *J Cell Physiol* 235, 2452–2463.
- Elmeliegy, M., Vourvahis, M., Guo, C., and Wang, D.D. (2020). Effect of P-glycoprotein (P-gp) Inducers on Exposure of P-gp Substrates: Review of Clinical Drug-Drug Interaction Studies. *Clin Pharmacokinet* 59, 699–714.
- Farmer, H., McCabe, N., Lord, C.J., Tutt, A.N.J., Johnson, D.A., Richardson, T.B., Santarosa, M., Dillon, K.J., Hickson, I., Knights, C., et al. (2005). Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* 434, 917–921.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., and Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* 136, E359-386.

Ferlicot, S., Vincent-Salomon, A., Médioni, J., Genin, P., Rosty, C., Sigal-Zafrani, B., Fréneaux, P., Jouve, M., Thiery, J.-P., and Sastre-Garau, X. (2004). Wide metastatic spreading in infiltrating lobular carcinoma of the breast. *European Journal of Cancer* 40, 336–341.

Ferreira, D., Adegas, F., and Chaves, R. (2013). The Importance of Cancer Cell Lines as in vitro Models in Cancer Methyloome Analysis and Anticancer Drugs Testing (IntechOpen).

Ferté, J. (2000). Analysis of the tangled relationships between P-glycoprotein-mediated multidrug resistance and the lipid phase of the cell membrane. *Eur J Biochem* 267, 277–294.

Fey, S.J., and Wrzesinski, K. (2012). Determination of Drug Toxicity Using 3D Spheroids Constructed From an Immortal Human Hepatocyte Cell Line. *Toxicol Sci* 127, 403–411.

Figueroa-Magalhães, M.C., Jelovac, D., Connolly, R., and Wolff, A.C. (2014). Treatment of HER2-positive breast cancer. *Breast* 23, 128–136.

Filippini, S.E., and Vega, A. (2013). Breast cancer genes: beyond BRCA1 and BRCA2. *Front Biosci (Landmark Ed)* 18, 1358–1372.

Ford, R.C., and Beis, K. (2019). Learning the ABCs one at a time: structure and mechanism of ABC transporters. *Biochem Soc Trans* 47, 23–36.

Fouad, Y.A., and Aanei, C. (2017). Revisiting the hallmarks of cancer. *Am J Cancer Res* 7, 1016–1036.

Fougner, C., Bergholtz, H., Norum, J.H., and Sørli, T. (2020). Re-definition of claudin-low as a breast cancer phenotype. *Nat Commun* 11, 1787.

Fu, D. (2013). Where is it and How Does it Get There - Intracellular Localization and Traffic of P-glycoprotein. *Front Oncol* 3, 321.

Fu, D., and Arias, I.M. (2012). Intracellular trafficking of P-glycoprotein. *Int J Biochem Cell Biol* 44, 461–464.

Fu, D., Mitra, K., Sengupta, P., Jarnik, M., Lippincott-Schwartz, J., and Arias, I.M. (2013). Coordinated elevation of mitochondrial oxidative phosphorylation and autophagy help drive hepatocyte polarization. *PNAS*.

Geisler, M., Blakeslee, J.J., Bouchard, R., Lee, O.R., Vincenzetti, V., Bandyopadhyay, A., Titapiwatanakun, B., Peer, W.A., Bailly, A., Richards, E.L., et al. (2005). Cellular efflux of auxin catalyzed by the Arabidopsis MDR/PGP transporter AtPGP1. *Plant J.* 44, 179–194.

Gerlach, J.H., Endicott, J.A., Juranka, P.F., Henderson, G., Sarangi, F., Deuchars, K.L., and Ling, V. (1986). Homology between P-glycoprotein and a bacterial haemolysin transport protein suggests a model for multidrug resistance. *Nature* 324, 485–489.

Ghosh, S., Spagnoli, G.C., Martin, I., Ploegert, S., Demougin, P., Heberer, M., and Reschner, A. (2005). Three-dimensional culture of melanoma cells profoundly affects gene expression profile: a high density oligonucleotide array study. *J Cell Physiol* 204, 522–531.

Ginis, I., Grinblat, B., and Shirvan, M.H. (2012). Evaluation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after cryopreservation and hypothermic storage in clinically safe medium. *Tissue Eng Part C Methods* 18, 453–463.

Glavinas, H., von Richter, O., Vojnits, K., Mehn, D., Wilhelm, I., Nagy, T., Janossy, J., Krizbai, I., Couraud, P., and Krajcsi, P. (2011). Calcein assay: a high-throughput method to assess P-gp inhibition. *Xenobiotica* 41, 712–719.

GLOBOCAN 2020 GLOBOCAN 2020.

Goisnard, A., Daumar, P., Dubois, C., Aubel, C., Roux, M., Depresle, M., Gauthier, J., Vidalinc, B., Penault-Llorca, F., Mounetou, E., et al. (2021a). LightSpot®-FL-1 Fluorescent Probe: An Innovative Tool for Cancer Drug Resistance Analysis by Direct Detection and Quantification of the P-glycoprotein (P-gp) on Monolayer Culture and Spheroid Triple Negative Breast Cancer Models. *Cancers* 13, 4050.

Goisnard, A., Dubois, C., Daumar, P., Aubel, C., Depresle, M., Gauthier, J., Vidalinc, B., Penault-Llorca, F., Mounetou, E., and Bamdad, M. (2021b). The New Serum-Free OptiPASS® Medium in Cold and Oxygen-Free Conditions: An Innovative Conservation Method for the Preservation of MDA-MB-231 Triple Negative Breast Cancer Spheroids. *Cancers* 13, 1945.

Gomes, A., Guillaume, L., Grimes, D.R., Fehrenbach, J., Lobjois, V., and Ducommun, B. (2016). Oxygen Partial Pressure Is a Rate-Limiting Parameter for Cell Proliferation in 3D Spheroids Grown in Physioxic Culture Condition. *PLoS ONE* 11, e0161239.

Gomes, A., Defaux, M., Lemee, R.M., Lobjois, V., and Ducommun, B. (2018). Reversible growth arrest of 3D tumor spheroids stored in oxygen absorber-induced anoxia. *Oncol Lett* 15, 2006–2009.

Gompel, A. (2019). Hormones et cancers du sein. *La Presse Médicale* 48, 1085–1091.

Gottesman, M.M. (2002). Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu Rev Med* 53, 615–627.

Gottesman, M.M., and Pastan, I. (1993). Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* 62, 385–427.

Gottesman, M.M., Lavi, O., Hall, M.D., and Gillet, J.-P. (2016). Toward a Better Understanding of the Complexity of Cancer Drug Resistance. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 56, 85–102.

Gregorczyk, S., Kang, Y., Brandt, D., Kolm, P., Singer, G., and Perry, R.R. (1996). p-Glycoprotein expression as a predictor of breast cancer recurrence. *Ann Surg Oncol* 3, 8–14.

Gu, G., Dustin, D., and Fuqua, S.A. (2016). Targeted therapy for breast cancer and molecular mechanisms of resistance to treatment. *Curr Opin Pharmacol* 31, 97–103.

Guiu, S., Michiels, S., André, F., Cortes, J., Denkert, C., Di Leo, A., Hennessy, B.T., Sorlie, T., Sotiriou, C., Turner, N., et al. (2012). Molecular subclasses of breast cancer: how do we define them? The IMPAKT 2012 Working Group Statement. *Ann Oncol* 23, 2997–3006.

Hahnen, E., Hauke, J., Engel, C., Neidhardt, G., Rhiem, K., and Schmutzler, R.K. (2017). Germline Mutations in Triple-Negative Breast Cancer. *BRC* 12, 15–19.

- Ham, S.L., Joshi, R., Luker, G.D., and Tavana, H. (2016). Engineered Breast Cancer Cell Spheroids Reproduce Biologic Properties of Solid Tumors. *Adv Healthc Mater* 5, 2788–2798.
- Hamrang, Z., Arthanari, Y., Clarke, D., and Pluen, A. (2014). Quantitative assessment of p-glycoprotein expression and function using confocal image analysis. *Microsc Microanal* 20, 1329–1339.
- Han, S.J., Kwon, S., and Kim, K.S. (2021). Challenges of applying multicellular tumor spheroids in preclinical phase. *Cancer Cell International* 21, 152.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674.
- He, M.Y., Rancoule, C., Rehailia-Blanchard, A., Espenel, S., Trone, J.-C., Bernichon, E., Guillaume, E., Vallard, A., and Magné, N. (2018). Radiotherapy in triple-negative breast cancer: Current situation and upcoming strategies. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 131, 96–101.
- Heinemann, V. (2005). Gemcitabine in metastatic breast cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 5, 429–443.
- van der Heyden, S., Gheuens, E., DeBruijn, E., Van Oosterom, A., and Maes, R. (1995). P-glycoprotein: clinical significance and methods of analysis. *Crit Rev Clin Lab Sci* 32, 221–264.
- Higgins, C.F., and Gottesman, M.M. (1992). Is the multidrug transporter a flippase? *Trends Biochem Sci* 17, 18–21.
- Holland, I.B., P.C. Cole, S., Kuchler, K., and F. Higgins, C. (2003). *ABC Proteins From Bacteria to Man* (Academic Press Inc).
- Høst, H., Brennhovd, I.O., and Loeb, M. (1986). Postoperative radiotherapy in breast cancer—long-term results from the Oslo study. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics* 12, 727–732.
- Hraběta, J., Belhajová, M., Šubrtová, H., Merlos Rodrigo, M.A., Heger, Z., and Eckschlager, T. (2020). Drug Sequestration in Lysosomes as One of the Mechanisms of Chemoresistance of Cancer Cells and the Possibilities of Its Inhibition. *Int J Mol Sci* 21.
- Hu, T., To, K.K.W., Wang, L., Zhang, L., Lu, L., Shen, J., Chan, R.L.Y., Li, M., Yeung, J.H.K., and Cho, C.H. (2014). Reversal of P-glycoprotein (P-gp) mediated multidrug resistance in colon cancer cells by cryptotanshinone and dihydrotanshinone of *Salvia miltiorrhiza*. *Phytomedicine* 21, 1264–1272.
- Huang, Z., Yu, P., and Tang, J. (2020). Characterization of Triple-Negative Breast Cancer MDA-MB-231 Cell Spheroid Model. *Onco Targets Ther* 13, 5395–5405.
- Huisman, M.T., Smit, J.W., Wiltshire, H.R., Hoetelmans, R.M., Beijnen, J.H., and Schinkel, A.H. (2001). P-glycoprotein limits oral availability, brain, and fetal penetration of saquinavir even with high doses of ritonavir. *Mol Pharmacol* 59, 806–813.

Hwang, T.J., Carpenter, D., Lauffenburger, J.C., Wang, B., Franklin, J.M., and Kesselheim, A.S. (2016). Failure of Investigational Drugs in Late-Stage Clinical Development and Publication of Trial Results. *JAMA Intern Med* 176, 1826–1833.

Imamura, Y., Mukohara, T., Shimono, Y., Funakoshi, Y., Chayahara, N., Toyoda, M., Kiyota, N., Takao, S., Kono, S., Nakatsura, T., et al. (2015). Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. *Oncol. Rep.* 33, 1837–1843.

Irvin, W.J., and Carey, L.A. (2008). What is triple-negative breast cancer? *Eur J Cancer* 44, 2799–2805.

Ishiguro, H., Masuda, N., Sato, N., Higaki, K., Morimoto, T., Yanagita, Y., Mizutani, M., Ohtani, S., Kaneko, K., Fujisawa, T., et al. (2020). A randomized study comparing docetaxel/cyclophosphamide (TC), 5-fluorouracil/epirubicin/cyclophosphamide (FEC) followed by TC, and TC followed by FEC for patients with hormone receptor-positive HER2-negative primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 180, 715–724.

Ivanov, D.P., and Grabowska, A.M. (2017). Spheroid arrays for high-throughput single-cell analysis of spatial patterns and biomarker expression in 3D. *Sci Rep* 7, 41160.

Ivanov, D.P., Grabowska, A.M., and Garnett, M.C. (2017). High-Throughput Spheroid Screens Using Volume, Resazurin Reduction, and Acid Phosphatase Activity. *Methods Mol Biol* 1601, 43–59.

Jain, D., and Aronow, W. (2019). Cardiotoxicity of cancer chemotherapy in clinical practice. *Hosp Pract (1995)* 47, 6–15.

Jo, Y., Choi, N., Kim, K., Koo, H.-J., Choi, J., and Kim, H.N. (2018). Chemoresistance of Cancer Cells: Requirements of Tumor Microenvironment-mimicking In Vitro Models in Anti-Cancer Drug Development. *Theranostics* 8, 5259–5275.

Jouan, E., Le Vée, M., Mayati, A., Denizot, C., Parmentier, Y., and Fardel, O. (2016). Evaluation of P-Glycoprotein Inhibitory Potential Using a Rhodamine 123 Accumulation Assay. *Pharmaceutics* 8.

Jovanović, B., Mayer, I.A., Mayer, E.L., Abramson, V.G., Bardia, A., Sanders, M.E., Kuba, M.G., Estrada, M.V., Beeler, J.S., Shaver, T.M., et al. (2017). A randomized phase II neoadjuvant study of cisplatin, paclitaxel with or without everolimus in patients with stage II/III triple-negative breast cancer (TNBC): Responses and long-term outcome correlated with increased frequency of DNA damage response gene mutations, TNBC subtype, AR status and Ki67. *Clin Cancer Res* 23, 4035–4045.

Juliano, R.L., and Ling, V. (1976). A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 455, 152–162.

Kamina, P. (1996). Anatomie gynécologique et obstétricale.

Kang, M.-H., Das, J., Gurunathan, S., Park, H.-W., Song, H., Park, C., and Kim, J.-H. (2017). The cytotoxic effects of dimethyl sulfoxide in mouse preimplantation embryos: a mechanistic study. *Theranostics* 7, 4735–4752.

- Khasraw, M., Bell, R., and Dang, C. (2012). Epirubicin: is it like doxorubicin in breast cancer? A clinical review. *Breast* 21, 142–149.
- Kilbride, P., Lamb, S., Milne, S., Gibbons, S., Erro, E., Bundy, J., Selden, C., Fuller, B., and Morris, J. (2016). Spatial considerations during cryopreservation of a large volume sample. *Cryobiology* 73, 47–54.
- Kim, Y., and Chen, J. (2018). Molecular structure of human P-glycoprotein in the ATP-bound, outward-facing conformation. *Science* 359, 915–919.
- Kim, C., Gao, R., Sei, E., Brandt, R., Hartman, J., Hatschek, T., Crosetto, N., Foukakis, T., and Navin, N.E. (2018). Chemoresistance Evolution in Triple-Negative Breast Cancer Delineated by Single-Cell Sequencing. *Cell* 173, 879-893.e13.
- Kim, H., Phung, Y., and Ho, M. (2012). Changes in global gene expression associated with 3D structure of tumors: an ex vivo matrix-free mesothelioma spheroid model. *PLoS One* 7, e39556.
- Kole, A.J., Park, H.S., Johnson, S.B., Kelly, J.R., Moran, M.S., and Patel, A.A. (2019). Overall survival is improved when DCIS accompanies invasive breast cancer. *Scientific Reports* 9, 9934.
- Kou, L., Sun, R., Bhutia, Y.D., Yao, Q., and Chen, R. (2018). Emerging advances in P-glycoprotein inhibitory nanomaterials for drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 15, 869–879.
- Krogstad, D.J., Gluzman, I.Y., Herwaldt, B.L., Schlesinger, P.H., and Wellems, T.E. (1992). Energy dependence of chloroquine accumulation and chloroquine efflux in *Plasmodium falciparum*. *Biochem. Pharmacol.* 43, 57–62.
- Kumar, P., and Aggarwal, R. (2016). An overview of triple-negative breast cancer. *Arch Gynecol Obstet* 293, 247–269.
- Kunnumakkara, A.B., Bordoloi, D., Sailo, B.L., Roy, N.K., Thakur, K.K., Banik, K., Shakibaei, M., Gupta, S.C., and Aggarwal, B.B. (2019). Cancer drug development: The missing links. *Exp Biol Med (Maywood)* 244, 663–689.
- Kuo, M.T. (2007). Roles of multidrug resistance genes in breast cancer chemoresistance. *Adv Exp Med Biol* 608, 23–30.
- Kurelec, B. (1992). The multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms. *Crit. Rev. Toxicol.* 22, 23–43.
- LaBarbera, D.V., Reid, B.G., and Yoo, B.H. (2012). The multicellular tumor spheroid model for high-throughput cancer drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 7, 819–830.
- Laloo, F., and Evans, D.G. (2012). Familial breast cancer. *Clin Genet* 82, 105–114.
- Lamovec, J., and Bracko, M. (1991). Metastatic pattern of infiltrating lobular carcinoma of the breast: an autopsy study. *J Surg Oncol* 48, 28–33.

- Langhans, S.A. (2018). Three-Dimensional in Vitro Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning. *Front Pharmacol* 9, 6.
- Larsen, C.-J. (2018). Sphéroïdes : le modèle de référence pour la culture in vitro des tumeurs solides ? *Bulletin du Cancer* 105, 25–34.
- Lawlor, D., Martin, P., Busschots, S., They, J., O’Leary, J.J., Hennessy, B.T., and Stordal, B. (2014). PARP Inhibitors as P-glycoprotein Substrates. *J Pharm Sci* 103, 1913–1920.
- Lee, A.H.S., and Ellis, I.O. (2008). The Nottingham prognostic index for invasive carcinoma of the breast. *Pathol Oncol Res* 14, 113–115.
- Legrand, O., Simonin, G., Perrot, J.Y., Zittoun, R., and Marie, J.P. (1998). Pgp and MRP activities using calcein-AM are prognostic factors in adult acute myeloid leukemia patients. *Blood* 91, 4480–4488.
- Lehmann, B.D., Bauer, J.A., Chen, X., Sanders, M.E., Chakravarthy, A.B., Shyr, Y., and Pietenpol, J.A. (2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J. Clin. Invest.* 121, 2750–2767.
- Lehmann, B.D., Jovanović, B., Chen, X., Estrada, M.V., Johnson, K.N., Shyr, Y., Moses, H.L., Sanders, M.E., and Pietenpol, J.A. (2016). Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. *PLoS ONE* 11, e0157368.
- Leidy, J., Khan, A., and Kandil, D. (2014). Basal-like breast cancer: update on clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular features. *Arch Pathol Lab Med* 138, 37–43.
- Leonard, G.D., Fojo, T., and Bates, S.E. (2003). The role of ABC transporters in clinical practice. *Oncologist* 8, 411–424.
- Levi-Setti, P.E., Patrizio, P., and Scaravelli, G. (2016). Evolution of human oocyte cryopreservation: slow freezing versus vitrification. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 23, 445–450.
- Li, L., Guan, Y., Chen, X., Yang, J., and Cheng, Y. (2021). DNA Repair Pathways in Cancer Therapy and Resistance. *Front. Pharmacol.* 0.
- Liedtke, C., Mazouni, C., Hess, K.R., André, F., Tordai, A., Mejia, J.A., Symmans, W.F., Gonzalez-Angulo, A.M., Hennessy, B., Green, M., et al. (2008). Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 26, 1275–1281.
- Liedtke, C., Hess, K.R., Karn, T., Rody, A., Kiesel, L., Hortobagyi, G.N., Pusztai, L., and Gonzalez-Angulo, A.M. (2013). The prognostic impact of age in patients with triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 138, 591–599.
- Ligue contre le cancer (2015). Le cancer à travers les siècles...

- Lim, E., Metzger-Filho, O., and Winer, E.P. (2012). The natural history of hormone receptor-positive breast cancer. *Oncology (Williston Park)* 26, 688–694, 696.
- Lips, E.H., Mulder, L., Oonk, A., van der Kolk, L.E., Hogervorst, F.B.L., Imholz, A.L.T., Wesseling, J., Rodenhuis, S., and Nederlof, P.M. (2013). Triple-negative breast cancer: BRCAness and concordance of clinical features with BRCA1-mutation carriers. *Br. J. Cancer* 108, 2172–2177.
- Litton, J.K., Scoggins, M., Hess, K.R., Adrada, B., Barcenas, C.H., Murthy, R.K., Damodaran, S., DeSnyder, S.M., Brewster, A.M., Thompson, A.M., et al. (2018a). Neoadjuvant talazoparib (TALA) for operable breast cancer patients with a BRCA mutation (BRCA+). *JCO* 36, 508–508.
- Litton, J.K., Rugo, H.S., Ettl, J., Hurvitz, S.A., Gonçalves, A., Lee, K.-H., Fehrenbacher, L., Yerushalmi, R., Mina, L.A., Martin, M., et al. (2018b). Talazoparib in Patients with Advanced Breast Cancer and a Germline BRCA Mutation. *N Engl J Med* 379, 753–763.
- Loibl, S., O’Shaughnessy, J., Untch, M., Sikov, W.M., Rugo, H.S., McKee, M.D., Huober, J., Golshan, M., von Minckwitz, G., Maag, D., et al. (2018). Addition of the PARP inhibitor veliparib plus carboplatin or carboplatin alone to standard neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer (BrighTNess): a randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 19, 497–509.
- Loncar, J., Popović, M., Zaja, R., and Smital, T. (2010). Gene expression analysis of the ABC efflux transporters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 151, 209–215.
- Longati, P., Jia, X., Eimer, J., Wagman, A., Witt, M.-R., Rehnmark, S., Verbeke, C., Toftgård, R., Löhr, M., and Heuchel, R.L. (2013). 3D pancreatic carcinoma spheroids induce a matrix-rich, chemoresistant phenotype offering a better model for drug testing. *BMC Cancer* 13, 95.
- Loo, T.W., and Clarke, D.M. (2005). Do drug substrates enter the common drug-binding pocket of P-glycoprotein through “gates”? *Biochem Biophys Res Commun* 329, 419–422.
- Lowenthal, R.M., and Eaton, K. (1996). Toxicity of Chemotherapy. *Hematology/Oncology Clinics* 10, 967–990.
- Luca, A.C., Mersch, S., Deenen, R., Schmidt, S., Messner, I., Schäfer, K.-L., Baldus, S.E., Huckenbeck, W., Piekorz, R.P., Knoefel, W.T., et al. (2013). Impact of the 3D microenvironment on phenotype, gene expression, and EGFR inhibition of colorectal cancer cell lines. *PLoS One* 8, e59689.
- Magalhães, R., Wang, X.W., Gouk, S.S., Lee, K.H., Ten, C.M., Yu, H., and Kuleshova, L.L. (2008). Vitrification successfully preserves hepatocyte spheroids. *Cell Transplant* 17, 813–828.
- Malhotra, G.K., Zhao, X., Band, H., and Band, V. (2010). Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol Ther* 10, 955–960.
- Malorni, L., Shetty, P.B., De Angelis, C., Hilsenbeck, S., Rimawi, M.F., Elledge, R., Osborne, C.K., De Placido, S., and Arpino, G. (2012). Clinical and biologic features of triple-negative breast cancers in a large cohort of patients with long-term follow-up. *Breast Cancer Res Treat* 136, 795–804.

- Mathews, L.A., Cabarcas, S.M., Hurt, E.M., Zhang, X., Jaffee, E.M., and Farrar, W.L. (2011). Increased expression of DNA repair genes in invasive human pancreatic cancer cells. *Pancreas* 40, 730–739.
- Maugeri-Saccà, M., Vigneri, P., and Maria, R.D. (2011). Cancer Stem Cells and Chemosensitivity. *Clin Cancer Res* 17, 4942–4947.
- Maughan, K.L., Lutterbie, M.A., and Ham, P. (2010). Treatment of Breast Cancer. *AFP* 81, 1339–1346.
- Mayer, B., Klement, G., Kaneko, M., Man, S., Jothy, S., Rak, J., and Kerbel, R.S. (2001). Multicellular gastric cancer spheroids recapitulate growth pattern and differentiation phenotype of human gastric carcinomas. *Gastroenterology* 121, 839–852.
- Mbeunkui, F., and Johann, D.J. (2009). Cancer and the tumor microenvironment: a review of an essential relationship. *Cancer Chemother Pharmacol* 63, 571–582.
- McCart Reed, A.E., Kalinowski, L., Simpson, P.T., and Lakhani, S.R. (2021). Invasive lobular carcinoma of the breast: the increasing importance of this special subtype. *Breast Cancer Res* 23.
- McGrath, J., and Trojer, P. (2015). Targeting histone lysine methylation in cancer. *Pharmacology & Therapeutics* 150, 1–22.
- McGrogan, B.T., Gilmartin, B., Carney, D.N., and McCann, A. (2008). Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer. *Biochim Biophys Acta* 1785, 96–132.
- McKnight, J.A. (2003). Principles of chemotherapy. *Clinical Techniques in Small Animal Practice* 18, 67–72.
- McMillin, D.W., Negri, J.M., and Mitsiades, C.S. (2013). The role of tumour–stromal interactions in modifying drug response: challenges and opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 12, 217–228.
- Medina, M.A., Oza, G., Sharma, A., Arriaga, L.G., Hernández Hernández, J.M., Rotello, V.M., and Ramirez, J.T. (2020). Triple-Negative Breast Cancer: A Review of Conventional and Advanced Therapeutic Strategies. *Int J Environ Res Public Health* 17.
- Menasché, P., Termignon, J.L., Pradier, F., and Grousset, C. (1994). Experimental evaluation of Celsior, a new heart preservation solution. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* 8, 207–213.
- Meng, Q. (2003). Hypothermic preservation of hepatocytes. *Biotechnol Prog* 19, 1118–1127.
- Mittler, F., Obeid, P., Rulina, A.V., Haguët, V., Gidrol, X., and Balakirev, M.Y. (2017). High-Content Monitoring of Drug Effects in a 3D Spheroid Model. *Front Oncol* 7, 293.
- Mohamed, A., Krajewski, K., Cakar, B., and Ma, C.X. (2013). Targeted Therapy for Breast Cancer. *The American Journal of Pathology* 183, 1096–1112.

Mondal, P., Jain, D., Aronow, W.S., and Frishman, W.H. (2019). Cardiotoxicity of Cancer Therapies. *Cardiol Rev* 27, 230–235.

Monjaret, F., Fernandes, M., Duchemin-Pelletier, E., Argento, A., Degot, S., and Young, J. (2016). Fully Automated One-Step Production of Functional 3D Tumor Spheroids for High-Content Screening. *J Lab Autom* 21, 268–280.

Moreira, M.P., da Conceição Braga, L., Cassali, G.D., and Silva, L.M. (2018). STAT3 as a promising chemoresistance biomarker associated with the CD44+/high/CD24-/low/ALDH+ BCSCs-like subset of the triple-negative breast cancer (TNBC) cell line. *Exp Cell Res* 363, 283–290.

Morris, G.J., Naidu, S., Topham, A.K., Guiles, F., Xu, Y., McCue, P., Schwartz, G.F., Park, P.K., Rosenberg, A.L., Brill, K., et al. (2007). Differences in breast carcinoma characteristics in newly diagnosed African-American and Caucasian patients: a single-institution compilation compared with the National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *Cancer* 110, 876–884.

Muguruma, M., Teraoka, S., Miyahara, K., Ueda, A., Asaoka, M., Okazaki, M., Kawate, T., Kuroda, M., Miyagi, Y., and Ishikawa, T. (2020). Differences in drug sensitivity between two-dimensional and three-dimensional culture systems in triple-negative breast cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 533, 268–274.

Munteanu, E., Verdier, M., Grandjean-Forestier, F., Stenger, C., Jayat-Vignoles, C., Huet, S., Robert, J., and Ratinaud, M.-H. (2006). Mitochondrial localization and activity of P-glycoprotein in doxorubicin-resistant K562 cells. *Biochem Pharmacol* 71, 1162–1174.

N. Marieb, E., Hoehn, K., and Moussakova, L. (2010). *Anatomie et physiologie humaines : Adaptation de la 9e édition américaine.*

Nabholtz, J.M., Abrial, C., Mouret-Reynier, M.A., Dauplat, M.M., Weber, B., Gligorov, J., Forest, A.M., Tredan, O., Vanlemmens, L., Petit, T., et al. (2014). Multicentric neoadjuvant phase II study of panitumumab combined with an anthracycline/taxane-based chemotherapy in operable triple-negative breast cancer: identification of biologically defined signatures predicting treatment impact. *Ann Oncol* 25, 1570–1577.

Nass, S.J., Rothenberg, M.L., Pentz, R., Hricak, H., Abernethy, A., Anderson, K., Gee, A.W., Harvey, R.D., Piantadosi, S., Bertagnolli, M.M., et al. (2018). Accelerating anticancer drug development - opportunities and trade-offs. *Nat Rev Clin Oncol* 15, 777–786.

Nedeljković, M., and Damjanović, A. (2019). Mechanisms of Chemotherapy Resistance in Triple-Negative Breast Cancer-How We Can Rise to the Challenge. *Cells* 8.

Noh, J.M., Choi, D.H., Huh, S.J., Park, W., Yang, J.H., Nam, S.J., Im, Y.H., and Ahn, J.S. (2011). Patterns of recurrence after breast-conserving treatment for early stage breast cancer by molecular subtype. *J Breast Cancer* 14, 46–51.

Nunes, A.S., Barros, A.S., Costa, E.C., Moreira, A.F., and Correia, I.J. (2019a). 3D tumor spheroids as in vitro models to mimic in vivo human solid tumors resistance to therapeutic drugs. *Biotechnol. Bioeng.* 116, 206–226.

- Nunes, A.S., Costa, E.C., Barros, A.S., de Melo-Diogo, D., and Correia, I.J. (2019b). Establishment of 2D Cell Cultures Derived From 3D MCF-7 Spheroids Displaying a Doxorubicin Resistant Profile. *Biotechnol J* 14, e1800268.
- O'Connor, C.J., Chen, T., González, I., Cao, D., and Peng, Y. (2018). Cancer stem cells in triple-negative breast cancer: a potential target and prognostic marker. *Biomark Med* 12, 813–820.
- Oger, A.-S., Boukerrou, M., Cutuli, B., Champion, L., Rousseau, E., Bussi eres, E., Raro, P., and Classe, J.-M. (2015). Le cancer du sein chez l'homme : approche épidémiologique, diagnostique, et thérapeutique :  tude multicentrique rétrospective à propos de 95 cas. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 43, 290–296.
- Okuma, H.S., and Yonemori, K. (2017). BRCA Gene Mutations and Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibitors in Triple-Negative Breast Cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1026, 271–286.
- Oplustil O'Connor, L., Rulten, S.L., Cranston, A.N., Oedra, R., Brown, H., Jaspers, J.E., Jones, L., Knights, C., Evers, B., Ting, A., et al. (2016). The PARP Inhibitor AZD2461 Provides Insights into the Role of PARP3 Inhibition for Both Synthetic Lethality and Tolerability with Chemotherapy in Preclinical Models. *Cancer Res* 76, 6084–6094.
- Oskarsson, T., Batlle, E., and Massagu , J. (2014). Metastatic stem cells: sources, niches, and vital pathways. *Cell Stem Cell* 14, 306–321.
- Ostrowska, A., Gu, K., Bode, D.C., and Van Buskirk, R.G. (2009). Hypothermic storage of isolated human hepatocytes: a comparison between University of Wisconsin solution and a hypothermosol platform. *Arch. Toxicol.* 83, 493–502.
- Padegimas, A., Clasen, S., and Ky, B. (2020). Cardioprotective strategies to prevent breast cancer therapy-induced cardiotoxicity. *Trends Cardiovasc Med* 30, 22–28.
- Park, S.-Y., Choi, J.-H., and Nam, J.-S. (2019). Targeting Cancer Stem Cells in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancers (Basel)* 11.
- Paterson, J.K., and Gottesman, M.M. (2007). P-GLYCOPROTEIN IS NOT PRESENT IN MITOCHONDRIAL MEMBRANES. *Exp Cell Res* 313, 3100–3105.
- Peppercorn, J., Perou, C.M., and Carey, L.A. (2008). Molecular subtypes in breast cancer evaluation and management: divide and conquer. *Cancer Invest* 26, 1–10.
- Pereira, B., Chin, S.-F., Rueda, O.M., Vollan, H.-K.M., Provenzano, E., Bardwell, H.A., Pugh, M., Jones, L., Russell, R., Sammut, S.-J., et al. (2016). The somatic mutation profiles of 2,433 breast cancers refines their genomic and transcriptomic landscapes. *Nat Commun* 7, 11479.
- Perou, C.M., Sørlie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslen, L.A., et al. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747–752.
- Petrenko, Y., Chudickova, M., Vackova, I., Groh, T., Kosnarova, E., Cejkova, J., Turnovcova, K., Petrenko, A., Sykova, E., and Kubinova, S. (2019). Clinically Relevant Solution for the Hypothermic Storage and Transportation of Human Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cells Int* 2019, 5909524.

Poggio, F., Bruzzone, M., Ceppi, M., Pondé, N.F., La Valle, G., Del Mastro, L., de Azambuja, E., and Lambertini, M. (2018). Platinum-based neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Ann Oncol* 29, 1497–1508.

Pogoda, K., Niwińska, A., Murawska, M., and Pieńkowski, T. (2013). Analysis of pattern, time and risk factors influencing recurrence in triple-negative breast cancer patients. *Med Oncol* 30, 388.

Post, I.C.J.H., de Boon, W.M.I., Heger, M., van Wijk, A.C.W.A., Kroon, J., van Buul, J.D., and van Gulik, T.M. (2013). Endothelial cell preservation at hypothermic to normothermic conditions using clinical and experimental organ preservation solutions. *Exp Cell Res* 319, 2501–2513.

Pourteimoor, V., Mohammadi-Yeganeh, S., and Paryan, M. (2016). Breast cancer classification and prognostication through diverse systems along with recent emerging findings in this respect; the dawn of new perspectives in the clinical applications. *Tumour Biol* 37, 14479–14499.

Prachayasittikul, V., and Prachayasittikul, V. (2016). P-glycoprotein transporter in drug development. *EXCLI J* 15, 113–118.

Prajoko, Y.W., and Aryandono, T. (2019). The Effect of P-Glycoprotein (P-gp), Nuclear Factor-Kappa B (Nf-kb), and Aldehyde Dehydrogenase-1 (ALDH-1) Expression on Metastases, Recurrence and Survival in Advanced Breast Cancer Patients. *Asian Pac J Cancer Prev* 20, 1511–1518.

Prat, A., Parker, J.S., Karginova, O., Fan, C., Livasy, C., Herschkowitz, J.I., He, X., and Perou, C.M. (2010). Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res* 12, R68.

Prat, A., Pineda, E., Adamo, B., Galván, P., Fernández, A., Gaba, L., Díez, M., Viladot, M., Arance, A., and Muñoz, M. (2015). Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *Breast* 24 Suppl 2, S26-35.

Qu, H., Fang, L., Duan, L., and Long, X. (2014). [Expression of ABCG2 and p-glycoprotein in residual breast cancer tissue after chemotherapy and their correlation with epithelial-mesenchymal transition]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 43, 236–240.

Radijov, V. (1997). *Human Microscopic Anatomy*.

Rakha, E., Ellis, I., and Reis-Filho, J. (2008). Are triple-negative and basal-like breast cancer synonymous? *Clin. Cancer Res.* 14, 618; author reply 618-619.

Rakha, E.A., Elsheikh, S.E., Aleskandarany, M.A., Habashi, H.O., Green, A.R., Powe, D.G., El-Sayed, M.E., Benhasouna, A., Brunet, J.-S., Akslen, L.A., et al. (2009). Triple-negative breast cancer: distinguishing between basal and nonbasal subtypes. *Clin Cancer Res* 15, 2302–2310.

Recasens, A., and Munoz, L. (2019). Targeting Cancer Cell Dormancy. *Trends Pharmacol. Sci.* 40, 128–141.

- Reis-Filho, J.S., Westbury, C., and Pierga, J.-Y. (2006). The impact of expression profiling on prognostic and predictive testing in breast cancer. *J Clin Pathol* 59, 225–231.
- Riffle, S., Pandey, R.N., Albert, M., and Hegde, R.S. (2017). Linking hypoxia, DNA damage and proliferation in multicellular tumor spheroids. *BMC Cancer* 17, 338.
- Robey, R.W., Pluchino, K.M., Hall, M.D., Fojo, A.T., Bates, S.E., and Gottesman, M.M. (2018). Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer. *Nat Rev Cancer* 18, 452–464.
- Robinson, N.J., Picken, A., and Coopman, K. (2014). Low temperature cell pausing: an alternative short-term preservation method for use in cell therapies including stem cell applications. *Biotechnol Lett* 36, 201–209.
- Robson, M., Im, S.-A., Senkus, E., Xu, B., Domchek, S.M., Masuda, N., Delaloge, S., Li, W., Tung, N., Armstrong, A., et al. (2017). Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation. *N Engl J Med* 377, 523–533.
- Rodgers, K.M., Udesky, J.O., Rudel, R.A., and Brody, J.G. (2018). Environmental chemicals and breast cancer: An updated review of epidemiological literature informed by biological mechanisms. *Environ Res* 160, 152–182.
- Roose, T., Chapman, S., and Maini, P. (2007). Mathematical Models of Avascular Tumor Growth. *SIAM Rev.*
- Rouzier, R., Perou, C.M., Symmans, W.F., Ibrahim, N., Cristofanilli, M., Anderson, K., Hess, K.R., Stec, J., Ayers, M., Wagner, P., et al. (2005). Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* 11, 5678–5685.
- Rubinsky, B. (2003). Principles of Low Temperature Cell Preservation. *Heart Fail Rev* 8, 277–284.
- Russel, W., and Burch, R. (1959). *The Principles of humane experimental technique* (London (UK): Universities Federation for Animal Welfare).
- Saias, L., Gomes, A., Cazales, M., Ducommun, B., and Lobjois, V. (2015). Cell-Cell Adhesion and Cytoskeleton Tension Oppose Each Other in Regulating Tumor Cell Aggregation. *Cancer Res.* 75, 2426–2433.
- van der Sandt, I.C., Blom-Roosemalen, M.C., de Boer, A.G., and Breimer, D.D. (2000). Specificity of doxorubicin versus rhodamine-123 in assessing P-glycoprotein functionality in the LLC-PK1, LLC-PK1:MDR1 and Caco-2 cell lines. *Eur J Pharm Sci* 11, 207–214.
- Sarkadi, B., Homolya, L., Szakács, G., and Váradi, A. (2006). Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinnity defense system. *Physiol Rev* 86, 1179–1236.
- Sawaki, M., Shien, T., and Iwata, H. (2019). TNM classification of malignant tumors (Breast Cancer Study Group). *Jpn J Clin Oncol* 49, 228–231.

Schnitzer, E., Pinchuk, I., Bor, A., Fainaru, M., Samuni, A.M., and Lichtenberg, D. (1998). Lipid oxidation in unfractionated serum and plasma. *Chem Phys Lipids* 92, 151–170.

Seidman, A.D. (2001). Gemcitabine as single-agent therapy in the management of advanced breast cancer. *Oncology (Williston Park)* 15, 11–14.

Senkowski, W., Jarvius, M., Rubin, J., Lengqvist, J., Gustafsson, M.G., Nygren, P., Kultima, K., Larsson, R., and Fryknäs, M. (2016). Large-Scale Gene Expression Profiling Platform for Identification of Context-Dependent Drug Responses in Multicellular Tumor Spheroids. *Cell Chem Biol* 23, 1428–1438.

Shah, A.N., and Gradishar, W.J. (2018). Adjuvant Anthracyclines in Breast Cancer: What Is Their Role? *Oncologist* 23, 1153–1161.

Sharma, P. (2016). Biology and Management of Patients With Triple-Negative Breast Cancer. *Oncologist* 21, 1050–1062.

Shibue, T., and Weinberg, R.A. (2017). EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol* 14, 611–629.

Shichi, Y., Sasaki, N., Michishita, M., Hasegawa, F., Matsuda, Y., Arai, T., Gomi, F., Aida, J., Takubo, K., Toyoda, M., et al. (2019). Enhanced morphological and functional differences of pancreatic cancer with epithelial or mesenchymal characteristics in 3D culture. *Sci Rep* 9, 10871.

Sledge, G.W. (2016). Curing Metastatic Breast Cancer. *J Oncol Pract* 12, 6–10.

Sneddon, L.U., Halsey, L.G., and Bury, N.R. (2017). Considering aspects of the 3Rs principles within experimental animal biology. *Journal of Experimental Biology* 220, 3007–3016.

Sørli, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., et al. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10869–10874.

Stebbing, J., and Ngan, S. (2010). Breast cancer (metastatic). *BMJ Clin Evid* 2010.

Stowe, D.F., Camara, A.K.S., Heisner, J.S., Aldakkak, M., and Harder, D.R. (2007). Ten-hour preservation of guinea pig isolated hearts perfused at low flow with air-saturated Lifer solution at 26°C: comparison to ViaSpan solution. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 293, H895–H901.

Sugie, T. (2018). Immunotherapy for metastatic breast cancer. *Chin Clin Oncol* 7, 28.

Syvänen, S., and Eriksson, J. (2012). Advances in PET Imaging of P-Glycoprotein Function at the Blood-Brain Barrier. *ACS Chem Neurosci* 4, 225–237.

Tannenbaum, J., and Bennett, B.T. (2015). Russell and Burch's 3Rs Then and Now: The Need for Clarity in Definition and Purpose. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 54, 120–132.

Theodoulou, F.L., and Kerr, I.D. (2015). ABC transporter research: going strong 40 years on. *Biochem Soc Trans* 43, 1033–1040.

Toft, D.J., and Cryns, V.L. (2011). Minireview: Basal-like breast cancer: from molecular profiles to targeted therapies. *Mol Endocrinol* 25, 199–211.

Trock, B.J., Leonessa, F., and Clarke, R. (1997). Multidrug resistance in breast cancer: a meta-analysis of MDR1/gp170 expression and its possible functional significance. *J Natl Cancer Inst* 89, 917–931.

Troisi, R., Meester, D., Van Den Broecke, C., Cuvelier, C.A., Fiers, T., de Hemptinne, B., and Hesse, U.J. (2003). Functional and structural integrity of porcine pancreatic grafts subjected to a period of warm ischemia and cold preservation with histidine-tryptophan-ketoglutarate (custodiol) or University of Wisconsin solution. *Transplantation* 75, 1793–1799.

Trounson, A.O. (1990). Cryopreservation. *British Medical Bulletin* 46, 695–708.

Tseng, L.M., Hsu, N.C., Chen, S.C., Lu, Y.S., Lin, C.H., Chang, D.Y., Li, H., Lin, Y.C., Chang, H.K., Chao, T.C., et al. (2013). Distant metastasis in triple-negative breast cancer. *Neoplasma* 60, 290–294.

Turriziani, O., Marco, P.D., Antonelli, G., and Dianzani, F. (2000). May the Drug Transporter P Glycoprotein Affect the Antiviral Activity of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Proteinase Inhibitors? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44, 473–474.

U.S. Department of Health and Human Services, F. and D.A. (2020). *In Vitro Drug Interaction Studies - Cytochrome P450 Enzyme- and Transporter-Mediated Drug Interactions Guidance for Industry*.

Vaché, C., Camares, O., De Graeve, F., Dastugue, B., Meiniel, A., Vaury, C., Pellier, S., Leoz-Garziandia, E., and Bamdad, M. (2006). *Drosophila melanogaster* p-glycoprotein: a membrane detoxification system toward polycyclic aromatic hydrocarbon pollutants. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 572–580.

Vache, C., Camares, O., Cardoso-Ferreira, M.-C., Dastugue, B., Creveaux, I., Vaury, C., and Bamdad, M. (2007). A potential genomic biomarker for the detection of polycyclic aromatic hydrocarbon pollutants: multidrug resistance gene 49 in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 1418–1424.

van der Valk, J., Bieback, K., Buta, C., Cochrane, B., Dirks, W.G., Fu, J., Hickman, J.J., Hohensee, C., Kolar, R., Liebsch, M., et al. (2018). Fetal Bovine Serum (FBS): Past - Present - Future. *ALTEX* 35, 99–118.

Valton, E., Amblard, C., Wawrzyniak, I., Penault-Llorca, F., and Bamdad, M. (2013). P-gp expression in brown trout erythrocytes: evidence of a detoxification mechanism in fish erythrocytes. *Sci Rep* 3, 3422.

Valton, E., Amblard, C., Desmolles, F., Combourieu, B., Penault-Llorca, F., and Bamdad, M. (2015). Mini-P-gp and P-gp Co-Expression in Brown Trout Erythrocytes: A Prospective Blood Biomarker of Aquatic Pollution. *Diagnostics (Basel)* 5, 10–26.

- Valton, E., Wawrzyniak, I., Amblard, C., Combourieu, B., Bayle, M.-L., Desmolles, F., Kwiatkowski, F., Penault-Llorca, F., and Bamdad, M. (2017). P-gp expression levels in the erythrocytes of brown trout: a new tool for aquatic sentinel biomarker development. *Biomarkers* 22, 566–574.
- van't Veer, L.J., and Bernards, R. (2008). Enabling personalized cancer medicine through analysis of gene-expression patterns. *Nature* 452, 564–570.
- Vishnukumar, S., Umamaheswaran, G., Anichavezhi, D., Indumathy, S., Adithan, C., Srinivasan, K., and Kadambari, D. (2013). P-glycoprotein expression as a predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Indian J Cancer* 50, 195–199.
- Waghray, D., and Zhang, Q. (2018). Inhibit or Evade Multidrug Resistance P-Glycoprotein in Cancer Treatment. *J Med Chem* 61, 5108–5121.
- Warburg, O., Wind, F., and Negelein, E. (1927). THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *J Gen Physiol* 8, 519–530.
- Ward, J.P., and King, J.R. (1999). Mathematical modelling of avascular-tumour growth. II: Modelling growth saturation. *IMA J Math Appl Med Biol* 16, 171–211.
- Wartenberg, M., Gronczynska, S., Bekhite, M.M., Saric, T., Niedermeier, W., Hescheler, J., and Sauer, H. (2005). Regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in multicellular prostate tumor spheroids by hyperthermia and reactive oxygen species. *Int J Cancer* 113, 229–240.
- Weiswald, L.-B., Bellet, D., and Dangles-Marie, V. (2015). Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia* 17, 1–15.
- Wenzel, C., Riefke, B., Gründemann, S., Krebs, A., Christian, S., Prinz, F., Osterland, M., Golfier, S., Räse, S., Ansari, N., et al. (2014). 3D high-content screening for the identification of compounds that target cells in dormant tumor spheroid regions. *Exp Cell Res* 323, 131–143.
- WHO Classification of Tumors Editorial Board WHO Classification of Tumours 5th Edition - Breast Tumours.
- Wilding, J.L., and Bodmer, W.F. (2014). Cancer cell lines for drug discovery and development. *Cancer Res* 74, 2377–2384.
- Wöckel, A., Albert, U.-S., Janni, W., Scharl, A., Kreienberg, R., and Stüber, T. (2018). The Screening, Diagnosis, Treatment, and Follow-Up of Breast Cancer. *Dtsch Arztebl Int* 115, 316–323.
- Wong, C.H., Siah, K.W., and Lo, A.W. (2019). Estimation of clinical trial success rates and related parameters. *Biostatistics* 20, 273–286.
- Yamagishi, T., Sahni, S., Sharp, D.M., Arvind, A., Jansson, P.J., and Richardson, D.R. (2013). P-glycoprotein mediates drug resistance via a novel mechanism involving lysosomal sequestration. *J. Biol. Chem.* 288, 31761–31771.

- Yeon, S.-E., No, D.Y., Lee, S.-H., Nam, S.W., Oh, I.-H., Lee, J., and Kuh, H.-J. (2013). Application of Concave Microwells to Pancreatic Tumor Spheroids Enabling Anticancer Drug Evaluation in a Clinically Relevant Drug Resistance Model. *PLOS ONE* 8, e73345.
- Yin, L., Duan, J.-J., Bian, X.-W., and Yu, S.-C. (2020). Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Res* 22, 61.
- Yoshida, T., and Shevkoplyas, S.S. (2010). Anaerobic storage of red blood cells. *Blood Transfus* 8, 220–236.
- Yoshida, T., AuBuchon, J.P., Tryzelaar, L., Foster, K.Y., and Bitensky, M.W. (2007). Extended storage of red blood cells under anaerobic conditions. *Vox Sanguinis* 92, 22–31.
- Zaja, R., Klobucar, R.S., and Smital, T. (2007). Detection and functional characterization of Pgp1 (ABCB1) and MRP3 (ABCC3) efflux transporters in the PLHC-1 fish hepatoma cell line. *Aquat. Toxicol.* 81, 365–376.
- Zanoni, M., Piccinini, F., Arienti, C., Zamagni, A., Santi, S., Polico, R., Bevilacqua, A., and Tesei, A. (2016). 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. *Sci Rep* 6, 19103.
- Zanoni, M., Pignatta, S., Arienti, C., Bonafè, M., and Tesei, A. (2019). Anticancer drug discovery using multicellular tumor spheroid models. *Expert Opin Drug Discov* 14, 289–301.
- Zardavas, D., Irrthum, A., Swanton, C., and Piccart, M. (2015). Clinical management of breast cancer heterogeneity. *Nature Reviews Clinical Oncology* 12, 381–394.
- Zhou, T., Hu, M., Pearlman, A., Patton, D., and Rohan, L. (2014). Expression and Localization of P-Glycoprotein, Multidrug Resistance Protein 4, and Breast Cancer Resistance Protein in the Female Lower Genital Tract of Human and Pigtailed Macaque. *AIDS Res Hum Retroviruses* 30, 1106–1116.

Résumé

La résistance des cellules tumorales aux traitements est un processus biologique complexe représentant un défi majeur en Oncologie pour l'optimisation des traitements du cancer. Elle constitue la principale cause d'échec thérapeutique et est souvent associée à un risque important de rechute ou de récurrences tumorales. Dans ce contexte, le groupe « Résistance » faisant partie de l'équipe IMoST (UMR INSERM/UCA 1240) a focalisé ses axes de recherche sur l'étude de la résistance tumorale par le développement d'outils précliniques *in vitro*. Pour ce faire, il utilise le modèle d'étude du Cancer du Sein Triple Négatif (CSTN), un sous-type de cancer du sein particulièrement agressif et souvent sujet au développement de profils résistants. L'un des principaux mécanismes impliqués dans la résistance tumorale est la surexpression basale ou induite de protéines transmembranaires appelées « *MultiDrug Resistance* » (MDR). Ces membres extrêmement ubiquitaires de la superfamille des transporteurs ABC sont impliqués dans la résistance croisée des cellules aux traitements anticancéreux, notamment par efflux extracellulaire d'un large panel de xénobiotiques. Dans ce cadre, le groupe « Résistance » développe des traceurs fluorescents LightSpot® permettant de détecter et quantifier la présence de protéines MDR. La première partie de ces travaux de thèse ont permis de valider l'utilisation de ce type de traceurs pour la détection de la résistance tumorale instaurée par la *Permeability-glycoprotein* (P-gp), une protéine MDR majeure. Notamment, le traceur LightSpot®-FL-1 permet de détecter et quantifier de manière sensible et complète la P-gp, sur des modèles cellulaires 2D et 3D, à l'état frais ou fixé. D'autre part le groupe « Résistance » développe des modèles de sphéroïdes, mimant fidèlement la résistance de microrégions tumorales avasculaires. Ces modèles de cultures cellulaires 3D présentent un fort potentiel pour le *screening* de médicaments à grande échelle. La seconde partie de ces travaux de thèse a permis de développer un concept innovant de préservation de sphéroïdes de CSTN MDA-MB-231, comme alternatif aux techniques conventionnelles de cryopréservation. Ce concept implique de maintenir les sphéroïdes jusqu'à 7 jours dans le milieu OptiPASS®, en anoxie et à 4°C. Les résultats obtenus ont démontré que ces conditions de conservations maintiennent intègres différents paramètres des sphéroïdes, notamment leur croissance, leur viabilité et leur réponse vis-à-vis de différents traitements anticancéreux. Ce protocole de préservation de sphéroïdes pourra notamment permettre d'optimiser leur utilisation, leur transport et leur intégration dans des grandes plateformes de *screening* médicamenteux. L'ensemble de ces travaux de recherche doctorale focalisés sur le développement (1) de traceurs fluorescents de détection des protéines MDR et (2) d'un protocole de conservation de sphéroïdes, sont valorisés par un transfert industriel direct, au sein du consortium BIORCELL3D. Ce dernier créé par la forte collaboration public/privé entre le groupe de « Résistance » et les sociétés BIOPASS et BIOMARQUEURS a permis l'élaboration d'une importante chaîne de valorisation.

Mots Clés : résistance tumorale, modélisation préclinique *in vitro*, Cancer du Sein Triple Négatif, *screening* de médicament à grande échelle, traceurs fluorescents, protéines MDR, P-gp, culture cellulaire 3D, sphéroïde, conservation de sphéroïdes, alternative à la cryopréservation, milieu de culture synthétique.

Abstract

Cancer drug resistance is a complex biological process representing a major challenge in Oncology for the optimization of cancer treatments. It is the main cause of treatment failure and is frequently associated with a significant risk of tumor relapse or recurrence. In this context, the "Résistance" group, part of the IMoST team (UMR INSERM / UCA 1240) has focused its research works on the study of cancer resistance through the development of *in vitro* preclinical tools. For this, this group uses Triple Negative Breast Cancer (CSTN) as study model, a breast cancer subtype particularly aggressive and often prone to the development of resistant profiles. One of the main mechanisms involved in cancer resistance is the basal or induced overexpression of transmembrane proteins called MultiDrug Resistance (MDR). These ubiquitous members of the ABC transporters superfamily are involved in the cellular cross-resistance to many cancer treatments, in particular by extracellular efflux of a large panel of xenobiotics. In this context, the "Résistance" group is developing LightSpot® fluorescent probes to detect and quantify the presence of MDR proteins. The first part of this works allowed to validate the use of this type of probes for the detection of cancer resistance established by the Permeability-glycoprotein (P-gp), a major MDR protein. In particular, the LightSpot®-FL-1 probe enables the sensitive and complete detection and quantification of P-gp, on fresh or fixed 2D and 3D cell models. On the other hand, the "Resistance" group is developing models of spheroids, faithfully mimicking the resistance of avascular tumor micro-regions. These 3D cell culture models have a great potential for high-throughput drug screening. Thus, the second part of this works allowed the development of an innovative concept for the preservation of CSTN MDA-MB-231 spheroids, as an alternative to conventional cryopreservation techniques. This concept involves maintaining spheroids for up to 7 days in OptiPASS® medium, in anoxia and at 4 °C. The results have demonstrated that these storage conditions preserved the integrity of various parameters of the spheroids, in particular their growth, their viability and their response to various anticancer drugs. This protocol for the preservation of spheroids will in particular allow to optimize their use, transport, and integration into large drug screening platforms. All of this doctoral research work focused on the development (1) of fluorescent tracers for the detection of MDR proteins and (2) of a spheroid storage protocol, are enhanced by a direct industrial transfer, within the BIORCELL3D consortium. The latter created by the strong public / private collaboration between the "Resistance" group and the BIOPASS and BIOMARQUEURS companies has enabled the development of an important value chain.

Keywords: cancer drug resistance, *in vitro* preclinical models, Triple Negative Breast Cancer, high-throughput drug screening, fluorescent probes, MDR proteins, P-gp, 3D cell culture, spheroid, spheroids storage, alternative to cryopreservation, synthetic culture medium.