

Table des matières

Résumé de la thèse.....	13
Résumé vulgarisé.....	14
Titre et résumé de la thèse en anglais	15
Résumé vulgarisé en anglais	16
Discipline	17
Mots clefs	17
Intitulés et adresses des laboratoires	17
Table des figures.....	19
Table des tableaux	23
Acronymes et abréviations.....	25
Introduction	27
Partie I : La lectine de <i>Xerocomellus Chrysenteron</i> : Un Nano-objet multifonctionnel.....	27
1. Découverte et Histoire des lectines.....	27
2. Les lectines : des outils biotechnologiques polyvalents	29
3. La lectine de <i>Xerocomellus Chrysenteron</i>	35
Partie II : Carcinomes péritonéaux, Cancer épithélial ovarien, problématiques cliniques et marqueurs associés	45
1. Les carcinomes péritonéaux	45
2. Le cancer épithélial ovarien	52
3. Le microenvironnement tumoral ovarien.....	65
4. Les biomarqueurs protéiques	71
5. Les biomarqueurs glycosidiques	75
6. Evaluations cliniques d’algorithmes prédictifs et de biomarqueurs	80
Partie III : Nanovectorisation, sondes diagnostiques et assistance chirurgicale	83
1. Nanovectorisation et délivrance ciblée de molécules thérapeutiques	83
2. Sondes diagnostiques et assistance chirurgicale intraopératoire.....	92

3. Administration et élimination des nanoparticules	98
4. La nanothéranostique.....	100
Partie IV : Projet de thèse	105
Résultats et Discussion	107
Partie I : Développement d'un test de viabilité cellulaire et d'un modèle murin de carcinose péritonéale ovarienne	107
1. Mise au point d'un test de viabilité basé sur la bioluminescence.....	107
2. Mise au point d'un modèle de carcinose péritonéale ovarienne	112
Partie II : Caractérisation biochimique de la protéine XCL, création de mutants et preuve de concept du confinement et de la délivrance ciblée de molécules thérapeutiques <i>in vitro</i>	119
1. Résumé de l'article, <i>Nanoscale 2019</i>	119
2. A protein nanocontainer targeting epithelial cancers: Rational engineering, biochemical characterization, drug loading and cell delivery	123
3. Docking et Dynamique Moléculaire de 72 molécules thérapeutiques.....	143
4. Délivrance ciblée de molécules thérapeutiques par le nanocontainer dans un modèle cellulaire du cancer épithélial ovarien	147
5. Bilan des résultats (partie II)	157
Partie III : Développement du mutant A38C de la protéine XCL comme nanosonde pour la détection de nodules submillimétriques <i>in vivo</i> et le repérage du marqueur associé sur des coupes histologiques	159
1. Résumé de l'article, <i>Biomaterials 2020</i>	159
2. Development of a near infrared protein nanoprobe targeting Thomsen-Friedenreich antigen for intraoperative detection of submillimeter nodules in an ovarian peritoneal carcinomatosis mouse model	163
3. Extension des applications de la nanosonde A38C-alexa647	189
4. Détection de l'antigène TF sur des coupes histologiques d'exérèses de chirurgies	192
5. Bilan des résultats (partie III)	194

Partie IV : Prévenir l'apparition des rechutes en exploitant la propriété anti-adhésive du nanocontainer	197
1. Mise en évidence de la propriété anti-adhésive de la lectine dans le modèle murin de carcinose péritonéale ovarienne (IGROV-1)	197
2. Influence des endotoxines	200
3. Détermination de la dose d'A38C nécessaire pour prévenir l'implantation de cellules tumorales <i>in vivo</i>	201
4. Bilan des résultats (partie IV)	203
Conclusions générales	205
Perspectives	207
Matériels et Méthodes	209
Protéines recombinantes	209
1. Production et purification	209
2. Marquage des protéines dans le proche infrarouge	210
Culture cellulaire : lignées, produits et réactifs	210
Chargement de molécules dans le nanocontainer A38C	213
Délivrance cellulaire et expériences de dose-réponse	213
Immunofluorescence	215
Cinétique d'entrée du nanocontainer dans les cellules par imagerie de fluorescence	215
Expériences d'endocytose et de dose/réponse	216
Quantification de l'endocytose et évaluation des modifications du cycle cellulaire en cytométrie en flux (FACS)	216
Evaluation de la viabilité cellulaire en bioluminescence	216
1. Vérification de l'influence des composés à tester sur la réaction enzymatique conduisant à l'émission de bioluminescence	216
2. AY-27 Luc	217
3. SKOV-3 Luc	219

Xénogreffes murines, administration de la protéine marquée et suivi de croissance tumorale en imagerie non invasive	220
1. Modèle IGROV-1 Luc GFP.....	220
2. Modèle SKOV-3 Luc GFP	223
3. Essai avec les cellules A-549 Luc GFP.....	224
Imagerie macroscopique de fluorescence sur les tissus tumoraux <i>ex vivo</i>	224
Evaluation de l'index péritonéal	225
1. Détermination de la surface des nodules implantés.....	225
2. Calcul de l'index péritonéal.....	226
Evaluation des ratios signal sur bruit de fond (SNR).....	226
Microscopie confocale et traitements des images de coupes histologiques.....	226
Coloration Hématoxyline et Eosine (H&E) et imagerie	227
Microscopie multiphotonique	227
Immunohistofluorescence sur tissus tumoraux	227
Imagerie confocale : acquisitions et traitement des images.....	228
Marquage de coupes histologiques d'exérèse de chirurgie avec A38C-alexa647.....	228
Dissociation de nodules tumoraux et cytométrie en flux	229
Analyses statistiques.....	230
Bibliographie	233

Résumé de la thèse

Le développement de thérapies ciblées et des techniques d'imagerie est un défi majeur en santé, particulièrement dans les pathologies cancéreuses. Les carcinomes péritonéaux sont habituellement causés par une dissémination de cellules tumorales au sein de la cavité abdominale, ce qui est le cas de 85% des patientes atteintes d'un cancer ovarien et plus de 10% des patients atteints d'un cancer colorectal. Dans les deux cas, les traitements consistent en une chirurgie (cytoréduction), aussi complète que possible, accompagnée de chimiothérapies. L'amélioration de la survie globale des patients passe par le développement de technologies parallèles comme de nouveaux outils diagnostiques pour détecter des implantations précoces dans le péritoine, le blocage de la dissémination de cellules cancéreuses pendant et après la chirurgie, ou encore la combinaison de chimiothérapies et de traitements ciblés intrapéritonéaux.

Ce projet de thèse consiste à aborder ces différents aspects par l'utilisation d'un nanocontainer protéique multifonctionnel. L'objectif est d'optimiser cette protéine, appartenant à la famille des lectines, pour envisager son développement en tant qu'outil théranostique dans le cadre du diagnostic et des traitements de cancers épithéliaux. La lectine de *Xerocomellus chrysenteron*, à l'origine extraite d'un champignon supérieur comestible, présente une forte affinité pour un biomarqueur glycosidique des carcinomes, l'antigène de Thomsen-Friedenreich (antigène TF ou CD176). De plus, la présence d'une large cavité hydratée au centre de cet assemblage protéique (homotétramère) permet d'envisager le confinement et l'adressage spécifique de molécules thérapeutiques à des cellules épithéliales cancéreuses.

Nous avons commencé par établir la preuve de concept de la délivrance ciblée de molécules thérapeutiques dans plusieurs lignées d'adénocarcinomes ovariens humains (OVCAR-3, SKOV-3, IGROV-1). Le marquage de la lectine dans le proche infrarouge a permis de confirmer le mécanisme de délivrance et prouver que la molécule thérapeutique avait bien été endocytée grâce à son confinement dans le nanocontainer. La protéine marquée a également été utilisée pour valider son utilisation comme nanosonde pour la détection de nodules tumoraux submillimétriques dans le péritoine. Cette détection est faite par imagerie de fluorescence *in vivo* dans des modèles précliniques de carcinome péritonéal ovarien préalablement développés à partir de lignées cellulaires. La combinaison des deux propriétés de la protéine (sonde et container) permet d'envisager son utilisation en nanothéranostique intrapéritonéale. Afin de confirmer ce développement prometteur, il sera nécessaire d'établir la preuve de concept sur des modèles murins plus pertinents de la situation clinique développés à partir de tumeurs issues de patientes (Patient Derived Xenografts, PDX).

Résumé vulgarisé

Le développement de thérapies ciblées et de techniques d'imagerie est un défi majeur en santé, en particulier dans les pathologies cancéreuses. Parmi elles, le cancer épithélial ovarien est la maladie gynécologique la plus létale. Aux stades avancés, il évolue en carcinose péritonéale causée par la dissémination de cellules cancéreuses dans la cavité abdominale. Le traitement standard associe une chirurgie à des chimiothérapies. La survie des patientes est faible du fait de récurrences souvent associées à des résistances aux traitements.

Nous proposons le développement d'une protéine multifonctionnelle appartenant à la famille des lectines. A l'origine extraite d'un champignon supérieur comestible, la lectine de *Xerocomellus chrysenteron* possède une cavité qui permet de confiner et transporter des médicaments de manière ciblée car cette protéine a une forte affinité pour un sucre retrouvé à la surface des cellules tumorales. Nous avons optimisé ce nano-objet pour envisager son développement en tant qu'outil théranostique, à savoir la combinaison de la thérapie ciblée et de l'imagerie diagnostique.

Titre et résumé de la thèse en anglais

***Xerocomellus chrysenteron* lectin, a theranostic nanotool for imaging and treatment of epithelial cancers: proof of concept applied to ovarian peritoneal carcinomatosis.**

The development of targeted therapy and imaging tools is a major challenge in human health, particularly in cancer pathologies. Peritoneal carcinomatosis is usually caused by scattering of cancer cells within the abdominal cavity, which is the case for 85% of ovarian cancer patients and more than 10% of colorectal cancer patients. In both cases treatments include a cytoreductive surgery, as complete as possible, and chemotherapies. Patients overall survival improvement can be reach with the development of parallel technologies such as new diagnostic tools to detect early implantations in the peritoneal cavity, agents to block the spreading of cancer cells detached during the surgical procedure, or combining chemotherapies and intraperitoneal targeted drug delivery.

This project involves reaching all those aspects by using a unique multifunctional nanocontainer protein. The aim is to maximize this protein, which belongs to the lectin family, to consider its development as a theranostic tool as part of epithelial cancers diagnostic and treatment. *Xerocomellus chrysenteron* lectin, originally extracted from an edible higher mushroom, has a strong affinity for a carcinoma glycan biomarker, the Thomsen-Friedenreich antigen (TF antigen). Furthermore, a large hydrated inner cavity located in the middle of the tetrameric assembly of the protein led us to consider the containment and specific addressing of therapeutic molecules to epithelial cancerous cells expressing TF antigen.

We first established the proof of concept for the targeted drug delivery of therapeutic molecules in several human ovarian adenocarcinoma cell lines (OVCAR-3, SKOV-3, IGROV-1). The labelling of the lectin in near infrared allowed us to confirm the mechanism implicated in the delivery and prove that the uptake of the molecule within the cells was due to its containment in the nanocontainer. The labelled protein was also used also to validate it as a nanoprobe for the detection of submillimeter nodules in the peritoneal cavity. This detection was made by *in vivo* fluorescence imaging in preclinical models of ovarian peritoneal carcinomatosis developed beforehand using established cell lines. The combination of these two properties of the protein (probe and container) permits to consider its use in intraperitoneal nanotheranostic. To confirm this promising development, it will be necessary to establish the proof of concept for theranostic aspects in mice models closer to clinic situations developed from patients' tumors (patient derived xenografts, PDX).

Résumé vulgarisé en anglais

The development of targeted therapy and imaging tools is a major challenge in human health, particularly in cancer pathologies. Among those, the epithelial ovarian cancer is the most lethal gynecological disease. At advance stages, it progresses to become a peritoneal carcinomatosis caused by the scattering of cancerous cells in the abdominal cavity. The standard treatment combines surgery and chemotherapies. The survival of patients is weak due to many relapses often associated with treatments resistance.

We propose to develop a multifunctional protein belonging to the lectin family. Originally extracted from an edible higher mushroom, *Xerocomellus chrysenteron* lectin possesses an inner cavity allowing drugs to be contained and carried in a targeted manner because the protein has a strong affinity for a sugar found at the surface of cancerous cells. We optimized this nano-object to consider its development as a theranostic tool, meaning the combination of targeted therapy and diagnostic imaging.

Discipline Biotechnologies

Mots clefs Nanocontainer, Nanosonde fluorescente, Théranostic intrapéritonéale, Carcinomes péritonéaux ovariens, Biomarqueur glycosidique, Délivrance ciblée

Intitulés et adresses des laboratoires

Institut de Pharmacologie et Biologie Structurale (**Laboratoire académique**)

Institut de Pharmacologie et Biologie Structurale, IPBS, Université de Toulouse, CNRS (UMR 5089), UPS, 205 Route de Narbonne, BP64182, 31077 Toulouse, France.

Urosphere (**Entreprise**)

Urosphere, Parc technologique du canal, Canal Biotech II, 3 rue des Satellites, 31400 Toulouse, France.

Table des figures

Figure 1 : Potentiel de ciblage des lectines à la surface apicale de cellules épithéliales.....	30
Figure 2 : Première description du Bolet Chrysentera par Pierre Buillard en 1791.....	36
Figure 3 : Alignement des séquences peptidiques d’XCL.....	36
Figure 4 : Immunolocalisation d’XCL.....	37
Figure 5 : Effet de la protéine XCL sur la prolifération cellulaire	38
Figure 6 : Détermination des constantes de liaison de la protéine XCL avec différents motifs glycosidiques	39
Figure 7 : Structure tridimensionnelle de la protéine XCL	40
Figure 8 : Site de liaison à l’antigène TF de la protéine XCL	41
Figure 9 : Une cavité au centre d’une structure homotétramérique	41
Figure 10 : Biodistribution du mutant A38C de la protéine XCL	43
Figure 11 : Schématisation de l’installation de la chimiothérapie hyperthermale intrapéritonéale (CHIP)	45
Figure 12 : Chimiothérapie intrapéritonéale pressurisée par aérosols, PIPAC	46
Figure 13 : La cavité péritonéale et l’espace sous péritonéal.....	47
Figure 14 : Microscopie électronique à balayage de cellules mésothéliales murines et d’un stomate ..	48
Figure 15 : Structure d’une tache laiteuse dans l’omentum.....	49
Figure 16 : Localisation du cancer ovarien et de ses métastases en fonction des stades de la pathologie	53
Figure 17 : Les différents sous-types histologiques de cancer épithélial ovarien	54
Figure 18 : Les différentes cibles moléculaires et voies de signalisation.....	64
Figure 19 : Le microenvironnement tumoral ovarien.....	67
Figure 20 : Utilisation des mucines par les carcinomes.....	73
Figure 21 : Structure de la Mucine 16.....	74
Figure 22 : Représentation schématisée des différents niveaux de glycosylation des Mucines	75
Figure 23 : Rôle des résidus glycosidiques dans le développement et la progression des cancers.....	76
Figure 24 : Voies de synthèse des O-glycanes dans les cellules épithéliales saines et tumorales	78
Figure 25 : Calculs de la sensibilité, spécificité et valeurs prédictives positive (PPV) et négative (NPV) d’un test diagnostique	81
Figure 26 : Plateformes nanothérapeutiques.....	83
Figure 27 : Illustrations des structures de plusieurs nanocages protéiques et les images correspondantes en microscopie électronique à transmission	87
Figure 28 : Ciblage passif et actif de molécules thérapeutiques.....	89

Figure 29 : Illustration des différentes méthodes de chargement d'une molécule dans une nanocage protéique et des fonctionnalisations possibles de ces nanocages pour le chargement ou l'adressage à une cible d'intérêt.....	92
Figure 30 : La fenêtre optique en imagerie in vivo	94
Figure 31 : Nanoparticules émettant dans le NIR.....	96
Figure 32 : Imagerie de fluorescence dans un modèle murin de carcinose péritonéale ovarienne 24h après administration intraveineuse (IV) ou intrapéritonéale (IP) d'une sonde émettant dans le NIR...	99
Figure 33 : La Nanothéranostique	101
Figure 34 : Illustration schématique de l'assemblage d'ATF-PEG-IONP et du chargement de la doxorubicine (Dox) ou du cisplatine (Cis) pour la délivrance ciblée.....	102
Figure 35 : Expériences préliminaires pour la mise au point d'un test de viabilité basé sur la bioluminescence des cellules AY-27 Luc.....	Erreur ! Signet non défini.
Figure 36 : Suivi non longitudinal de la viabilité cellulaire en bioluminescence sur les cellules AY-27 Luc	109
Figure 37 : Validation de la méthode sur les cellules AY-27 Luc	110
Figure 38 : Expériences préliminaires pour la mise au point d'un test de viabilité basé sur la bioluminescence des cellules SKOV-3.....	111
Figure 39: Validation de la méthode sur les cellules SKOV-3.....	111
Figure 40 : Suivi de croissance tumorale en imagerie non invasive de bioluminescence.....	113
Figure 41 : Dissémination péritonéale dans un modèle murin de carcinose péritonéale ovarienne ...	114
Figure 42 : Validation du modèle de carcinose péritonéale ovarienne (1).....	115
Figure 43 : Validation du modèle de carcinose péritonéale ovarienne (2).....	116
Figure 44 : Validation du modèle de carcinose péritonéale ovarienne (3).....	117
Figure 45 : Les deux surfaces d'interaction des interfaces du tétramère.....	120
Figure 46 : Processus de confinement d'une molécule dans la cavité du nanocontainer protéique ...	121
Figure 47 : Les cinq étapes de la Dynamique Moléculaire	144
Figure 48 : Etat de protonation de différentes molécules thérapeutiques d'intérêt à pH4.....	145
Figure 49 : Prédiction in silico du confinement de 72 molécules thérapeutiques par docking et dynamique moléculaire.....	146
Figure 50 : Validation de la perte d'expression de la Mucine 16 par les cellules OVCAR-3 shMUC16, Cinétique d'entrée du nanocontainer et quantification de l'endocytose.....	148
Figure 51 : Détection de l'antigène TF par A38C-alexa647 indépendamment de l'expression de MUC16	150
Figure 52 : Caractérisation de la cinétique d'endocytose d'A38C-alexa647 dans des lignées cellulaires de cancers ovariens.....	151

<i>Figure 53 : Délivrance ciblée de doxorubicine dans 3 lignées d'adénocarcinomes ovariens humains</i>	153
<i>Figure 54 : Délivrance ciblée de mithramycine A (MTM) dans 2 lignées d'adénocarcinomes ovariens humains.....</i>	155
<i>Figure 55 : Délivrance ciblée de bléomycine (Bleo), méthotrexate (MTX) et fludarabine (F-ara-A) dans les cellules OVCAR-3.....</i>	157
<i>Figure 56 : Caractérisation de la cinétique d'endocytose d'A38C-alexa647 dans les carcinomes pulmonaires.....</i>	189
<i>Figure 57 : Permissivité du péritoine: carcinomes péritonéales à partir de carcinomes pulmonaires ..</i>	191
<i>Figure 58 : Caractérisation du marquage de la nanosonde (A38C-alexa647) sur des coupes histologiques d'exérèse de chirurgie provenant d'une patiente atteinte de carcinome péritonéale ovarienne.</i>	193
<i>Figure 59 : Spécificité du marquage de la nanosonde sur des coupes histologiques.....</i>	194
<i>Figure 60 : Suivi non invasif de l'implantation tumorale.....</i>	198
<i>Figure 61 : Quantification de l'implantation tumorale</i>	199
<i>Figure 62 : Suivi non invasif de l'implantation tumorale.....</i>	201
<i>Figure 63 : Quantification de l'implantation tumorale</i>	202
<i>Figure 64 : Evaluation des doubles transductions (exemple des cellules IGROV-1) pour le suivi en imagerie des modèles in vivo.....</i>	211
<i>Figure 65 : Temps de dédoublement des différentes lignées d'adénocarcinomes ovariens humains .</i>	212
<i>Figure 66 : Evaluation de la double transduction des cellules A-549 pour le suivi en imagerie du modèle in vivo</i>	212
<i>Figure 67 : Plan de plaques</i>	218
<i>Figure 68 : Plan de plaques</i>	219
<i>Figure 69: Dispositif pour l'imagerie non invasive de bioluminescence.....</i>	221
<i>Figure 70 : Analyse d'images.....</i>	222
<i>Figure 71 : Stratégies de « gating » FACS.....</i>	230

Table des tableaux

<i>Tableau 1 : Brève histoire de Lectinologie.....</i>	<i>28</i>
<i>Tableau 2 : Essais cliniques publiés entre 2012 et 2018 démontrant l'efficacité des PARPi comme traitement de maintien dans le cancer ovarien.....</i>	<i>62</i>
<i>Tableau 3 : Essais cliniques de phase III en cours évaluant des inhibiteurs de points de contrôles immunitaires en combinaison avec des PARPi et des chimiothérapies.....</i>	<i>65</i>
<i>Tableau 4 : Groupes pour les expériences de validation d'un test de viabilité basé sur la bioluminescence (1).....</i>	<i>217</i>
<i>Tableau 5 : Groupes pour les expériences de validation d'un test de viabilité basé sur la bioluminescence (2).....</i>	<i>219</i>
<i>Tableau 6 : Calibration de la caméra du microscope de fluorescence</i>	<i>225</i>
<i>Tableau 7 : Attribution et calcul de scores pour obtenir l'index péritonéal</i>	<i>226</i>

Acronymes et abréviations

A38C	Alanine mutée en cystéine en position 38 de la séquence peptidique d'XCL	EIS	Spectroscopie d'Impédance Electrochimique
ABL	<i>Agaricus bisporus Lectin</i>	ECT	ElectroChimioThérapie
Ag	Antigène	EMA	European Medicines Agency
ALA	5-aminolevulinic acid	EOC	Cancer Epithélial Ovarien
ANOVA	one-way analysis of variance	EPR	Enhanced Permeability and Retention
ANSM	Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé	FACS	Fluorescence-activated cell sorting
ATCC	American Type Culture Collection	F-ara-A	Fludarabine (9-β-D-arabinosyl-2-fluoroadenine)
ATP	Adénosine TriPhosphate	FCS	Fetal Calf Serum
AUC	Area Under Curve	FDA	Food and Drug administration
Bleo	Bléomycine	FGF	Fibroblast Growth Factor
BP	Bandpass	FGS	Fluorescence Guided Surgery
BRCA 1/2	Breast Cancer ½	FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et Obstétrique
BSA	Bovine Serum Albumin	FITC	Fluorescein isothiocyanate
CA125	Cancer Antigen 125	FMOs	fluorescence minus one
CAFs	Cancer-Associated Fibroblasts	FRET	Fluorescence energy transfer
CCMV	Cowpae chlorotic mottle virus	Gal	Galactose
CD	Cluster of differentiation	GalNac	N-acétylgalactosamine
C-dots	Cornell dots	Gem	Gemcitabine
CDs	Cabon dots	HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
CIC	Cancer-Initiating Cells	HCT116	Carcinomes colorectaux humains (lignée cellulaire)
Cis	Cisplatine	HE4	Human Epididymis Protein 4
COSMC	Core 1 β1,3-galactosyl transferase specific molecular chaperone	HeLa	Henrietta Lacks
CPMV	Cowpae mosaïc virus	HGSOC	Cancers ovariens séreux de haut grade (High Grade Serous Ovarian Cancer)
CRS	Chirurgie de cytoréduction (Cyto reductive Surgery)	HIPEC	Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy
CT scan	Computed Tomography scanner (tomodensitométrie)	HPA	Agglutinine d' <i>Helix pomatia</i>
CuAAC	Copper-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition	Hsp	Heat shock protein
DAB	Diaminobenzidine	ICG	Indocyanine green
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole	IFN-γ	Interféron gamma
DESKTOP	Descriptive Evaluation of preoperative Selection KriTeria for Operability	Ig	Immunoglobuline
DMSO	Dimethyl sulfoxide	IHF	Immunohistofluorescence
Doxo	doxorubicine	IL-8	Interleukine 8
DSF	Differential Scanning Fluorimetry	i.p	intrapéritonéal
EC ₅₀	Concentration de principes actifs à laquelle la moitié de l'efficacité maximale est obtenue	IPTG	isopropyl-β- thiogalactopyranoside
ECM	Matrice extracellulaire (Extracellular Matrix)	IRM	Imagerie de Résonance Magnétique
EDTA	acide éthylènediaminetétraacétique	ITC	Isothermal titration calorimetry
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor	KD	constante de dissociation
		LB	Lymphocytes B
		sLea	sialyl-Lewis A
		sLex	sialyl-Lewis X

LGSOC	Cancers ovariens séreux de bas grade (Low Grade Serous Ovarian Cancer)	rec	recombinante
LOH	Loss of heterozygosity	RGD	peptide Arginine-Glycine-Acide aspartique
LPS	Lipopolysaccharides	RMI	Risk of Malignancy Index
LTc	Lymphocytes T cytotoxiques	ROCA	Risk of ovarian Cancer Algorithm
LTh	Lymphocytes T helper	ROI	Region Of Interest
Luc	Luciferase	ROMA	Risk Of Malignancy Algorithm
M	molaire	SATT-TTT	Société d'accélération du transfert technologique-Toulouse Tech Transfer
MD	Molecular Dynamics (Dynamique Moléculaire)	scFv	Single-chain fragment variable
MDSCs	Myeloid-derived suppressor cells	SD	Standard Deviation
MHCII	Major Histocompatibility Complex	SEM	Standard Error of the Mean
MMP	Métalloprotéases matricielles (Matrix MetalloProteinase)	sHSP	small Heat Shock Proteins
MOI	Multiplicity Of Infection	shRNA	short or small hairpin RNA
MSCs	Cellules souches mésenchymateuses (Mesenchymal stem cells)	siRNA	small interfering Ribonucleic Acid
MTM	Mithramycine A / Plicamycine	SLE	Surface Ligand Efficiency
MTX	Méthotrexate	SNA-I	Agglutinine de <i>Sambucus nigra</i> de type I
MUC	Mucines	SNR	Signal to noise ratio (rapports signaux sur bruit de fond)
MWCO	Molecular Weight Cut Off	SPARC	Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine
NA	Numerical Aperture	sTn	antigène Tn (Thomsen) sialylé
Ni-NTA	Nickel- Nitrilotriacetic acid	TAMs	Macrophages associés aux tumeurs (Tumor-Associated Macrophages)
NK	cellules natural killer	TEV	Tobacco Etch Virus
NLS	Nuclear Localization Sequences	TF	antigène de Thomsen-Friedenreich
ns	non significatif	TGF-β	Transforming Growth Factor β
O.C.T	Optimal Cutting Temperature	TML	<i>Tricholoma mongolicum</i> Lectin
PARPi	Polyadenosine 5'diphosphoribose [poly (ADP ribose)] polymerisation Inhibitor	TNFα	Tumor Necrosis Factor alpha
PBS	phosphate buffered saline	TME	Microenvironnement tumoral (Tumor MicroEnvironment)
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor	UEA-I	Agglutinine d' <i>Ulex europeus</i>
PDX	Patient Derived Xenografts	VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
PEG	Polyéthylène Glycol	WD	Working Distance
PFA	paraformaldéhyde	WFDC2	Whey Acidic Four-Disulfide Core proteins
PIPAC	Pressurized Intraperitoneal Aerosol Chemotherapy	WGA	Wheat Germ Agglutinin
PNA	Peanut Agglutinin	wt	wild type
PPC	Carcinomes Primaires du Péritoine (Primary Peritoneal Carcinoma)	XCL	<i>Xerocomus (Xerocomellus) chrysenteron</i> lectin
QDs	Quantum dots		

Introduction

Partie I : La lectine de *Xerocomellus Chrysenteron* : Un Nano-objet multifonctionnel

1. Découverte et Histoire des lectines

Les lectines représentent une très large famille de protéines dont la caractéristique commune est leur capacité à reconnaître et se lier à des motifs glycosidiques. La toute première trace écrite d'une lectine, bien que non identifiée, date de 1860 [1]. L'auteur rapporte la "coagulation" d'une goutte de sang de pigeon lorsqu'elle est mise en présence d'un venin de serpent. Les faits marquant de l'histoire des lectines ont été résumés par Hans-Joachim Gabius et son équipe dans deux revues (Tableau 1, [2,3]). Cette famille de protéines a d'abord été nommée hémagglutinine, ou encore phytohémagglutinine, car les premières étaient toutes extraites de plantes et ont commencé à être étudiées pour leur capacité à agglutiner les globules rouges. La première lectine a été extraite à la fin XIX^e siècle. Il s'agissait de la Ricine qui provenait des graines de ricin (*Ricinus communis*) et était très toxique [4]. Peu après en 1900, Karl Landsteiner, médecin et biochimiste de l'université de Vienne, a fait la découverte des groupes sanguins du système ABO. Il rapporta en 1907 que l'activité d'hémagglutinines, extraites de différentes graines, était différente quand il comparait leur interaction avec le sang de différents animaux. Il en conclut que l'action des phytohémagglutinines était comparable à celles des anticorps [5]. La première hémagglutinine pure, extraite du haricot sabre (*Canavalia ensiformis*), a été obtenue par James B Sumner en 1919 qui l'a cristallisée avec succès, et qu'il appela Concanavoline A [6]. Ce n'est que deux décennies plus tard que Sumner et Howell (1936) rapportèrent que l'agglutination d'érythrocytes par la Concanavoline A était inhibée par le saccharose, démontrant pour la première fois la spécificité des lectines pour les sucres [7]. A la fin des années 1940, William C Boyd [8] et Karl O Renkonen [9] ont fait indépendamment la découverte de la spécificité des hémagglutinines pour les groupes sanguins humains. Ils démontrèrent que des érythrocytes d'un type de groupe sanguin étaient agglutinés par certaines lectines de manière spécifique puisque ces mêmes protéines n'interagissaient pas avec les érythrocytes d'un autre groupe sanguin. Quelques années plus tard Walter JT Morgan et Winifred M Watkins [10] ont démontré que l'agglutination des cellules sanguines de type A par la lectine du haricot de Lima était inhibée par la N-acétylgalactosamine (GalNAc) liée en alpha à une protéine, et celles des cellules sanguines de type O par le L-fucose lié en alpha à une protéine. Ils ont ainsi prouvé que l' α -GalNAc et l' α -L-fucose sont les sucres déterminant des groupes sanguins A et O respectivement. Leurs travaux constituent les premières preuves de la présence de sucres à la surface de cellules et leur potentiel comme marqueur d'identité cellulaire. La

capacité des agglutinines de plantes à distinguer les globules rouges des différents groupes sanguins a conduit Boyd et Shapleigh en 1954 à proposer pour la première fois le nom de Lectines, provenant du Latin *legere* signifiant choisir [11]. En 1965, une découverte d'importance, faite par Joseph C Aub,

1860	Observation of blood "coagulation" by rattlesnake venom (S. W. Mitchell)
1888	Detection of erythrocyte agglutination by protein fractions from castor beans and other plant seeds (H. Stillmark)
1891	Toxic plant agglutinins applied as model antigens (P. Ehrlich)
1898	Introduction of the term "haemagglutinin" or phytohaemagglutinin for plant proteins that agglutinate red blood cells (M. Elfstrand)
1902	Detection of bacterial agglutinins (R. Kraus)
1902	Demonstration that blood "coagulation" by snake venom (later shown to depend on a C-type lectin) observed in 1860 was not caused by blood clotting but by cell agglutination (S. Flexner, H. Noguchi)
1906	Detection of an agglutinin in bovine serum (later characterized as the C-type lectin conglutinin) that acts on activated complement-coated erythrocytes (J. Bordet, F. P. Gay)
1907	Detection of nontoxic agglutinins in plants (K. Landsteiner, H. Raubitschek)
1913	Use of intact cells for the purification of lectins (R. Kobert)
1919	Crystallization of a lectin, concanavalin A (J. B. Sumner)
1936	Precipitation of starch, glycogen, and mucins by concanavalin A and its interaction with the stromata of erythrocytes define the carbohydrate as a ligand (J. B. Sumner, S. F. Howell)
1941	Detection of viral agglutinins (G. K. Hirst)
1947–1948	Detection of lectins specific for human blood groups (W. C. Boyd, K. O. Renkonen)
1952	Carbohydrate nature of blood group determinants proven by lectin-mediated agglutination and its sugar-dependent inhibition (W. M. Watkins, W. T. J. Morgan)
1954	Introduction of the term "lectin" for plant agglutinins, primarily for those that are blood-group specific (W. C. Boyd)
1960	Detection of the mitogenic potency of lectins toward lymphocytes (P. C. Nowell)
1965	Application of affinity chromatography for the isolation of lectins (I. J. Goldstein, B. B. L. Agrawal)
1972	Determination of the amino acid sequence and three-dimensional structure of a lectin, concanavalin A (G. M. Edelman, K. O. Hardman, C. F. Ainsworth et al.)
1972–1977	Discovery of impaired synthesis of a marker for glycoprotein (lysosomal enzymes) routing as the cause of a human disease (mucopolysaccharidosis II) and identification of the marker as Man-6-phosphate, the ligand for P-type lectins (E. F. Neufeld et al.; W. S. Sly et al.)
1974	Isolation of a mammalian Gal/GalNAc-specific lectin from the liver (G. Ashwell)
1978	First conference focusing on lectins and glycoconjugates, termed Interlec (T. C. Bøg-Hansen)
1979	Detection of endogenous ligands for plant lectins (H. Rüdiger)
1983	Detection of the insecticidal action of a plant lectin (L. L. Murdock)
1984	Isolation of lectins from tumors (H.-J. Gabius; R. Lotan, A. Raz)
1985	Discovery of immobilized glycoproteins as pan-affinity adsorbents for lectins (H. Rüdiger)
1987	Introduction of neoglycoconjugates for localization of tissue lectins for tumor diagnosis (H.-J. Gabius et al.)
1989	Detection of the fungicidal action of a plant lectin (W. J. Peumans)
1992–1993	Identification of impaired synthesis of lectin (selectin) ligands by defective fucosylation as the cause for leukocyte adhesion deficiency type II (A. Etzioni et al.)
1995	Structural analysis of a lectin–ligand complex in solution by NMR spectroscopy (J. Jiménez-Barbero et al.)
1996–1998	Detection of differential conformer selection by plant and animal lectins (H.-J. Gabius et al.; L. Poppe et al.)
2001–2002	Advances in lectinology and glycosciences honored by dedication of special issues of <i>Biochim. Biophys. Acta</i> , <i>Biochimie, Biol. Chem.</i> , <i>Cells Tissues Organs</i> , <i>Chem. Rev.</i> , <i>Curr. Opin. Struct. Biol.</i> , <i>J. Agric. Food Chem.</i> (<i>Liener symposium</i>), and <i>Science</i> to these topics

Tableau 1 : Brève histoire de **Lectinologie** [2, 3].

concerna la capacité de la lectine du germe de blé (wheat germ agglutinin, WGA) à agglutiner préférentiellement les cellules cancéreuses [12]. D'autres études ont suivi donnant le premier lien entre les changements de glycosylation à la membrane plasmique et le développement de cancers [13–15]. Les chromatographies d'affinité pour la purification des lectines ont été décrites pour la première fois en 1967 par Irwin J Goldstein and Bipin BL Agrawal avec la purification de la Concanavaline A sur colonne de dextran [16]. Jusqu'au début des années 1970 peu de lectines purifiées avaient été recensées et la majeure partie provenait de plantes.

A ce jour, la plupart des lectines étudiées le sont essentiellement sous forme extraites et purifiées. Très peu de lectines sont disponibles sous forme recombinante, et le cas échéant sont principalement produites chez des hôtes microbiens (bactéries). Dans ce contexte, il est intéressant d'envisager leur utilisation en diagnostic, comme sonde moléculaire pour détecter des glycosylations aberrantes, ou en thérapie [17]. La forme recombinante peut contenir une étiquette (ou tag) en fusion avec la lectine permettant la purification spécifique de la protéine produite sur des

chromatographies d'affinité. Pour autant, cela ne permet pas de s'affranchir des co-purifications d'autres molécules, provenant de l'hôte de production comme les endotoxines bactériennes.

2. Les lectines : des outils biotechnologiques polyvalents

Les lectines appartiennent donc à un groupe hétérogène de protéines se liant aux carbohydrates avec une grande spécificité et une bonne affinité, et pouvant ainsi être utilisées pour l'identification de motifs glycosidiques. Elles ont été isolées de nombreuses sources différentes : virus, bactéries, champignons, algues, animaux et plantes [18]. Les sites de liaison aux sucres de ces protéines vont interagir avec des mono et oligosaccharides de manière réversible, très spécifique et sans activité catalytique, via des liens non covalents impliquant des liaisons hydrogènes, de Van der Waals et des interactions ioniques et hydrophobes [19,20]. Les lectines sont spécifiques de carbohydrates particuliers : mannose, acide sialique, fucose, N-acétylglucosamine, galactose/GalNAc, des sucres plus complexes et des glycoprotéines [21,22]. Elles vont reconnaître ces motifs à la surface des cellules, sur des coupes histologiques et dans des fluides biologiques. Les lectines constituent donc une famille de protéines polyvalentes pouvant être de précieux outils en biotechnologies pour des applications en thérapie et diagnostic [23,24].

a) Applications en thérapie

- **Délivrance de molécules thérapeutiques**

Les techniques de délivrance contrôlée de molécules, comme par exemple avec les liposomes, vont permettre de moduler la durée et la quantité de principes actifs relargués pour produire l'effet escompté. Cependant la majorité de ces systèmes ont un inconvénient majeur, à savoir la passivité de leur ciblage. En revanche, le relargage de molécules médié par l'adhésion de lectines à la membrane cellulaire, via une interaction spécifique avec des motifs glycosidiques, permet de se lier directement aux cellules cibles [25]. Dans ce contexte, les sites de liaison des lectines sont des protéines ou des lipides glycosylés présents à la surface des cellules. Les motifs de glycosylation vont être différents d'une cellule à l'autre et sont souvent altérés dans beaucoup de pathologies. Les cellules tumorales épithéliales par exemple vont présenter des altérations de glycosylation en comparaison de cellules épithéliales saines [26]. Ainsi, les lectines vont interagir différemment en fonction de ces motifs et pouvoir discriminer les tissus auxquels les molécules thérapeutiques doivent être délivrées. Pour être des outils de délivrance ciblée, les lectines doivent présenter une haute spécificité de reconnaissance pour un marqueur et une faible toxicité. Après la liaison, dépendant de leur structure et de leur spécificité, elles vont interagir à la surface des cellules et peuvent être endocytées ou pas. Lorsqu'elles sont internalisées, elles vont emprunter la voie endosomale ou se retrouver directement dans le

cytoplasme (Figure 1, [27]), permettant donc, quand elles sont couplées à une molécule, non seulement un ciblage actif mais aussi une assimilation du principe actif médiée par les cellules [27].

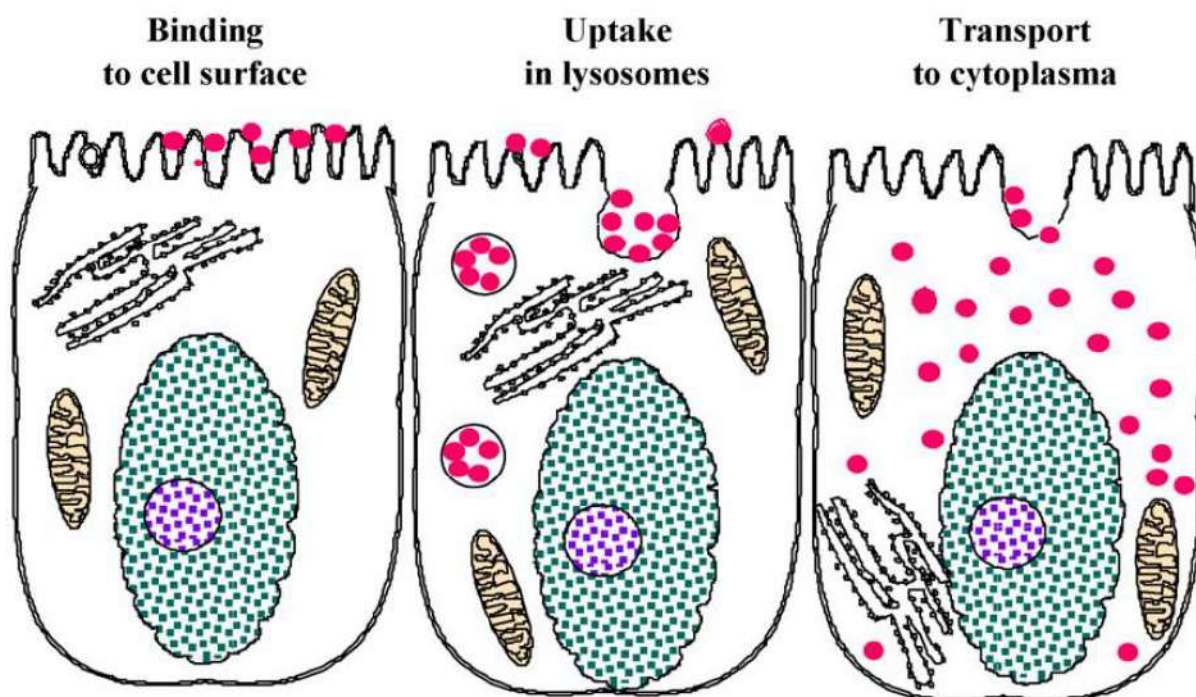


Figure 1 : Potentiel de ciblage des lectines à la surface apicale de cellules épithéliales [27]. Liaison, internalisation et transport intracellulaire (à travers ou en court-circuitant les compartiments endosomaux) de lectines ou de lectines conjuguées à une molécule qui va dépendre de l'interaction entre la protéine et le motif glycosidique.

A titre d'exemple, la durée de l'effet hypoglycémique d'insuline chez des rats diabétiques a été considérablement augmentée par l'administration orale d'insuline encapsulée dans des microparticules fonctionnalisées par des lectines attachées à leurs surfaces, en comparaison d'insuline libre [28]. Cette encapsulation protège l'insuline d'une dégradation protéolytique ou due au pH acide du tractus gastro-intestinal. Les lectines extraites du germe de blé (WGA), avec lesquelles les microparticules ont été fonctionnalisées, se lient à la N-acétylglucosamine et aux acides sialiques, exprimés par les cellules du tractus intestinal, ce qui améliore leur absorption et donc la délivrance d'insuline. Un autre groupe a évalué l'efficacité de liposomes, recouverts d'agglutinines extraites de *Bauhinia purpurea*, comme système de délivrance de molécules thérapeutiques pour le traitement du cancer de la prostate. Ces liposomes sont adressés par les lectines qui sont capables de se lier aux motifs galactosyl de fin de chaînes polysaccharidiques portées par les glycoprotéines membranaires des cellules cancéreuses prostatiques. La doxorubicine encapsulée dans les liposomes fonctionnalisés avec les lectines a inhibé la croissance de tumeurs prostatiques (implantées en sous-cutanée) chez la souris [29].

- **Propriétés anti-cancéreuses**

Certaines lectines vont avoir des effets cytotoxiques sur des cellules cancéreuses qui se traduiront par une inhibition de la prolifération ou l'activation de voies apoptotiques. De plus, ces lectines vont

souvent n'être toxiques qu'envers les cellules tumorales et ne présenter qu'une faible toxicité pour des cellules saines. En effet, elles vont distinguer les modifications de glycosylation à la surface des cellules cancéreuses en comparaison des profils glycosidiques normaux des cellules saines [30]. Par la reconnaissance de leur carbohydrate, ces lectines cytotoxiques vont être endocytées et vont pouvoir altérer la physiologie cellulaire. A titre d'exemple, une lectine isolée des graines d'haricot noir du nord de la Chine se lie à la membrane des cellules HCT116 (carcinomes colorectaux), via les GalNAc exprimés par les glycoprotéines membranaires, avant d'être retrouvée dans le Golgi et les lysosomes dans les 3h qui suivent le traitement de ces cellules. L'endocytose de cette lectine va induire une agrégation de l'appareil de Golgi et donc affecter le transport de protéines du réticulum endoplasmique (RE) vers le Golgi conduisant à une accumulation de protéines dans le RE. Cette endocytose conduit aussi à une malformation des mitochondries et une dépolarisation de la membrane puis à terme la mort cellulaire par apoptose [31].

Parmi des études réalisées *in vivo*, la lectine extraite de *Crataeva tapia*, qui va se lier préférentiellement au glucose plutôt qu'au galactose, a démontré des propriétés antitumorales sur un modèle murin de sarcome sans pour autant s'avérer toxique pour les animaux (toxicité évaluée par administration orale) [32].

Une lectine recombinante (*rec*) est à ce jour évaluée en clinique. Il s'agit d'une lectine cytotoxique et immunomodulatrice issue du gui européen (*Viscum album*), nommée Aviscumine. La structure de l'Aviscumine *rec* comporte une chaîne A cytotoxique, N-glycosidase inactivant l'ARN ribosomal 28S et conduisant à une inhibition de la traduction et de la synthèse protéique, et une chaîne B portant le site de liaison au motif glycosidique (α -2,6-sialyllactosamine) et responsable de son endocytose dans les cellules [33]. Ainsi, après avoir présenté des inhibitions de la croissance tumorale sur plusieurs modèles animaux [34–36], son efficacité en thérapie anti-cancéreuse a été évaluée dans des essais cliniques de phases I/II suite à des administrations intraveineuses et sous-cutanées [37–39]. Ces études ont prouvé que l'Aviscumine *rec* induit une stabilisation de la maladie pour plusieurs tumeurs solides chez des patients réfractaires aux autres traitements, avec une toxicité tolérable aux doses induisant une modulation de la réponse immunitaire. Celle-ci est médiée par la stimulation de l'activité antitumorale des cellules « natural killer » (NK) [40].

- **Modulation de la réponse immunitaire**

De nombreuses lectines présentent des effets immunomodulateurs tels que l'induction de réponses immunitaires par les lymphocytes T « helper » (Th). Les lectines de champignons, entre autres, sont présentées comme des modulateurs potentiels de la réponse immunitaire. Par exemple, les lectines TML-1 et TML-2, extraites du champignon *Tricholoma mongolicum*, induisent une réponse de type Th1 à travers l'activation des macrophages chez des souris injectées quotidiennement en intrapéritonéal

pendant une semaine. Elles stimulent également la production d'ion nitrite et de TNF (Tumor Necrosis Factor) par les macrophages. De plus, ces deux lectines vont favoriser l'activation de macrophages *in vivo* induisant une inhibition de la croissance tumorale dans la cavité péritonéale d'un modèle murin de sarcome [41]. Ces effets sont probablement la conséquence de la liaison de ces protéines à des motifs glycosidiques à la surface des macrophages modulant ainsi la réponse immunitaire.

Il a également été rapporté que des lectines peuvent jouer un rôle dans la cicatrisation en influençant la réponse inflammatoire et la production de cytokines [42]. Dans ce contexte, ces protéines de sources naturelles pourraient être très efficaces pour favoriser la re-épithélialisation et la cicatrisation, particulièrement chez des patients présentant des problèmes de plaies chroniques comme les diabétiques [24].

- **Propriétés antifongique et antiparasitaire**

Des études récentes ont démontré le potentiel de lectines reconnaissant des motifs glycosidiques variés, comme agents antifongique et antiparasitaire. A titre d'exemple, des lectines de plantes étudiées pour leur potentiel antifongique vont inhiber la croissance et empêcher la germination des spores d'espèces phytopathogéniques [43,44].

Les lectines Concanavalline A (ConA) et *Glycine max*, également extraites de plantes, peuvent inhiber la liaison puis l'invasion d'un parasite (*Enteromyxum scophthalmi*) dans l'épithélium intestinal de poissons turbots. Les auteurs suggèrent que ces lectines agissent par compétition en bloquant la reconnaissance de résidus glycosidiques, GalNAc et galactose (*Glycine max*) et mannose/glucose (ConA), cruciale pour l'interaction entre le parasite et les cellules intestinales [45].

Il a aussi été rapporté l'activité larvicide de lectines, extraites de *Myracrodruon urundeuva*, contre le moustique *Aedes aegypti*, connu pour être le vecteur de virus provoquant la dengue, le chikungunya ou encore le zika [46].

b) Applications en diagnostic

- **Marqueurs histochimiques**

Des perturbations dans l'environnement cellulaire en lien avec une pathologie (inflammation, infection, désordre immunologique, néoplasie) déclenchent souvent des altérations de glycosylation des protéines membranaires comme des fucosylations, des sialylations ou le démasquage de structures glycosidiques [47]. Il est possible d'utiliser des lectines comme marqueurs dans des analyses histochimiques pour mettre en évidence des différences de liaison entre des tissus normaux et cancéreux [48]. La révélation du marquage se fait généralement par addition de diaminobenzidine (DAB) et de peroxyde d'hydrogène sur des lectines conjuguées à la peroxydase. Cette technique est

souvent utilisée en recherche, diagnostic et pronostic de maladies induisant des altérations de glycosylation comme le cancer.

Le profil glycosidique de cellules cancéreuses du sein et du colon, métastatiques ou non, a été analysé par histochimie avec l'agglutinine d'*Helix pomatia* (HPA) et des sélectines (molécules d'adhésion cellulaire). HPA marque uniquement les cellules métastatiques. Ainsi les propriétés de liaison de certaines lectines peuvent s'avérer utiles pour discriminer des phénotypes de cellules cancéreuses [49].

Dans le cancer ovarien, l'agglutinine d'*Ulex europeus* (UEA-I) est utilisée comme marqueur pronostic. L'intensité du marquage d'UEA-I sur des coupes histologiques augmente avec l'avancement des stades de la tumeur. Cette lectine reconnaissant le fucose, il a été suggéré que l'expression de ce sucre à la membrane des cellules cancéreuses augmente au fur et à mesure de la progression de la maladie [50]. La frutaline, une lectine de plante issue de graines d'*Artocarpus incisa* et se liant à l' α -D-galactose, a été évaluée pour le diagnostic du cancer de la prostate. Des carcinomes de prostate et des tissus prostatiques hyperplasiques bénins ont été analysés en comparant le marquage de la frutaline native et de la frutaline *rec*. La forme native se lie préférentiellement aux carcinomes en comparaison des tissus hyperplasiques, alors que la frutaline *rec* ne se lie qu'aux tissus tumoraux [51]. Comme évoqué plus haut, des différences peuvent exister entre la forme recombinante et extraite d'une lectine. Dans cet exemple, la frutaline *rec* est plus spécifique que la forme native.

La Concanavaline A et l'UEA-I ont été conjuguées à des quantum dots pour le marquage de motifs glycosidiques sur du tissu mammaire dépendant respectivement des spécificités de chacune pour l' α -D-mannose et le L-fucose. Ce marquage permet de discriminer des tissus normaux et tumoraux grâce à l'expression et la distribution différentielles des motifs glycosidiques [52].

Les lectines utilisées dans ces analyses histochimiques sont donc des outils très utiles pour le diagnostic et le pronostic des cancers.

- **Biocapteurs pour la détection de maladies**

Des analyses biologiques utilisant des lectines comme biocapteurs ont été développées pour la détection de glycoprotéines circulantes ou membranaires [53]. Ces systèmes sont basés sur la conversion de l'interaction de lectines avec leur carbohydrate en un signal mesurable pour permettre la quantification de biomarqueurs. Ces signaux peuvent être électrochimiques, optiques, massiques, ou encore thermiques, cependant les biocapteurs électrochimiques sont les plus développés car ils sont rapides, pratiques, peu coûteux et faciles d'utilisation [53,54]. Ces dispositifs vont permettre le criblage de pathogènes et le diagnostic de maladies grâce à la détection de biomarqueurs glycosidiques.

Par exemple, un biocapteur électrochimique, utilisant la Concanavoline A et des électrodes modifiées avec des nanoparticules d'or, a été décrit pour la détection de glycoprotéines dans le sérum de patients infectés par le virus de la dengue [55].

Les agglutinines de *Sambucus nigra* de type I (SNA-I), spécifiques des acides sialiques et immobilisées sur une surface (or), constituent un biocapteur ultrasensible. Celui-ci a été développé pour quantifier la fétuine et l'asialofétuine, des glycoprotéines sialylées ou non portant un glycotope. Ce biocapteur utilise la spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS) et permet la détection de ces glycoprotéines à des concentrations de l'ordre du femto-molaire. Cette sensibilité permet d'envisager son utilisation pour le diagnostic de maladies associées à des sialylations aberrantes de glycoprotéines [56]. Dans des échantillons biologiques, la lectine SNA-I est aussi utilisée pour la détection de l'antigène Tn sialylé (sTn), un monosaccharide coiffé d'acide sialique exprimé sur des glycoprotéines dans les carcinomes. La SNA-I est immobilisée sur une surface faite d'électrodes en or et mise en présence de sérums provenant de donneurs sains et de patients atteints d'un carcinome. La quantification par EIS de ce biocapteur permet de distinguer les sérums d'individus sains et malades [57].

L'évaluation de la présence de mannose et d'acide sialique à la surface de cellules normales et cancéreuses peut être effectuée avec un biocapteur électrochimique fait de Concanavoline A et de SNA-I. Le mannose, détecté par la Concanavoline A, va être exprimé par les cellules normales et cancéreuses alors que les acides sialiques vont être plus nombreux à la surface des cellules tumorales. Ce biocapteur est donc également très prometteur pour le criblage de l'expression de glycanes à la surface des cellules dans le cadre d'un diagnostic précoce et de suivi de traitement [58].

Les différents exemples présentés ci-dessus permettent de faire ressortir certaines informations essentielles pour le développement d'une lectine permettant la détection de motifs glycosidiques particuliers et les applications en thérapie qui peuvent en découler. Tout d'abord, les lectines sous forme extraites et purifiées peuvent ne pas être entièrement pures. Un autre composé présentant une certaine affinité pour la lectine peut avoir été co-purifié et engendrer une compétition pour la reconnaissance spécifique du marqueur glycosidique par la lectine d'intérêt, ou agir comme un inhibiteur non compétitif faisant écran. Des effets biologiques dus au contaminant co-purifié, et non à la lectine, peuvent également être observés. La production d'une lectine sous forme recombinante permet de s'affranchir de ce paramètre puisqu'une fois le clonage et la production effectués, la purification spécifique de lectine est assurée par des colonnes d'affinité. Cependant, des contaminants provenant de l'hôte dans lequel la lectine est produite, comme les endotoxines pour une production en système bactérien par exemple, peuvent être retrouvés en sortie de purification.

Par ailleurs, l'utilisation de lectines comme marqueurs histochimiques ou biocapteurs démontrent qu'il est possible de les marquer, avec de la peroxidase, ou encore avec un fluorophore ou un isotope radioactif, sans gêner la reconnaissance du sucre.

Enfin, nous avons vu que des lectines utilisées in vivo peuvent être administrées de différentes manières dépendant de l'effet thérapeutique recherché.

3. La lectine de *Xerocomellus Chrysenteron*

a) Propriété insecticide, purification, et clonage de la lectine recombinante XCL

Les champignons supérieurs représentent une source potentielle de molécules susceptibles d'être utilisées dans différents domaines. A l'origine de ce travail, le groupe de Biochimie des protéines du Laboratoire de Synthèse et Physicochimie de Molécules d'Intérêt Biologique (L. Chavant, A. Klæbe, L. Paquereau et D. Fournier) cherchait à exploiter cette source en phytoprotection. Les résultats obtenus indiquaient que l'essentiel de l'activité insecticide de 14 espèces de champignons testées était dû à la présence de protéines. Certaines d'entre elles appartenaient à des familles potentiellement actives contre les insectes, comme les lectines [59] qui étaient facilement détectables. Le groupe s'est donc focalisé sur l'extraction des activités lectines les plus toxiques à partir de quatre espèces : *Leospista nuda*, *Xerocomellus chrysenteron*, *Clitocybe nebularis* et l'*Amanite phalloïde*.

La purification de ces protéines à partir des extraits bruts a été réalisée sur colonne de lactosyl-sépharose [60]. La toxicité des lectines purifiées a ensuite été testée sur *D. melanogaster* et c'est la lectine de *Xerocomellus chrysenteron* (XCL) qui présentait la plus forte toxicité [61]. Des tests d'agglutination ont démontré que la liaison d'XCL est inhibée par le D-galactose, le lactose (β -D-galactopyranosyl (1→4) D-glucose) et la N-acétylgalactosamine.

Pierre Buillard laissa la première trace écrite de ce champignon qu'il présenta comme le Bolet Chrysenteron à la fin du XVIII^e siècle (Figure 2). Le nom de *Xerocomus chrysenteron* lui est donné en 1888 par Lucien Quélet [62], pour être finalement renommé *Xerocomellus chrysenteron* en 2008 [63].



Figure 2 : Première description du *Bolet Chrysenterum* par Pierre Buillard en 1791.

Pour cloner le gène de la lectine XCL, la stratégie décrite dans l'article publié par l'équipe en 2003 [64] a été utilisée. En bref, après purification des extraits protéiques sur colonne de lactosyl-sépharose, migration et purification de la bande correspondante à XCL sur gel SDS-PAGE, et digestion trypsique, un micro séquençage peptidique a été effectué en spectrométrie de masse. Après purification de l'ARN total d'XCL, deux ADNc pleine taille ont été isolés, sachant qu'il existe au moins une troisième isoforme puisqu'un peptide supplémentaire avait été obtenu lors du séquençage (Figure 3).

XCL1	1	MSYSITLRVYQTNDRGYFSIVEKTVWHFANGGTWSEANGAHTLTQGGSGTSGVLRFLST
XCL2	1	MSYSITLHVYQRNPARGFFHVVEQTVWHYANGGTWSEANGALTLTQGGSGTSGVIRFLSD
XCL3		GYFSIVESTV
XCL1	61	KGERITVAVGVHNYKRWCDVVTGLKPDDETALVINPQYYNNGGRDYVREKQLAEYSVTSAI
XCL2	61	KGERITVAVGVHNYKRWCDVVTGLKPDQETALVINGEYYNEGKRAYAREKQLAEYSVTSAV
XCL1	121	GTKVEVVYTVAEGNNLEANVIFS
XCL2	121	GTKVEVVYTVAEGNNLEKANVIG

Figure 3 : Alignement des séquences peptidiques d'XCL, et d'une troisième isoforme issue d'un peptide supplémentaire, obtenues par micro séquençage peptidique.

L'isolement de l'ADNc a conduit à l'obtention de la protéine recombinante correspondante (XCL1). Plusieurs systèmes d'expression ont été testés en parallèle (baculovirus, cellules mammifères, *E. coli*) conduisant tous à la production de la protéine XCL rec. La fusion N-terminale d'une étiquette (ou tag) de six histidines permet la purification de la protéine XCL sur colonne de nickel (Ni-NTA). Dans cette construction le tag peut être retiré par protéolyse par la TEV [65]. La comparaison de la séquence d'XCL avec les banques de données a révélé qu'elle présente une forte homologie avec la lectine d'*Agaricus*

bisporus (ABL). Le motif glycosidique reconnu (antigène de Thomsen-Friedenreich) ainsi que le mécanisme d'endocytose faisaient partie des données publiées sur la protéine ABL [66].

A ce stade du travail, l'équipe a décidé d'orienter leur recherche sur le mécanisme d'internalisation cellulaire d'XCL ainsi que sur la détermination de sa structure puisqu'aucune structure des membres de cette famille de lectine n'avait encore été résolue par cristallographie.

b) Mécanisme d'internalisation cellulaire d'XCL

Deux articles de l'équipe [67,68] décrivent les principaux résultats obtenus sur le mécanisme et la cinétique de pénétration cellulaire d'XCL, sur la possibilité d'utiliser cette lectine pour faciliter la pénétration cellulaire d'autres composés et ainsi que sur son effet antiadhésif dose-dépendant sur des cellules adhérentes.

La localisation subcellulaire des lectines XCL et ABL a toujours été décrite comme étant associée au système vésiculaire (vésicules d'endocytoses, endosomes, lysosomes, corps multivésiculaires, pinosomes) [67,69]. Le mécanisme principal d'internalisation d'XCL passe par une endocytose clathrine dépendante. Dans des expériences effectuées sur les cellules HeLa, il a été observée une fixation d'XCL au niveau membranaire, puis une internalisation rapide avec un marquage périnucléaire et enfin une localisation dans les endosomes tardifs (Figure 4, [67]).

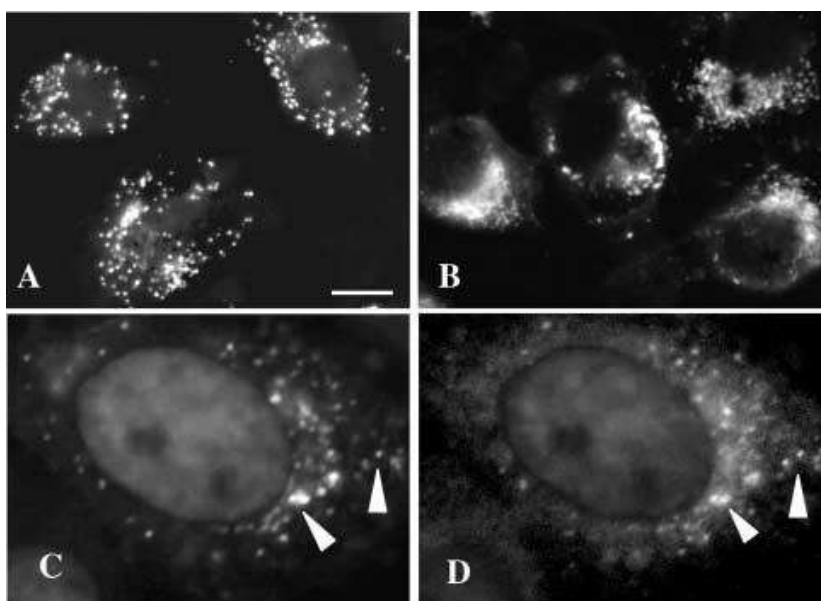


Figure 4 : Immunolocalisation d'XCL dans des cellules HeLa après 30min (A) et 4h (B) d'incubation [67]. Les cellules ont été incubées en présence de 70µg/mL d'XCL. Barre taille = 10µm. (C) et (D) Co-localisation d'XCL et de la Cathepsine D dans les cellules HeLa traitées 16h avec 17µg/mL d'XCL. Un anticorps secondaire (goat anti-rabbit IgG) couplé à la Rhodamine a été utilisé pour la détection d'XCL (C), et un autre anticorps secondaire (goat anti-mouse IgG) couplé au FITC pour la détection de la Cathepsine D (D). Les flèches montrent des exemples de zone de co-localisation entre les deux protéines.

Par ailleurs, XCL ne présente aucun effet sur la vitesse de division de différents types cellulaires. Il apparaît cependant qu'XCL bloque la division cellulaire par perte d'adhérence des cellules au substratum, lorsqu'il s'agit de cellules adhérentes (HeLa et 3T3), et de manière dose-dépendante (Figure 5, [68]).

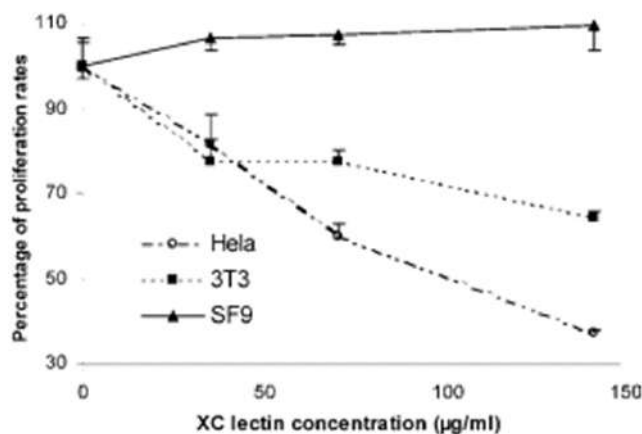


Figure 5 : Effet de la protéine XCL sur la prolifération cellulaire [68]. Expérience de dose/réponse pour déterminer le taux de prolifération de cellules HeLa, NIH-3T3 et Sf9 après 2 jours de culture en présence de différentes concentrations d'XCL.

Ces travaux ont été abordés par comparaison aux caractéristiques générales déjà décrites pour d'autres lectines, en particulier ABL. L'équipe a utilisé ces données comme témoin positif dans leurs expériences, bien qu'elles ne soient ni présentées, ni citées dans leurs deux articles mentionnés précédemment. Compte-tenu de la forte homologie entre XCL et ABL (structures primaires, spécificité de liaison identique), il paraissait fort probable que les comportements d'ABL au niveau cellulaire soient retrouvés pour XCL. Pourtant, cela n'a pas été le cas concernant le rôle antiprolifératif décrit pour ABL sur des cellules cancéreuses du colon (HT29), ainsi que son effet sur le transport NLS dépendant [69,70]. En revanche, l'ensemble des données obtenues supporte l'idée que le comportement d'XCL et d'ABL sur différents types cellulaires est très similaire en ce qui concerne leur cinétique de fixation et de pénétration cytoplasmique.

Une explication possible pour les différences de résultats observés entre ABL et XCL réside dans l'origine des lectines utilisées. En effet, l'ABL est commerciale (Sigma) et a été obtenue par extraction du champignon de Paris selon le protocole décrit par C. Presant [71]. Cette purification conduit à l'obtention d'un mélange contenant au moins deux isoformes de cette lectine. Ceci n'a rien de surprenant et il est très probable que le comportement de ces isoformes soit identique comme cela semble être le cas pour XCL. Rien n'exclut cependant qu'un composé quelconque soit co-purifié avec ces isoformes et qu'il puisse être, seul ou en association avec ABL, responsable de l'effet décrit sur le transport NLS dépendant [69], qui n'a jamais été observé avec la protéine XCL *rec*.

L'incapacité à reproduire ces résultats ne remet pas nécessairement en cause la validité des expériences faites. Il paraît cependant étonnant que les expériences décrites avec l'ABL extraite n'aient pas été réitérées avec l'ABL *rec*. L'ADNc d'ABL est cloné depuis 1995 [72] et ces protéines se produisent

facilement chez *E. coli*. Seule l'obtention d'ABL en système hétérologue pourrait permettre d'exclure un effet lié à un contaminant d'extraction.

c) Liaison aux sucres et structure tridimensionnelle de la protéine XCL

Les constantes d'affinité d'XCL pour certains sucres ainsi que la résolution de la structure tridimensionnelle d'XCL ont fait l'objet de deux articles [73,74].

• Liaison au motif glycosidique

La détermination par microcalorimétrie isotherme de titration (Isothermal titration calorimetry, ITC) des constantes de liaison d'XCL à différents motifs saccharidiques a donné des résultats attendus pour ce type d'interaction. Des constantes de dissociation de l'ordre du millimolaire (5mM) pour les monosaccharides, comme la N-acétylgalactosamine, imposent l'utilisation de concentrations relativement élevées en protéine pour réaliser l'expérience. La concentration d'XCL utilisée était de l'ordre de 0,4mM, soit environ 6mg.mL⁻¹, c'est-à-dire proche de la limite de solubilité de la protéine, l'équipe n'ayant jamais pu dépasser 7mg.mL⁻¹ (précipitation d'XCL au-delà). Pour des sucres comme le lactose ou le galactose, ces expériences ont donc été impossibles à réaliser. Vis-à-vis du disaccharide reconnu spécifiquement par XCL, l'antigène de Thomsem-Friedenreich (TF ; β -D-Gal(1-3)-D-GalNac), seul ou ancré sur la Fétuine, les constantes de dissociation sont de l'ordre du micromolaire, précisément 9,4 μ M pour l'antigène TF seul, puis 1,7 et 0,4 μ M respectivement pour la Fétuine et l'Asialofétuine (Figure 6, [73]).

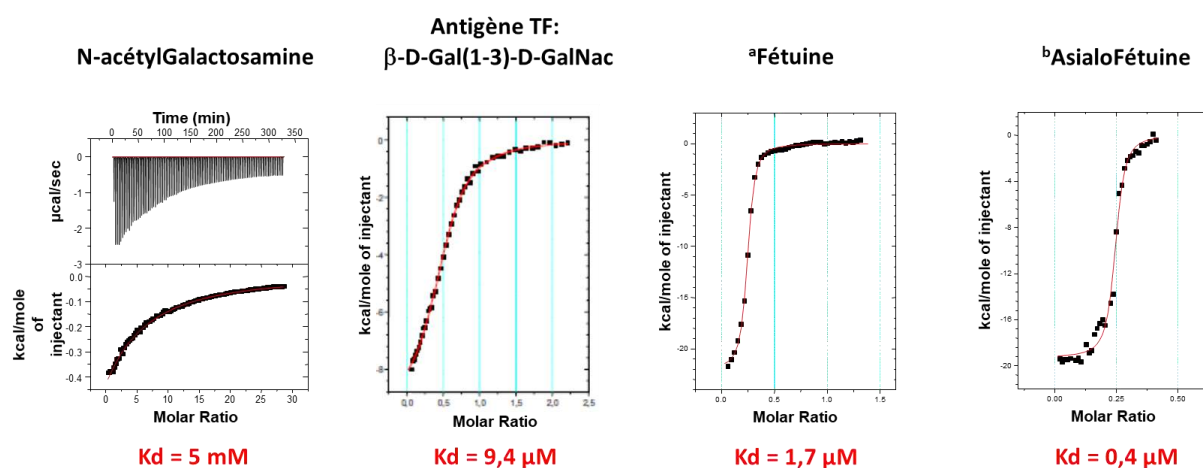


Figure 6 : Détermination des constantes de liaison de la protéine XCL avec différents motifs glycosidiques par microcalorimétrie isotherme de titration (adapté de [73]).

^a Fétuine = protéine portant l'antigène TF

^b Asialofétuine = protéine portant l'antigène TF sans l'acide sialique

Ce disaccharide a été largement étudié depuis les années 1930, il est retrouvé sur des glycoprotéines membranaires comme les mucines [75]. L'antigène TF, ou son précurseur direct Tn (GalNac-O-sérine), sont exprimés dans 80 à 90% des carcinomes [76–78], en revanche ils ne sont pas ou peu présents dans

les tissus sains [79,80]. Ce disaccharide est donc décrit comme un marqueur glycosidique, ou glycotope, des cancers épithéliaux (vésical [81], colorectal [82], ovarien [83], mammaire [84,85], pulmonaire [86]). Il existe déjà des lectines utilisées comme marqueurs histochimiques de cet antigène : la Jacaline (extraite du Jacquier, proche de l'arbre à pain) [87], la lectine de l'Amarante [88], la lectine de l'arachide [89]. Une partie de cette introduction sera dédiée à l'explication de son démasquage dans le cadre des cancers épithéliaux et son expression dans les tissus sains et tumoraux (voir Partie II).

- **Résolution de structure**

La protéine XCL s'est cristallisée relativement facilement (Figure 7, [74]), il a cependant fallu muter quelques résidus pour produire cette protéine en présence de sélénio-méthionine. La structure tétramérique en solution d'XCL a été établie par ultracentrifugation analytique ainsi que par gel exclusion.

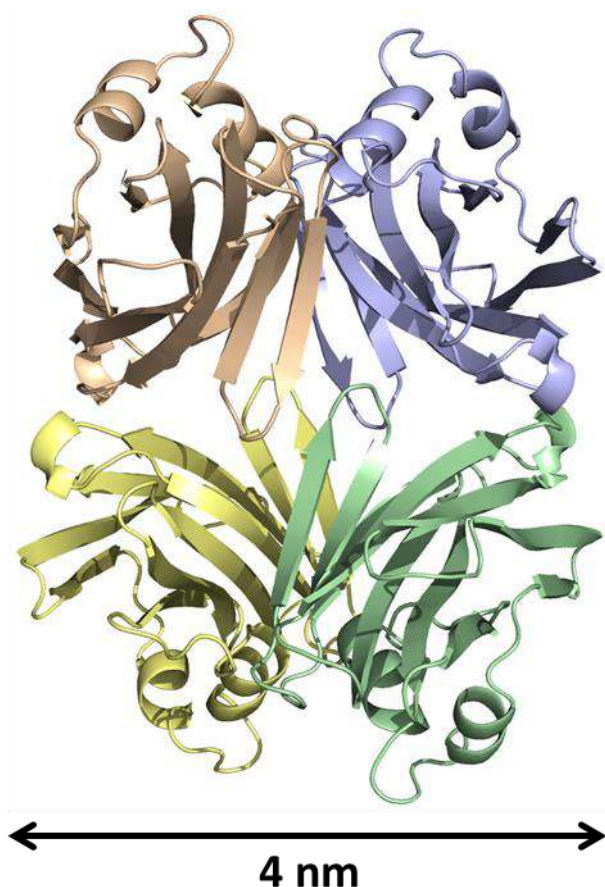


Figure 7 : Structure tridimensionnelle de la protéine XCL résolue par Cristallographie aux rayons X (adapté de [74])

L'équipe a ensuite essayé par immersion et co-cristallisation de fixer du D-galactose sur la protéine XCL pour déterminer la position du site de liaison avec les sucres, mais ces tentatives ont échoué. Au même moment une équipe italienne obtenait des cristaux avec ABL [90]. L'équipe a donc choisi de publier leurs données sur la structure d'XCL sans la position du site de liaison. En parallèle, une étude de dynamique moléculaire a été réalisée par Georges Czaplicki à l'IPBS pour prédire *in silico* les positions des 4 sites

de liaison (homotétramère) avec l'antigène TF sur XCL. Quelques mois après la publication de l'équipe sur la cristallographie, la structure d'ABL en présence de substrat était publiée [91]. Compte-tenu de la position connue du site de liaison sur ABL et de la prédiction *in silico* faite sur XCL, les structures des deux lectines ont été superposées et les positions correspondaient. L'équipe a donc pu valider la dynamique moléculaire qui avait bien prédit la position des sites de liaison à l'antigène TF sur le tétramère XCL (Figure 8).

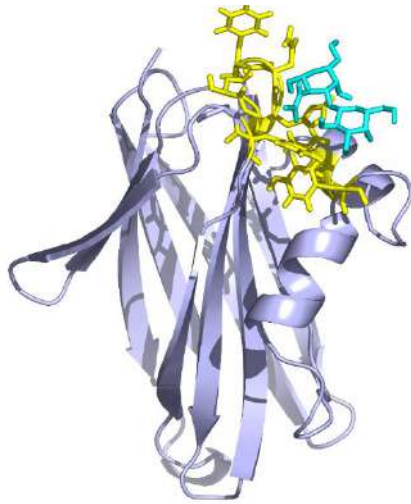


Figure 8 : Site de liaison à l'antigène TF de la protéine XCL. Un monomère d'XCL (homotétramère) est représenté (bleu) avec les acides aminés (jaune) impliqués dans la liaison avec le motif glycosidique, l'antigène TF (cyan).

Fait très important, la résolution de la structure tridimensionnelle de la protéine XCL a révélé la présence d'une cavité hermétique au centre de cette structure (1nm^3) et a ainsi ouvert de nouveaux champs d'investigation (Figure 9).

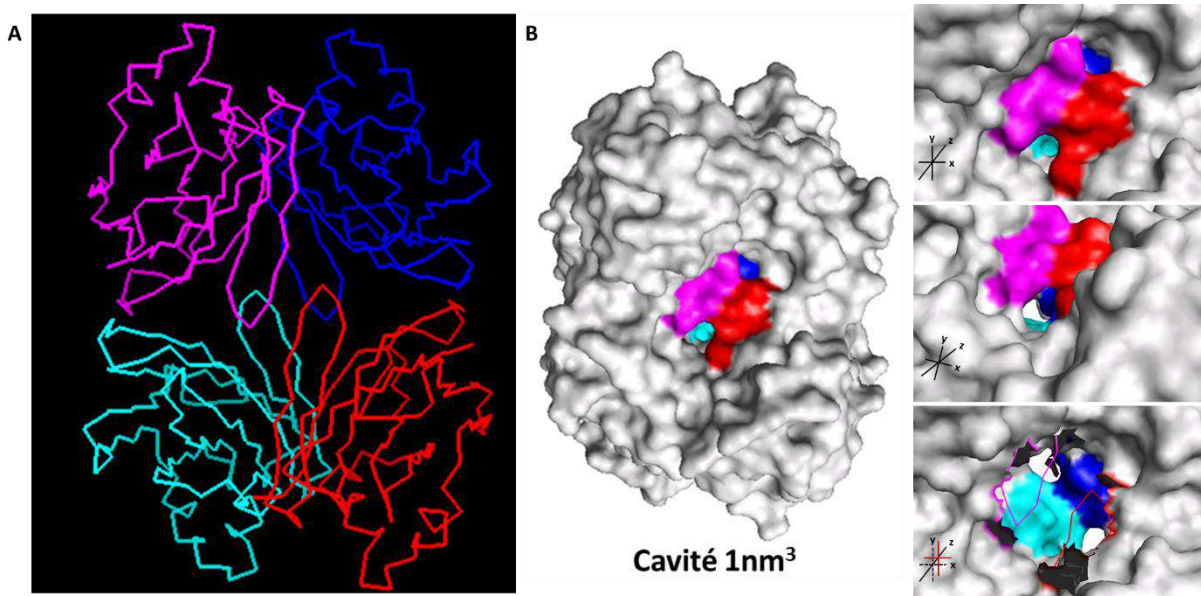


Figure 9 : Une cavité au centre d'une structure homotétramérique. (A) Rappel de la structure globale de la lectine XCL. (B) mise en évidence de la cavité (1nm^3) hermétique en faisant ressortir la part de chaque monomère, les boucles des monomères rose et rouge à l'avant, et bleu et cyan à l'arrière (panel de gauche). Les trois agrandissements présentés (panel de droite) montrent la cavité sous différentes orientations ou au travers des monomères roses et rouge, faisant ressortir des orifices ou ouvertures entre les boucles de tailles équivalentes à une molécule d'eau.

La consultation des banques de données de structures a démontré qu'une cavité d'une telle taille au cœur d'un assemblage protéique n'avait pas d'équivalent. Par ailleurs, la présence de quelques chaînes latérales polaires à l'intérieur de la cavité est en accord avec la caractérisation de « bouches » d'entrée de solvant. Ces observations suggèrent la possibilité, pour cet assemblage tétramérique, de lier un soluté et d'assurer son confinement dans un environnement protéique.

d) Du fondamental à l'appliqué

Depuis l'étude du mécanisme d'internalisation cellulaire, l'obtention des données de structure et la détermination de la nature du motif glycosidique spécifiquement reconnu par XCL, de nombreux autres développements ont vu le jour. En effet, la présence intrinsèque de quatre sites de liaison pour un biomarqueur cancéreux et d'une cavité susceptible de pouvoir transporter des molécules sur un même nano-objet protéique représente un ensemble peu commun et très séduisant pour envisager des développements en vectorisation ciblée de molécules anti-cancéreuses.

Beaucoup de travaux ont été effectués pour obtenir différents mutants d'XCL, poursuivre le travail de caractérisation biochimique, et démontrer qu'il est possible de confiner une molécule au sein de la cavité. Tous ces développements ont conduit à l'obtention d'un brevet en 2012 sur l'aspect nanocontainer de la protéine XCL, déposé par la Société d'accélération de transfert technologique de Toulouse (Toulouse Tech Transfer, TTT), dont le Professeur Laurent Paquereau est le principal inventeur (WO 2014/016504 A1). Des spécialistes (société Novoptim) ont alors été consultés début 2013 quant au lancement d'un projet de maturation, financé par TTT, pour établir une preuve de concept de la délivrance ciblée de molécules thérapeutiques. Entre autres choses, il est ressorti de cette expertise une liste de 72 molécules thérapeutiques d'intérêt, sélectionnées par des cliniciens et chercheurs, pour être confinées dans la protéine XCL.

Le projet de maturation démarra à l'automne 2013 avec pour objectifs (i) d'identifier par criblage *in silico* et dynamique moléculaire des molécules thérapeutiques susceptibles d'être confinées, (ii) maîtriser et évaluer fonctionnellement le confinement des composés précédemment identifiés, (iii) et évaluer *in vitro* l'efficacité de délivrance de molécules sur un modèle cellulaire.

Une des réserves émises par les experts, consultés avant le lancement du projet, concernait le mode d'administration du nanocontainer pour des études précliniques sur modèle murin. En effet, sachant que l'antigène TF est présent sous forme circulante (glycosylations des érythrocytes), il est difficile d'envisager une injection systémique de la protéine. De brèves expériences de biodistribution, évaluées par imagerie de fluorescence non invasive, ont été réalisées sur le petit animal à la fin du projet de maturation. Trois voies d'administration ont été testées : intrapéritonéale, per os et intraveineuse. Les deux premières n'ont soulevé aucun problème de toxicité, même en injection ou

gavage quotidiens de 150µg de protéine pendant 5 jours consécutifs. En revanche et comme attendu, l'injection intraveineuse d'une dose équivalente de protéines a conduit au décès de l'animal en quelques secondes (Figure 10).

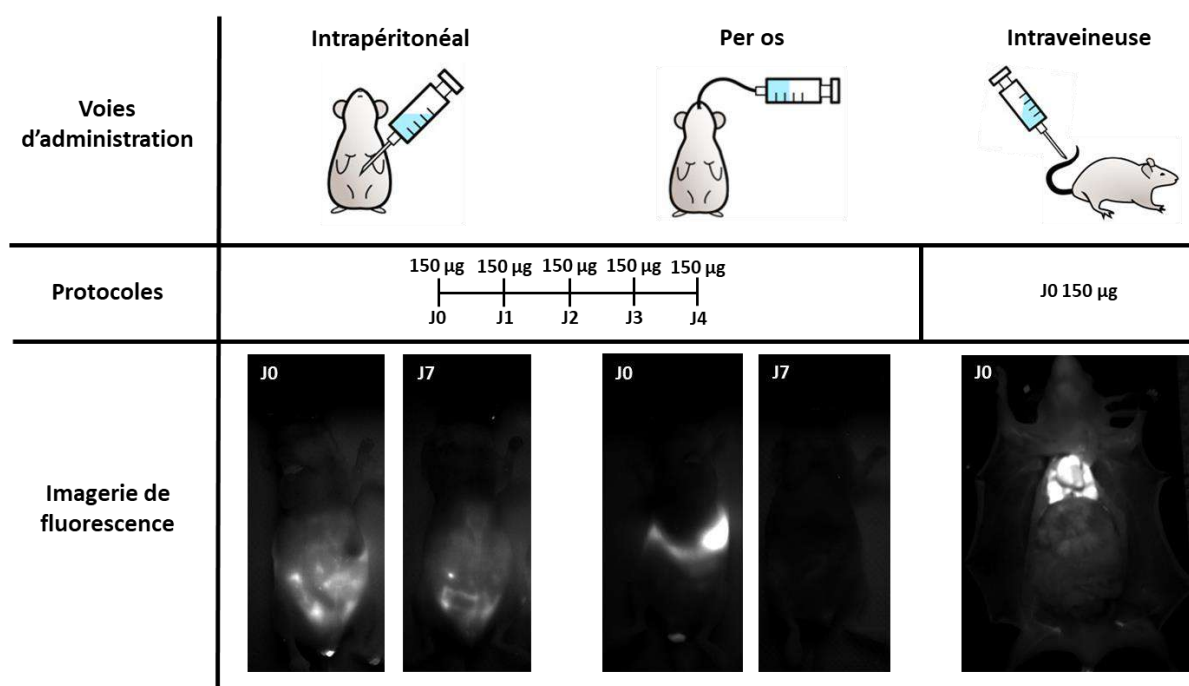


Figure 10 : Biodistribution du mutant A38C de la protéine XCL suite à l'injection (unique ou répétée) d'une dose constante (150µg) par différentes voies d'administration.

L'article [92] publié au début de l'année 2019 regroupe une partie des développements effectués sur la protéine XCL, en matière d'ingénierie protéique et de caractérisation biochimique, qui ont conduit à l'établissement de la preuve de concept de la délivrance ciblée de doxorubicine dans des lignées d'adénocarcinomes ovariens humains. Cet article, ainsi que des résultats supplémentaires, seront présentés dans la deuxième partie des résultats de ce projet de thèse.

La création de différents mutants de la lectine XCL a fait suite à la compréhension de la dynamique de la protéine, en particulier en matière d'échange de monomères. Deux de ces mutants, présentés dans l'article mentionné ci-dessus, ont permis d'élucider le mécanisme d'ouverture de la protéine et ainsi bloquer ces échanges de manière à empêcher la fuite d'une molécule confinée dans la cavité. Un des mutants d'XCL, nommé A38C, avec lequel il est possible de contrôler l'ouverture et la fermeture de cette structure tétramérique, a été utilisé pour établir la preuve de concept de la délivrance ciblée de doxorubicine.

Le cancer épithélial ovarien a été choisi comme modèle d'étude *in vitro* pour la nanovectorisation de molécules thérapeutiques. Compte-tenu des modes d'administration possibles de la protéine, de l'évolution systématique de ces cancers en carcinomes péritonéaux et des problématiques cliniques associées, le cancer ovarien apparaît comme un modèle de choix pour valider une approche *in vivo*.

Au cours de ce projet de thèse, un autre axe de développement du nano-objet s'est concentré sur l'imagerie diagnostique. Les sites de liaison intrinsèques d'XCL pour l'antigène TF, le glycotope des carcinomes, nous ont conduits à étudier le nanocontainer comme nanosonde fluorescente. En effet, le mutant A38C de la protéine XCL a été marqué avec un fluorophore émettant dans le proche infrarouge pour pouvoir être détecté lors des expériences ayant conduit à la preuve de concept de la nanovectorisation de principes actifs *in vitro*. La mutation A38C permet de s'assurer que le rendement de marquage de la protéine reste inchangé en empêchant les échanges entre monomères. C'est donc à nouveau ce mutant qui a été choisi pour le développement de la nanosonde. Ainsi, suite à des expériences réalisées *in vitro* sur des lignées d'adénocarcinomes ovariens humains et à la mise au point d'un modèle murin de carcinose péritonéale ovarienne, nous avons évalué l'efficacité de notre nano-objet pour la détection de nodules submillimétriques dans la cavité péritonéale. Ce second axe de recherche a conduit à l'écriture d'un article accepté en février 2020 dans le journal Biomaterials. Celui-ci, ainsi que des résultats complémentaires, seront présentés dans la troisième partie des résultats de ce manuscrit.

Dans la suite de cette introduction, nous nous concentrerons tout d'abord sur les carcinoses péritonéales en général, puis sur le cancer épithélial ovarien, les problématiques cliniques et les marqueurs associés. Ensuite nous aborderons les systèmes de nanovectorisation et les sondes diagnostiques pour l'assistance chirurgicale décrites dans la littérature, avant de présenter le projet de recherche développé durant ce travail de doctorat.

Partie II : Carcinomes péritonéaux, Cancer épithélial ovarien, problématiques cliniques et marqueurs associés

1. Les carcinomes péritonéaux

Les carcinomes péritonéaux ont plusieurs origines et représentent les stades avancés de différents cancers épithéliaux d'origine gastro-intestinale et gynécologique. En absence de métastases systémiques, les carcinomes sont qualifiés de maladies locorégionales confinées à un seul organe : le péritoine. Dans la plupart des cas, les patients décèdent d'occlusion intestinale sans métastases sur des sites distants [93].

Etant donné le pronostic défavorable des carcinomes péritonéaux, elles ont longtemps été considérées comme un état pré-terminal traité en palliatif. L'introduction de la chirurgie de cytoréduction (CRS), ne laissant aucun résidu tumoral, associée à une ou des chimiothérapies a permis de faire évoluer la prise en charge de patients sélectionnés. Ces chimiothérapies peuvent être délivrées par voie systémique (intraveineuse) ou intrapéritonéale. La voie intrapéritonéale permet d'augmenter la concentration locale des molécules thérapeutiques avec un ratio AUC (Area Under Curve) « dose-intensité » extrêmement favorable tout en limitant leur diffusion systémique et donc leur toxicité et effets secondaires associés [94,95]. Différents schémas d'administration sont possibles avec des injections réalisées en per ou péri-opératoire, ou en séquentiel comme une chimiothérapie systémique. La chimiothérapie intrapéritonéale peut également être combinée à une hyperthermie régionale au moment de la chirurgie (CHIP, chimiothérapie hyperthermique intrapéritonéale ; HIPEC, Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy) augmentant ainsi son effet local (ratio AUC péritonéo-plasmatique). Une schématisation de la procédure est proposée Figure 11 [96].

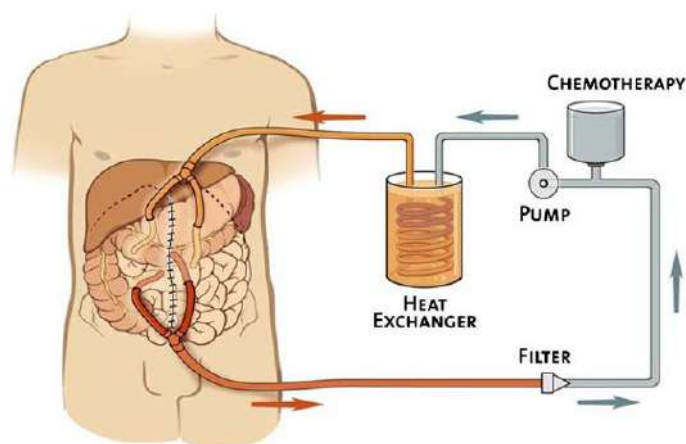


Figure 11 : Schématisation de l'installation de la **chimiothérapie hyperthermique intrapéritonéale (CHIP)** réalisée en fin de chirurgie cytoréductrice [96].

Ces dernières années une autre approche intrapéritonéale, moins invasive que l'HIPEC, a été développée pour améliorer la diffusion de chimiothérapies. Il s'agit de la chimiothérapie intrapéritonéale pressurisée par aérosols (PIPAC, Pressurized Intraperitoneal Aerosol Chemotherapy, Figure 12, [97]) qui repose sur plusieurs principes physiques permettant (i) d'optimiser l'homogénéité de distribution du principe actif en appliquant un aérosol plutôt qu'un liquide, (ii) d'appliquer une pression hydrostatique pour contrecarrer la pression élevée des fluides interstitiels intratumoraux et (iii) de limiter les pertes sanguines au moment de l'administration du principe actif. De plus, cette approche peut être effectuée plusieurs fois avec une évaluation continue de son efficacité en comparant les biopsies entre chaque cycle.

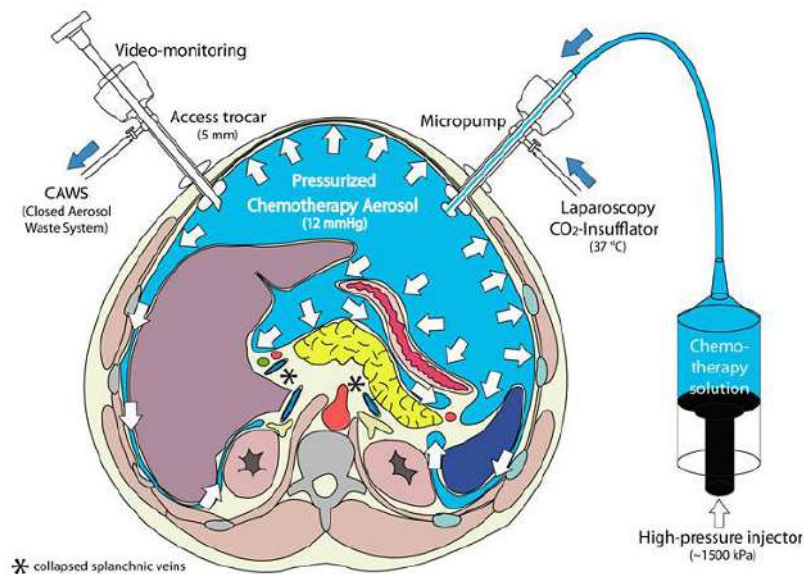


Figure 12 : Chimiothérapie intrapéritonéale pressurisée par aérosols, PIPAC (adapté de [97]). La procédure est effectuée dans un bloc opératoire au moment de la biopsie réalisée par laparoscopie. La solution de chimiothérapie (environ 10% de la dose systémique) est nébulisée avec une micro pompe dans la cavité abdominale des patients.

Le diagnostic préopératoire des carcinomes péritonéaux est limité du fait de la faible sensibilité des techniques d'imagerie disponibles. Les plus utilisées sont l'imagerie de résonance magnétique (IRM) et la tomodensitométrie (computed tomography scanner, CT scan) mais elles ne permettent pas le repérage de petites implantations (nodules tumoraux) dans la cavité abdominale. Ainsi le meilleur moyen pour établir un diagnostic est toujours la visualisation directe par chirurgie, soit mini-invasive (laparoscopie), soit par ouverture de l'abdomen (laparotomie) en fonction des cas [93].

a) Pathogénie :

Il existe deux types de pathogénie des carcinomes péritonéaux : la dissémination des cellules depuis une tumeur primaire située sur un organe abdominal (ovaire, pancréas, colon, etc.), et les tumeurs primaires du péritoine.

Dans cette partie, les 2 modèles seront présentés et l'accent sera mis sur le premier puisqu'il représente le modèle choisi dans le projet de recherche, à savoir la carcinose péritonéale d'origine ovarienne.

L'anatomie de la cavité abdominale est schématisée dans la Figure 13 [98].

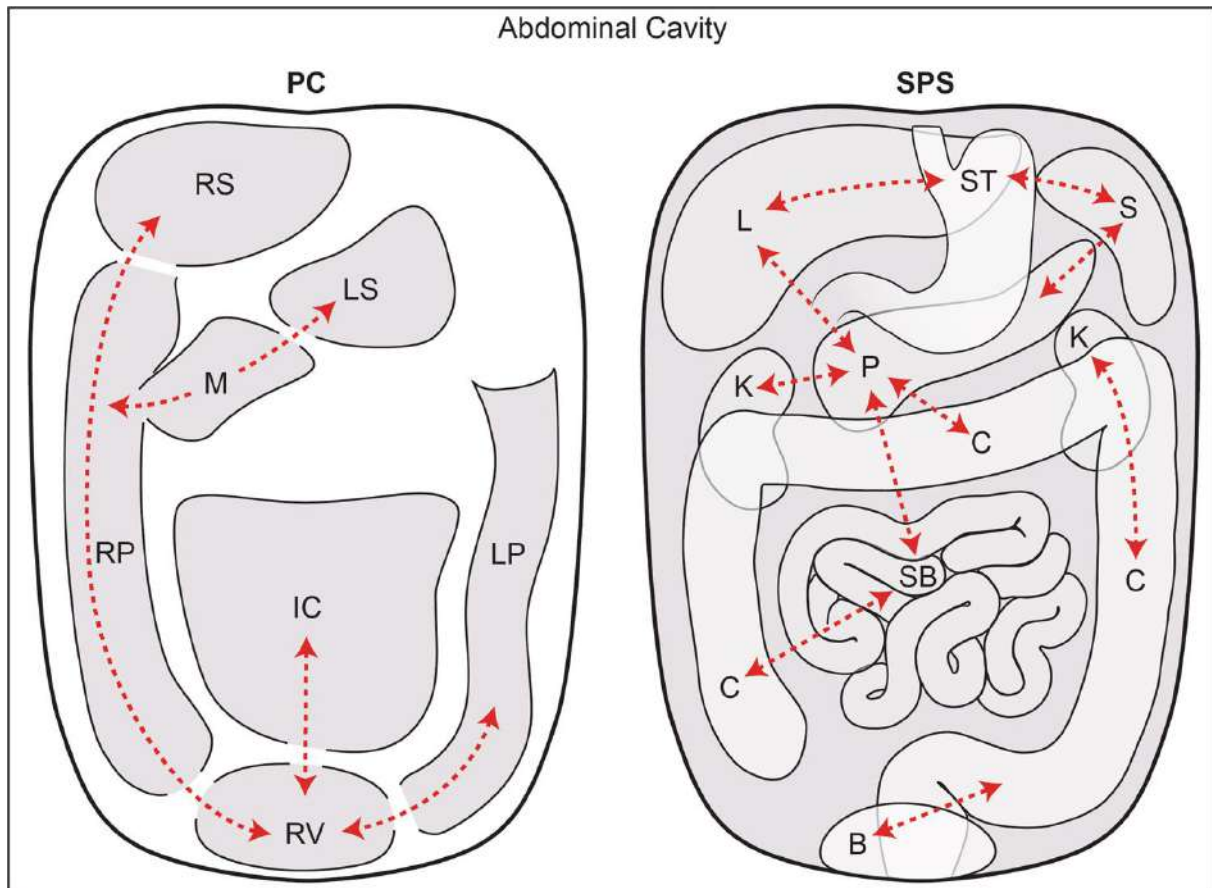


Figure 13 : La cavité péritonéale et l'espace sous péritonéal (adapté de [98]). Représentation schématisée de la cavité péritonéale (PC) sur la gauche et de l'espace sous péritonéal (SPS) sur la droite. Ces deux espaces sont complètement séparés par le péritoine dans la cavité abdominale. La PC est un espace continu avec des renforcements interconnectés dont certains sont représentés ici. Le SPS est aussi un espace continu contenant tous les organes abdominaux et pelviens qui sont interconnectés par des ligaments et des mésos. Les lignes pointillées représentent certaines de ces interconnexions qui permettent la dissémination de cellules tumorales dans cet espace. Abréviations pour la cavité péritonéale : IC inframesocolic compartment (compartiment sous mésocolique), LP left paracolic recess (gouttière pariéto-colique gauche), LS lesser sac (bourse omentale), M Morison's pouch (poche de Morrison), RP right paracolic recess (gouttière pariéto-colique droite), RS right subphrenic space (espace sous-phrénique ou sous-diaphragmatique droit) et RV rectovesical space (espace recto-vesical). Abréviations pour l'espace sous péritonéal : B bladder (vessie), C colon (colon), K kidney (rein), L liver (foie), P pancreas (pancréas), S spleen (rate), SB small bowel (petit intestin) et ST stomach (estomac).

- **Dissémination depuis une tumeur primaire**

Ce processus est initié par le détachement d'un groupe de cellules de la masse tumorale primaire leur permettant d'accéder et/ou de migrer dans la cavité péritonéale. Ce phénomène se produit selon différents mécanismes. L'un des plus décrits consiste en une exfoliation spontanée de cellules cancéreuses pouvant être médiée par la diminution d'expression ou la perte de fonction de molécules d'adhésion intercellulaire, comme l'E-cadhérine, à la surface de tumeurs épithéliales. Ce mécanisme est décrit pour les carcinoses péritonéales d'origine colorectale [99], gastrique [100] et ovarienne

[101]. L'initiation du détachement des cellules peut aussi provenir d'une perforation iatrogénique ou spontanée de la tumeur primaire [102] entraînant la présence de cellules tumorales viables dans la cavité péritonéale qui vont se redéposer. On parle alors de dissémination.

Cette dernière va s'effectuer en s'appuyant sur 3 forces physiques : la gravité, la convection due aux mouvements péristaltiques du tractus digestif et la pression négative exercée par les mouvements du muscle diaphragmatique. Ces trois forces physiques conduisent à un sens de circulation du liquide péritonéal dans lequel baignent les cellules tumorales le plus souvent amassées en cluster [103]. Les sites d'implantation de ces disséminations vont dépendre d'un processus passif lié au ralentissement du flux péritonéal, de la biologie des cellules cancéreuses libres ainsi que de celles des tissus dans lesquels ces métastases s'implantent [104].

Le premier mécanisme d'implantation est nommé trans-mésothélial. Au cours de ce processus, les cellules s'attachent directement au mésothélium péritonéal par le biais de molécules d'adhésion (CD44, Intégrines, etc.) [105], puis elles pénètrent la barrière mésothéliale ce qui leur permet d'adhérer au tissu conjonctif sub-mésothélial *via* les intégrines. Suite à l'invasion de l'espace sub-péritonéal à proximité de capillaires sanguins, la prolifération va se faire *via* la production de facteur de croissance par les cellules cancéreuses (autocrine) ou par les cellules conjonctives (paracrine) [106].

L'autre route d'implantation est qualifiée de trans-lymphatique. Les cellules cancéreuses libres vont accéder à l'espace lymphatique sub-péritonéal au travers d'ouvertures, ou stomates, faites par les vaisseaux lymphatiques dans le mésothélium péritonéal (stomates, Figure 14, [107]).

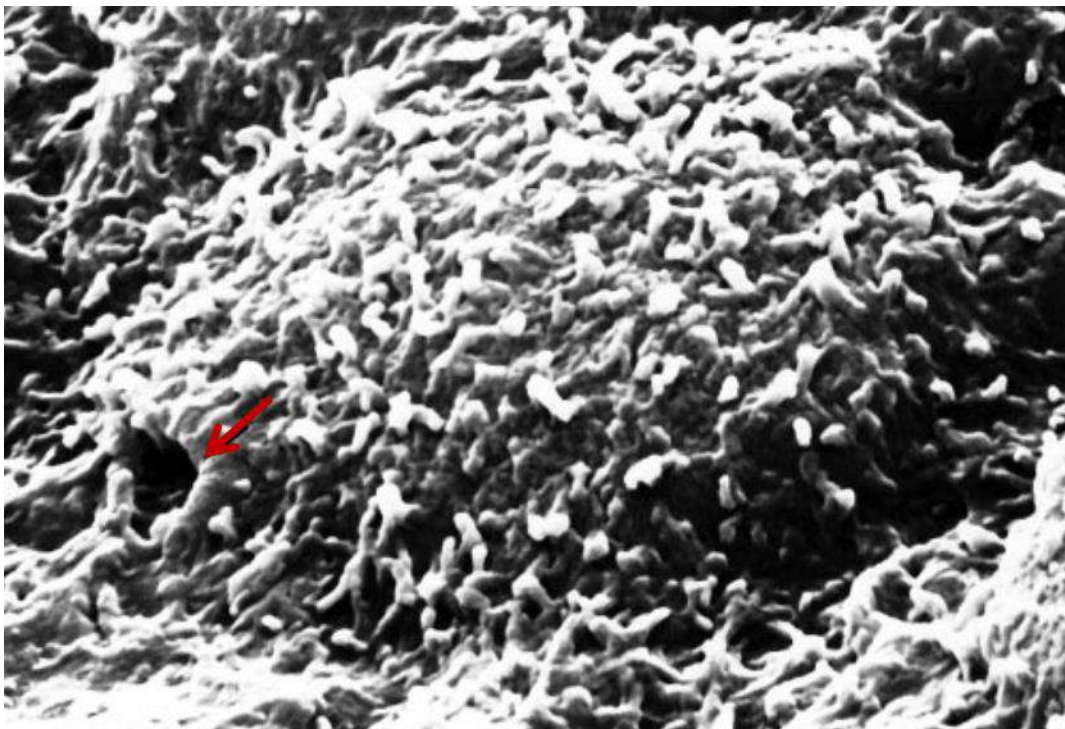


Figure 14 : Microscopie électronique à balayage de **cellules mésothéliales murines** et d'un **stomate** adjacent repéré par une flèche rouge (x27 000) [107].

Les régions de la cavité possédant une forte densité de stomates sont le petit et le grand omentum, la surface inférieure du diaphragme et le mésentère du petit intestin. Ces régions sont caractérisées par la présence de taches laiteuses (milky spots, Figure 15, [108]) qui sont des structures lymphatiques composées de macrophages et lymphocytes entourant un réseau de capillaires sanguins (omental glomeruli) qui reposent directement sous le mésothélium [109].

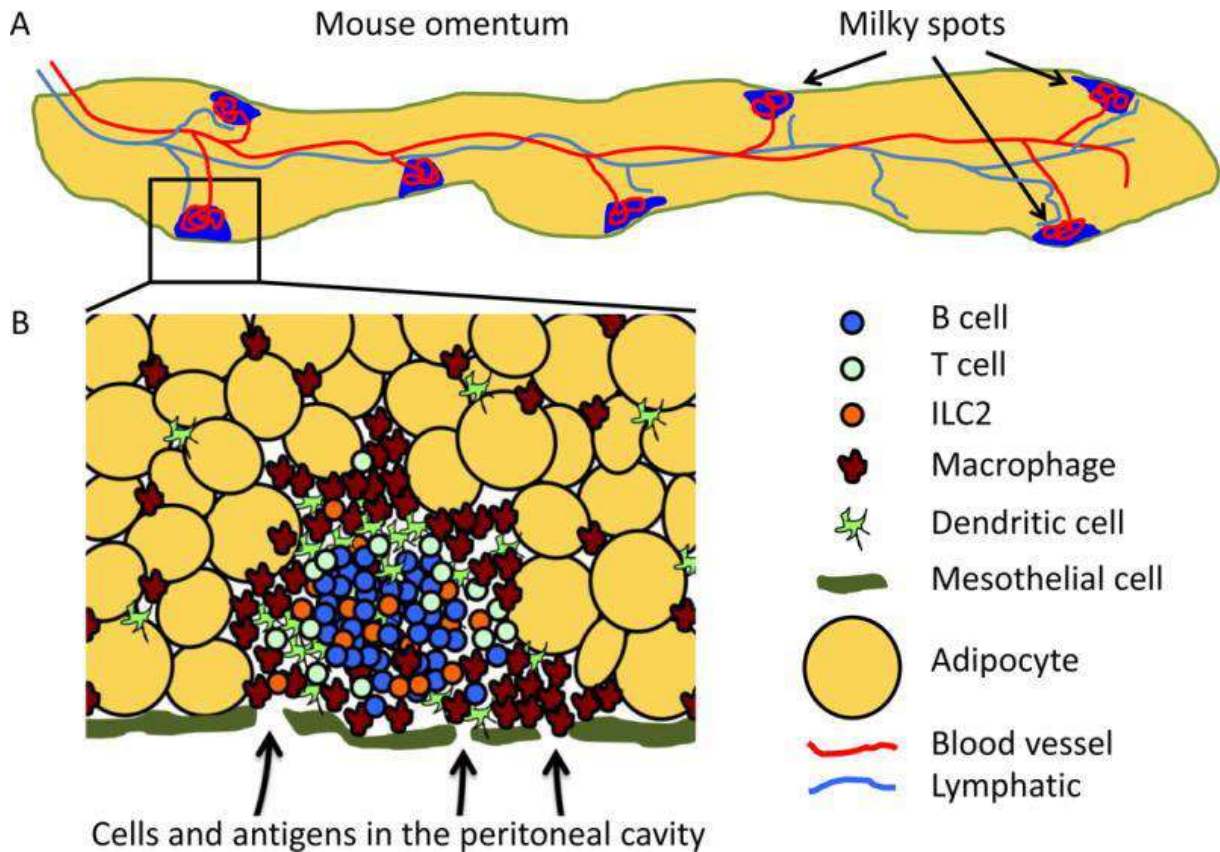


Figure 15 : Structure d'une tache laiteuse dans l'omentum (adapté de [108]). **(A) Illustration schématisique de l'omentum d'une souris.** Il s'agit d'une fine bande d'adipocytes (jaunes) recouverte d'une couche de cellules mésothéliales (vertes). Les taches laiteuses (bleues) sont situées juste au-dessous de la couche mésothéliale encastrées entre les adipocytes. L'omentum est bien vascularisé par un réseau étendu de capillaires (non représentés) se faufilant entre les adipocytes pour se connecter à des vaisseaux sanguins centraux plus larges (rouges). Ceux-ci sont aussi connectés aux taches laiteuses et forment un nœud glomérulaire dans les amas lymphocytaires. Un large vaisseau lymphatique central (bleu pâle) parcourt également le centre de l'omentum et ses ramifications conduisent aux taches laiteuses aussi bien qu'à des zones de l'omentum en étant dépourvues. L'omentum humain est beaucoup plus large et pourrait s'apparenter à un tablier pendant devant l'abdomen. Il contient également des taches laiteuses. **(B) Structure d'une tache laiteuse.** Ce sont des collections de leucocytes encastrés entre des adipocytes juste en dessous de la couche mésothéliale. Les lymphocytes B (bleus) forment un amas central, alors que les macrophages (marron) et les cellules dendritiques (verte pâle) ont tendance à s'accumuler autour et à l'extérieur de la tache laiteuse, et sont aussi retrouvés individualisés tout au long de l'omentum. Les lymphocytes T (cercles verts) et les ILCs (innate lymphoid cells, cellules lymphoïdes innées, orange) peuvent être mélangés avec les lymphocytes B et peuvent se regrouper en amas autour des vaisseaux sanguins (non représentés). Les cellules et les antigènes sont collectés passivement par le flux de liquide péritonéal depuis la cavité péritonéale au travers de « fenêtres » dans la couche mésothéliale. Ils peuvent aussi être transportés activement par des cellules phagocytaires comme les macrophages.

Beaucoup de stomates sont retrouvés dans ces taches laiteuses. Ainsi les cellules cancéreuses libres contenues dans les fluides péritonéaux vont atteindre le réseau lymphatique subpéritonéal et se retrouver dans les ganglions abdomino-pelviens ou mésentériques. Il est important de noter que le péritoine viscéral qui recouvre le foie et les surfaces de l'intestin grêle et de la rate est dépourvu de

stomates et de taches laiteuses, ces régions seront donc envahies tardivement, aux stades les plus avancés des carcinoses [104].

Ces deux mécanismes d'implantation illustrent le concept de permissivité du péritoine. L'évolution des cancers colorectaux, ovariens et gastriques vers la carcinose péritonéale vont emprunter ces deux routes.

- **Tumeurs primaires du péritoine**

Beaucoup plus rares que les précédents, les carcinomes primaires du péritoine (PPC) sont similaires, d'un point de vue histologique et clinique, au cancer épithélial ovarien. Certains auteurs les assimilent d'ailleurs aux cancers de l'ovaire et des trompes, considérant les annexes de l'utérus et le péritoine comme un seul organe d'un point de vue pathogénique. Les PPC sont souvent détectés tardivement, et leur diagnostic préopératoire ne peut être fait par imagerie. Ce diagnostic est donc typiquement réalisé après évaluation chirurgicale et études anatomopathologiques. Dans ce contexte, lorsque les ovaires paraissent normaux en présence d'une maladie étendue de l'abdomen, il est possible qu'il s'agisse d'un PPC. Cependant, 96% des PPC vont impliquer la surface des ovaires, donc pour distinguer un PPC extra-ovarien d'une carcinose d'origine ovarienne une évaluation histologique de l'étendue et de l'invasion de la tumeur sur les ovaires est nécessaire [110].

Les adénocarcinomes papillaires séreux du péritoine [111] sont un exemple de ce modèle pathogénique. Il est difficile de différencier ce type de tumeurs des métastases péritonéales provenant de la dissémination d'une tumeur primaire. Leur traitement étant similaire à celui des cancers de l'ovaire et des trompes, cette entité nosologique est le plus souvent classée avec ces derniers.

Le mésothéliome péritonéal malin représente la seule tumeur primaire du péritoine. Les mésothéliomes en général représentent des tumeurs rares et agressives provenant de la surface mésothéliale de la plèvre, du péritoine, du péricarde et de la tunique vaginale des testicules. L'augmentation de la fréquence des mésothéliomes de la plèvre depuis les années 1970 est due à une exposition à l'amiante pour 50% des patients [112,113]. Cette incidence va augmenter considérablement durant les 20 prochaines années compte tenu de l'exposition permanente à l'amiante d'une partie de la population entre 1950 et 1990. Les mésothéliomes péritonéaux représentent 20% des mésothéliomes. Aucune relation directe avec l'exposition à l'amiante n'a été formellement établie [114]. Les symptômes de cette maladie n'étant pas spécifiques (ascites, douleur abdominale, perte de poids, etc.), le défi relève encore une fois du diagnostic, où l'imagerie standard (échographie, scanner) est souvent non contributive. La prise en charge de ces patients a aussi évolué ces dernières années, des chimiothérapies uniques aux thérapies triples combinées à la CRS, l'HIPEC et la chimiothérapie systémique dans certains centres [115]. Par ailleurs, de nombreuses études sont en cours pour évaluer la place de l'immunothérapie.

b) Origines des carcinoses péritonéales secondaires, issues de dissémination de tumeurs primaires

- **Carcinoses péritonéales gastriques**

La pénétration de la séreuse gastrique et la propagation lymphatique sont les deux paramètres les plus importants affectant le pronostic de ce type de carcinose [116,117]. Lorsque la séreuse gastrique est infiltrée par la tumeur, l'évolution de ce cancer vers une carcinose péritonéale est très fréquente. La moitié des patients va évoluer vers une carcinose malgré la chirurgie de première intention [118], sachant que 5 à 20% des patients se présentent déjà avec une carcinose au moment du diagnostic. La médiane du taux de survie global des patients atteint de carcinoses d'origine gastrique est de 3,1 mois [119].

- **Carcinoses péritonéales d'origine colorectale**

Un peu plus de 10% des cancers colorectaux évoluent en carcinose péritonéale [120]. Celles-ci étaient encore récemment considérées comme condition terminale à cause de leur pronostic sombre de survie médiane de 5 à 6 mois [119,121]. Ces carcinoses colorectales peuvent être détectées au moment du diagnostic et jusqu'à 6 mois après, elles sont alors qualifiées de synchrones. Lorsqu'elles sont développées suite à la chirurgie pour l'excision de la tumeur primaire et détectées plus de 6 mois après le diagnostic initial, elles sont qualifiées de métachrones [122,123]. Dans ce dernier cas, les carcinoses métachrones sont localisées dans une partie différente du colon, ce qui permet de les distinguer d'éventuelles rechutes de la tumeur primaire. Seuls les patients présentant des carcinoses peu avancées et sans métastases systémiques peuvent bénéficier de l'approche de CRS combinée à l'HIPEC [124], qui induit une augmentation de la survie globale et une diminution de la morbidité et de la mortalité [125,126]. Dans un essai clinique randomisé hollandais réalisé dans les années 90, le taux de survie des patients est augmenté par cette approche, en comparaison de l'approche impliquant une chimiothérapie systémique et une chirurgie palliative, aux conditions que la carcinose implique moins de 5 régions dans la cavité abdominale et que la CRS soit suffisamment complète [127]. Les données de l'essai randomisé de phase III PRODIGE 7, présenté à l'American Society of Clinical Oncology 2018, comparant une stratégie de chimiothérapie systémique associée à une chirurgie complète avec une randomisation préopératoire de l'ajout ou non d'une HIPEC, n'a pas montré de différence en terme de survie globale et de survie sans récurrence [128].

- **Carcinoses péritonéales d'origine pancréatique**

Le cancer pancréatique évolue lui aussi fréquemment en carcinose péritonéale [121]. La médiane de survie pour les patients présentant une carcinose ou d'autres métastases excède rarement 3 mois [119]. Les métastases péritonéales sont observées chez approximativement 40% des patients [129].

L'autre site privilégié des métastases dans ce cancer est le foie dans 50 à 60% des cas [130]. Les métastases péritonéales proviennent de sites cancéreux non détectés en chirurgie ou imagerie, ou de la dissémination de foyers tumoraux pendant la chirurgie [131]. Dans ce dernier cas, l'HIPEC (gemcitabine) en thérapie adjuvante intraopératoire pourrait être bénéfique pour prévenir les rechutes locorégionales [132,133].

- **Carcinomes péritonéaux d'origine ovarienne**

Concernant le cancer épithélial ovarien, la totalité des patientes évoluera vers une carcinose péritonéale et il est communément admis qu'une CRS complète est le paramètre le plus important pour prolonger leur durée de vie. Les carcinomes péritonéaux ovariens seront développés de manière plus détaillée dans le paragraphe suivant puisqu'il s'agit du modèle d'étude choisi dans ce projet.

2. Le cancer épithélial ovarien

a) Epidémiologie

Le cancer épithélial ovarien (EOC, regroupant les cancers épithéliaux des ovaires, des trompes, et du péritoine) est un cancer rare, avec une incidence de moins de 4500 nouveaux cas par an en France. Il représente cependant le cancer gynécologique le plus létal. Une amélioration notable du taux de survie à 5 ans après le diagnostic a été enregistrée au cours de ces dernières années, puisqu'il est passé de 30 à plus de 50% [134,135] grâce à la concentration des patientes dans des centres experts et le développement de nouvelles stratégies de traitements [136,137]. La médiane de survie sans récurrence actuelle correspond à la survie globale observée il y a 20 ans [138]. Malgré ce constat, la majorité des patientes va présenter des rechutes dans la cavité abdominale avec une récurrence de la carcinose péritonéale [139]. La plus grande influence sur le taux de survie est le stade auquel sont diagnostiquées les patientes, à savoir un taux de survie de plus de 50% pour les diagnostics en stades avancés, contre 92% pour les diagnostics aux stades précoces [140]. Malheureusement, 75% des patientes sont diagnostiquées aux stades avancés en raison de symptômes peu spécifiques [141,142]. De plus, des données génomiques laissent à penser que les implants de carcinose sont concomitants au développement de la tumeur primaire, ce qui explique la fréquence des stades avancés [143]. Ces stades avancés sont représentés par les stades IIb à IV dans la classification FIGO (Fédération Internationale de Gynécologie et Obstétrique) [144] (Figure 16, [145]). Ils correspondent aux carcinomes péritonéaux ovariens c'est-à-dire la dissémination de cellules tumorales, provenant de la tumeur primaire, dans la cavité péritonéale [144].

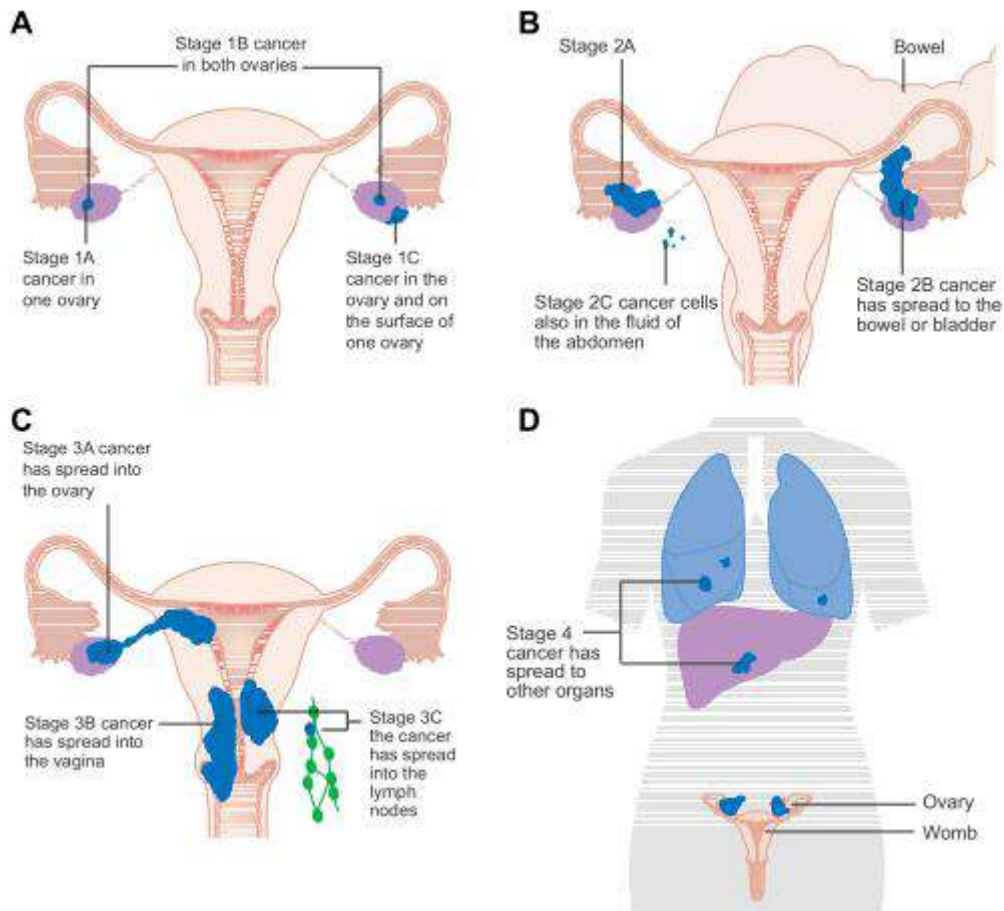


Figure 16 : Localisation du cancer ovarien et de ses métastases en fonction des stades de la pathologie (adapté de [145]). **(A)** Stade I : cancer confiné aux ovaires. **(B)** Stade II : métastases proches de la tumeur dans la cavité pelvienne, invasion des organes abdominaux à proximité et dissémination de cellules cancéreuses. **(C)** Stade III : le cancer ovarien a atteint les ganglions lymphatiques rétropéritonéaux et s'est disséminé en dehors de la cavité pelvienne sur les organes abdominaux. **(D)** Stade IV : le cancer implique des cellules tumorales dans l'épanchement pleural et des métastases sur des sites distants.

Différents types histologiques de cancers ovariens existent mais les carcinomes séreux de haut grade (HGSOC) sont les plus fréquemment rencontrés (75% des cas). Il existe 4 autres types de cancers ovariens : séreux de bas grade (LGSOC), mucineux, à cellules claires et endométrioïde (Figure 17, [142]).

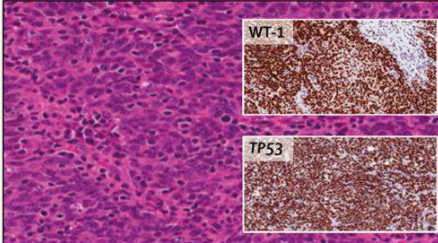
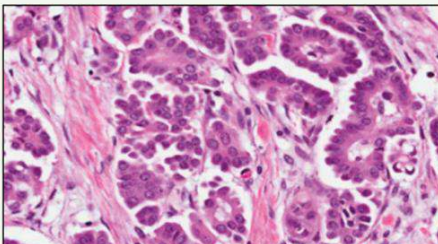
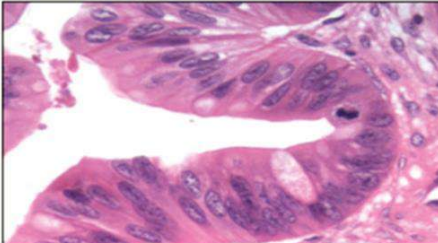
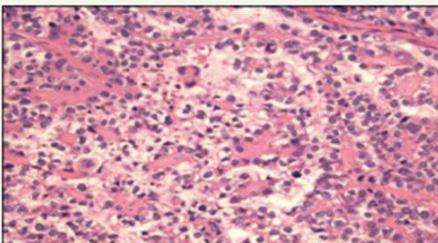
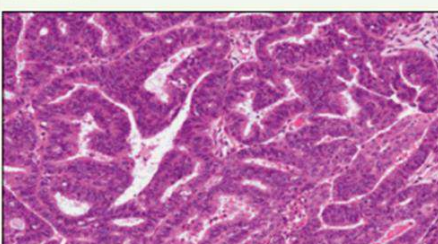
<p>HGSOC</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Highly aggressive tumours • Papillary or solid growth pattern • Tumour cells with atypical, large irregular nuclei • High proliferative rate • Initial chemosensitivity with subsequent acquisition of increasing resistance • Key targets: <i>TP53</i>, <i>BRCA1</i> and 2, and <i>HRR</i> genes
<p>LGSOC</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Indolent behaviour • Micro-papillary pattern • Tumour cells with small uniform nuclei • Low proliferative rate • Relative chemoresistance • Key targets: <i>BRAF</i>, <i>KRAS</i>, <i>NRAS</i>, and <i>PIK3CA</i>
<p>Mucinous</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Large size tumours filled with mucus-like material • Early-stage diagnosis • Chemoresistant • Key targets: <i>KRAS</i>, <i>PIK3CA</i>, and <i>HER2</i> amplification
<p>Clear-cell</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Glycogen-containing cells with clear cytoplasm • Tubulo-cystic, papillary, solid, or mixed patterns • Frequently associated with endometriosis • Early-stage diagnosis • Poor prognosis and resistance to chemotherapy • Key targets: <i>PIK3CA</i>, <i>ARID1A</i>, and <i>PTEN</i>
<p>Endometrioid</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Solid and cystic patterns • Frequently associated with endometriosis • Low grade share the same profile as LGSOC • High grade share similarity with HGSOC • Key targets: <i>PIK3CA</i>, <i>PTEN</i>, <i>ARID1A</i>, <i>POLE</i>, and <i>MMR</i> deficiency

Figure 17 : Les différents sous-types histologiques de cancer épithélial ovarien et leurs principales caractéristiques [142]. Les marquages P53 et WT1 de carcinomes ovariens séreux de haut grade sont représentés dans les inserts du panel du haut. X50 à x400 = grossissements des colorations à l'Hématoxyline et à l'Eosine. X50 = grossissement des immunohistochimies. HGSOC = High-Grade Serous Ovarian Carcinoma. LGSOC=Low-Grade Serous Ovarian Carcinoma.

La prédisposition génétique au cancer ovarien impliquant les gènes *BRCA1* et *BRCA2* est retrouvée dans 25% des HGSOC. Cependant, plus de 50% des HGSOC présentent une anomalie de recombinaison homologue (incluant *BRCA* mais aussi d'autres gènes comme *RAD51*). Certains syndromes génétiques

connus impliquent aussi une prédisposition à l'EOC, comme par exemple le syndrome de Lynch (Hereditary nonpolyposis colorectal cancer) [146,147] qui est associé à 10% des EOC héréditaires, (soit 1 à 2% de tous les cas) et particulièrement aux tumeurs ovariennes de type endométrioïde et à cellules claires [140].

Les facteurs de risque associés à cette affection incluent la nulliparité, un âge précoce aux premières menstruations et une ménopause tardive, l'historique familial, le tabac et les affections gynécologiques bénignes [140].

b) Dépistage et diagnostic

Les premiers symptômes des EOC ne sont pas spécifiques et incluent des distensions et gonflements abdominaux, une satiété précoce, des nausées, des changements dans le fonctionnement intestinal, des problèmes urinaires, des douleurs de dos, de la fatigue et une perte de poids [148]. Les premiers tests réalisés quand il y a suspicion de cancer ovarien sont l'évaluation du taux de CA125 sanguin et une échographie pelvienne. Le CA125 est le marqueur tumoral standard pour l'EOC approuvé par la Food and Drug Administration (FDA), la European Medicines Agency (EMA) et l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM). Il est issu de la protéolyse membranaire d'une glycoprotéine, la Mucine 16, qui est surexprimée à la surface des cellules épithéliales cancéreuses ovariennes. Cependant, le taux de CA125 peut être élevé dans de nombreuses autres conditions, à savoir en présence d'autres tumeurs épithéliales, durant les menstruations, la grossesse et l'allaitement, lors d'atteintes gynécologiques bénignes (endométriose) et également toute inflammation des séreuses (infection) [149,150]. Les faux positifs sont donc possibles [150]. Par contre, l'évaluation du taux de CA125 sanguin dans le suivi per-thérapeutique est extrêmement utile et fiable [151]. Basé sur un ELISA sandwich, le manque de spécificité du test est dû au fait que les deux anticorps, bien que spécifiques, ne peuvent pas discriminer un CA125 issu de cellules saines d'un CA125 issu de cellules cancéreuses puisqu'ils possèdent le même corps protéique. Les échographies pelviennes, sujettes à une variabilité inter-opérateur importante, ne sont pas informatives même lorsque les patientes se présentent avec une importante ascite dans l'abdomen. Ainsi, pour rendre un diagnostic et une évaluation du stade de la tumeur ovarienne, des imageries (IRM, tomodensitométrie et tomographie par émission de positrons) de l'abdomen et du pelvis sont utiles mais une chirurgie est nécessaire, le plus souvent par laparoscopie, avec une analyse anatomo-pathologique des biopsies réalisées. A un stade débutant, sans lésion péritonéale visible, la chirurgie servant à définir correctement le stade de la tumeur inclue une hystérectomie et une salpingo-oophorectomie bilatérale, une omentectomie et une inspection minutieuse des surfaces péritonéales avec biopsies et ablation de tous les endroits suspects puis dissection des ganglions para-aortiques et pelviens [142]. La détermination du stade de la maladie est conventionnellement réalisée selon la classification FIGO

[144]. Le diagnostic pathologique des tissus est essentiel pour déterminer les types histologiques du cancer ovarien qui vont avoir différents précurseurs, présentations cliniques, chimiosensibilités et donc différentes issues pour les patientes. Ce diagnostic va aussi permettre la recherche de mutation de gènes impliqués dans les recombinaisons homologues, comme BRCA. Ainsi, le type histologique du cancer ovarien et la présence ou non d'une anomalie génétique tumorale conditionneront les stratégies de traitement [142].

Des efforts considérables ont été réalisés ces dernières années pour améliorer le dépistage de l'EOC, en particulier dans les familles à risque (mutation BRCA identifiée), et surtout faire en sorte qu'il soit possible de le déceler aux stades les plus précoces, puisque le pronostic y est bien meilleur. Malheureusement, aucune amélioration réelle n'est à rapporter pour envisager un dépistage généralisé, comme celui fait pour le cancer du sein par exemple, compte tenu de l'absence de technique de dépistage fiable et de la faible incidence de ce type de cancer [152].

Une étude a été réalisée sur plus de 4000 femmes, dont 10% ou plus présentait un risque de développer un EOC au cours de leur vie. Un algorithme prédisant le risque de cancer ovarien (ROCA), associant un test sérique (HE4) et l'échographie transvaginale, a été utilisé, ce qui a donné des résultats encourageants avec 53% des diagnostics faits à des stades précoces [153]. Des études sont également engagées pour améliorer les stratégies de dépistage génomique, chez les patientes à risque dû à l'historique familial, en les complétant par des dosages fréquents du CA125 [154]. Par ailleurs, sachant que 15 à 20% des patientes atteintes de HGSOC présentent des mutations BRCA1 et BRCA2 de la lignée germinale, le diagnostic devrait déclencher l'analyse de profils génétiques pour la patiente et les membres de sa famille [155].

c) Pathogénie

Il est difficile d'étudier les événements primaires menant au développement des EOC en raison du nombre très limité d'échantillons tumoraux disponibles à des stades précoces, de l'hétérogénéité inter-individuelle de cette maladie et de l'instabilité génétique des tumeurs. Concernant la clonalité, les tests d'hétérozygotie (loss of heterozygosity, LOH), d'inactivation du chromosome X et l'évaluation de mutations sur des gènes spécifiques conduisent tous à la conclusion que les EOC ont une origine monoclonale compte tenue des similarités retrouvées entre la tumeur primaire et les métastases [156,157]. Certaines technologies récentes (Comparative Genome Hybridization, Microarray Expression Profiling), permettant d'analyser des milliers de gènes en même temps, ont conduit à l'identification de gènes et de voies de signalisation potentiellement responsables de la pathogénie de ces cancers [158,159].

Une étude comparant des cellules épithéliales ovariennes saines à des cellules cancéreuses issues de tumeurs à des stades précoces et avancés a identifié des différences d'expression génique entre les tissus sains et tumoraux. Les tissus cancéreux précoces et avancés présentaient des profils très similaires, sachant que des analyses génomiques ont démontré la présence d'anomalies génétiques aux stades les plus avancés [160]. Il faut donc être prudent puisque les métastases ou disséminations peuvent continuer à acquérir des mutations qui pourraient, au moment où elles sont détectées par les analyses, être interprétées comme des signatures génétiques à l'origine de leur développement. En réalité, ces mutations acquises aux stades les plus avancés ont souvent vocation de permettre aux métastases péritonéales de devenir systémiques, donc de passer la barrière endothéliale des vaisseaux.

Des désordres génétiques héréditaires sont à l'origine d'environ 10% des cancers ovariens, et parmi eux 90% sont dus à des mutations des gènes BRCA1 ou BRCA2. Les protéines correspondantes sont considérées comme des gardiennes du génome puisqu'elles jouent un rôle très important dans la signalisation des dommages à l'ADN, l'activation des mécanismes de réparation, l'induction de l'apoptose et la surveillance des points de contrôles du cycle cellulaire [161–163]. Certains dommages à l'ADN laissent des cicatrices qui peuvent être détectées par des tests commerciaux évaluant les anomalies de recombinaison homologue.

Les études cliniques, translationnelles et génétiques ont démontré que la carcinogenèse des cancers ovariens contient au moins 2 grandes catégories : les tumeurs malignes de haut grade à croissance rapide qui sont relativement chimiosensibles, incluant les HGSOV, les carcinomes endométrioïdes de haut grade, et les carcinomes à cellules claires ; les tumeurs de bas grade à croissance lente répondant moins aux chimiothérapies [164].

Les analyses moléculaires et protéomiques suggèrent que les mutations sur les gènes K-RAS et BRAF, par exemple, sont présentes dans 30 à 50% des tumeurs de bas grade mais rarement détectées sur des tumeurs de haut grade [165]. En revanche, des mutations du gène p53 sont rarement observées sur les tumeurs de bas grade, alors qu'elles sont présentes dans 50 à 80% des tumeurs de haut grade [166,167]. La voie de signalisation p53 est prédominante dans les tumeurs de bas grade alors qu'elle est absente du 2^{ème} modèle, suggérant que l'inactivation de cette voie est un événement clef conduisant au développement de tumeurs de haut grade [168].

Pour qu'il y ait développement tumoral, dans la majorité des cas, une cellule cancéreuse doit être capable d'échapper à beaucoup de mécanismes cellulaires empêchant en temps normal le développement de cellules aberrantes. Ces cellules cancéreuses peuvent donc proliférer de manière anarchique, inhiber les mécanismes d'apoptose, se séparer de la tumeur primaire, envahir le tissu conjonctif puis s'implanter et croître dans de nouveaux tissus, et déclencher la vascularisation tumorale (angiogenèse) [169]. Une des premières protéines décrites associées aux cancers ovariens

est la protéine src, une tyrosine kinase non réceptrice qui participe à de nombreux processus carcinogènes [170]. La surexpression de cette protéine est décrite dans 93% des tumeurs ovariennes de haut grade [171], et est impliquée dans les processus de résistance aux traitements à base de sels de platine et de taxanes [172]. Par ailleurs, la protéine EGFR (epidermal growth factor receptor), appartenant à la famille des récepteurs à la tyrosine kinase de type I, est normalement exprimée sur l'épithélium sain de la surface ovarienne mais surexprimée dans 35 à 90% des EOC [173].

Bien que les modifications génétiques des cellules cancéreuses soient cruciales, de plus en plus d'études démontrent que l'implication du microenvironnement est aussi importante pour le développement tumoral. Concernant les carcinomes, tout laisse à penser que le péritoine est permissif à l'implantation tumorale, voir même la favorise. En effet, une tumeur ne compte pas que des cellules tumorales mais également des composants de la matrice extracellulaire (ECM), des cellules du tissu conjonctif et des cellules immunitaires. La communication entre les cellules tumorales et celles des tissus avoisinants coordonne l'invasion du tissu conjonctif, l'intravasation dans les circulations sanguine et lymphatique, l'adhésion et la croissance des métastases, ainsi que l'établissement de l'angiogenèse [169]. Ainsi, les altérations du péritoine et du tissu conjonctif sous-jacent peuvent contribuer à la dissémination des cellules tumorales ovariennes [174]. Par exemple, les médiateurs de l'angiogenèse incluent des facteurs issus des cellules cancéreuses mais aussi des cellules conjonctives. Le taux d'interleukine 8 (IL-8) joue un rôle important dans l'angiogenèse et la croissance des cancers ovariens, par conséquent il est élevé chez les patientes présentant des tumeurs aux stades précoces ou avancés [175,176].

La production de cytokines par les cellules mésenchymateuses stimule l'épithélium ovarien et active des processus pouvant être à l'origine de la transformation de cellules saines en cellules tumorales [177]. De plus, la production de cytokines par les cellules cancéreuses va stimuler leur croissance et inhiber le processus apoptotique [178].

Un des paramètres importants dans le processus métastatique, et une des caractéristiques définissant la malignité, est l'invasion. Le passage de cellules tumorales à travers la membrane basale de l'épithélium nécessite justement une interaction entre ces cellules et le conjonctif permissif sous-jacent [169]. Les métalloprotéases matricielles (MMP) sont une famille d'endopeptidases (zinc-dépendantes) qui digèrent le collagène et d'autres composants importants de la matrice. Elles vont aussi induire le relargage de VEGF (vascular endothelial growth factor), facteur déterminant de l'angiogenèse [179]. Les tumeurs ovariennes surexpriment MMP-2 et MMP-9 [180] et cette surexpression va être corrélée aux stades de développement des tumeurs [181].

Le processus métastatique des EOC est différent de ceux décrits dans la plupart des carcinomes. Le relargage de cellules cancéreuses par des tumeurs précoces est difficile à déterminer, cependant des cytologies péritonéales positives ont été détectées dans 30% des cancers ovariens de stade I [182].

Etant donné que les cancers ovariens présentent des cellules tumorales capables de se détacher de la tumeur primaire, le rôle de molécules d'adhésion a été évalué dans le processus de dissémination péritonéale. La E-cadhérine par exemple, est exprimée de manière uniforme dans le cancer ovarien alors qu'elle est absente des épithéliums de surface sains [183].

Les caractéristiques communes aux deux modèles de pathogenèse des cancers ovariens sont l'esquive de la surveillance immunitaire, l'invasion du tissu conjonctif, la survie des cellules tumorales dans la cavité péritonéale, leur adhésion sur des sites distants, leur croissance continue et l'initiation de l'angiogenèse [169].

d) Les traitements et prises en charge

- **En première intention**

Depuis les années 1980, la chirurgie cytoréductrice de première intention suivie de chimiothérapies est devenue la norme de soins [184]. Le facteur influençant le plus le pronostic des patientes est l'efficacité de la chirurgie ayant toujours pour objectif d'être la plus complète possible en ne laissant pas de tumeurs résiduelles [185]. Le débat du choix entre la CRS suivie de chimiothérapies, ou la thérapie néo adjuvante suivie de CRS est toujours d'actualité [186]. De nombreux efforts de recherche sont encore à fournir de manière à orienter au mieux les patientes, en passant par de meilleurs systèmes de scores pour évaluer l'étendue des maladies en imagerie ou laparoscopie, et des algorithmes qui permettraient de prédire l'issue de tel ou tel traitement [142].

Un essai clinique européen randomisé publié en 2010 a démontré que la survie globale des patientes en stade IIIC, avec des implants de carcinose inférieur à 5 cm, est meilleure quand elles sont orientées directement vers la CRS alors que celle des patientes en stade IV est meilleure avec la thérapie néo adjuvante [187]. Cependant dans les deux cas, le paramètre le plus important est toujours l'absence de tumeur résiduelle après la chirurgie qu'elle soit pratiquée en première intention ou après chimiothérapie néo adjuvante [185,187].

En ce qui concerne les chimiothérapies, les directives de traitement sont très orientées par les HGSOC puisqu'ils représentent la très large majorité des cancers ovariens. La recommandation standard dans les chimiothérapies de première intention est l'administration d'une bi-thérapie à base de sels de platine (carboplatine) associés à un taxane (paclitaxel) toutes les trois semaines et pour six cycles [188]. Les taxanes se lient aux polymères de tubuline inhibant ainsi leur polymérisation et l'assemblage des microtubules ce qui bloque la division cellulaire, alors que les analogues du platine vont former des pontages intra-brin sur l'ADN [189].

Deux essais cliniques randomisés (GOG218 [190] et ICON7 [191]) ont démontré une augmentation significative de la survie des patientes sans progression de la maladie (pas d'augmentation de la survie globale) lorsqu'un inhibiteur de l'angiogenèse, le bevacizumab, est utilisé en association avec la

chimiothérapie puis en monothérapie avec une maintenance de 15 mois. Le bevacizumab est un anticorps dirigé contre le VEGF, facteur clef de la vasculogénèse et de l'angiogénèse, qui lorsqu'il se lie à sa cible va agir comme compétiteur pour empêcher la liaison du VEGF à ses récepteurs situés à la surface des cellules endothéliales. Ces conclusions ont conduit à l'évolution des normes de soin avec l'addition de bevacizumab aux molécules de paclitaxel et carboplatine toutes les trois semaines pour les stades avancés du cancer ovarien.

L'utilisation de cisplatine et de paclitaxel par voie intrapéritonéale a démontré certains avantages en matière de survie dans plusieurs essais cliniques pour des patientes présentant des tumeurs résiduelles de moins d'un centimètre après la chirurgie de cytoréduction [192,193]. Cependant à dose équivalente, aucun avantage significatif n'a été démontré pour l'administration intrapéritonéale *versus* l'administration systémique [194]. Les études associées à un bénéfice ont été critiquées, la chimiothérapie intrapéritonéale était faite avec du cisplatine à 100 mg/m² et associée à une forte toxicité [195].

Deux essais cliniques randomisés ont été effectués en Hollande (NCT00426257, [196]) et en Corée (NCT01091636, [197]) en utilisant l'HIPEC au moment de la chirurgie de cytoréduction, après la thérapie néo-adjuvante. Les hollandais ont rapporté une amélioration significative en matière de survie globale pour le groupe de patientes ayant reçu l'HIPEC. En revanche les coréens ne sont pas arrivés aux mêmes conclusions.

L'utilisation des inhibiteurs des enzymes poly (ADP-ribose) polymérase (PARPi) représente à ce jour la plus grande avancée observée dans le traitement des HGSOc, en maintenant des défauts dans le processus de réparation des dommages à l'ADN présents dans environ 50% des HGSOc, à cause des mutations sur BRCA1 et BRCA2 et des anomalies de réparation de l'ADN par recombinaison homologue. Les PARPi ont démontré une efficacité remarquable lorsqu'ils sont utilisés seuls chez des patientes en primo-traitement, indépendamment de la présence de mutations sur BRCA1 et BRCA2, et une amélioration notable chez des femmes présentant les mutations BRCA et sensibles aux sels de platine [198–201]. Pour ces dernières, l'Olaparib, un PARPi, a été approuvé en Europe comme traitement de maintenance [137]. Les résultats de l'étude SOLO1 montrent un gain considérable en survie des patientes sans progression de la maladie en cas de maintenance par PARPi après une chirurgie et une chimiothérapie à base de sels de platine. Après plus de 5 ans, la médiane de survie globale n'est toujours pas obtenue, laissant penser qu'une partie de la population est peut-être guérie, notion inenvisageable il y a encore quelques années.

L'association d'une chimiothérapie à base de sels de platine et de bevacizumab suivie d'une maintenance par PARPi et bevacizumab a été évaluée récemment avec un gain supplémentaire en survie sans récurrence pour toutes les patientes présentant des anomalies de réparation des dommages à l'ADN par recombinaison homologue [138].

- **Suivi des traitements**

Une bonne mise en place du suivi des patientes peut conduire à une détection précoce de rechutes, cependant il n'existe pas de normes de soins claires sur le type de suivi à effectuer ni sur sa fréquence. Des examens physiques réguliers sont généralement recommandés. Chez certaines patientes, un des premiers signes de rechute est l'augmentation du CA125 sanguin, mais la valeur seuil pour détecter ces rechutes n'est pas vraiment établie puisque le bénéfice en matière de survie basé seulement sur la détection d'augmentation de CA125 n'est pas avéré [202]. Le doublement du taux sérique de CA125 à trois mois d'intervalle constitue à l'heure actuelle la référence [203]. A noter qu'un essai randomisé évaluant la réalisation ou non d'un suivi systématique du CA125 n'a pas mis en évidence de supériorité de survie, laissant penser que l'avance de la récurrence au diagnostic (asymptomatique dans ce cas) ne modifie pas l'histoire globale de la maladie. La tomodensitométrie, et plus généralement l'imagerie réalisée pour détecter des rechutes asymptomatiques, ne devrait pas être effectuée de façon systématique. Elle est par contre utile comme élément de référence en cas de récurrence avant de commencer une nouvelle ligne de thérapie [142].

- **Les rechutes**

Traditionnellement, les rechutes des cancers ovariens sont considérées comme incurables chez environ 75% des patientes diagnostiquées à des stades avancés. Il s'agit donc d'un exemple de maladies chroniques, élément important pour adapter les périodes de traitement et les périodes d'observation. Depuis 30 ans, un algorithme fonctionnel, basé sur la durée sans traitement aux sels de platine avant la réapparition de tumeurs, est un outil remarquablement efficace pour sélectionner la thérapie à utiliser au moment des rechutes et donc interférer sur le pronostic [142]. Après une ou plusieurs récurrences platine-sensibles, une résistance secondaire à ce traitement va survenir, suivie de l'occlusion intestinale à l'origine du décès des patientes.

Au moment de la réapparition de la maladie, la CRS secondaire doit être considérée dans certains cas [204]. Durant l'essai AGO-OVAR, un algorithme prédictif de l'efficacité de la chirurgie secondaire, nommé score DESKTOP (Descriptive Evaluation of preoperative Selection KriTeria for OPerability), a été développé. Un score DESKTOP positif prédit la probabilité d'effectuer une résection complète des implantations tumorales issues de rechutes dans plus de deux patientes sur trois avec une précision de 95% [205]. Les résultats définitifs de l'essai de phase III AGO DESKTOP III comparant, lors d'une récurrence, une stratégie de chirurgie suivie de chimiothérapie *versus* chimiothérapie seule seront présentés lors du prochain congrès de l'ASCO (American Society of Clinical Oncology) en 2020, sachant que les données préliminaires ont démontré un gain significatif en survie des patientes sans progression de la maladie [206].

Pour les HGSOC, dans le cas de rechutes sensibles aux sels de platine, si la chirurgie secondaire n'est pas indiquée, un nouveau challenge en chimiothérapie systémique aux sels de platine est standard [207,208]. Comme en première intention, des stratégies de maintenance ont été mise en place avec le bevacizumab et ont démontré un bénéfice significatif sur le contrôle de la maladie [209,210].

Les bénéfices des traitements de maintien aux PARPi ont été démontrés en phase III dans différents essais cliniques ([137,211–214]) conduisant à l'approbation des PARPi par l'EMA comme traitement de maintenance chez des patientes en rechutes sensibles aux sels de platine ayant atteint une réponse partielle ou complète à la chimiothérapie, indépendamment de leur statut BRCA. La dernière molécule de type PARPi ajoutée en date, le rucaparib, a également démontré un bénéfice significatif avec une utilisation en monothérapie [213]. Le Tableau 2 regroupe les principaux essais cliniques démontrant l'efficacité des PARPi comme traitement de maintien [141].

THERAPY	CLINICAL PHASE	PATIENT POPULATION	BENEFIT	CONCLUSION
Olaparib maintenance	Phase 3	In first line for newly diagnosed, advanced ovarian cancer with <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> (or both) mutation after complete or partial clinical response to platinum-based chemotherapy	The risk of disease progression or death was 70% lower with olaparib than with placebo at median follow up of 41 months 60% vs. 27% (hazard ratio for disease progression or death, 0.30; 95 % confidence interval, 0.23 to 0.41; $P < .001$)	The use of maintenance therapy with olaparib provided a substantial benefit with regard to progression-free survival among women with newly diagnosed advanced ovarian cancer and a <i>BRCA1/2</i> mutation, with a 70% lower risk of disease progression or death with olaparib than with placebo Moore et al. 2018 ¹²⁸
Olaparib maintenance	Phase 2	Platinum-sensitive, relapsed ovarian cancer	PFS was significantly longer with olaparib than with placebo: 8.4 vs 4.8 mo from randomization to completion of chemotherapy	Olaparib as maintenance significantly improved PFS among patients with platinum-sensitive, relapsed, high-grade serous ovarian cancer Interim analysis showed no overall survival benefit Ledermann 2012 ¹¹⁶
Olaparib (tablets) maintenance	Phase 3	Platinum-sensitive, relapsed, high-grade serous ovarian cancer with a <i>BRCA1</i> or <i>BRCA2</i> mutation	Median PFS was significantly longer with olaparib than with placebo: 19.1 vs 5.5 mo	Olaparib tablet maintenance significantly improved PFS with no detrimental effect on quality of life in patients with platinum-sensitive, relapsed ovarian cancer and a <i>BRCA1/BRCA2</i> mutation Pujade-Lauraine 2017 ¹¹⁵
Niraparib maintenance	Phase 3	Platinum-sensitive, recurrent ovarian cancer (categorized by the presence or absence of germline <i>BRCA</i> [<i>gBRCA</i>] mutation)	Median duration of PFS was significantly longer with niraparib than placebo: 21.0 vs 5.5 mo in patients with <i>gBRCA</i> 12.9 vs 3.8 mo in patients with non- <i>gBRCA</i>	Among patients with platinum-sensitive, recurrent ovarian cancer, the median duration of PFS was significantly longer among those receiving niraparib than among those receiving placebo, regardless of the presence or absence of <i>gBRCA</i> mutations Mirza 2016 ¹¹⁹
Rucaparib maintenance	Phase 3	Platinum-sensitive, recurrent, high-grade ovarian cancer	Median PFS was significantly longer with rucaparib than with placebo in: Patients with <i>BRCA</i> -mutant carcinoma: 16.6 vs 5.4 mo Patients with HRD carcinoma: 13.6 vs 5.4 mo The intention-to-treat population: 10.8 vs 5.4 mo	Across all primary analysis groups, rucaparib significantly improved PFS survival in patients with platinum-sensitive ovarian cancer who had achieved a response to platinum-based chemotherapy Coleman 2017 ¹²²

Abbreviations: HRD, homologous recombination deficiency; PARP, poly (ADP-ribose) polymerase; PFS, progression-free survival.

Tableau 2 : Essais cliniques publiés entre 2012 et 2018 démontrant l'efficacité des PARPi comme traitement de maintien dans le cancer ovarien [141].

Pour les rechutes des HGSOc dites résistantes aux traitements utilisés en première intention, des monothérapies séquentielles sont proposées avec des injections hebdomadaires de paclitaxel, doxorubicine liposomale pégylée et gemcitabine jusqu'à une nouvelle progression de la maladie ou des effets secondaires toxiques inacceptables. Cependant, étant donné que le taux de réponse de ces rechutes résistantes est bas (10 à 15% environ), de nombreux essais cliniques planchent sur le développement d'agents capables de passer outre le mécanisme de résistance [215]. L'essai clinique de phase III AURELIA [216] a démontré l'avantage de l'addition de bevacizumab à différents types de chimiothérapies, en terme de survie globale et taux de réponse objective.

- **Les tumeurs réfractaires**

Les patientes ayant des maladies dites réfractaires, donc résistantes aux traitements dès la chimiothérapie de première intention aux sels de platine, vont de fait avoir un pronostic très sombre puisque leur réponse à la chimiothérapie standard sera très faible. L'utilisation de thérapies combinées pourrait avoir un grand intérêt pour le traitement des tumeurs réfractaires avec par exemple l'association d'immunothérapie, de PARPi et d'anti-angiogéniques. Le développement d'immunothérapies a entre autre pour l'objectif de moduler le microenvironnement tumoral, pour le rendre plus sensible aux traitements (voir paragraphe suivant ; immunothérapies contre le cancer ovarien). Malheureusement les résultats préliminaires des essais en immunothérapie comme monothérapie ne sont pas très encourageants [217], ainsi des approches basées sur des thérapies combinées ou ciblant les lymphocytes T sont développées [218].

Beaucoup d'efforts sont également réalisés pour la mise en place de thérapie ciblée, comme le développement de molécules thérapeutiques conjuguées aux anticorps. Un agent cytotoxique lié à un anticorps, spécifique d'un marqueur de la maladie, va permettre d'amener la molécule de manière ciblée aux tumeurs pour épargner au maximum les tissus sains environnants [219]. Une de ces thérapies ciblées est évaluée en essai clinique de phase III (FORWARD I). Il s'agit d'un anticorps monoclonal humanisé (mirvetuximab) dirigé contre le récepteur au folate couplé à la molécule cytotoxique maytansinoid DM4. Cette étude est réalisée sur des patientes présentant un EOC surexprimant le récepteur au folate et résistant aux sels de platine [220]. Ce type de thérapie ouvre la voie de l'exploration de techniques d'imagerie fonctionnelle basées sur l'identification d'une cible spécifique de la maladie [221]. De nombreuses nouvelles cibles ont été identifiées pour chaque type de tumeur ovarienne et sont à l'heure actuelle évaluées dans le cadre d'essais cliniques (Figure 18, [142]).

Des thérapies combinatoires ciblant la réponse aux dommages à l'ADN, le cycle cellulaire, les voies de signalisation et le microenvironnement tumoral seront peut-être nécessaires pour contrôler la grande complexité génétique de l'évolution des EOC [142].

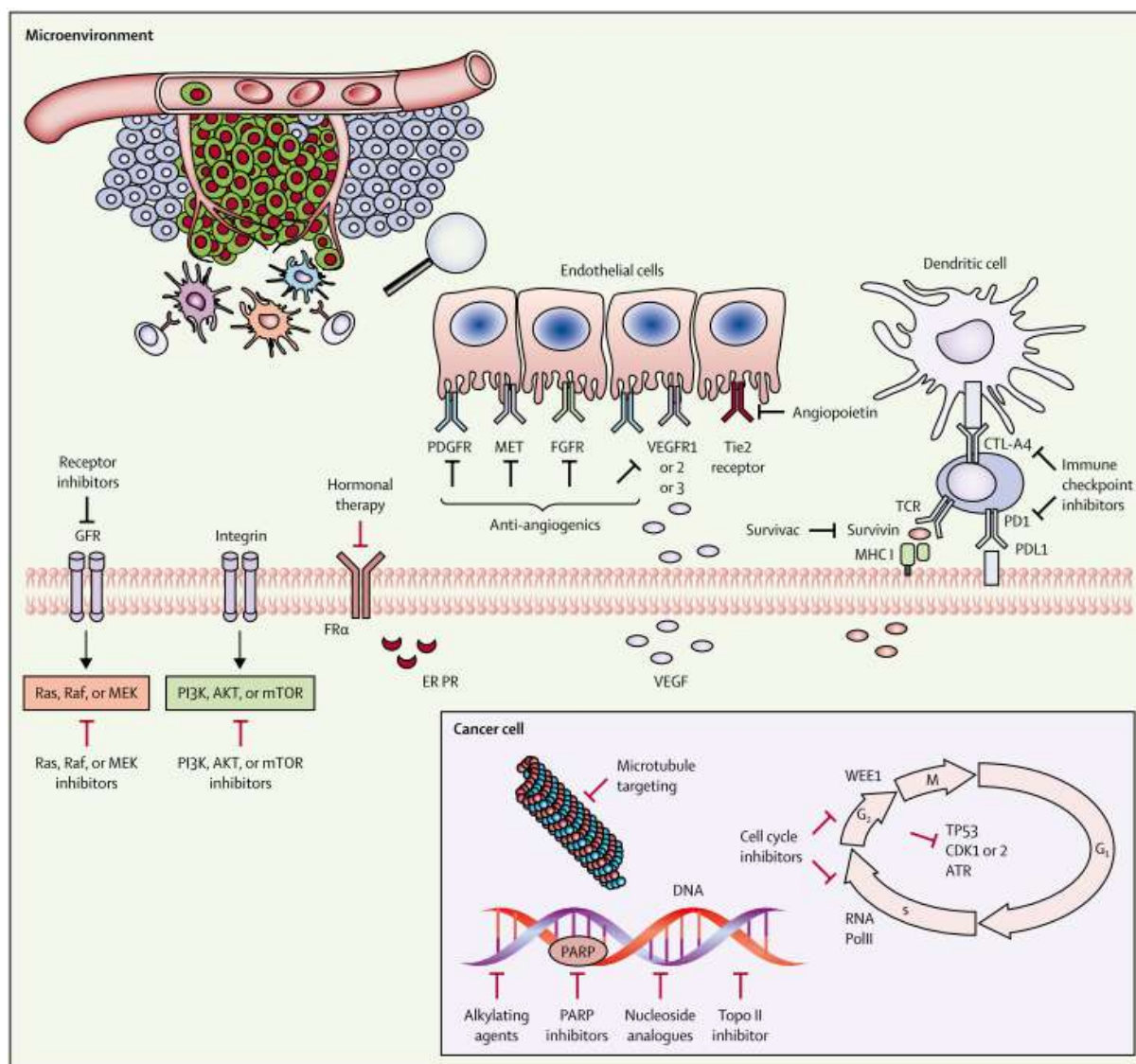


Figure 18 : Les différentes cibles moléculaires et voies de signalisation sur lesquelles se concentrent les efforts de recherche pour le développement de nouveaux traitements [142]. Ces cibles peuvent provenir des cellules cancéreuses mais également du microenvironnement tumoral, comme les cellules immunitaires ou le tissu sanguin.

La création de centres experts « Cancer de l’ovaire », par essence multidisciplinaires associant oncologue médical, chirurgien, anatomopathologiste, imageur, radiothérapeute, médecin spécialiste, médecin traitant, infirmière de pratique avancée, psychologue, etc. représente le lieu idéal pour intégrer des soins de haute qualité et les dernières avancées de la recherche biomédicale dans les pratiques cliniques, capitales pour l’amélioration et les futurs développements de la médecine de précision qui auront un impact majeur sur la prise en charge des patientes [142]. De plus, il a été démontré que la survie des patientes traitées dans un centre participant à la recherche est augmentée [206].

- **Les immunothérapies contre le cancer ovarien**

Le microenvironnement tumoral est constitué d'énormément de cellules pouvant influencer le développement de la tumeur, sa progression, sa vascularisation ou encore sa sensibilité aux traitements. Dans le contexte du cancer ovarien, de nombreuses cellules et molécules peuvent être potentiellement ciblées en immunothérapie. Le Tableau 3, extrait du Bulletin du cancer, regroupent les essais cliniques de phase III en cours se concentrant sur l'inhibition des points de contrôles immunitaires (IPCI) en combinaison avec des PARPi ou encore avec PARPi et chimiothérapies [222].

Essai	IPCI	Agent associé	Ligne	Sélection des patientes	n	Critère de jugement principal	État d'avancement
+ CHIMIOTHÉRAPIE (CT) ET BÉVACIZUMAB							
ATALANTE	Atezolizumab	Carboplatine + paclitaxel/ gemcitabine/ doxorubicine liposomale pégylée (DLP) + Bévacizumab	Rechute	Platine sensible 1 ou 2 lignes antérieures maximum	600	PFS jugée par l'investigateur (iPFS)	Recrutement terminé
IMagyn050/GOG 3015/ENGOT-OV39	Atezolizumab	Carboplatine + paclitaxel (CP) + Bévacizumab (Bev)	Première ligne	Stades III/IV Résidu macroscopique ou chimiothérapie néo adjuvante	1300	iPFS et OS dans la population en ITT et PD-L1+	Recrutement terminé
+ INHIBITEUR DE PARP							
ATHENA	Nivolumab	Maintenance avec Rucaparib après réponse à une CT à base de sels de platine	Première ligne	Stades III/IV	1012	iPFS	Recrutement en cours
FIRST	Dostarlimab	Maintenance avec Niraparib après CP ± Bev	Première ligne	Stades III/IV	912	iPFS	Recrutement en cours
MK-7339-001/ KEYLYNK-001/ENGOT-ov43	Pembrolizumab	Maintenance avec Olaparib après CP ± Bev	Première ligne	Stades III/IV BRCAwt	1086	iPFS OS	Recrutement en cours
DUO-0	Durvalumab	Maintenance avec Olaparib après CP + Bev	Première ligne	Stades III/IV opérées BRCAwt (cohorte BRCA mutée en ouvert)	1056	iPFS	Recrutement en cours
ANITA	Atezolizumab	Maintenance avec Niraparib après CP/C + gemcitabine/C + DLP	Rechute	Platine sensible 1 ou 2 lignes antérieures maximum	414	iPFS	Recrutement en cours

Tableau 3 : Essais cliniques de phase III en cours évaluant des inhibiteurs de points de contrôles immunitaires en combinaison avec des PARPi et des chimiothérapies [222].

3. Le microenvironnement tumoral ovarien

Les modifications génétiques conduisant au phénotype tumoral sont largement établies. Cependant depuis deux décennies, un grand nombre de publications souligne l'implication des tissus avoisinant les tumeurs dans le développement et la progression de ces dernières. Le rôle de ce microenvironnement tumoral (TME) est de première importance dès les stades les plus précoces de la carcinogenèse. Le TME est composé de matrice extracellulaire (ECM) et de différents types cellulaires

qui interagissent entre eux et avec les cellules cancéreuses par le biais de signaux et facteurs sécrétés. Parmi ces différents types cellulaires nous retrouvons des cellules immunitaires (macrophages, lymphocytes, cellules NK, cellules dendritiques, neutrophiles et cellules myéloïdes immatures) et non immunitaires (cellules endothéliales, fibroblastes, adipocytes, cellules mésothéliales et les cellules mésenchymateuses) [223].

La nature de ce microenvironnement va dépendre du tissu dans lequel se développe les tumeurs. En conditions physiologiques, le microenvironnement correspond au tissu conjonctif, ou stroma, propre à chaque tissu et indispensable à l'architecture et au bon fonctionnement des organes. Dans le cancer ovarien, les cellules tumorales sont capables de modifier la composition de leur stroma en induisant la différenciation de cellules saines vers des phénotypes pro-tumoraux. Les cellules du TME vont en retour être capables de faciliter la progression des tumeurs en régulant leur croissance et dissémination, l'angiogenèse, l'immunosuppression et les chimiorésistances associées. L'implication du microenvironnement dans la dissémination péritonéale de cellules cancéreuses issues de la tumeur primaire ne fait donc plus aucun doute [224]. Les caractéristiques particulières du stroma péritonéal expliquent également le concept de permissivité du péritoine pour l'implantation de cellules cancéreuses. La transition épithélio-mésenchymateuse effectuée par les cellules tumorales, en traversant la membrane basale de l'épithélium, pour initier le processus de dissémination est rendue possible par des changements dans la nature des signaux externes de l'ECM [225]. Le stroma péritonéal va donc influencer le développement et la progression tumorale et aussi la résistance aux traitements [226]. La Figure 19 est issue d'une revue qui récapitule les caractéristiques du microenvironnement tumoral dans le contexte du cancer ovarien [224].

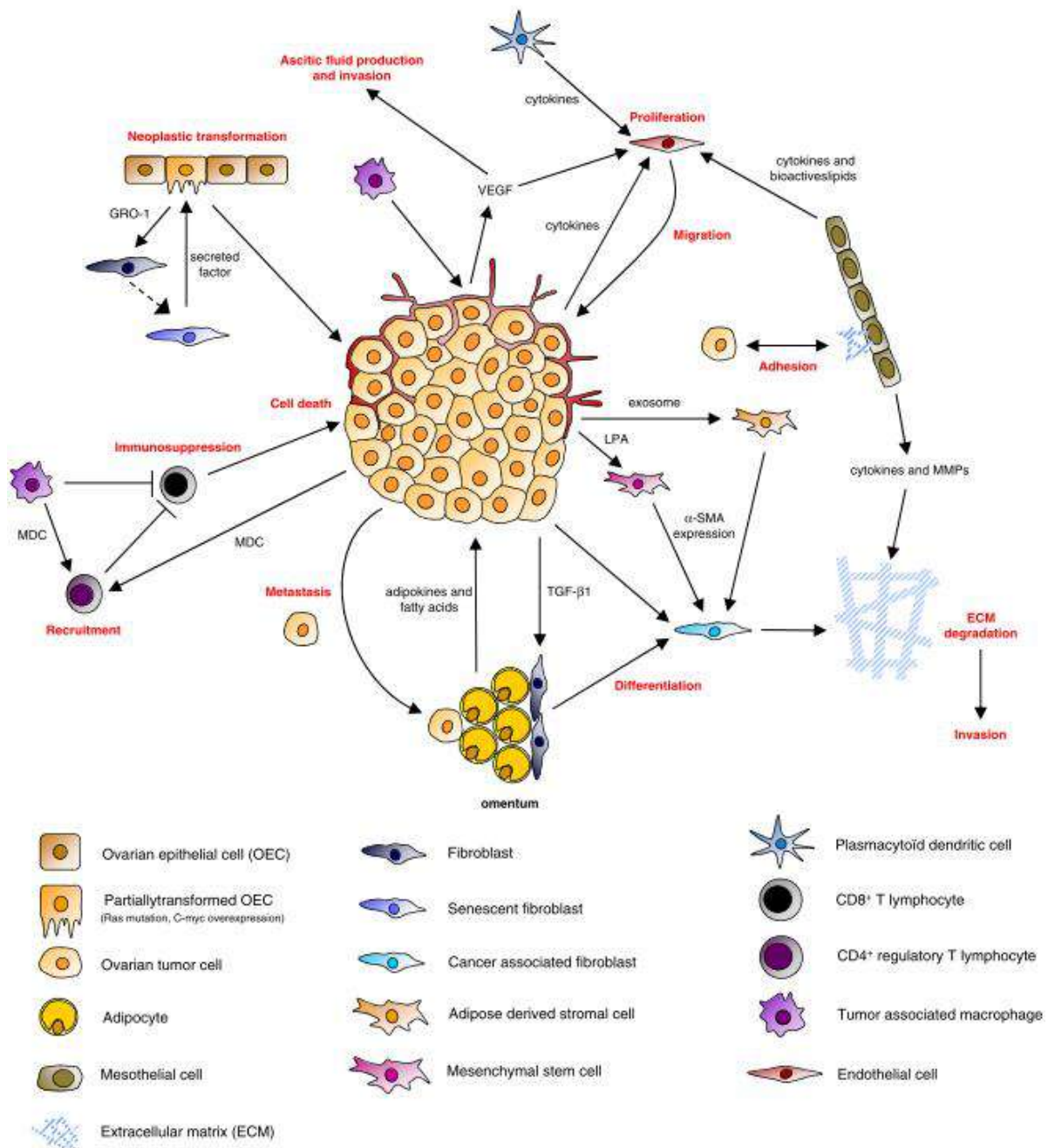


Figure 19 : Le microenvironnement tumoral ovarien [224]. Représentation non exhaustive des différents facteurs du TME ovarien. Les cellules cancéreuses ovariennes sont capables de réguler la composition de leur TME, particulièrement en induisant la différenciation des fibroblastes, des cellules souches mésenchymateuses et des adipocytes du stroma en fibroblastes associés au cancer (cancer-associated fibroblasts, CAFs). Ces cellules, comme les cellules mésothéliales, peuvent dégrader la matrice extracellulaire et favoriser l'invasion des cellules tumorales. Les cellules mésothéliales sont aussi capables de favoriser l'angiogenèse et de réguler l'adhésion des cellules tumorales. Les macrophages associés au cancer (Tumor-associated macrophages, TAMs) peuvent réguler l'angiogenèse, augmenter la production d'ascites, activer le recrutement de lymphocytes T régulateurs et inhiber les lymphocytes T cytotoxiques. Les adipocytes de l'omentum favorisent la croissance tumorale et le processus métastatique par la sécrétion d'adipokines et d'acides gras.

a) Les cellules immunitaires

• Les TAMs (Tumor-associated macrophages)

Les monocytes, dérivant de progéniteurs myéloïdes dans la moelle osseuse, ont la faculté de passer dans la circulation sanguine, puis de migrer par extravasation vers différents tissus où il se différencient en macrophages ou cellules dendritiques [227]. Ainsi, les macrophages sont tissulaires alors que les monocytes sont présents dans le compartiment vasculaire ainsi que dans le tissu conjonctif (histiocytes). En conditions physiologiques, les macrophages sont des cellules de l'immunité innée capables d'éliminer des pathogènes ou des cellules anormales par phagocytose mais également d'activer le système immunitaire adaptatif en devenant des cellules présentatrices d'antigènes. Les macrophages jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie tissulaire et dans la réponse immune, notamment en modulant la réponse inflammatoire.

Dans le contexte tumoral, les TAMs sont des composants majeurs du microenvironnement. En effet, les monocytes sanguins sont recrutés dans les tumeurs *via* des facteurs sécrétés par les cellules tumorales et stromales [228]. Une fois différenciés en macrophages, ces TAMs vont promouvoir la prolifération, la survie et la mobilité des cellules tumorales donc des métastases, ainsi que l'angiogenèse et la suppression de l'immunité antitumorale [229]. Un tel panel de fonctions pro-tumorales explique pourquoi une forte densité de macrophages dans les tumeurs est souvent associée à un mauvais pronostic [230]. Au cours de la carcinogenèse, les macrophages peuvent subir différentes polarisations leur conférant des phénotypes pro-inflammatoire (M1) et pro-tumoraux (M2). Ces deux types de polarisations doivent être considérés comme les extrêmes d'un ensemble d'états d'activation. Dans les stades précoces de l'oncogenèse, il est décrit que les macrophages sont « classiquement » activés avec un phénotype M1. Cette polarisation M1 est typiquement déclenchée par des toxines bactériennes (Lipopolysaccharides, LPS), l'interféron gamma (IFN- γ) seul ou combiné à des cytokines ou d'autres facteurs de croissance [231]. Ces macrophages M1 sont caractérisés par la production d'IL-12 et la surexpression d'autres cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-6, IL-23), dont certaines qui sont capables d'induire directement la lyse et la mort des cellules transformées [232]. Ils produisent également de nombreuses chimiokines (CCL8, CCL15, CCL19, CCL20, CXCL13, *etc.*) [233]. Les macrophages M1 vont donc exercer un rôle microbicide mais également tumoricide. Ils vont donc avoir une activité plutôt antitumorale.

Les macrophages de type M2 sont considérés comme des macrophages « alternativement » activés, et représentent le phénotype majoritaire des TAMs acquis de manière concomitante à la progression tumorale [232]. Ils vont aussi sécréter des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-1 β , TNF- α) et sont caractérisés par l'expression de marqueurs propres tels que la Dectine 1, le récepteur au mannose

(CD206) et le « scavenger receptor » CD163 [233]. Ces macrophages M2 ont donc un profil immunosuppresseur associé à la prolifération tumorale.

- **Les lymphocytes T**

Beaucoup de lymphocytes T différents sont retrouvés dans le TME. Parmi eux les lymphocytes T cytotoxiques (LTc), ou lymphocytes T CD8⁺, sont des cellules de l'immunité acquise capables de reconnaître spécifiquement des antigènes tumoraux. Les LTc exercent une activité antitumorale par sécrétion de perforine et de granzyme, entraînant respectivement la formation de pores dans la membrane plasmique et la mort cellulaire par activation des caspases [224]. Les LTc et les lymphocytes CD4⁺ T helper 1 (LTh1) vont tous deux sécréter beaucoup d'autres facteurs, dont l'IFN- γ , cytokine importante pour ses activités de prévention et suppression du développement tumoral. Ainsi, dans beaucoup de tumeurs solides, une infiltration de LTc et LTh1 est corrélée à un bon pronostic [234]. Cependant, tous les lymphocytes T ne sont pas des effecteurs anti-tumoraux. Le rôle des cellules CD4⁺ T helper 2, T helper 17, et des cellules T régulatrices dans le développement tumoral est encore obscur et controversé [234–236].

- **Autres cellules immunitaires**

Les tumeurs recrutent également une variété de cellules myéloïdes immatures, souvent référencées comme Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs), qui comprennent des précurseurs de cellules myéloïdes granulocytaires et mononucléaires. Ces dernières peuvent finalement évoluer en TAMs [237,238]. Les MDSCs sont caractérisées par un phénotype immunosuppresseur [239].

Les autres cellules du système immunitaire impliquées dans le microenvironnement tumoral ovarien sont les cellules NK, les cellules dendritiques et les polynucléaires neutrophiles [224].

b) Les cellules non immunitaires

- **Les CAFs (Cancer-associated Fibroblasts)**

Les fibroblastes sont une population hétérologue de cellules d'origine mésenchymateuse appartenant au tissu conjonctif. Leur activité principale en conditions physiologiques est le maintien de l'homéostasie de la matrice extracellulaire en produisant la plupart des protéines qui la compose (collagène, fibronectine, laminine, *etc.*) et en synthétisant les MMP responsables de sa dégradation de manière à orchestrer la balance métabolique de l'ECM. Ils sont aussi impliqués dans la réparation de lésions tissulaires [240].

Durant la croissance tumorale, le stress hypoxique et le faible taux de nutriments disponibles induisent la sécrétion de facteurs et de cytokines par les cellules tumorales qui vont exercer un effet paracrine sur les cellules du stroma environnant. Une exposition prolongée au transforming growth factor β (TGF- β), au platelet-derived growth factor (PDGF), au fibroblast growth factor (FGF) et au VEGF va

aboutir à la transdifférentiation des fibroblastes en « cancer-associated fibroblasts » ou CAFs. Ils vont ensuite présenter un phénotype pro-tumoral en favorisant la prolifération de cellules cancéreuses, l'invasion des tissus et donc les métastases [240,241]. Il a aussi été démontré que les CAFs vont avoir une activité immunosuppressive par la sécrétion d'une chimiokine, CXCL12, qui va favoriser l'infiltration de cellules T régulatrices [242].

- **Les cellules endothéliales**

Les cellules endothéliales tapissent la paroi interne des vaisseaux sanguins et sont également recrutées lors de la formation des vaisseaux lymphatiques, on parle de lymphangiogenèse. Elles sont donc cruciales au maintien de l'intégrité des vaisseaux et à la formation de nouveaux vaisseaux. Dans le stroma tumoral, elles vont jouer un rôle prédominant dans le processus de néo-angiogenèse déclenché par le stress hypoxique et le manque de nutriments. Les cellules cancéreuses et les cellules du TME (CAFs et cellules mésenchymateuses) vont stimuler la néo-angiogenèse en sécrétant des facteurs pro-angiogéniques (cytokines et facteurs de croissance) qui vont induire la différenciation de progéniteurs des cellules endothéliales. Le nombre de progéniteurs circulant est augmenté dans la circulation de patientes atteintes d'un cancer ovarien comparé à un sujet sain [224,243]. Le facteur clef de l'angiogenèse est le VEGF qui va favoriser la prolifération et la migration des cellules endothéliales et augmenter la perméabilité des vaisseaux déjà existants [244]. L'expression de VEGF, relevé dans 70% des cancers ovariens est associée à un mauvais pronostic [245].

- **Les autres cellules non immunitaires**

Dans le cancer ovarien, de multiples cellules sont à proximité des cellules tumorales, d'autant plus lorsque cette tumeur s'est disséminée dans le péritoine. Ainsi, les adipocytes, les cellules mésothéliales et les cellules souches mésenchymateuses (MSCs), impliquées dans le développement du cancer ovarien, pourraient être des cibles intéressantes pour améliorer les traitements [224].

Les adipocytes sont les cellules qui composent le tissu adipeux. Elles ont pour particularité le stockage de l'énergie et elles sécrètent de nombreux facteurs de croissance. L'omentum, structure péritonéale principalement composée d'adipocytes, est le site de développement préférentiel des métastases suite aux disséminations des cellules ovariennes cancéreuses dans la cavité péritonéale. Ces cellules vont sécréter différentes cytokines pour favoriser l'invasion des cellules tumorales (IL-6, IL-8, etc.). Elles peuvent aussi contribuer à la croissance tumorale en abreuvant les cellules cancéreuses d'acides gras [246].

Anatomiquement la cavité péritonéale et ses organes sont recouverts par une couche de cellules mésothéliales [247]. Celles-ci vont exprimer de nombreuses protéines contenues dans l'ECM, parmi elles l'acide hyaluronique qui va favoriser l'adhésion des cellules cancéreuses ovariennes *via* le CD44 [248–250]. Un fort taux d'acide hyaluronique est corrélé avec la progression tumorale et donc à un

mauvais pronostic pour les patientes [251]. Les cellules mésothéliales peuvent aussi contribuer à la mobilité des cellules tumorales [252] et sécréter plusieurs protéines impliquées dans la progression du cancer, comme l'IL-6 qui est produite en grande quantité et décrite comme pro-tumorale [253].

Les MSCs ont une durée de vie longue, une capacité d'auto-renouvellement, et peuvent se différencier en de nombreux types cellulaires comme les adipocytes, les chondrocytes et les ostéocytes [254]. Ces cellules sont surtout décrites pour leurs propriétés pro-tumorales. Dans le cancer ovarien, elles jouent un rôle dans la résistance aux traitements en sécrétant du CXCL-12 qui va augmenter la résistance des cellules tumorales à l'hyperthermie [255]. Il a aussi été démontré qu'elles peuvent favoriser le processus d'angiogenèse en induisant l'expression de VEGF, entre autres [256].

c) La matrice extracellulaire (ECM)

Au-delà de la contribution de ces différents types cellulaires au TME, la matrice extracellulaire et les molécules d'adhésion en sont d'autres composants majeurs. La capacité des cellules tumorales ovariennes à se disséminer et métastaser dans la cavité péritonéale est en partie régie par la composition de l'ECM. Etant donné que les molécules qui la composent vont être différentes d'un tissu à l'autre, le fait que les cellules cancéreuses ovariennes s'implantent souvent sur certains sites préférentiels dans la cavité peut s'expliquer par la composition de l'ECM à ces endroits (petit et grand omentum, trompes de Fallope, la rate, l'utérus, le hile du foie, *etc.*) [257]. Les protéines acides sécrétées et riches en cystéine (Secreted protein acidic and rich in cysteine, SPARC) sont présentes de manière transitoire dans l'ECM et interagissent avec des facteurs de croissance et d'autres composants pour réguler l'expression des MMP, responsables de la dégradation de la matrice [258]. Les SPARC sont sous-régulées dans l'EOC en comparaison de leur expression dans des cellules épithéliales ovariennes saines. La restauration de leur niveau d'expression réduit la croissance et la tumorigénicité de cellules cancéreuses ovariennes en induisant l'apoptose [259]. Ces protéines réduisent également l'adhésion des carcinomes à l'ECM, sont antagonistes des fonctions de VEGF [260] et inhibent la prolifération, le chimiotactisme et l'invasion des tissus induits par l'IL-6 [261]. Les SPARC sont aussi capables d'inhiber les interactions établies entre les cellules cancéreuses et les macrophages ou les cellules mésothéliales [262]. Par ailleurs, la progression du cancer ovarien est en grande partie corrélée à la faculté d'adhésion des cellules tumorales qui va se faire *via* les intégrines connues pour interagir avec un large panel de protéines dans l'ECM [263].

4. Les biomarqueurs protéiques

Une des difficultés majeures contribuant au mauvais pronostic des EOC est la détection de la maladie à des stades avancés. Pourtant, ce cancer fait partie des rares pour lesquels des biomarqueurs,

appartenant à différentes familles de protéines, ont été identifiés, étudiés et sont utilisés en clinique. Cependant, le dosage de ces biomarqueurs aux stades précoces est très peu sensible [264].

a) Les Mucines

Les Mucines sont une famille de glycoprotéines multifonctionnelles de haut poids moléculaires exprimées par les cellules épithéliales des tractus urogénital, gastro-intestinal et respiratoire [265,266]. Chez l'Homme 18 gènes codant pour des Mucines ont été identifiées : MUC1, MUC2, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC7, MUC8, OVGP1 (MUC9), MUC11/12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17, MUC19 et MUC20 [267]. Le rôle clef des Mucines est le maintien de l'hydratation des surfaces épithéliales pour assurer le bon fonctionnement des différents conduits qui en sont tapissés. Par ailleurs, les Mucines sont impliquées dans le renouvellement et la différenciation de l'épithélium, ainsi que dans la protection contre les infections et les lésions. Elles peuvent aussi moduler l'adhésion cellulaire et l'immunosuppression [267]. Les régions répétées en tandem, riches en sérine et thréonine, largement O-glycosylées sont leur marque de fabrique. Leur poids moléculaire va être entièrement dépendant de leur taux de glycosylation. De plus, leur fonction va dépendre de la nature et du nombre de glycosylations qu'elles portent. Leurs larges domaines extracellulaires peuvent empêcher l'interaction de molécules d'adhésion cellulaire avec leurs ligands par encombrement stérique. Ainsi dans le cadre des carcinomes, la surexpression de ces glycoprotéines membranaires peut affecter les propriétés adhésives et anti-adhésives des cellules tumorales, les interactions intercellulaires et l'adhésion des cellules à l'ECM favorisant ainsi l'invasion du stroma et les métastases. Les Mucines peuvent également jouer un rôle d'écran pour que les cellules épithéliales tumorales échappent à la surveillance du système immunitaire (Figure 20, [267]).

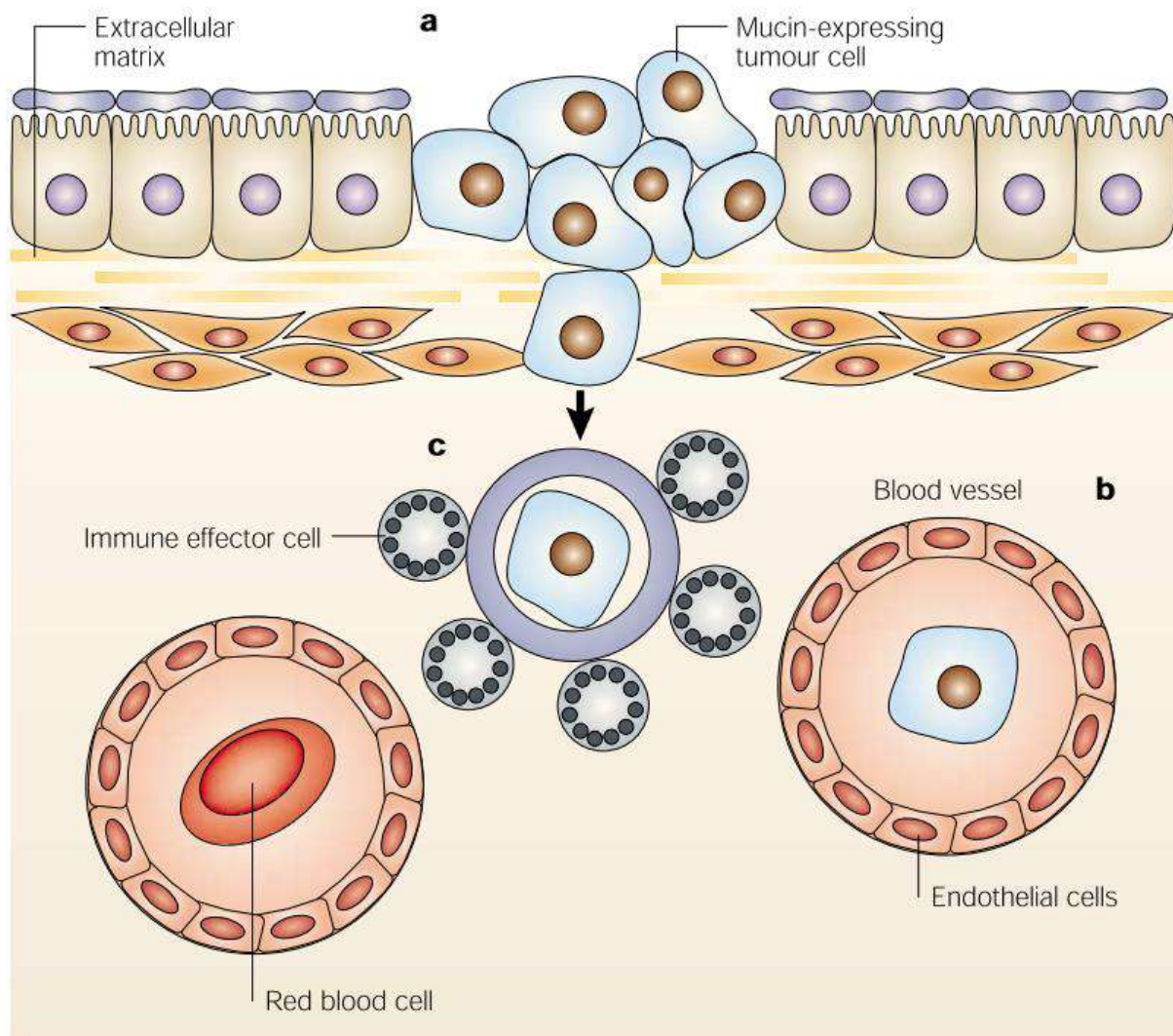


Figure 20 : Utilisation des mucines par les carcinomes pour l'invasion, le développement des métastases et pour faire écran aux cellules du système immunitaire [267]. Les tumeurs se servent de (a) l'effet antiadhésif des mucines pour se détacher de la masse tumorale et du stroma environnant et envahir d'autres tissus (b) et de leur propriété d'adhésion pour s'attacher à l'endothélium, se retrouver dans la circulation sanguine et (c) échapper à la surveillance du système immunitaire.

En comparaison du taux d'expression des Mucines en conditions physiologiques par l'épithélium de surface des ovaires, les EOC surexpriment différentes Mucines. C'est le cas de MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5AC et MUC16 [268,269].

b) La Mucine 16 ou Cancer Antigen 125 (CA125)

Le CA125, issu de la protéolyse membranaire de la Mucine 16, est le biomarqueur des EOC le plus discuté dans la littérature et le premier approuvé par la FDA, l'EMA et l'ANSM pour le suivi des traitements.

La Mucine 16 est une des Mucines possédant le plus haut poids moléculaire (2,5 à 5 MDa en fonction de son taux de glycosylation). Sa structure est présentée Figure 21 [270].

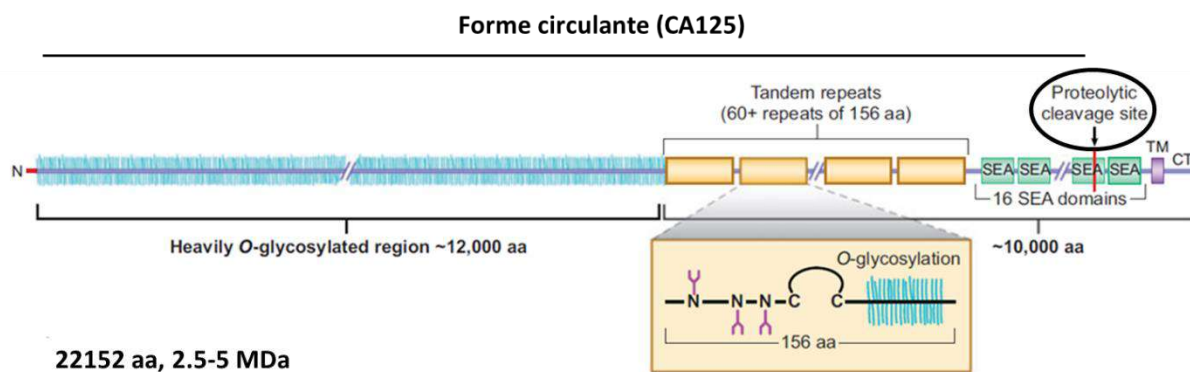


Figure 21 : Structure de la Mucine 16 (adapté de [270]). Les domaines clefs sont la séquence signal en N-terminal (rouge hachuré de bleu pour représenter les glycosylations), les modules *Sperm protein*, *Enterokinase*, et *Agrin* (SEA) ; le domaine transmembranaire (TM) ; la queue cytoplasmique (CT) ; L'insert illustre les régions répétées contenant des sites de N et O-glycosylations et des ponts disulfures.

L'interaction entre la Mucine 16 et la mésothéline, une protéine surexprimée par les cellules mésothéliales dans les carcinomes ovariens, pourrait favoriser les métastases dans le cancer ovarien. En effet, leur interaction peut conduire à la formation de sphéroïdes dans les fluides péritonéaux, et ainsi augmenter la charge tumorale aux sites d'implantations secondaires. Cette interaction peut également améliorer l'adhésion des cellules cancéreuses ovariennes au péritoine et à la surface des organes abdominaux [271].

Le clivage protéolytique de la Mucine 16 conduit à la libération de sa forme circulante, le CA125, dans la circulation sanguine. Le dosage du CA125 est utilisé principalement en suivi de traitement ou en complément de l'imagerie au diagnostic puisqu'il est augmenté dans 80% des stades avancés du cancer ovarien [272]. Ce dosage a commencé à être utilisé au début des années 1980 avec l'isolement d'un anticorps monoclonal, l'OC125 [273]. Son seuil limite supérieur est donné à 35 U/mL [274]. L'utilité clinique du CA125 en diagnostic est compromise par le manque de spécificité et le taux élevé de faux positifs. Des concentrations fortes de ce marqueur sont détectées dans d'autres cancers épithéliaux (seins, pancréas, poumons, etc.), des maladies bénignes comme les endométrioses, et également en conditions physiologiques (menstruations, grossesses) [275]. Ainsi, il est utilisé en suivi de traitements pour détecter l'apparition des rechutes, seul ou en combinaison avec d'autres marqueurs.

c) Human Epididymis Protein 4 (HE4)

Un nouveau biomarqueur est évalué pour sa pertinence dans le diagnostic des EOC, il s'agit du Human Epididymis Protein 4 (HE4) [276]. Cette glycoprotéine de 20-25 kDa sécrétée par les cellules épithéliales appartient à la famille des « whey acidic four-disulfide core proteins » ou WFDC2 [277]. HE4 est exprimée faiblement dans l'épithélium des organes des systèmes respiratoire et reproductif, mais surexprimée dans la majorité des cancers ovariens [278]. Son potentiel en tant que biomarqueur des

EOC a été évalué pour la première fois au début des années 2000 [276]. Tout comme le CA125, de nombreuses études suggèrent l'utilisation de l'HE4 en suivi de traitement et surveillance des rechutes.

5. Les biomarqueurs glycosidiques

Les biomarqueurs décrits jusque-là sont tous de nature protéique. Les deux réellement utilisés en clinique (CA125 et HE4) sont plus précisément des glycoprotéines surexprimées dans la plupart des EOC. La transformation des cellules épithéliales ovariennes est accompagnée de différents changements dans la machinerie de glycosylation protéique, particulièrement celle des Mucines, conduisant à des aberrations comme des O-glycosylations tronquées (Figure 22, [279]).

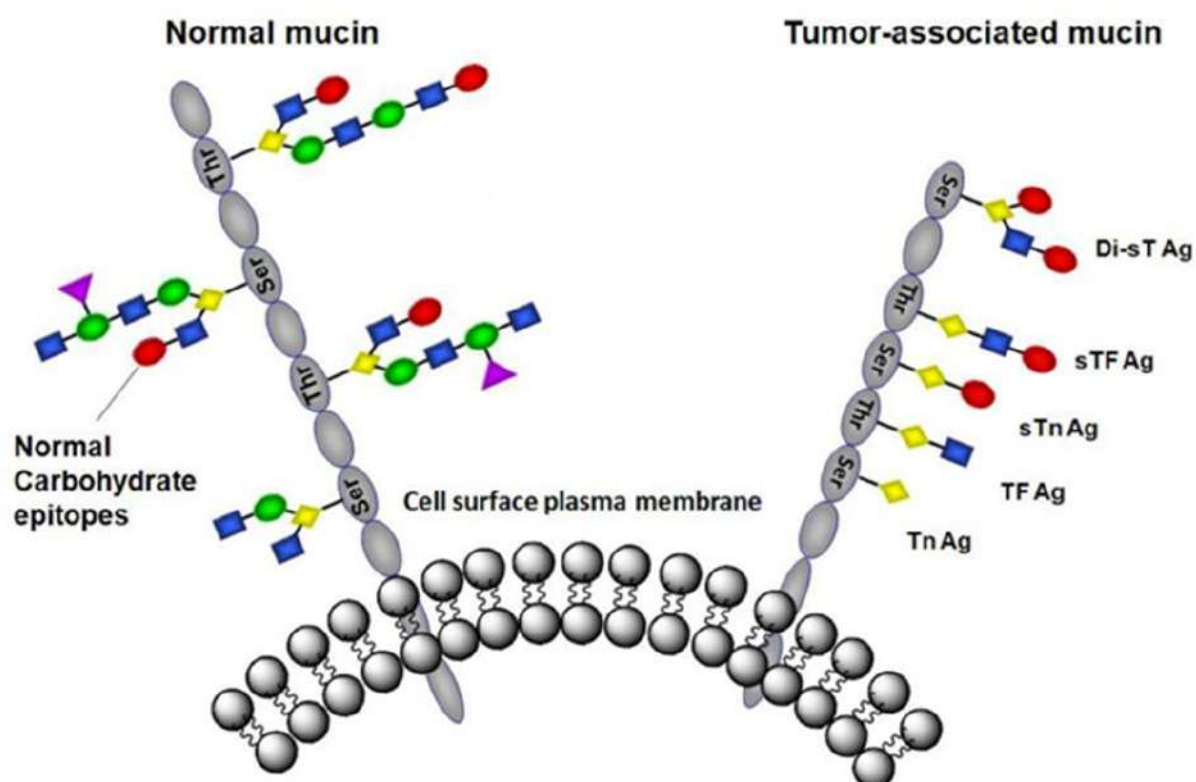


Figure 22 : Représentation schématique des différents niveaux de glycosylation des Mucines [279]. Structures des carbohydrates exprimés sur les Mucines à la surface de cellules mammifères saines (gauche) et cancéreuses (droite). Les chaînes oligosaccharidiques sont bien plus élaborées sur les Mucines saines présentant une variété de résidus glycosidiques ramifiés, et masquant ainsi les antigènes Tn et TF, sous forme sialylée (s) ou non, qui sont démasqués sur les Mucines exprimées à la surface de cellules tumorales. Acide sialique : rond rouge ; N-acétylgalactosamine : losange jaune ; Galactose : carré bleu ; Glucose : rond vert ; Fucose : triangle violet.

Celles-ci ont été largement décrites dès les stades précoces de beaucoup de carcinomes. Parmi ces O-glycosylations tronquées issues de synthèses incomplètes, nous retrouvons l'antigène de Thomsen-Friedenreich (antigène TF ou antigène T), son précurseur direct Tn (antigène Thomsen-nouvelle) et leurs formes sialylées (sTF et sTn). Par ailleurs, l'expression de structures sialofucosylées, comme l'antigène sialyl-Lewis A (sLea, Neu5Ac α 2–3Gal β 1–3 [Fuc α 1–4] GlcNAc β -) et l'antigène sialyl-Lewis X (sLex, Neu5Ac α 2–3Gal β 1–4 [Fuc α 1–3] GlcNAc β -), est aussi fréquemment reportée sous forme de

nouvelles synthèses dans les stades avancés des carcinomes avec un rôle important dans la progression tumorale et la formation des métastases [280–282].

Cette partie se focalisera sur les O-glycosylations tronquées, et plus particulièrement l'antigène TF, puisqu'il est le biomarqueur glycosidique spécifiquement reconnu par la protéine XCL qui fait l'objet de ce projet de thèse. De nombreuses autres glycosylations aberrantes sont décrites dans le cadre du cancer. Leur nature et leur implication dans le développement et la progression des tumeurs sont résumées dans cette revue (Figure 23, [283]).

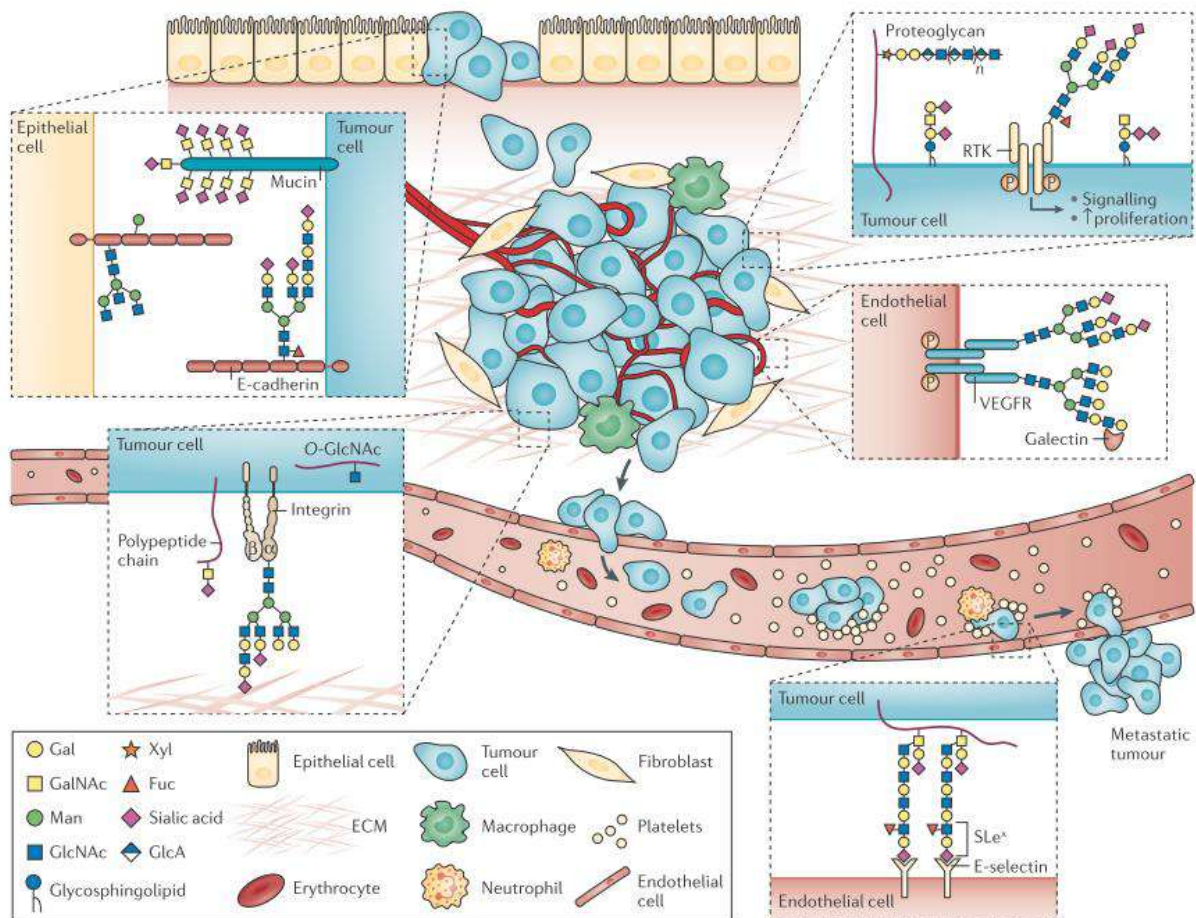


Figure 23 : Rôle des résidus glycosidiques dans le développement et la progression des cancers (adapté de [283]). Les glycanes jouent un rôle fondamental dans les étapes clés du développement et de la progression des cancers. Dans le processus de dissociation et d'invasion des cellules tumorales, les glycanes interfèrent avec les adhésions intercellulaires. La croissance et la prolifération tumorale sont caractérisées par des glycosylations aberrantes des récepteurs de facteurs de croissance qui vont moduler leurs activités et donc les voies de signalisation en aval. Les sialylations terminales interfèrent avec les interactions entre les cellules et l'ECM favorisant ainsi le phénotype migratoire et invasif des cellules cancéreuses. Ces modifications sont aussi impliquées dans l'angiogenèse (Galectin). Fuc, fucose ; Gal, galactose ; GlcA, glucuronic acid ; Man, mannose ; RTK, receptor tyrosine kinase ; Xyl, xylose.

• L'antigène de Thomsen-Friedenreich (TF)

Dans le microenvironnement tumoral, les changements de glycosylation vont favoriser la mobilité et l'adhésion des cellules cancéreuses, ou encore l'activation de récepteurs, ce qui va contribuer à leur phénotype invasif [284]. Les O-glycosylations tronquées sont présentes dans 90% des carcinomes

[76,77,285,286], et leur présence est corrélée à la progression tumorale et aux métastases [78,287–289]. Nous parlerons donc de glycotope. En conditions physiologiques, l'antigène TF, ou structure de core 1, ou antigène oncofœtal ou CD176, et son précurseur direct le monosaccharide N-acétylgalactosamine ou Tn, sont des structures intermédiaires dans la maturation des O-glycosylations des Mucines dans l'appareil de Golgi. L'antigène TF a été décrit pour la première fois en 1930 [290] comme une structure cryptique qui est découverte après un traitement à la neuraminidase de globules rouges de vertébrés. Pourtant son implication dans les cancers épithéliaux n'a été comprise que quatre décennies plus tard par le groupe de Georg F. Springer qui le décrit comme un marqueur tumoral potentiel pour une variété de carcinomes [76,286,291]. Depuis de nombreuses autres études ont démontré sa spécificité tumorale et sa large distribution dans la plupart des carcinomes [286,292–294]. Cependant la proportion de cas exprimant l'antigène TF varie selon le type de carcinome, de quasiment 100% pour l'EOC, à 85% pour le cancer du sein, ou encore 60% dans le cancer colorectal et autour de 15% dans les carcinomes à cellules rénales [295].

Ce glycotope est présent dès les premières étapes de la carcinogenèse et tout au long de l'évolution du carcinome [286]. Par exemple, une étude démontre que l'expression de l'antigène TF, porté par la Mucine 1 dans le cancer du sein, reste constante durant la carcinogenèse [296].

Dans l'EOC, des coupes histologiques montrent un marquage de TF à la surface des cellules périphériques d'un carcinome ovarien, alors que la surface d'un épithélium ovarien normal, sur des sections de lésions bénignes, est négative pour ce marquage. Aucun marquage intracellulaire du glycotope n'a été décrit dans des adénocarcinomes ovariens [286]. Les auteurs de cet article précisent que les tissus testés ont été inclus en paraffine, ce qui a pu affecter la préservation du carbohydrate. Ils démontrent aussi que des métastases issues d'une tumeur primaire positive au marquage de TF seront elles aussi positives, et *vice-versa* celles d'une tumeur primaire négative seront négatives. Ils concluent que le glycotope est exprimé dès le début de la transformation de tissus ovariens sains en carcinomes et qu'un fort taux d'expression de TF est corrélé à la dédifférenciation des cellules tumorales et aux métastases [286].

- **Expression de TF dans les tissus sains**

En conditions physiologiques, il n'est pas possible de détecter l'antigène TF dans le tissu épithélial puisqu'il est masqué par de nombreuses glycosylations longues et ramifiées. Il est cependant possible de le détecter aux surfaces apicales du conduit pancréatique, des tubules distaux et des canaux collecteurs du rein, ainsi qu'à la surface des macrophages du thymus, de la rate et des ganglions lymphatiques [80].

- **Démasquage de TF dans le cancer**

Le démasquage de l'antigène TF peut être la conséquence d'une sous régulation de glycosyltransférases due à une mutation dans le gène COSMC (Core 1 β 1,3-galactosyl transferase specific molecular chaperone) qui code pour la T-synthase [297,298] (Figure 24, [299]).

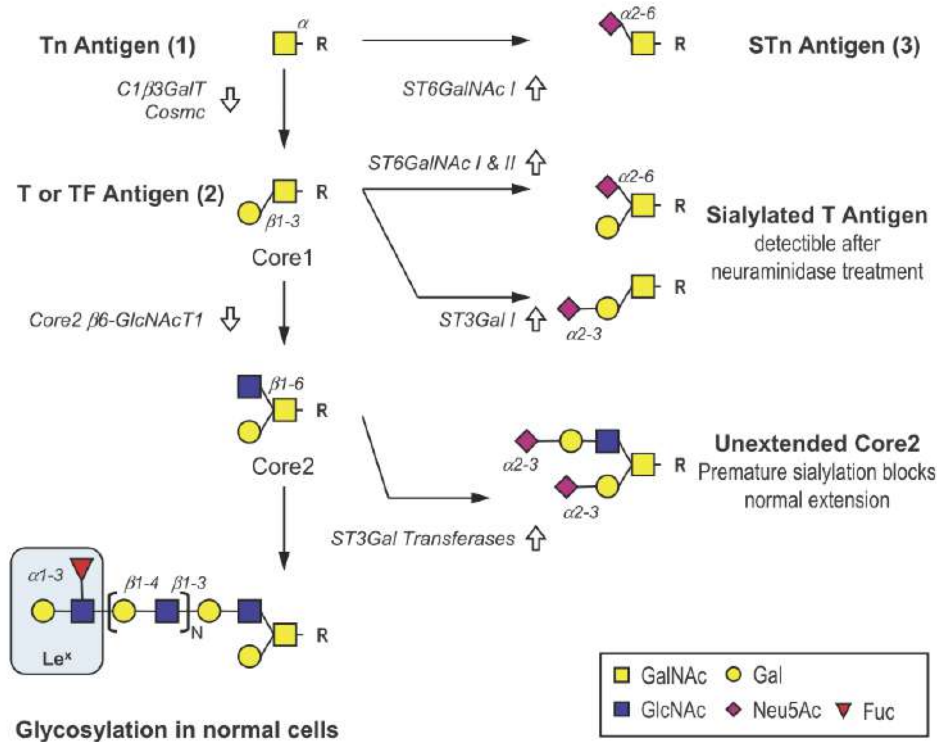


Figure 24 : Voies de synthèse des O-glycanes dans les cellules épithéliales saines et tumorales [299].

Toutes ces réactions sont catalysées dans l'appareil de Golgi. Les enzymes impliquées dans les voies de synthèse sont indiquées en italique. Elles peuvent être sous régulées ou mutées dans les cellules cancéreuses (flèches vers le bas) conduisant à la diminution ou l'absence de structures glycosidiques étendues et à la révélation des antigènes T et Tn précédemment masqués. Au même moment ou décalé dans le temps, une surexpression de diverses sialyltransférases est observée (flèches vers le haut). Celles-ci vont entrer en compétition avec les enzymes d'extension normales et générer des structures sialylées et tronquées (colonne de droite). Cette compétition va intervenir à différents niveaux des voies d'extension et va donc produire des structures sialylées de chaque précurseur : l'antigène de Thomsen-nouvelle sialylé (sTn), antigène de Thomsen-Friedenreich sialylé (sialyl-T, ou sialyl-TF, ou Core1 sialylé) et des O-glycanes de core 2 sialylés. Gal, Galactose ; GalNAc, N-acetylgalactosamine ; GlcNAc, N-acetylglucosamine ; Neu5Ac, N-acetylneuraminic acid ; Fuc, fucose. Les liaisons glycosidiques (anoméries et carbones impliqués) sont uniquement indiquées la première fois qu'elles interviennent dans la voie de biosynthèse. N, nombre variable (2 à 10) de répétitions d'unités de lactosamine (β 1-3/4GlcNAc).

Cependant, il a été démontré que ces événements sont rares et ne sont pas suffisants ou n'expliquent qu'en partie le phénomène de démasquage de Tn et TF dans les cancers [296,300,301].

Dans le processus de transformation d'un tissu sain en tumeur maligne, des changements s'opèrent dans la structure et la fonction de l'appareil de Golgi. Chaque glycosyltransférase a une place définie dans les citernes du Golgi, et celles-ci sont d'une importance primordiale pour la biosynthèse régulière des glycanes [302]. Dans le Golgi des cellules tumorales, la localisation anormale de glycosyltransférases et d'autres molécules a été décrite [303]. En effet, au lieu de se cantonner à un

endroit précis de l'organite cellulaire, comme c'est le cas dans les cellules saines, ces enzymes sont exprimées dans tout l'appareil de Golgi [304]. Une des raisons évoquées pour la redistribution de ces enzymes est l'augmentation du pH dans les vésicules du Golgi [305,306]. Une augmentation de seulement 0,2 unité de pH serait suffisante pour inhiber l'élongation des glycosylations dans le Golgi de cellules cancéreuses du sein et du colon [307]. Les complexes hétéromériques de glycosyltransférases dans les vésicules du Golgi, garantissant le processus de biosynthèse des chaînes glycosidiques, sont stables à pH acide mais se dissocient à des pH plus élevés [308]. Une étude démontre que l'altération des glycosylations n'est pas due à une inactivation des glycosyltransférases par l'augmentation de pH, mais plutôt à une mauvaise localisation de ces enzymes qui vont s'accumuler dans les endosomes tardifs à cause du pH anormalement élevé dans le Golgi [309,310]. Ainsi, une explication plus générale des modifications des glycosylations observées dans les carcinomes pourrait être la perte du gradient de pH dans le Golgi. Cependant, à l'heure actuelle, il n'y a pas de raison concrète évoquée dans la littérature sur l'origine de la dérégulation du pH dans le Golgi des cellules tumorales.

En plus des cellules épithéliales cancéreuses, plusieurs articles rapportent l'expression de l'antigène TF sur les cellules initiatrices du cancer (cancer-initiating cells, CIC) [311,312]. Par ailleurs, l'expression de ce biomarqueur a également été décrite dans de nombreux néoplasmes suggérant que son démasquage, et donc son expression à la membrane des cellules cancéreuses épithéliales est initiée dès le début de la tumorigenèse [293].

Quelques protéines seulement vont porter cet antigène TF et chacune va être caractéristique d'un certain type tumoral. Par exemple, CD44 dans le cancer colorectal, la Mucine 1 dans le cancer du sein, CD34 dans les leucémies ou encore les Mucines 1 et 16 dans les cancers ovariens [311,313]. Ainsi, le ciblage du profil glycosidique des Mucines, en plus de leurs épitopes peptidiques, pourrait augmenter la spécificité de détection des biomarqueurs Mucines 1 et 16 dans les EOC [313].

- **Expression de TF dans le microenvironnement tumoral**

Ce glycotope, présent dans 80 à 90% des carcinomes, est aussi exprimé par de nombreuses cellules immunitaires (lignées lymphoïde et myéloïde) dans le microenvironnement tumoral. En comparant la réactivité de la lectine d'arachide (peanut agglutinin, PNA) et d'anticorps monoclonaux spécifiques de l'antigène TF, des marquages ont été observés sur les précurseurs des lymphocytes B dans la moelle épinière, sur les thymocytes immatures (précurseurs des lymphocytes T) et sur les cellules leucémiques dans la plupart des leucémies aiguës. En revanche, aucun marquage n'a été visualisé sur les lymphocytes matures normaux dans la circulation sanguine puisque le biomarqueur glycosidique n'est pas présent sur les cellules B matures et est masqué par l'acide sialique sur les lymphocytes T matures [314–316]. Quant aux cellules de la lignée myéloïde, les anticorps monoclonaux et la PNA ont détecté

le CD176 sur les macrophages dans les organes lymphoïdes (thymus, rate et ganglions lymphatiques) mais il n'y avait pas d'expression de l'antigène TF sur les macrophages du tissu conjonctif [80]. Le glycotope a aussi été retrouvé sur des cellules de leucémie myéloïde aiguë, porté par d'autres protéines que celles des carcinomes [317]. En effet, le co-marquage du CD45 et CD176 a déjà été reporté sur des cellules leucémiques humaines [318].

6. Evaluations cliniques d'algorithmes prédictifs et de biomarqueurs

Une réponse aux traitements est souvent associée à une diminution de moitié du taux de CA125 sanguin, alors que lorsqu'il est doublé cela indique une résistance aux traitements et une progression de la maladie. L'élévation permanente du CA125 après les traitements de première intention est un indicateur spécifique de rechutes qui prédit la persistance de tumeurs résiduelles [319]. Cependant, malgré un retour à la normale du dosage pendant les traitements, des tumeurs sont retrouvées dans la moitié des chirurgies de seconde intention. Ainsi le CA125 n'est pas assez sensible pour l'évaluation d'une réponse complète aux thérapies de première intention [264].

Pour distinguer une maladie bénigne d'un cancer ovarien, le HE4 a démontré la plus forte sensibilité, 72.9% (et 95% de spécificité), comparé au CA125 entre autres. Cependant, la meilleure sensibilité en diagnostic est la combinaison du CA125 et de l'HE4 (76.4%), ce qui suggère que l'utilisation combinée de ces deux marqueurs est plus fiable que leur dosage individuel [320]. Dans une autre étude, le panel de 4 biomarqueurs (CA125, HE4, MMP-7 et mésothéline) a été évalué pour la surveillance des patientes après CRS et chimiothérapie. Il en ressort que HE4 peut prédire l'apparition de rechutes plus tôt que le CA125, et il permet aussi l'évaluation des patientes n'exprimant pas le CA125. En revanche, le MMP-7 et la mésothéline ont un faible potentiel comme compléments du CA125 pour la surveillance des rechutes [321].

Il existe également plusieurs algorithmes prédictifs de la malignité d'une masse pelvienne qui ont été établis en combinant l'âge, le statut ménopausique, l'imagerie et les dosages sanguins de biomarqueurs. Dans les années 1990, le Risk of Malignancy Index (RMI) a été développé. Il prend en compte trois caractéristiques préopératoires : un score déterminé après imagerie par ultrason, le statut ménopausique et le dosage du CA125. En plaçant le seuil du RMI à 200, sa sensibilité est de 85% pour 97% de spécificité [287].

Suite à une étude mentionnée précédemment combinant le CA125 et l'HE4 [320], le même groupe a développé un autre algorithme, le Risk Of Malignancy Algorithm (ROMA) en intégrant les taux de CA125 et HE4 avec le statut ménopausique, sans considérer les données d'imagerie [322]. Plusieurs études ont démontré une sensibilité de 93% pour 75% de spécificité. Cet algorithme semble plus sensible chez les femmes ménopausées [323].

Un autre algorithme, appelé OVA1, a été approuvé par la FDA en 2009 pour discriminer les masses pelviennes malignes et bénignes. OVA1 combine les données d'imagerie, le statut ménopausique et le dosage du CA125 avec 4 autres biomarqueurs [324]. Dans cette étude, il est démontré qu'OVA1 augmente la sensibilité mais diminue la spécificité.

Compte tenu des études cliniques effectuées avec ces algorithmes, OVA1 et ROMA ne devraient pas être utilisés en diagnostic du cancer ovarien ou pour retarder une chirurgie de première intention. Leur utilisation doit être limitée à une aide pour la décision de référer ou non une patiente à un oncologue gynécologue spécialisé lorsque la probabilité de malignité d'une masse pelvienne est importante [264].

Au bilan, différents marqueurs, principalement de nature protéique mais aussi de nature glycosidique, ont été identifiés dans le cancer ovarien. Cependant, à l'heure actuelle, aucun test diagnostic non invasif (non chirurgical) ou de dépistage à des stades précoces n'est disponible. Pour cause, le manque de sensibilité et de spécificité des tests ELISA pour détecter le marqueur universel de l'EOC, le CA125, puisque celui-ci est le même à la surface d'une cellule cancéreuse et d'une cellule saine. Par ailleurs, il n'y a que très peu de travaux développant des sondes pour la détection spécifique du marqueur glycosidique des carcinomes, l'antigène TF [325–329].

Pour valider un test diagnostique, la spécificité (reconnaître un seul partenaire) et la sensibilité (seuil de détection) de l'objet utilisé pour la détection (sonde) sont donc évaluées. La spécificité représente la probabilité que le test identifie correctement les personnes n'étant pas atteintes par la pathologie. La sensibilité indique la probabilité que toutes les personnes atteintes par la pathologie soient identifiées par le test diagnostique (Figure 25, [330]).

	Disorder	No Disorder
Positive Test Result	True Positive (TP)	False Positive (FP)
Negative Test Result	False Negative (FN)	True Negative (TN)

Sensitivity = $TP / (TP + FN)$
 Specificity = $TN / (TN + FP)$
 PPV = $TP / (TP + FP)$
 NPV = $TN / (FN + TN)$

Figure 25 : Calculs de la sensibilité, spécificité et valeurs prédictives positive (PPV) et négative (NPV) d'un test diagnostique (adapté de [330]).

La génération d'objets bispécifiques ciblant, sur le même marqueur moléculaire, un épitope glycosidique (l'antigène TF) et un épitope protéique (cible des anticorps monoclonaux utilisés actuellement dans les tests de suivi de traitement) serait un moyen d'augmenter la spécificité et la sensibilité d'un test diagnostique de l'EOC. Actuellement, la bi-spécificité est comprise en termes de détection de deux entités différentes (diabodies [331], greffage de deux sondes sur une même plateforme [332], dual-aptamer [333], etc.). En effet, la reconnaissance de deux motifs doit conduire à

une augmentation de l'affinité globale du système, qui serait exprimée en termes d'avidité (plusieurs affinités), ainsi qu'à un effet cumulatif des spécificités.

Partie III : Nanovectorisation, sondes diagnostiques et assistance chirurgicale

1. Nanovectorisation et délivrance ciblée de molécules thérapeutiques

Les principales difficultés rencontrées avec les chimiothérapies systémiques traditionnelles en cancérologie, en dehors de la chimiorésistance, sont les faibles doses disponibles au niveau des tumeurs et donc la nécessité d'administrer de fortes doses, ainsi que la toxicité de ces molécules pour les tissus sains de l'organisme. Pour tenter de pallier ces problèmes, de nombreux systèmes de délivrance ont été conçus à partir de plateformes naturelles (oligosaccharides, lipides, protéines) ou synthétiques (silice, polymères, gels, *etc.*) pour transporter de manière efficace les molécules thérapeutiques à leur cible. Les principales caractéristiques d'un système de transport de principes actifs « idéal » sont sa facilité de production, sa stabilité, ses capacités d'encapsulation et de relargage efficaces et contrôlées des molécules, sa faible toxicité, sa biocompatibilité et biodégradabilité.

a) Nature des nanovecteurs

Différents nanomédicaments tels que les principes actifs conjugués à des anticorps ou des polymères, les nanovecteurs lipidiques et polymériques, les nanoparticules inorganiques et virales sont actuellement utilisés en thérapie anticancéreuse.

Plusieurs exemples de nanovecteurs utilisés en clinique sont présentés dans la Figure 26 [334].

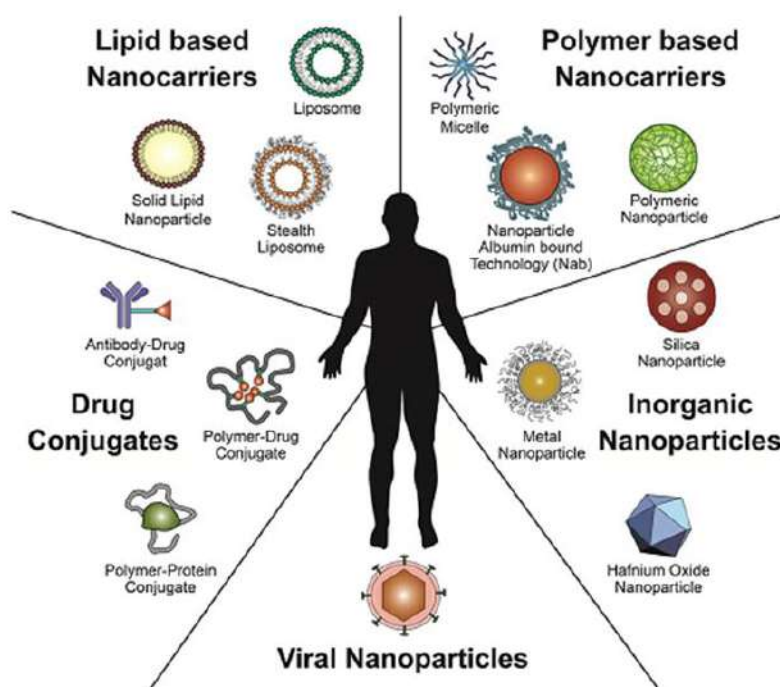


Figure 26 : Plateformes nanothérapeutiques [334].

- **Les nanovecteurs de nature non-protéique**

Liposomes

Les liposomes sont parmi les premiers nano-objets non-protéiques à ciblage passif à avoir été développés et utilisés en clinique pour la délivrance de principes actifs [335,336]. Ce sont des structures colloïdales auto-assemblées composées d'une bicouche lipidique entourant un compartiment aqueux et pouvant encapsuler une grande variété d'agents thérapeutiques [337]. Deux exemples concrets, et parmi les premiers approuvés par la FDA, sont le Myocet et le Caelyx, deux structures liposomales renfermant de la doxorubicine. La différence entre les deux réside dans l'ajout de PEG à la surface du liposome pour le Caelyx de manière à prolonger son temps de rétention dans la circulation sanguine. C'est effectivement le plus gros bénéfice obtenu avec ces nanovecteurs, à savoir une durée de vie dans la circulation et une aire sous la courbe (area under curve, AUC), donc une dose au niveau du tissu tumoral, bien plus importante que la molécule libre [338].

Polymères

Des plateformes plus récentes sont représentées par les polymères d'origine naturelle ou synthétique. Des macromolécules polymériques peuvent être conjuguées à des agents actifs par des liens (ou linkers) stables dans le sang mais labiles à pH acide ou en présence d'enzymes, comme c'est le cas au niveau du microenvironnement tumoral ou dans des compartiments intracellulaires [339]. La plupart des polymères développés comme système de délivrance sont de nature synthétique et par conséquent leur biodégradabilité est questionnée.

Nanoparticules inorganiques

Ce type de nano-objet est principalement utilisé pour la détection en imagerie. Ils seront développés dans le 2^{ème} chapitre de cette partie de l'introduction.

- **Les nanovecteurs viraux**

Lentivirus et rétrovirus

Les vecteurs lentiviraux et rétroviraux, souvent utilisés en recherche, sont des technologies en développement pour de nombreuses applications cliniques nécessitant le transfert de matériel génétique. A titre d'exemple, la transduction par des vecteurs lentiviraux de récepteurs à antigène chimériques (CARs, Chimeric Antigen Receptors) ciblant un marqueur des lymphocytes B (CD19) permet la reprogrammation *ex vivo* de lymphocytes T humains qui seront alors dirigés contre les lymphocytes B tumoraux. En effet, des essais cliniques utilisant la thérapie basée sur ces lymphocytes T reprogrammés chez des patients atteints de leucémie aiguë lymphoblastique de type B, ont démontré une forte efficacité avec des réponses complètes et durables chez plus de 60% des patients en rechute ou présentant des maladies réfractaires [340,341].

- **Les nanovecteurs de nature protéique**

Origine naturelle

Les développements les plus récents dans ce domaine se sont focalisés sur les plateformes protéiques car elles présentent plusieurs avantages par rapport aux plateformes synthétiques, à savoir leur stabilité structurale, leur biocompatibilité, leur faible toxicité, leur nature biodégradable, et la présence de deux à trois surfaces disponibles pour des fonctionnalisations (face externe, cavité interne et interface entre sous-unités pour les protéines multimériques) [342]. La cavité intérieure permet de charger la molécule à transporter, la surface extérieure est utilisée pour la protection de la molécule et pour l'accrochage de ligands de manière à effectuer un ciblage actif ou améliorer la biodistribution du nanovecteur, et la déstabilisation des interactions entre des sous-unités protéiques peuvent permettre la création de pores, ou l'assemblage / désassemblage de la structure pour réaliser le confinement du principe actif. Leur nature protéique permet également d'envisager des modifications génétiques et chimiques pour fonctionnaliser ces nanoparticules et réaliser un ciblage actif des tumeurs solides [343]. Ces nanocages consistent en un auto-assemblage de sous-unités d'une même protéine, ou encore une combinaison de plusieurs protéines, pour former des systèmes complets capables d'encapsuler ou se lier à des principes actifs puis de les transporter aux tissus tumoraux cibles. Ainsi, la première structure de nature protéique approuvée par la FDA pour son utilisation en thérapie anticancéreuse fut l'Abraxane en 2005. Il s'agit d'un agglomérat de molécules d'albumine qui forment une coquille protectrice dans laquelle est encapsulé du paclitaxel [344].

La ferritine/apoferritine est une des protéines les plus décrites comme système de nanovectorisation. En conditions physiologiques, elle va stocker l'excédent de fer pour éviter d'atteindre des niveaux toxiques pour les cellules. Elle est constituée de 24 sous-unités (450 kDa) qui s'assemblent en une cage creuse de 12 nm de diamètre avec une cavité d'environ 8 nm. A des pH très bas (pH 2), la cage va se désassembler en plusieurs sous-unités. Ainsi lorsqu'elle est mise en présence de molécules thérapeutiques à ces pH acides, leur confinement va être effectué en revenant à un pH basique (pH 8.5) permettant le réassemblage de la protéine en nanocage. Ce nanocontainer a pu être modifié pour transporter avec succès une variété de molécules inorganiques à destinée thérapeutique ou d'imagerie. La combinaison de surfaces intérieure et extérieure modifiables et la présence de 14 canaux hydrophobes ou hydrophiles traversant la structure ont permis le confinement ou la conjugaison de nombreuses molécules solubles et insolubles [345]. A titre d'exemple, le cisplatine et le carboplatine [346], le 5-fluorouracil [347] ainsi que la doxorubicine [348,349] ont été confinés dans la ferritine/apoferritine. Des fluorophores et molécules quencher [350,351], des fragments d'anticorps [352] ou encore des acides nucléiques [353] ont également été couplés à cette nanocage *via* des modifications génétiques et chimiques de sa surface extérieure.

Les small heat shock proteins (sHSP) permettent la synthèse et le repliement correct des protéines en formant des complexes stables [354]. Elles sont aussi constituées de 24 sous-unités pour une masse de 16,5 kDa par monomère et un diamètre extérieur et intérieur de respectivement 12 et 6,5 nm. La principale différence avec la ferritine est la présence de nombreux pores d'environ 3nm qui vont laisser les molécules circuler librement vers l'intérieur ou l'extérieur de la structure [355].

Les protéines Vault sont exprimées de manière ubiquitaire dans toutes les cellules eucaryotes. Il s'agit de particules de ribonucléoprotéine qui contiennent plusieurs copies d'ARN et de nombreuses copies de trois espèces de protéines. La protéine Vault s'auto-assemble sous forme de baril avec une large lumière intérieure. Elles mesurent approximativement 72,5 nm de long et 41 nm de large [356]. Leur stabilité structurale et leur nature non immunogène en font d'excellents candidats pour des applications biomédicales comme le transport des molécules thérapeutiques ou d'imagerie [357,358].

Les nanovecteurs basées sur les capsides virales

La plupart des virus possèdent une capside composée de centaines de sous-unités protéiques qui vont s'auto-assembler, cela leur permet de stocker et protéger l'ADN ou l'ARN viral. Ces protéines virales conservent leur capacité d'assemblage en cage en absence du matériel nucléaire viral [359]. Leur taille s'échelonne de 10 nm à 1 µm et leur caractéristique la plus importante est qu'elles ne sont pas pathogènes. Ces nanoparticules offrent également la possibilité de modifier leurs surfaces interne et externe faites d'acides aminés, ainsi que les interfaces entre les protéines composant la cage, pour devenir des systèmes de vectorisation de principes actifs. Les capsides virales les plus utilisées sont les Cowpae mosaïc virus (CPMV) [360,361], les Cowpae chlorotic mottle virus (CCMV) [362] et le bactériophage MS2 [363] principalement en délivrance de molécules thérapeutiques [364], pour l'imagerie diagnostique [360], ou encore en conjugaison avec des particules fluorescentes [365] et des anticorps [366].

La Figure 27 [343] propose une représentation schématique et des images de microscopie électronique des nanocages protéiques décrites ci-dessus.

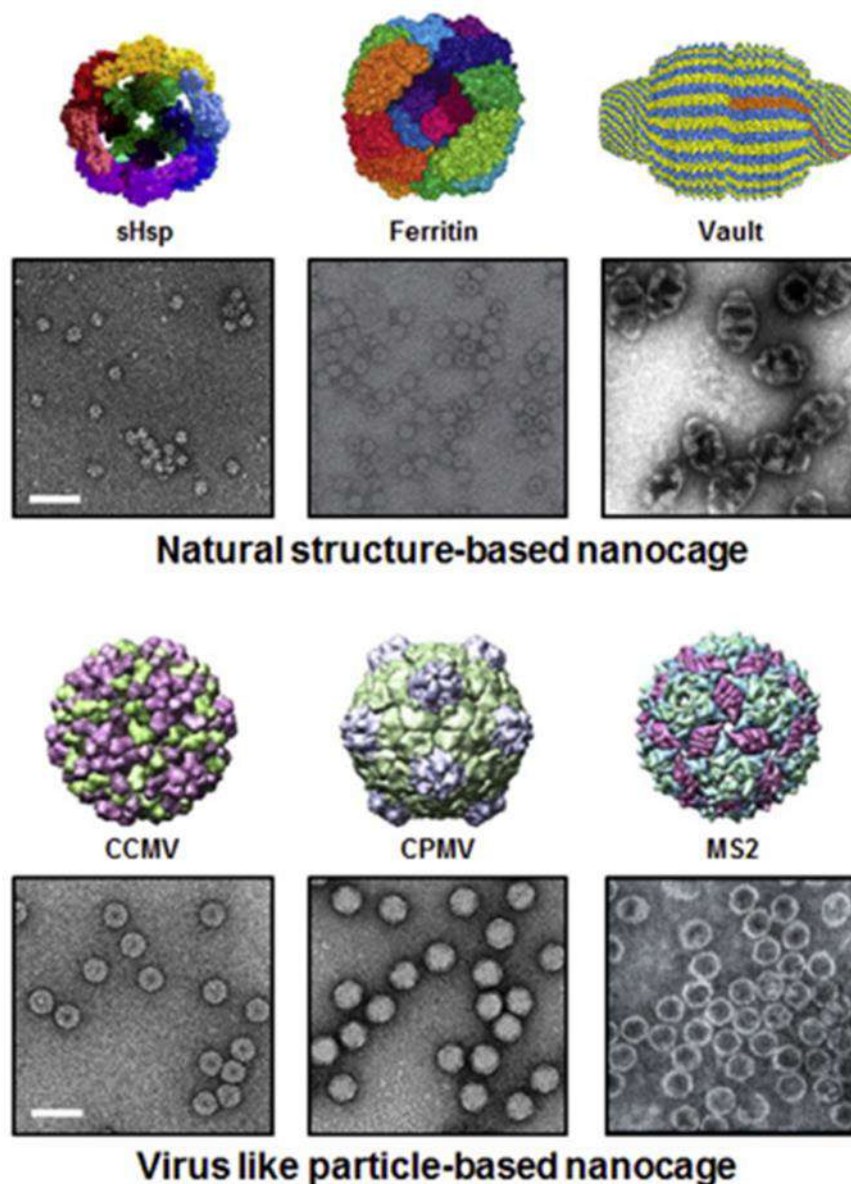


Figure 27 : Illustrations des structures de plusieurs nanocages protéiques et les images correspondantes en microscopie électronique à transmission (adapté de [343]). sHSP : small heat shock Proteins, CPMV : Cowpae mosaic virus, CCMV : Cowpae chlorotic mottle virus, bactériophage MS2. Barre de taille 50nm.

b) Chargement de molécules thérapeutiques dans les nanovecteurs

Quel que soit le système choisi pour la nanovectorisation d'une molécule thérapeutique, quatre aspects cruciaux sont à considérer : l'encapsulation dans la nanocage, le nombre de molécules thérapeutiques qu'il est possible d'y encapsuler, le nombre de nanocage atteignant la cible et le relargage contrôlé du principe actif sur le site tumoral.

• Liens non covalents

Certains chargements vont simplement jouer sur l'affinité de la molécule à transporter pour la cavité interne de la nanocage protéique. En d'autres termes, les acides aminés tapissant l'intérieur de la

cavité du nanovecteur vont interagir avec la molécule d'intérêt. Les interactions électrostatiques entre des molécules d'ADN et l'intérieur de la cavité d'une capsid virale sont un exemple de ce mode de chargement [367]. Il est aussi possible de charger des molécules dans un second container qui aura lui de l'affinité pour les acides aminés à l'intérieur d'une capsid virale par exemple.

Des modifications génétiques peuvent également être effectuées pour produire sous forme recombinante un nanovecteur protéique fusionné à la molécule à transporter, lorsqu'elle est de nature protéique. Une protéine chimérique composée des protéines d'une capsid virale, d'un peptide RGD (site de fixation des intégrines à leur récepteur) et d'une protéine liant l'ARN va s'assembler en macromolécule container capable de transporter un siRNA, en le protégeant de l'activité des nucléases, et de l'amener de manière ciblée au cytoplasme de cellules cibles [368].

De plus, des variations de pH, ou encore un choc osmotique, déclenchent des changements structuraux réversibles de certaines nanocages qui peuvent être utilisés pour le chargement du principe actif. C'est le cas de la dynamique d'assemblage/désassemblage vu précédemment avec l'exemple de la ferritine/apoferritine [369], ou encore l'ouverture/fermeture de pores à la surface d'une particule de CCMV dépendant du pH et de la force ionique du milieu [370].

- **Liens covalents**

Le chargement de molécules thérapeutiques dans des nanocages protéiques est aussi souvent effectué par des liens covalents entre la molécule à transporter et le nanovecteur, de manière à s'assurer que la molécule ne pourra pas fuir de la nanocage avant son relargage contrôlé. Ce lien covalent va généralement se faire sur des groupements fonctionnels d'acides aminés endogènes de la nanocage comme les cystéines (-SH), les lysines, les tyrosines et les acides aspartique et glutamique (-NH₂) [371]. Cet attachement se fait depuis l'intérieur de la cavité de la nanocage ou sur la surface extérieure, cependant dans ce dernier cas, la molécule à transporter ne sera plus ni confinée ni protégée de l'environnement extérieur. La plupart du temps ces liens vont être une liaison amine sur les lysines ou un pont disulfure sur les cystéines, comme ceux qui ont été réalisés pour conjuguer 80 molécules de doxorubicine à un CPMV et les délivrer à des cellules cancéreuses (HeLa) [372].

La click chemistry (copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition, CuAAC) représente une méthode alternative, plus rapide et plus spécifique que celles mentionnées ci-dessus, pour incorporer des groupements fonctionnels sur ou dans un nanovecteur [373]. Elle a été utilisée pour greffer des acides aminés contenant des groupes alkyne et azide non naturels sur différentes capsides virales [374].

De plus, la liaison covalente des molécules peut aussi être effectuée en modifiant génétiquement, par mutagenèse dirigée, les acides aminés composant le nanovecteur protéique pour y introduire de nouvelles fonctionnalités. Comme par exemple l'introduction d'une cystéine ou d'une lysine possédant deux groupements réactifs [375].

c) Ciblage passif et actif des nanovecteurs

- Ciblage passif

Suite à l'administration systémique d'une molécule anti-cancéreuse, celle-ci va affecter tant les tissus sains que le tissu tumoral, avec une très faible efficacité de ciblage, et une élimination rapide par la circulation sanguine (clairance rénale et hépatique) (Figure 28A, [376]).

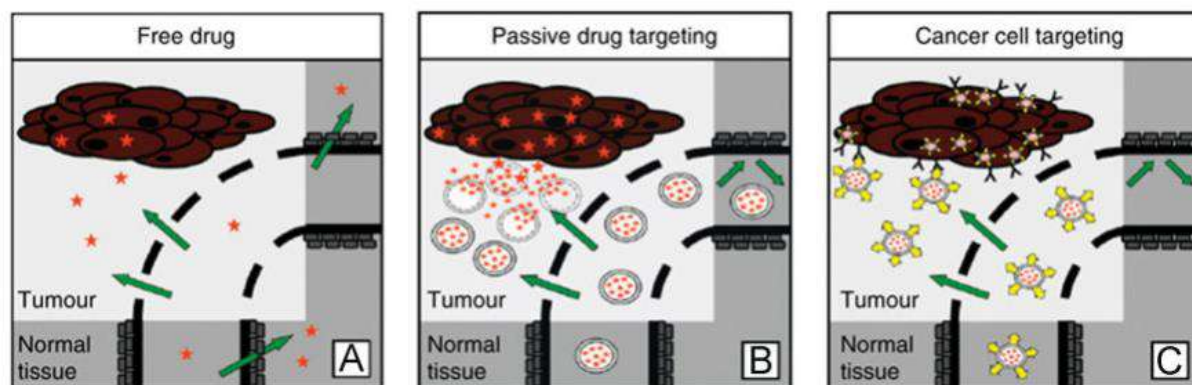


Figure 28 : Ciblage passif et actif de molécules thérapeutiques (adapté de [376]). (A) Une molécule libre va affecter tant les tissus normaux que les tissus tumoraux, avec une faible efficacité de ciblage et une élimination rapide par le sang. (B) Une approche de ciblage passif profitant de l'effet EPR pour augmenter la délivrance de la molécule sur le site de la tumeur avec moins de dommages pour les tissus sains. (C) Ciblage actif qui va augmenter l'efficacité des molécules avec leur endocytose et relargage dans les cellules tumorales suite à l'interaction d'un ligand avec son récepteur.

La génération de nanoparticules dites « furtives » a été mise en place pour leurrer les défenses immunitaires et ainsi atteindre les cibles biologiques en profitant de l'effet EPR (Enhanced Permeability and Retention). Les nanoparticules, transportant le principe actif de médicaments, sont recouvertes de polyéthylène glycol (PEG) qui crée un encombrement stérique et qui les rend plus hydrophiles, limitant ainsi leur interaction avec les opsonines responsables de la reconnaissance et de la phagocytose par les macrophages. Leur temps de demi-vie dans la circulation est donc augmenté. Cette approche de ciblage passif profite de l'effet EPR, soit une plus grande perméabilité et rétention dans le tissu tumoral. En effet, le manque de maturité des vaisseaux sanguins qui irriguent les tumeurs, et donc leur plus forte perméabilité, entraîne une libération plus importante des nanoparticules au niveau de la tumeur. De leurs côtés, la forte densité du tissu tumoral et l'immaturité des vaisseaux lymphatiques permettent la rétention de la molécule thérapeutique relarguée car il n'y a pas de drainage correct des fluides vers les ganglions. Le ciblage passif va donc diminuer les effets néfastes pour les tissus sains environnants sans pour autant les éliminer. Cependant, il ne garantit pas la délivrance intracellulaire de la molécule thérapeutique (Figure 28B, [376]).

- Ciblage actif intrinsèque

Le ciblage actif permet la vectorisation de principes actifs directement dans les cellules tumorales, par des interactions récepteurs-ligands par exemple, entraînant une augmentation de l'efficacité du traitement puisque la molécule aura été endocytée préférentiellement par les cellules ciblées,

diminuant ainsi sa toxicité dans le reste de l'organisme et augmentant la dose efficace délivrée (Figure 28C, [376]).

Parmi les nanoparticules qui possèdent déjà une affinité pour une cible donnée, et donc un ciblage actif intrinsèque, nous retrouvons les lectines. A titre d'exemple, MornigaG, une lectine de plante de structure tétramérique provenant de *Morus nigra* est connue pour reconnaître avec une grande affinité l'antigène TF. Le groupe travaillant sur son développement l'a liée à un photosensibilisateur, la porphyrine, pour que celui-ci soit amené de manière efficace à des cellules leucémiques (Jurkat) surexprimant le glycotope. Cette conjugaison permet d'augmenter la phototoxicité de la porphyrine grâce à l'adressage effectué par MornigaG [377,378].

Les nanocages de nature protéique et non-protéique décrites précédemment ne possèdent pas de site de reconnaissance intrinsèque pour un biomarqueur ou une molécule cible. En revanche, il est possible de les fonctionnaliser pour leur permettre d'effectuer un ciblage actif.

d) Fonctionnalisations des nanovecteurs

L'efficacité de délivrance d'un principe actif va dépendre non seulement de la capacité d'encapsulation du nanovecteur mais également de son ciblage des cellules cancéreuses, de sa vitesse de relargage de la molécule après endocytose et de ses propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques. Lorsque des nanocontainers présentent les propriétés nécessaires à une délivrance efficace, ils vont permettre une meilleure pénétration des principes actifs dans les tissus ciblés. Ainsi, il est possible de réduire les doses administrées, ce qui diminue par conséquent la toxicité au niveau des tissus sains environnants [343].

La fonctionnalisation des nanovecteurs va permettre d'assurer un ciblage des cellules cancéreuses lorsque la nanoparticule transportant le principe actif ne possède pas d'affinité intrinsèque pour un biomarqueur par exemple. Ces fonctionnalisations vont être de nature génétique ou chimique.

- **Fonctionnalisations génétiques**

La résolution de la structure d'un nanovecteur protéique va permettre d'envisager sa production comme protéine recombinante et donc d'ajouter la séquence d'un peptide ou d'une protéine entière en N ou C terminal de la nanocage pour obtenir une protéine de fusion. Cette fonctionnalisation est généralement utilisée pour ajouter un système de reconnaissance à la surface d'une nanocage à ciblage passif. Cela a pour conséquence l'augmentation de la distribution de la molécule transportée au niveau du tissu cible, puis, après reconnaissance à la membrane, l'incorporation du nanovecteur dans les cellules tumorales et le relargage de la molécule thérapeutique [343].

Par exemple, la conjugaison de la séquence du peptide RGD à la surface d'une capsid virale a permis l'adressage *in vivo* au tissu tumoral d'un siRNA confiné. En effet, le peptide RGD a une affinité pour les

récepteurs aux intégrines surexprimés à la surface des cellules endothéliales tapissant les vaisseaux tumoraux et à la surface des cellules tumorales [379].

- **Fonctionnalisations chimiques**

Comme vu précédemment avec le chargement de molécules par liaisons covalentes, les fonctionnalisations chimiques vont permettre l'introduction de groupements fonctionnels pour le chargement de molécules dans les nanocages, ainsi que l'accrochage de systèmes d'adressage sur les nanocages. Un groupe a greffé 180 acides foliques à la capsid virale du Cucumber mosaic virus pour la délivrance ciblée de doxorubicine dans un modèle murin de cancer ovarien. Les acides foliques vont permettre l'adressage de la nanoparticule chargée en doxorubicine puisqu'ils vont se lier spécifiquement à leurs récepteurs surexprimés sur la plupart des cellules tumorales ovariennes [380]. Cette construction a permis de diminuer la cardiotoxicité de la doxorubicine et d'augmenter l'effet cytotoxique de la molécule comparé à la doxorubicine libre. Il est important de mentionner que dans cette étude en plus du potentiel d'adressage et de confinement du nanovecteur, l'administration de cette construction a été réalisée par voie intrapéritonéale. En effet, même seules, certaines molécules thérapeutiques, comme la doxorubicine, sont bien plus efficaces pour certaines applications quand elles sont administrées par une autre voie que la voie systémique classique. Ainsi, lors du développement de ce type de nanovecteur, en plus des nombreuses considérations à prendre en compte quant au choix du vecteur, de la molécule à véhiculer et des fonctionnalisations à effectuer, il ne faut pas se restreindre à des administrations systémiques *in vivo*. La voie sous-cutanée va par exemple être privilégiée pour l'injection de nanocages protéiques qui vont s'accumuler dans les ganglions lymphatiques par ciblage passif et interagir avec un grand nombre de cellules immunitaires. La nature potentiellement immunogène des nanocages protéiques est souvent discutée, pourtant elles sont particulièrement bien équipées pour la délivrance de molécules immunomodulatrices justement parce qu'elles vont interagir avec le système immunitaire [343].

La Figure 29 [343] représente une illustration schématique des différentes méthodes de chargement et de fonctionnalisation des nanovecteurs.

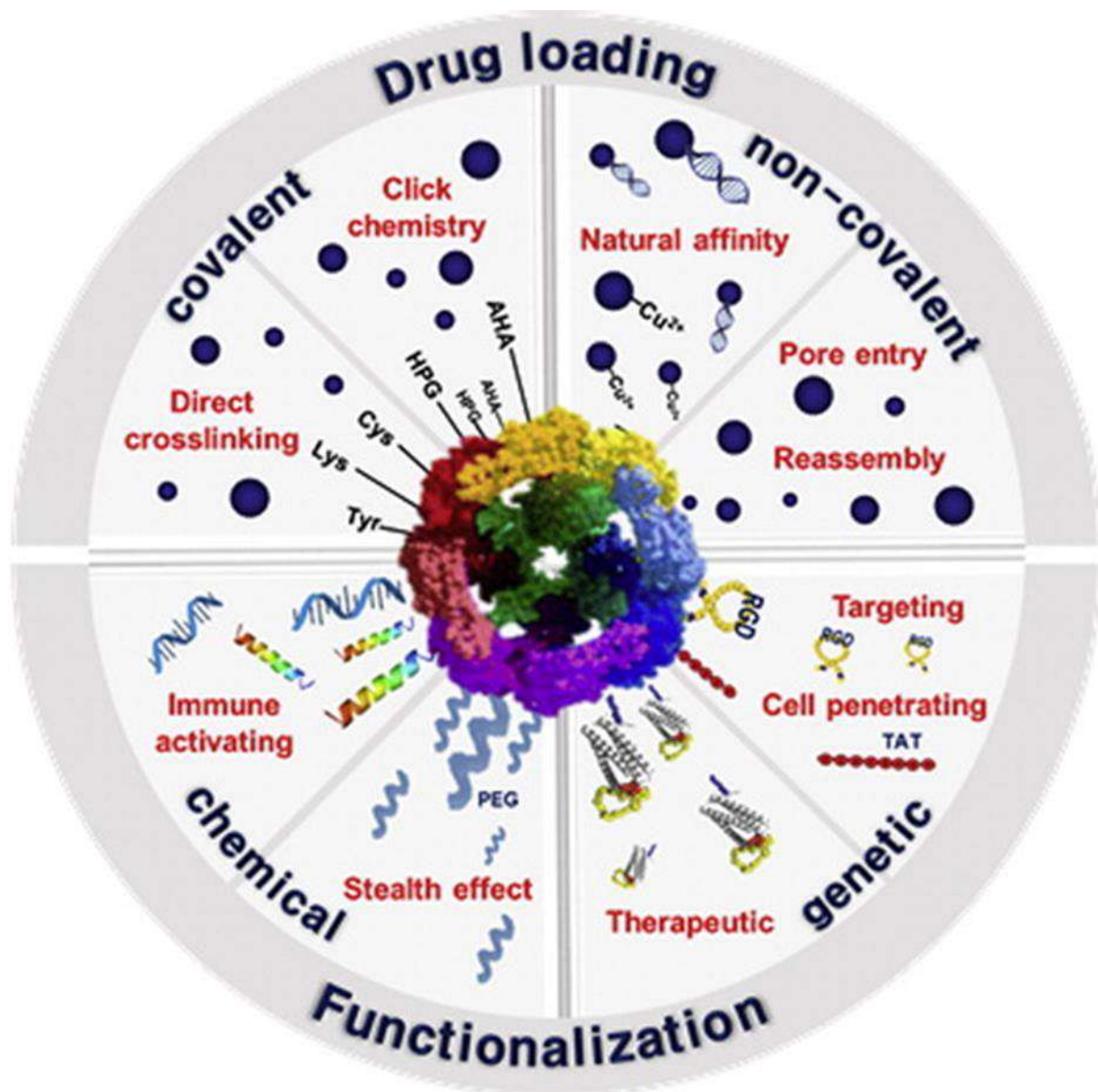


Figure 29 : Illustration des différentes méthodes de chargement d'une molécule dans une nanocage protéique et des fonctionnalisations possibles de ces nanocages pour le chargement ou l'adressage à une cible d'intérêt (résumé graphique [343]).

2. Sondes diagnostiques et assistance chirurgicale intraopératoire

En première intention et parfois après les rechutes, la chirurgie de cytoréduction est l'étape la plus importante et la plus déterminante pour la suite des traitements et le devenir des patientes atteintes d'une carcinose péritonéale d'origine ovarienne. Il s'agit d'un défi de taille pour les chirurgiens puisque l'objectif est de ne laisser aucune tumeur résiduelle dans la cavité péritonéale. Ainsi, c'est avant tout

l'expérience du chirurgien effectuant la CRS qui va être cruciale pour l'efficacité de la chirurgie et donc l'issue pour les patientes.

Les métastases péritonéales sont très variables en taille, s'échelonnant de nodules submillimétriques à des masses tumorales de plusieurs centimètres de diamètre [381,382]. Les nodules microscopiques, invisibles à l'œil nu ($<1\text{ mm}^2$), sont souvent la cause des rechutes lorsqu'ils n'ont pas été retirés à la CRS et n'ont pas été affectés par les chimiothérapies [383–385]. De nombreuses études se sont portées sur la recherche de solutions complémentaires pour améliorer la visibilité du chirurgien. Les techniques d'imagerie intraopératoire, et en particulier les chirurgies guidées par la fluorescence (FGS), promettent d'améliorer considérablement la détection et donc la résection de tumeurs, en particulier dans la cavité péritonéale [382,385].

a) Les chirurgies guidées par des sondes fluorescentes

Les premiers essais de FGS (Fluorescence Guided Surgery) datent du milieu du 20^{ème} siècle et reposaient sur les différences d'autofluorescence des tissus sous illumination aux ultraviolets (10-390 nm) [386]. Peu après, Moore a utilisé la fluorescéine, excitée dans l'ultraviolet, pour différencier les tissus malins des tissus sains [387].

Dans le cancer épithélial ovarien, le récepteur au folate (ou acide folique) est surexprimé dans 90% des cas [388]. Van Dam *et al.* ont exploité cette surexpression pour construire une sonde de détection intraopératoire spécifique avec du folate couplé à du FITC (Fluorescein isothiocyanate). Ils ont obtenu un signal positif chez trois des quatre patientes testées atteintes d'un EOC [389]. Il est important de noter que la pénétration dans les tissus de fluorophores émettant dans le spectre visible (390-750 nm), comme le FITC, est très limitée principalement du fait de l'absorption des photons par les chromophores naturels présents dans l'organisme (mélanine, hémoglobine, *etc.*). De plus, l'autofluorescence de certains tissus dans les mêmes longueurs d'onde (notamment au niveau du tractus digestif) limite la visibilité avec ce type de fluorophore [390].

Le développement des caméras d'imagerie de fluorescence a permis d'envisager l'utilisation de fluorophores émettant dans le proche infrarouge (near infrared, NIR, 750 nm-1 μm), photons invisibles à l'œil nu. A ces longueurs d'onde, l'absorption par les tissus et l'autofluorescence est très faible ce qui va permettre de pénétrer jusqu'à quelques millimètres sous la surface des tissus illuminés [391] (Figure 30, [392]).

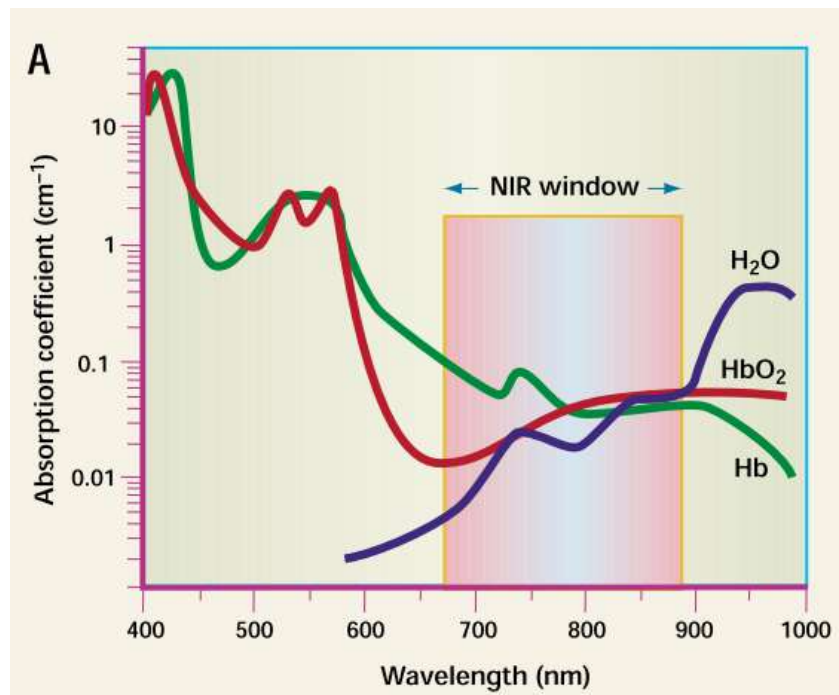


Figure 30 : La fenêtre optique en imagerie in vivo [392]. La fenêtre du proche infrarouge (650-900 nm) est adaptée à l'imagerie de fluorescence in vivo car l'absorption des photons par les chromophores naturels de l'organisme (Hb, hémoglobine <650 nm ; eau >900 nm) y est minimale.

Par exemple, Hoogstins *et al.* ont décrit l'utilisation de l'OTL38, un analogue du folate couplé à un fluorophore émettant dans le NIR, qui a permis d'améliorer de 29% la détection de nodules tumoraux, en comparaison des méthodes conventionnelles (palpation), dans la cavité péritonéale d'une petite cohorte de patientes. Cependant, aucun seuil de détection en matière de taille de nodules n'est renseigné dans l'article, de même qu'il n'y a pas de données sur la survie globale des douze patientes testées [393].

Des études précliniques ont été réalisées sur une sonde peptidique fluorescente dans le NIR, l'Angiostamp®, et le dispositif optique rattaché, Fluobeam® (Fluoptics, Grenoble), pour la détection intraopératoire de tumeurs péritonéales dans des modèles murins de carcinose péritonéale ovarienne et chez des animaux domestiques (chiennes et chattes) ayant développé la pathologie [389, 390]. Cette sonde est administrée par voie systémique et cible les $\alpha v \beta 3$ intégrines exprimées par les cellules endothéliales. Les résultats démontrent que les xénogreffes péritonéales des modèles murins, y compris des nodules inframillimétriques, ont bien toutes été détectées par le traceur mais indépendamment de leur niveau d'expression des intégrines. Les auteurs suggèrent que le marquage de l'Angiostamp® est donc simplement associé à l'angiogenèse. Chez les animaux domestiques, les FGS ont été réalisées sur des tumeurs locales et des carcinoses péritonéales, et les résultats démontrent que des nodules tumoraux mammaires et ovariens ont été détectés spécifiquement par l'Angiostamp®.

Ce traceur fluorescent a également été utilisé en assistance intraopératoire pour déterminer le potentiel d'une nouvelle approche thérapeutique, l'électrochimiothérapie (ECT), pour minimiser les disséminations tumorales dues aux chirurgies cytoréductrices (iatrogènes) dans la cavité abdominale. L'imagerie intraopératoire a permis d'augmenter l'efficacité de l'ECT pour le traitement de ces métastases péritonéales [396].

Malgré de nombreux essais, très peu de sondes intraopératoires sont disponibles en clinique. Une des rares ayant obtenu l'approbation de la FDA est un agent émettant dans le NIR appelé Indocyanine green (ICG) [397]. Son utilisation avec des microscopes chirurgicaux en clinique humaine a été approuvée en 2006. L'ICG est largement utilisé pour l'imagerie en temps réel de chirurgies abdominales. Bien que l'ICG ait une clairance rénale rapide et soit très bien toléré, il s'agit d'une sonde à ciblage passif, donc non spécifique des tissus cancéreux. Après une administration systémique, l'ICG s'accumule dans les vaisseaux formés lors de l'angiogenèse tumorale en raison de son affinité pour les protéines du plasma et en profitant de l'effet EPR. Ainsi, les chirurgiens utilisent des caméras à haute-résolution pour détecter la fluorescence de l'ICG et réaliser des évaluations intraopératoires de l'étendue des carcinomes péritonéaux [376, 392]. Bien que cet agent fluorescent présente certains avantages, son manque de spécificité conduit à un taux élevé de faux positifs [398] et l'émission de fluorescence par le tractus gastro-intestinal peut masquer la détection de tumeurs dans la cavité péritonéale [399].

Le 5-aminolevulinic acid (ALA) est un photosensibilisateur non toxique formé naturellement dans les mitochondries. Son administration orale ou intrapéritonéale conduit à l'accumulation de protoporphyrine IX endogène (précurseur de l'hème) dans les cellules tumorales. L'ALA a été utilisé en imagerie diagnostique pour l'assistance de CRS en première intention [400] et de chirurgies laparoscopiques en seconde intention [401]. La détection de nodules péritonéaux est améliorée de 30%, par rapport à l'utilisation de la lumière blanche, pour des implants non-microscopiques (environ 5 mm). Par ailleurs, une précaution majeure à prendre en compte après l'administration d'ALA est la photosensibilité des patients [400,401].

Pour les carcinomes péritonéaux, la sonde idéale serait donc multimodale associant un fluorophore émettant dans le NIR, une spécificité pour le ciblage actif d'un marqueur tumoral et un autre agent pour de l'imagerie en IRM ou CT scan pour passer outre la limitation de la fluorescence pour la détection en profondeur dans les tissus. De plus, il est très important que le fluorophore en NIR émette une forte intensité de fluorescence et soit photorésistant pour pouvoir être utilisé dans des CRS qui sont des chirurgies longues. Il est également essentiel de souligner que la sonde doit être non toxique et qu'elle doit être excrétée ou dégradée pour éviter des effets toxiques indésirables à long terme [382].

b) Les nanoparticules inorganiques émettant dans le NIR

Les nanoparticules émettant dans le NIR pourraient potentiellement répondre à tous les critères évoqués ci-dessus. En effet, elles vont émettre une intensité de fluorescence plus importante, avoir des rendements quantiques (rapport entre les photons émis et absorbés) bien meilleurs que n'importe quel fluorophore organique et donc des rapports signaux sur bruit de fond (SNR) plus grands [402]. Elles vont pouvoir s'accumuler dans les tumeurs grâce à l'effet EPR, mais il est aussi envisageable de les fonctionnaliser en greffant une spécificité de ciblage à leur surface ou encore en ajoutant un autre agent d'imagerie pour les rendre multimodales. La Figure 31 [382] présente des nanoparticules émettant dans le NIR développées en recherche et en clinique.

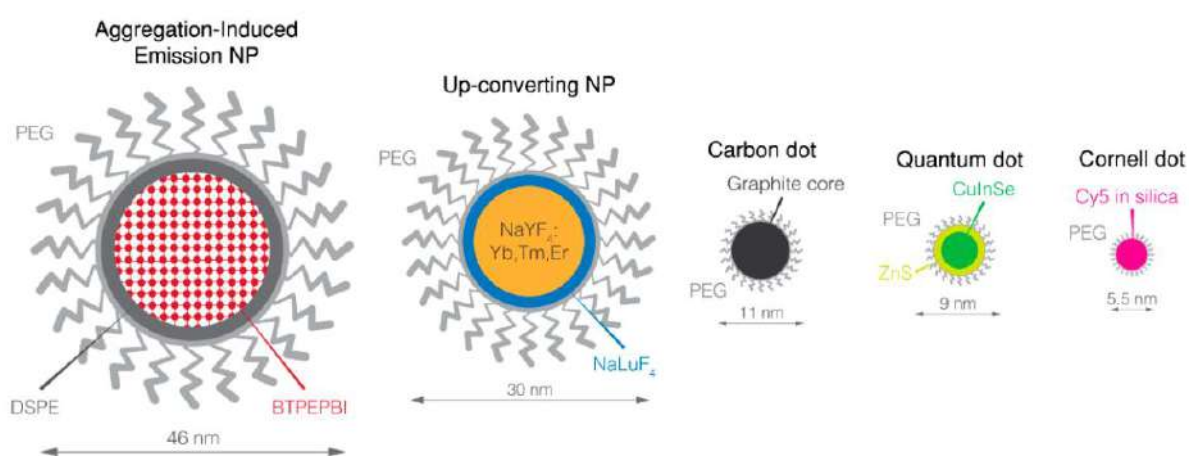


Figure 31 : Nanoparticules émettant dans le NIR [382]. BTPEPBI : 1,7-tetraphenylethene modified 3,4,9,10-Tetracarboxylic perylene bisimide; Cy5: cyanine 5; DSPE: 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(polyethylene glycol)]; NP: nanoparticule.

• Quantum dots (QDs)

Ce sont des nanocristaux fluorescents composés de matériaux semi-conducteurs. Leur spectre d'émission va dépendre de leur composition et de leur taille, ainsi un QD composé de plomb de 3 nm va émettre vers 800 nm alors que si son diamètre est augmenté jusqu'à 6,5 nm, il émettra au-delà de 1,5 μm [403]. Les QDs hydrophobes peuvent être solubilisés dans l'eau par échange de ligand ou encapsulation dans des micelles phospholipidiques. Cette synthèse organique permet d'obtenir des QDs avec une longue durée de vie de fluorescence et à haut rendement quantique ce qui permet de distinguer facilement les signaux d'intérêt de l'autofluorescence de tissus [404]. Il existe aussi des synthèses de QDs hydrophiles où le solvant organique est remplacé par de l'eau.

Malgré des propriétés optiques attractives, la faiblesse des QDs vient de leur composition en métaux lourds, comme le cadmium ou le plomb, et de leur excitation à des longueurs d'ondes dans le visible qui limite la profondeur de visualisation. Par ailleurs, suite à une injection intraveineuse, les QDs s'accumulent rapidement dans le foie et les reins ce qui peut conduire à des conséquences néfastes sur le long terme. Pour prévenir la dégradation des QDs une fois injectés dans l'organisme, il est

possible d'ajouter une coquille protectrice autour de noyau, avec du sulfure de zinc par exemple (ZnS). Un groupe a synthétisé des QDs multimodaux composés de cuivre et d'indium, protégés par une épaisse coquille de ZnS fonctionnalisée avec du manganèse pour permettre de faire de l'IRM et de la fluorescence dans le NIR. Ils démontrent que ces QDs peuvent être utilisés pour la détection de ganglions lymphatiques *in vivo* après une injection sous-cutanée [405]. Une autre étude démontre que des QDs composés de zinc, mercure et sélénium, avec une excitation et une émission de fluorescence dans le NIR (785 nm et 800 nm respectivement), permettent une détection très spécifique de tumeurs péritonéales après une injection intrapéritonéale [406].

- **Nanoparticules à conversion ascendante**

Ces nanoparticules sont obtenues par le même type de synthèse que les QDs mais à partir d'atomes de lanthanides, ce qui va leur conférer des propriétés d'émission de fluorescence particulières. A travers une conversion multiphotonique, ces nanoparticules vont émettre dans le NIR après une excitation à des longueurs d'onde supérieures (vers 980nm) [407]. Ceci va conduire à d'excellents SNR et une grande pénétration dans les tissus. Ces nanoparticules à conversion ascendante ont été testées sur un modèle murin de carcinose péritonéale [408]. Les auteurs soulignent la bonne biocompatibilité de ces nanoparticules et le fait que certains atomes des lanthanides sont déjà approuvés par la FDA pour leur utilisation en imagerie IRM. Cependant de nombreuses études de toxicité sont encore à effectuer pour pouvoir affirmer la non toxicité de ces nanoparticules *in vivo*.

- **Carbon Dots (CDs)**

Les Carbon dots sont obtenus à partir de molécules carbonées. Leur synthèse implique un processus solvothermal comme vu avec les synthèses organiques de QDs ou une calcination. La production d'un cœur en graphène va dépendre du précurseur organique et du processus de synthèse utilisé. Tout comme les QDs, les CDs sont caractérisés par de très hauts rendements quantiques et une grande photostabilité en présentant l'avantage d'être purement organique [409]. Un groupe a développé des carbon nanodots, à partir de la suie de pneus de voitures brûlées en réalisant un traitement oxydatif avec de l'acide nitrique, permettant de faire de l'imagerie de fluorescence *in vivo* dans le NIR après une implantation sous-cutanée des CDs incorporés dans un matrigel [410].

- **Fluorophores dont l'émission est induite par l'agrégation**

Il s'agit du phénomène inverse du self-quenching (diminution de la fluorescence émise induite par des molécules quencher de même nature que le fluorochrome). En effet, certains fluorophores organiques vont avoir besoin de s'agréger pour émettre de la fluorescence. Ils vont émettre une forte intensité de fluorescence et sont aussi photostables. Comme la plupart des fluorophores organiques, ils ont une bonne biocompatibilité [411]. Cependant, ces fluorophores sont très hydrophobes par nature, il va donc être nécessaire de les encapsuler en ajoutant un polymère amphiphile dans un solvant organique,

qui sera ensuite éliminé par évaporation. Une fois le solvant éliminé, le mélange de polymères et de fluorophores agrégés va être resuspendu et soniqué pour en faire une suspension aqueuse. Une étude a déterminé que ce type de nanoparticules peut s'accumuler dans les tumeurs, par effet EPR après administration systémique, et permettre la détection de nodules péritonéaux submillimétriques avec un SNR très haut (7,2) [412].

- **Fluorophores encapsulés dans la silice**

La coquille protectrice de silice, en plus d'être une surface facile à fonctionnaliser, permet d'améliorer la photostabilité des fluorophores encapsulés. Les Cornell dots (C-dots) sont des nanoparticules très petites (moins de 10nm). Ils sont synthétisés avec des dérivés de cyanine liés à un précurseur de la silice qui vont réagir pour former une entité fluorescente. Par la suite, une coquille de silice est ajoutée pour protéger la structure. Ainsi, les propriétés d'émission de la cyanine restent inchangées cependant elle aura une intensité de fluorescence plus importante et sera plus photostable [413]. Par ailleurs, les C-dots sont conçus pour éviter une toxicité due à l'accumulation dans les tissus. Leur très petite taille va induire une excrétion rapide par les reins diminuant ainsi le risque de cytotoxicité, et également la présence de fluorophores libres donc de bruit de fond. La coque de silice étant chimiquement polyvalente, il est possible d'y greffer des PEG ou encore une molécule d'adressage.

A ce jour un C-dot de cyanine 5.5 PEGylé sur lequel a été greffé un agent ciblant les récepteurs aux intégrines est entré en phase I d'essai clinique (NCT02106598) pour la détection préopératoire de ganglions lymphatiques enflés dans les cancers du sein et les cancers colorectaux. Les premiers résultats sont attendus pour avril 2020.

Récemment, la mort par ferroptose (type de mort cellulaire programmée dépendante du fer) de cellules cancéreuses dépourvues de nutriments et exposées à des C-dots a été mise en évidence et constitue une propriété inattendue de ces nanoparticules [414]. Le cumul du fluorophore pour l'imagerie diagnostique et des propriétés cytotoxiques pour la thérapie permettent d'envisager l'utilisation de ces nanoparticules en théranostique (diagnostic couplé à la thérapie). Cette notion sera développée dans le chapitre suivant.

3. Administration et élimination des nanoparticules

Les nombreuses possibilités offertes par les propriétés particulières des nanoparticules n'enlèvent pas la barrière de la sécurité indispensable à franchir pour envisager leur utilisation en clinique.

- **Voies d'administration**

La biodistribution d'une nanoparticule va énormément dépendre de la voie choisie pour son administration. Jusqu'à présent nous n'avons quasiment parlé que d'injection systémique or, pour une FGS dans le cadre des carcinomes péritonéaux ovariens, le repérage des plus petits nodules

implantés dans le péritoine sera impossible puisqu'ils ne sont pas encore vascularisés [415]. En revanche, des fluorophores émettant dans le NIR et injectés en intrapéritonéal permettent la détection de petites tumeurs en réduisant le bruit de fond et donc en augmentant le SNR. La Figure 32 [416] présente une expérience qui compare l'administration intraveineuse et intrapéritonéale d'une sonde fluorescente émettant dans le NIR dans un modèle murin de carcinose péritonéale ovarienne. Les tumeurs péritonéales sont détectées par la sonde injectée en intrapéritonéal, alors que celle-ci va s'accumuler dans le foie et la rate lorsqu'elle est administrée en systémique.

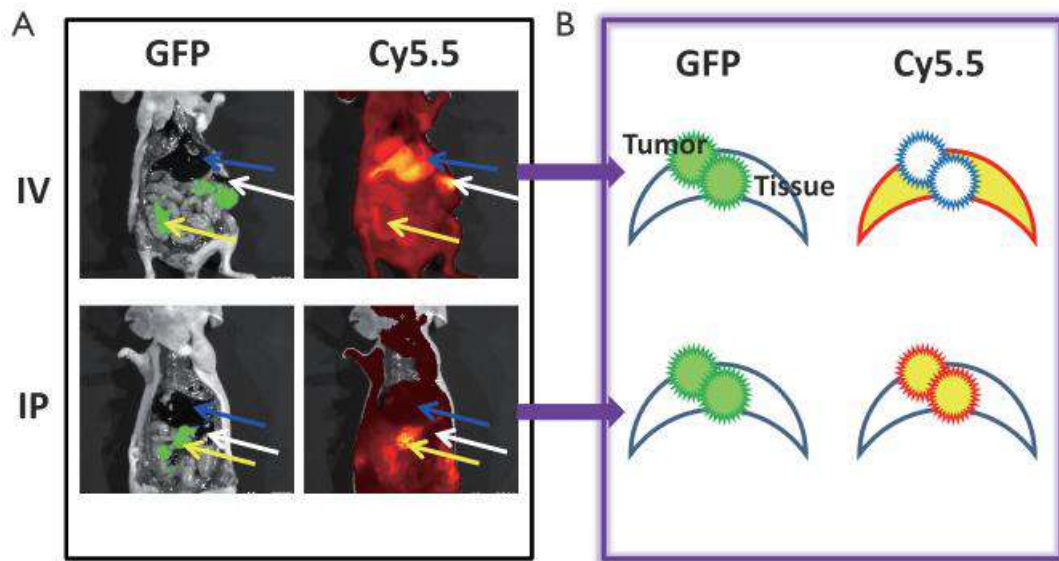


Figure 32 : Imagerie de fluorescence dans un modèle murin de carcinose péritonéale ovarienne 24h après administration intraveineuse (IV) ou intrapéritonéale (IP) d'une sonde émettant dans le NIR (adapté de [416]). (A) Le signal de la GFP indique la localisation des tumeurs SKOV-3, et les images Cy5.5 présentent le signal de la sonde. L'injection IV induit un fort signal fluorescent dans le foie (flèche bleue) et la rate (flèche blanche) mais aucun signal au niveau des tumeurs péritonéales (flèche jaune). En revanche, avec l'injection IP il n'y a pas de signal au niveau du foie et de la rate, alors que le signal de la sonde (Cy5.5) est visible dans les tumeurs péritonéales. (B) Illustration schématique du contraste de fluorescence entre les tumeurs et les organes selon la voie d'administration de la sonde. Tumeurs péritonéales en vert (colonne GFP), repérage de la sonde en orange (colonne Cy5.5). Accumulation du signal de la sonde dans les tissus sains et pas de signal dans les tissus tumoraux après injection IV (panel du haut). Co localisation des signaux des tumeurs et de la sonde après injection IP (panel du bas).

Il est également possible d'envisager des lavages péritonéaux après l'administration de nanoparticules fluorescentes pour nettoyer le matériel non fixé et donc augmenter d'autant plus le SNR [382].

Par ailleurs, même lorsqu'il s'agit d'une molécule thérapeutique seule, l'injection systémique n'est pas automatiquement la meilleure option, surtout pour le traitement des tumeurs péritonéales. La comparaison de l'injection de doxorubicine par voie systémique et intrapéritonéale (i.p) a démontré que la biodisponibilité de la molécule injectée en i.p est estimée à presque 50% suggérant que la majorité de la doxorubicine atteint les cellules tumorales cibles dans la cavité péritonéale avant de passer dans la circulation systémique. De plus, le temps de rétention moyen du principe actif après administration intrapéritonéale est 80% plus long qu'après administration systémique [417,418].

La voie intrapéritonéale permet d'éviter ou de diminuer largement l'exposition systémique de tous les organes aux nanoparticules, améliorant ainsi la sécurité et offrant la possibilité de fonctionnaliser la nanosonde par un ciblage actif pour augmenter la sélectivité et le SNR en assistance intraopératoire.

- **Excrétion urinaire**

Le critère le plus important pour l'utilisation de nanoparticules en clinique, en plus de leurs propriétés physiques pour la FGS, est leur élimination rapide de l'organisme pour éviter l'accumulation dans des organes pouvant engendrer des effets néfastes. Choi *et al.* ont démontré que seuls les QDs de taille inférieure à 6 nm étaient entièrement excrétés par voie rénale, alors que les plus grands s'accumulent au niveau du foie, des poumons et de la rate [419]. De plus, un autre groupe a démontré le rôle important de la filtration glomérulaire agissant comme une chromatographie d'exclusion en laissant passer plus rapidement les nanoparticules plus grandes [420]. Ainsi, le diamètre idéal pour la clairance rénale efficace d'une nanoparticule serait compris entre 1,7 et 6 nm. L'utilisation des QDs en clinique semble compromise puisque la plupart présentent des tailles exclues de cette fourchette.

Une autre option pour faciliter l'excrétion rénale est l'encapsulation des nanoparticules dans un matériel biocompatible comme la silice. Une étude présente une méthode simple pour l'encapsulation de QDs, composés de cadmium et de tellure, dans une coquille de silice et montre la biodistribution de ces nanoparticules *in vivo*. Trente minutes après administration systémique, la nanoparticule est principalement excrétée dans les urines, la coquille de silice induit aussi une prolongation de sa demi-vie dans la circulation sanguine et diminue son accumulation dans le foie [421].

4. La nanothéranostique

Dans les paragraphes précédents, nous avons abordé la nanovectorisation de molécules thérapeutiques ainsi que l'utilisation de sondes diagnostiques. Certaines nanoparticules, souvent suite à diverses étapes de fonctionnalisation, vont pouvoir cumuler ces deux propriétés. Ces nano-objets ouvrent donc la voie au développement de la nanothéranostique, c'est-à-dire le diagnostic et la thérapie au sein d'une même entité à l'échelle nanométrique. Une nanoparticule « idéale » pour les traitements et l'imagerie diagnostique dans le cadre des carcinoses péritonéales ovariennes regrouperait les propriétés suivantes : une spécificité de reconnaissance pour un biomarqueur, la possibilité d'être repérée, la capacité à confiner une molécule, et être non toxique (Figure 33, [422]).

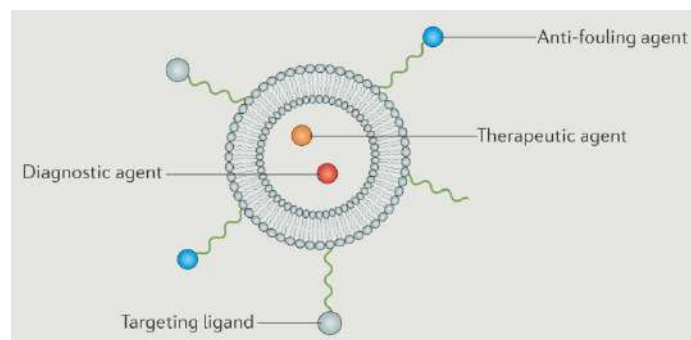


Figure 33 : La Nanotheranostique (adapté de [422]). Un objet nanotheranostique traditionnel possède un agent pour le diagnostic et un autre pour la thérapie, regroupés en une seule entité. Pour améliorer les propriétés pharmacocinétiques, des fonctionnalisations sont possibles pour rendre ses agents furtifs, de manière à leurrer les défenses immunitaires et ainsi atteindre les cibles biologiques, et ciblant pour qu'il soit adressé directement aux tumeurs.

La spécificité de reconnaissance est rarement intrinsèque à la nanoparticule. Comme vu précédemment, il est possible de l'ajouter par couplage avec un anticorps ou un peptide ciblant par exemple, qui vont reconnaître un biomarqueur, le plus souvent surexprimé sur le tissu tumoral. Ainsi, une des premières limitations soulevées ici est l'identification d'un biomarqueur pertinent à cibler. Nous avons vu que dans le cancer ovarien plusieurs biomarqueurs spécifiques, de nature peptidique ou glycosidique, ont été identifiés ce qui n'est pas le cas pour la plupart des cancers. Il est donc possible d'envisager des constructions orientant la nanoparticule vers les tissus tumoraux ovariens.

La possibilité d'être repérée ou suivie permet d'utiliser la nanoparticule en imagerie diagnostique à plusieurs moments dans le parcours de soins, du diagnostic initial aux suivis de traitement en passant par l'assistance intraopératoire au moment des chirurgies de cytoréduction. Pour que la nanoparticule soit visible, il est nécessaire de la fonctionnaliser en y greffant un fluorophore ou tout autre agent, à l'image des exemples abordés dans cette partie. Ce couplage est souvent fait à la surface du nano-objet mais pas exclusivement, et quel que soit l'agent d'imagerie choisi, il faut que celui-ci remplisse certains critères, comme la photostabilité, indispensables pour envisager son utilisation en clinique.

La capacité de la nanoparticule à confiner une molécule cytotoxique permet non seulement d'éviter sa dégradation précoce mais également de protéger les tissus sains de son effet toxique. Il faut donc être capable de contrôler son confinement et sa libération une fois amenée au tissu tumoral.

Pour finir, il est indispensable que la nanoparticule soit biocompatible et biodégradable donc non toxique pour envisager une utilisation en clinique. Une clairance rénale rapide est donc souvent privilégiée bien qu'un juste milieu soit à trouver pour ne pas avoir à réadministrer la nanoparticule dans le cas par exemple de l'assistance intraopératoire sur des chirurgies longues. Par ailleurs, la voie intrapéritonéale permet de diminuer largement la toxicité systémique et améliore la biodisponibilité de la nanoparticule pour les tumeurs péritonéales.

A titre d'exemple, une étude rapporte la délivrance ciblée de doxorubicine ou de cisplatine dans un modèle murin orthotopique de cancer du pancréas. Des nanoparticules d'oxyde de fer (IONP), encapsulées dans un polymère amphiphile PEGylé, sont fonctionnalisées pour le ciblage par le fragment peptidique N-terminal de l'activateur plasminogène urokinase (uPA). La doxorubicine est encapsulée dans l'espace hydrophobe de la capsule du polymère amphiphile. Le cisplatine est lui conjugué aux nanoparticules par une liaison de coordination entre le platineum chargé positivement (pH 8,5) et les charges négatives des groupements carboxyliques à la surface des IONP. De plus, un fluorophore émettant dans le NIR a été couplé aux groupements thiols libres des cystéines du peptide ciblant. L'uPA va reconnaître son récepteur uPAR, surexprimés à la surface des cellules cancéreuses dans 70% des cancers pancréatiques, 80% des cancers ovariens, 85% of des cancers colorectaux et 37% des cancers gastriques. Cet adressage va permettre l'endocytose des nanoparticules et donc de la doxorubicine ou du cisplatine. La délivrance ciblée de ces molécules va pouvoir être détectée par IRM (IONP) et imagerie optique de fluorescence (fluorophore NIR). Des analyses histologiques révèlent que les nanoparticules ont pénétré de la périphérie jusqu'au centre la tumeur primaire et les métastases péritonéales. La délivrance ciblée de la doxorubicine ou du cisplatine a inhibé de plus de 20% la croissance tumorale, en comparaison des molécules libres après administration i.p, sans toxicité systémique. La détection d'un signal fluorescent intense dans les implantations tumorales péritonéales, suite à une injection i.p, suggèrent qu'il est possible d'utiliser cet objet en FGS pour guider l'excision de tumeurs résistantes au cisplatine ou à la doxorubicine (Figure 34, [423]).

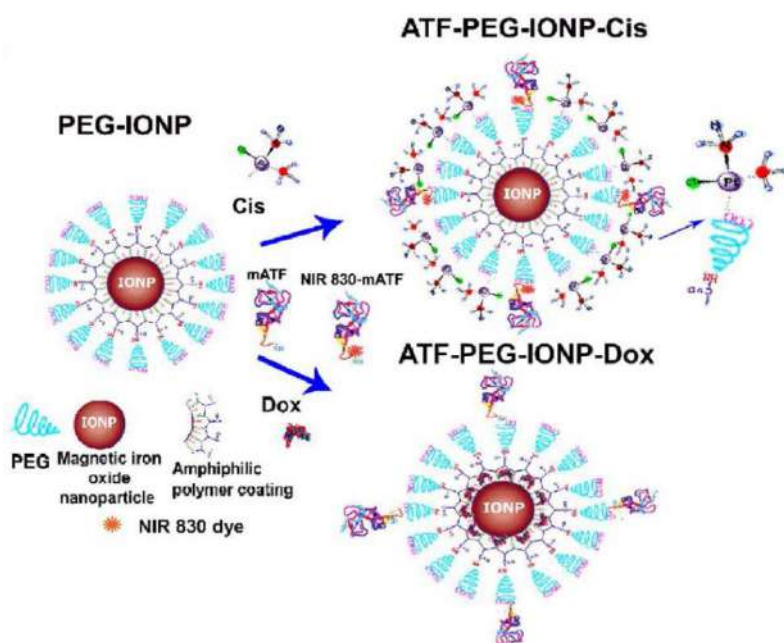


Figure 34 : Illustration schématique de l'assemblage d'ATF-PEG-IONP et du chargement de la doxorubicine (Dox) ou du cisplatine (Cis) pour la délivrance ciblée (adapté de [423]). Amino Terminal fragment (ATF) : fragment N-terminal de uPAR (récepteur de l'activateur plasminogène urokinase) ; PolyéthylèneGlycol (PEG) ; nanoparticules d'oxyde de fer (IONP).

Malgré les nombreux nano-objets décrits dans la littérature et développés à des fins théranostiques, très peu d'entre eux regroupent toutes les caractéristiques détaillées précédemment et rares sont ceux disponibles en clinique. Dans l'exemple ci-dessus, la nanoparticule théranostique présente beaucoup d'avantages (imagerie multimodale, adressage spécifique), notamment en matière de pénétration des tissus tumoraux, en revanche l'assemblage des différents partenaires (IONP, fluorophore, molécule thérapeutique) pour obtenir l'objet final peut s'avérer très complexe pour envisager une production à grande échelle. De plus, dans le cas du cisplatine, le greffage à l'extérieur de la nanoparticule ne permet pas d'assurer la protection de la molécule ni son isolement du milieu extérieur.

Pour le développement de ce type d'objet, il est essentiel d'envisager la faisabilité d'une production à grande échelle, sans quoi, même si les études précliniques sont très prometteuses, le passage en clinique ne sera pas possible. La production est plus aisée à mettre en place lorsque le nano-objet présente plusieurs propriétés intrinsèques, comme un ciblage actif, et ainsi peu de partenaires différents à assembler. Par ailleurs, bien que la molécule thérapeutique à transporter puisse être greffée à la surface de la nanoparticule, ce qui est souvent le cas, il est toujours préférable que celle-ci soit confinée pour éviter qu'elle ne soit dégradée ou qu'elle interagisse de manière néfaste avec le milieu extérieur. Un confinement implique que la manipulation de la nanoparticule soit contrôlée, qu'il soit possible de relarguer la molécule confinée une fois adressée aux tissus cibles, et que le nombre de molécules encapsulées soit suffisant pour engendrer l'effet cytotoxique attendu. Des expériences de biodistribution in vivo sont indispensables pour déterminer la meilleure voie d'administration de manière à engendrer le maximum d'effet avec la molécule thérapeutique transportée. Dans le cas où une toxicité se présente pour une voie d'administration choisie, ce ne sera pas forcément le cas avec d'autres modes d'injection. Ces expériences permettent donc de déterminer la toxicité de l'objet théranostique, et également d'appréhender la stabilité et la durée de vie du fluorophore ou de l'agent d'imagerie choisi et conjugué à la nanoparticule. Enfin, des études de pharmacocinétiques approfondies sont obligatoires de manière à valider ces nanoparticules pour une utilisation théranostique en clinique.

Compte-tenu des concepts décrits dans cette introduction, il y a donc encore beaucoup de progrès à faire dans le développement de sondes en assistance intraopératoire des chirurgies de cytoréduction pour permettre une plus grande spécificité de détection, la détection en profondeur dans les tissus, et le traitement des nodules submillimétriques intra-abdominaux dans le cadre des carcinoses péritonéales.

Partie IV : Projet de thèse

La lectine de *Xerocomellus chrysenteron* (XCL) est donc une protéine, à l'origine extraite du bolet à chair jaune (champignon supérieur comestible), puis produite sous forme recombinante dans un système microbien (*E. coli*) et purifiée par colonne d'affinité (Ni-NTA) grâce à l'étiquette six histidines ajoutée en N-terminal de sa séquence. C'est une lectine qui sous sa forme recombinante peut être produite en grande quantité. La protéine XCL mesure 3,4 nm de rayon en considérant qu'il s'agit d'une sphère hydratée (soit 165 nm³), et présente une cavité au centre de sa structure (1 nm³) dans laquelle il est possible de confiner différents types de molécules thérapeutiques grâce aux interactions non covalentes qui s'établissent entre les acides aminés bordant la cavité et la molécule. Elle possède 4 sites de reconnaissance (homotétramère) pour un glycotope biomarqueur des carcinomes, l'antigène TF, peu ou pas exprimé sur les cellules épithéliales saines. La protéine XCL est donc un nano objet qui peut intrinsèquement cibler un ligand spécifique. Pour finir, en dehors de la voie d'administration systémique, ce nano-objet ne présente pas de toxicité chez le petit animal en administration *per os* et intrapéritonéale. L'ensemble peu commun de ses propriétés ouvre en grand le champ d'applications pour son développement.

L'objectif de ce travail est donc multiple. Dans un premier temps, il faut s'assurer de la faisabilité de l'encapsulation de molécules thérapeutiques d'intérêt dans la cavité de la lectine puis mettre au point un protocole de confinement. Par la suite, un modèle cellulaire doit être développé pour évaluer l'efficacité de cette protéine en tant que nanocontainer et amener la preuve de concept *in vitro* de la délivrance de principes actifs à des adénocarcinomes ovariens humains suite à une reconnaissance du glycotope à la membrane. L'évaluation *in vitro* peut être effectuée en déterminant la viabilité des cellules mis en présence du nanocontainer chargé ou non et en analysant les modifications apportées par cette délivrance au niveau du cycle cellulaire. Pour pouvoir détecter notre nano-objet durant ces expériences, il est important de s'assurer qu'il peut être marqué avec un fluorophore, de préférence émettant dans le NIR, sans bloquer l'interaction de la protéine avec son ligand à la surface des cellules. Dans un second temps, un modèle murin de carcinose péritonéale ovarienne doit être établi. Une des plus grosses problématiques cliniques de cette maladie est la dissémination de foyers cancéreux dans la cavité abdominale suivi du développement de masses tumorales ou nodules de tailles variées, et notamment submillimétriques. Le modèle mis au point doit refléter cet aspect pour permettre le développement de la lectine comme nanosonde fluorescente applicable à l'imagerie diagnostique pour l'assistance intraopératoire des chirurgies de cytoréduction. Le marquage des nodules dans le péritoine des animaux peut être analysé par fluorescence à différentes échelles (macro, microscopique et cytométrie) en marquant le nano-objet dans le NIR. Une partie du projet consiste donc à caractériser

ce marquage *in vivo* et évaluer s'il est possible de détecter des masses tumorales de taille submillimétrique avec la lectine.

Enfin, le cumul des deux propriétés de ce nano-objet permet d'envisager son développement comme outil théranostique trouvant une application toute indiquée dans l'assistance des chirurgies de cytoréduction, tant en matière d'imagerie diagnostique que de thérapie ciblée. Pour cela, il est nécessaire d'amener la preuve de concept *in vivo* de l'efficacité du nanocontainer en matière de détection d'implantations tumorales, indépendamment de leur taille, et de la vectorisation ciblée de molécules thérapeutiques dans le modèle murin de carcinose péritonéale ovarienne.

Résultats et Discussion

Partie I : Développement d'un test de viabilité cellulaire et d'un modèle murin de carcinose péritonéale ovarienne

Ce travail a été réalisé dans le cadre de la collaboration avec la société Urosphere (CIFRE). L'idée était de disposer d'un test *in vitro* simple permettant de déterminer au préalable l'efficacité de candidats médicament sur des lignées cellulaires cancéreuses à partir desquelles des modèles précliniques ont été développés (carcinomes vésicaux et ovariens). Dans le cas où les molécules engendrent une diminution de la viabilité *in vitro*, elles pourront être testées *in vivo* sur les modèles correspondants.

1. Mise au point d'un test de viabilité basé sur la bioluminescence

Il existe de nombreux types de tests de viabilité, (i) basés sur l'absence de coloration des cellules (Trypan blue, eosin, etc.), (ii) des tests colorimétriques (MTT, crystal violet, etc.), (iii) des tests basés sur la fluorescence ou encore (iv) la bioluminescence émises par les cellules [424]. Les modèles *in vivo* mis au point dans ce projet reposent sur l'imagerie du petit animal et notamment la bioluminescence, il était donc important de mettre au point un test de viabilité *in vitro* basé sur ce même principe. En effet, en plus de permettre une continuité entre une évaluation *in vitro* puis *in vivo* d'un candidat médicament, cette méthode présente plusieurs avantages en comparaison d'autres méthodes existantes. La mesure est rapide et automatique (lecteur de plaque) donc réalisable sur un grand nombre d'échantillons en même temps. Il est possible d'effectuer un suivi longitudinal (mêmes cellules) de la viabilité sur plusieurs jours puisqu'il n'est pas nécessaire d'effectuer un passage des cellules avant la mesure, ce qui permet de s'affranchir de nombreux biais. De plus, la mesure de la bioluminescence est sensible et directement liée au métabolisme cellulaire, ce qui implique qu'elle diminue rapidement après la mort cellulaire. En revanche, il est important de s'assurer au préalable que la molécule thérapeutique à tester n'a pas d'influence sur la réaction enzymatique responsable de l'émission de la bioluminescence par les cellules [424].

Les mises au point de ce test de viabilité ont été effectuées sur deux types cellulaires, les cellules AY-27 (carcinomes vésicaux de rat) et les cellules SKOV-3 (carcinomes ovariens humains) exprimant de manière constitutive le gène codant pour la luciférase (Luc) suite à une transduction de ces cellules par un lentivirus (cf matériels et méthodes).

a) AY-27 Luc

La première étape consistait à établir l'ensemencement optimal de cellules à J-1 pour pouvoir faire un suivi de croissance sur 3 jours. Trois densités cellulaires ont été testées dans des plaques 96 puits,

adaptées aux mesures de bioluminescence, et le suivi a été effectué par lecture de bioluminescence à 24h, 48h et 72h après ensemencement (Figure 35A). La meilleure linéarité entre le temps et l'intensité de bioluminescence est obtenue pour 8000 cellules/cm², c'est donc la densité cellulaire retenue pour l'ensemencement à J-1 des cellules AY-27 Luc. Par la suite, il s'agissait de déterminer à quel moment, après ajout du substrat luciférine, il fallait démarrer la mesure de l'émission de bioluminescence des cellules en s'assurant que la réaction enzymatique avait atteint un plateau. L'expérience réalisée a démontré que le plateau est atteint trop rapidement, ainsi lorsque la lecture de plaque a été lancée l'intensité de bioluminescence était déjà en train de diminuer (Figure 35B). Pour que les expériences soient le plus reproductibles possibles, les lectures de plaques seront toujours effectuées 10 minutes après ajout du substrat. Avant de faire une expérience en présence des molécules thérapeutiques pour valider les mises au point, il fallait s'assurer qu'elles n'interfèrent pas avec la réaction enzymatique conduisant à l'émission de photons (Figure 35C). Ainsi le substrat (luciférine), l'enzyme et de l'ATP ont été mis en présence des deux molécules contrôles à tester, le cisplatine et la gemcitabine, reprises dans leurs solvants respectifs, l'eau et le DMSO (dimethyl sulfoxide), avec une concentration en solvant équivalente à 10% du volume final (Figure 35D). Lorsque le solvant de la molécule est l'eau, aucune interférence au niveau de la réaction enzymatique n'est à rapporter. En revanche, en présence de DMSO, une augmentation des intensités de bioluminescence est observée. Dans ce cas, il est possible que la présence de 10 % DMSO dans le milieu réactionnel ait concentré le substrat en diminuant le volume réactionnel aqueux réel. Cela implique que la réaction s'est faite à concentration en substrat plus forte conduisant à une augmentation de l'émission de photons et donc de l'intensité de bioluminescence mesurée, si la concentration en substrat n'est pas en large excès. Le DMSO n'affecte pas le signal de bioluminescence lorsque sa concentration est ≤ 5%. Ainsi, en présence des cellules AY-27 Luc, sa concentration a été rapportée à 1% du volume final, en adaptant la concentration de la solution mère de gemcitabine. Par conséquent, l'augmentation des intensités de bioluminescence n'est plus observée.

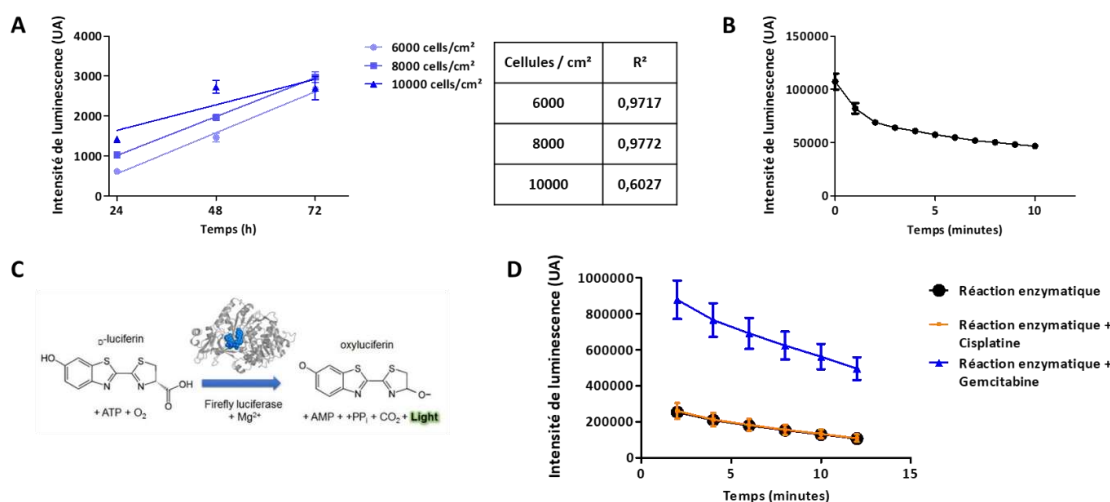


Figure 35 : Expériences préliminaires pour la mise au point d'un test de viabilité basé sur la bioluminescence des cellules AY-27 Luc. (A) Densité d'ensemencement pour effectuer un suivi de la croissance cellulaire en bioluminescence sur 3 jours. Les régressions linéaires ont été réalisées avec le logiciel Prism pour obtenir les R^2 . (B) Détermination du temps auquel seront lues les plaques après ajout du substrat. (C) Réaction enzymatique entre la luciférine et la luciférase conduisant à l'émission de photons qui seront captés par le lecteur de plaque pour obtenir les intensités de bioluminescence. (D) Réaction enzymatique brute (contrôle) et en présence de deux molécules thérapeutiques (100 μ M Cisplatine et 100 μ M Gemcitabine). Lecture de la bioluminescence pour vérifier s'il y a des interférences. Expérience en triplicata. Les intensités de bioluminescence sont exprimées en unité arbitraire (UA).

Une expérience a été réalisée selon les paramètres mis au point en présence de concentrations croissantes de cisplatine (Cis) et/ou gemcitabine (Gem) ; ces 2 molécules étant les premiers choix de traitement dans le cancer métastatique de la vessie. Dans un premier temps, des puits différents étaient utilisés, en ensemençant puis traitant les cellules de manière équivalente à J-1 (ensemencement) et J0 (ajout des molécules), pour chaque temps d'analyse (Figure 36A). Le but était de ne pas avoir à faire de rinçage des puits qui conduisent à une perte de cellules pouvant interférer avec l'évaluation de viabilité. Les résultats obtenus mettent en évidence un effet cytotoxique dose-dépendant des 2 molécules sur les cellules AY-27 Luc (plus flagrant avec le cisplatine qu'avec la gemcitabine), en comparaison des cellules contrôles et cellules contrôles en présence des solvants (Figure 36B).

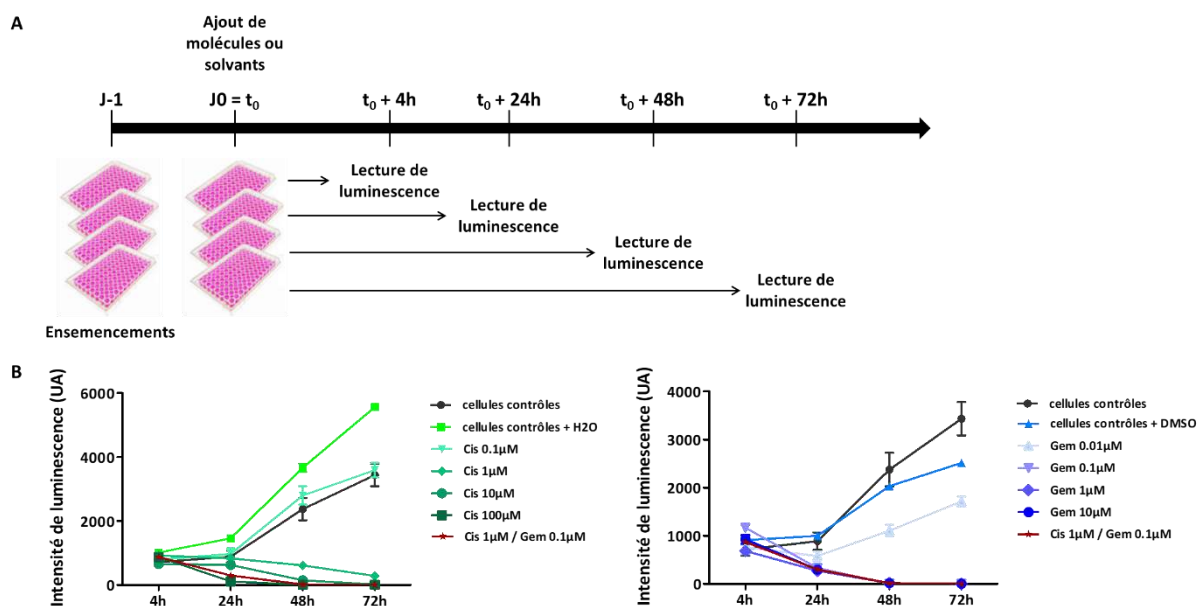


Figure 36 : Suivi non longitudinal de la viabilité cellulaire en bioluminescence sur les cellules AY-27 Luc. (A) Les cellules AY-27 Luc sont ensemençées à 8000 cellules/cm² à J-1, puis les molécules à différentes concentrations (0,01 ; 0,1 ; 1 ; 10 et 100 μ M) ou leurs solvants respectifs sont ajoutés au milieu de culture à t₀, en utilisant des puits différents pour chaque temps d'analyse. Après 4h, 24h, 48h et 72h d'incubation, 150 μ g/mL de luciférine sont ajoutés au milieu de culture et l'intensité de bioluminescence est obtenue avec un lecteur de plaque. (B) Graphes présentant les résultats obtenus avec le cisplatine (panel de gauche) et la gemcitabine (panel de droite). Les intensités de bioluminescence sont exprimées en unité arbitraire (UA). Expérience en triplicata.

A ce stade le test de viabilité semble concluant puisque l'effet des molécules est visible et il est possible de l'évaluer sur 72h en bioluminescence, cependant le suivi mis en place n'est pas idéal car il n'est pas réalisé sur les mêmes cellules tout du long de l'expérience.

Ainsi, par la suite et pour un suivi longitudinal sur 3 jours, les lectures de bioluminescence ont été faites sur les mêmes puits, donc les mêmes cellules, à chaque temps d'analyse et sans rinçage intermédiaire des puits (Figure 37A). Les avantages du suivi longitudinal, par rapport à l'expérience précédente, sont le gain de temps, l'utilisation de plus faibles quantités de substances à tester et la réalisation d'un suivi plus précis. Pour valider ce test de viabilité basé sur la bioluminescence (Figure 37B), un test de viabilité « classique » par comptage cellulaire avec du bleu trypan a été effectué en parallèle (Figure 37C). Cette expérience a conduit à la validation de la méthode puisque les résultats obtenus sont équivalents entre les deux tests de viabilité et que la lecture de bioluminescence a permis de mettre en évidence un effet cytotoxique dose-dépendant des 2 molécules, comme dans l'expérience précédente.

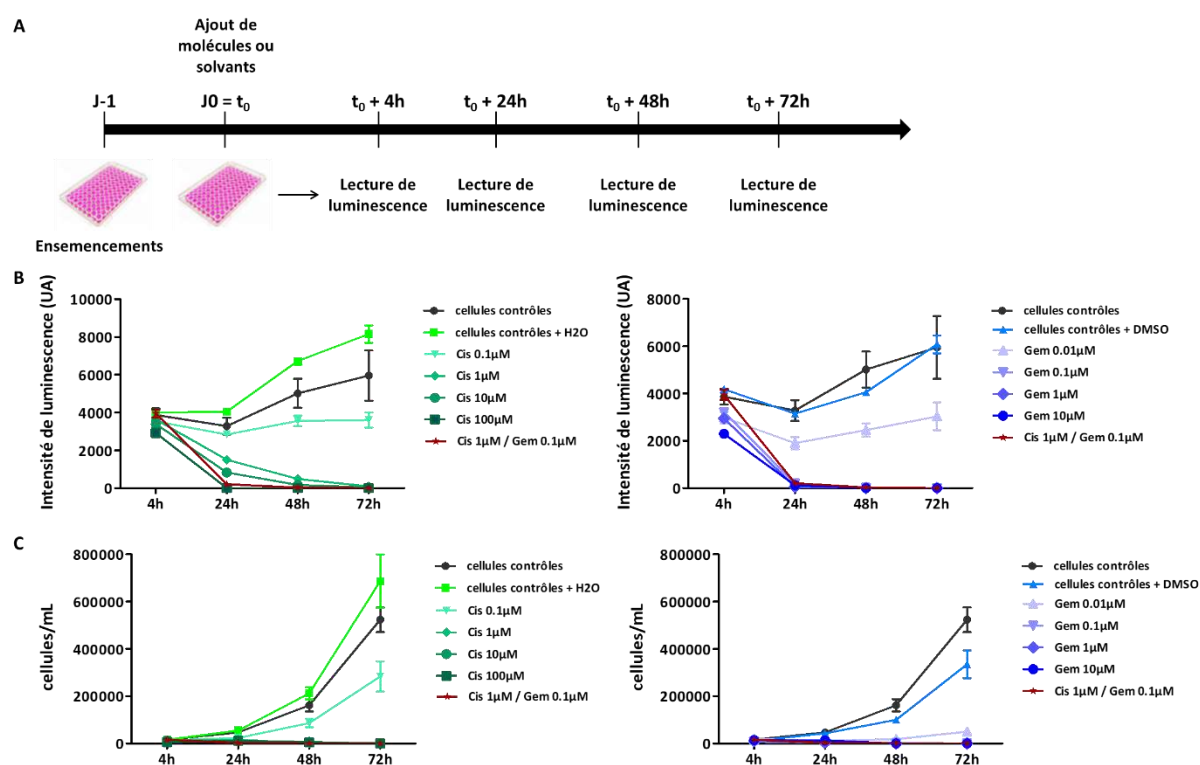


Figure 37 : Validation de la méthode sur les cellules AY-27 Luc. (A) Les cellules AY-27 Luc sont ensemencées à 8000 cellules/cm² à J-1, puis les molécules à différentes concentrations (0,01 ; 0,1 ; 1 ; 10 et 100μM) ou leurs solvants respectifs sont ajoutés au milieu de culture à t₀, en utilisant les mêmes puits pour chaque temps d'analyse. Après 4h, 24h, 48h et 72h d'incubation, 150μg/mL de luciférine sont ajoutés au milieu de culture et l'intensité de bioluminescence est obtenue avec un lecteur de plaque. (B) Graphes présentant les résultats obtenus avec le cisplatine (panel de gauche) et la gemcitabine (panel de droite) en suivi longitudinal. Les intensités de bioluminescence sont exprimées en unité arbitraire (UA). Expérience en triplicata. (C) Graphes présentant les résultats obtenus avec le test de viabilité réalisé par comptage cellulaire avec du bleu de trypan. Expérience en triplicata.

b) SKOV-3 Luc

Pour vérifier que ce test de viabilité basé sur la bioluminescence est applicable à d'autres lignées cellulaires, la même stratégie expérimentale a été réalisée sur les cellules SKOV-3 Luc. Une densité d'ensemencement a dû être déterminée pour les cellules SKOV-3 Luc de manière à effectuer un suivi de leur croissance en bioluminescence sur 3 jours. La meilleure linéarité entre le temps et l'intensité

de bioluminescence est obtenue pour 7 000 cellules/cm², c'est donc la densité cellulaire retenue pour l'ensemencement à J-1 des cellules SKOV-3 Luc (Figure 38A). Le composé qui sera utilisé, pour valider les mises au point de la méthode sur ces cellules, est la doxorubicine, molécule utilisée en clinique dans le traitement du cancer de l'ovaire. Son interférence potentielle avec la réaction enzymatique brute conduisant à l'émission de photons a été évaluée (Figure 38B).

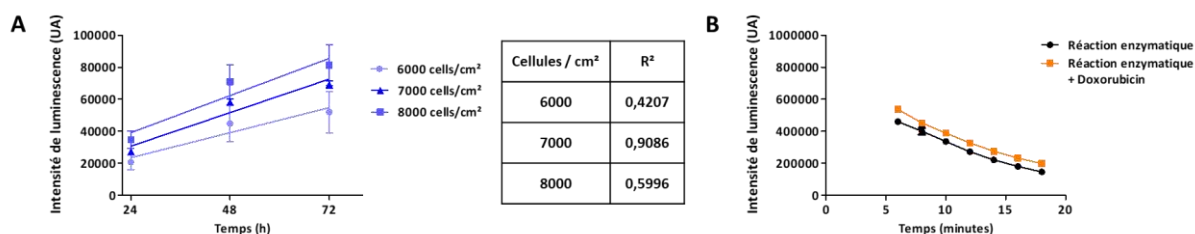


Figure 38 : Expériences préliminaires pour la mise au point d'un test de viabilité basé sur la bioluminescence des cellules SKOV-3. (A) Densité d'ensemencement pour effectuer un suivi de la croissance cellulaire en bioluminescence sur 3 jours. Les régressions linéaires ont été réalisées avec le logiciel Prism pour obtenir les R². (B) Réaction enzymatique brute (contrôle) et en présence de 2 µM de doxorubicine. Lecture de la bioluminescence pour vérifier s'il y a des interférences. Expérience en triplicata. Les intensités de bioluminescence sont exprimées en unité arbitraire (UA).

Une expérience de dose-réponse de doxorubicine a été réalisée selon les paramètres mis au point en présence de concentrations croissantes de doxorubicine. Pour le suivi longitudinal sur 3 jours, les lectures ont été faites sur les mêmes puits, donc les mêmes cellules, à chaque temps d'analyse (Figure 39A). Pour valider ce test de viabilité basé sur la bioluminescence, un test de viabilité par comptage cellulaire avec du bleu trypan a été effectué en parallèle (Figure 39B).

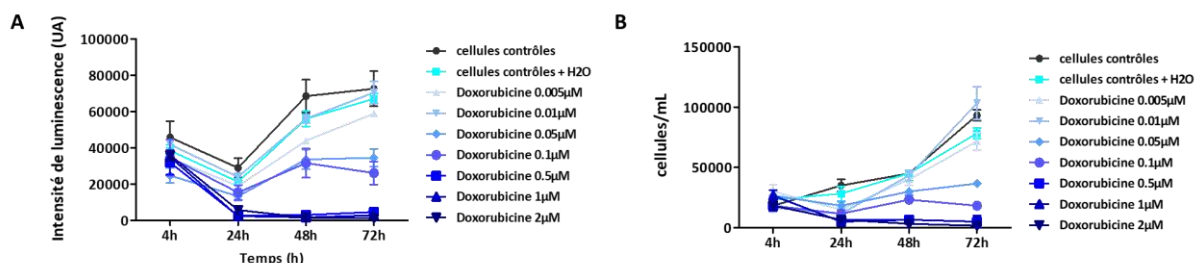


Figure 39: Validation de la méthode sur les cellules SKOV-3. (A) Les cellules SKOV-3 Luc sont ensemencées à J-1 et à 7000 cellules/cm². A J0, la doxorubicine à différentes concentrations (0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1 et 2µM) ou l'eau (solvant) est ajouté au milieu de culture. Après 4h, 24h, 48h et 72h d'incubation, 150 µg/mL de luciférine sont ajoutés au milieu de culture et l'intensité de bioluminescence est obtenue avec un lecteur de plaque. Graphes présentant les résultats obtenus en suivi longitudinal, les intensités de bioluminescence sont exprimées en unité arbitraire (UA). Expérience en triplicata. (B) Graphes présentant les résultats obtenus avec le test de viabilité réalisé par comptage cellulaire avec du bleu de trypan. Expérience en triplicata.

Les résultats obtenus démontrent que la doxorubicine a un effet cytotoxique dose dépendant sur les cellules SKOV-3 Luc, et qu'il est possible d'évaluer cet effet sur 72h. De plus, des résultats équivalents sont obtenus avec le test de viabilité réalisé par comptage cellulaire. Cette expérience, adaptée de celle mise au point sur les cellules AY-27 Luc, a conduit à la validation de la méthode.

2. Mise au point d'un modèle de carcinose péritonéale ovarienne

L'objectif de cette étude de recherche et développement de la société Urosphere était de mettre au point un modèle murin de carcinose péritonéale ovarienne à partir de lignées cellulaires dont il est possible de suivre la croissance au cours du temps avec l'imagerie non invasive de bioluminescence. Ainsi, ce modèle permettrait une évaluation de l'efficacité de candidats médicament sur la progression de la carcinose péritonéale.

Il existe de nombreuses lignées cellulaires de cancer ovarien humain disponibles, cependant leur tumorigénécité après xénogreffe chez un animal immunodéprimé est variable. En effet, cela va dépendre de plusieurs paramètres comme le nombre de cellules injectées ou encore la localisation de la xénogreffe (sous-cutanée, intrapéritonéale, etc.) [425]. L'injection intrapéritonéale de cellules SKOV-3, entre autres lignées possibles, est un modèle largement décrit dans la littérature pour le développement d'implants péritonéaux d'origine ovarienne. Pour imiter au mieux la situation clinique qui implique le détachement de cellules depuis la tumeur primaire qui vont se disséminer et conduire à de nombreuses métastases péritonéales, le nombre de cellules injectées initialement doit être bas. L'inoculation de $1-2 \cdot 10^6$ cellules SKOV-3 permet d'assurer un bon taux de prise de greffe puis un développement lent de la carcinose chez les animaux, comparé à d'autres lignées plus agressives [426]. Il est ainsi possible de suivre ce type de modèle sur plusieurs semaines pour évaluer l'efficacité d'un principe actif [427,428].

Pour les mises au point du suivi de croissance en imagerie non invasive, une première expérience a été réalisée sur 8 animaux pendant 7 semaines. Les souris ont reçu une injection intrapéritonéale de $1 \cdot 10^6$ SKOV-3 Luc GFP puis ont été suivies une fois par semaine avant d'être euthanasiées (Figure 40A). Les images obtenues en imagerie de bioluminescence (Figure 40B) ont permis d'observer la progression du signal, reflétant l'avancée de la carcinose. Le suivi quantitatif (Figure 40C) est présenté en valeurs de densités intégrées et d'intensités de bioluminescence moyennes (voir matériels et méthodes). Durant les trois semaines qui ont suivis la xénogreffe, les carcinoses ont stagné avant se développer considérablement jusqu'à la fin de l'expérience. Le suivi quantitatif de la croissance tumorale a donc été possible en imagerie non invasive de bioluminescence, avec une visualisation hebdomadaire de la progression tumorale, sur une période de 7 semaines.

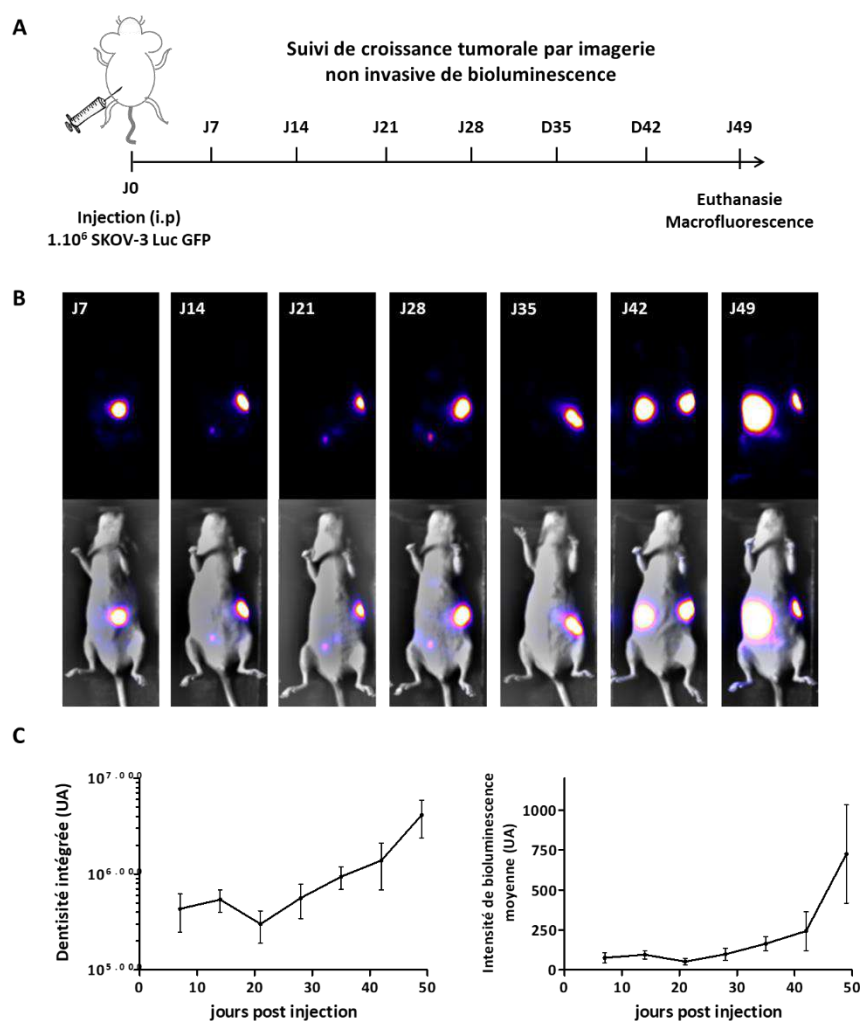


Figure 40 : Suivi de croissance tumorale en imagerie non invasive de bioluminescence. (A) Schéma du protocole **(B)** Images de bioluminescence (panel du haut), et superposition des images de lumière blanche et de bioluminescence (panel du bas). Un animal représentatif sur 7 semaines parmi les 8 souris contrôles xénogreffées. Les images ont été analysées avec le logiciel imageJ et alignées sur la même dynamique de bioluminescence pour visualiser l'évolution de la carcinose. **(C)** Quantification de la croissance tumorale par analyse d'images (voir matériels et méthodes). La croissance est exprimée en densité intégrée (graphe de gauche, UA = unité arbitraire) et intensité de bioluminescence moyenne (graphe de droite). Les graphes ont été obtenus avec le logiciel Prism et sont représentés en moyennes \pm SEM. $n=8$.

En fin d'expérience les animaux sont euthanasiés et nous avons vérifié la répartition des masses tumorales dans la cavité abdominale des animaux en macroscopie de fluorescence (expression de la GFP par les cellules SKOV-3). Tous les animaux présentaient bien des signaux GFP correspondants à des nodules de taille variable qui ont été observés sur tous les sites de développement des carcinoses, à savoir : le tractus digestif, la rate et le grand omentum, le foie et le petit omentum, le diaphragme et le rétropéritoine (Figure 41A). Une quantification de la surface des masses tumorales a été effectuée par analyse d'images (Figure 41B).

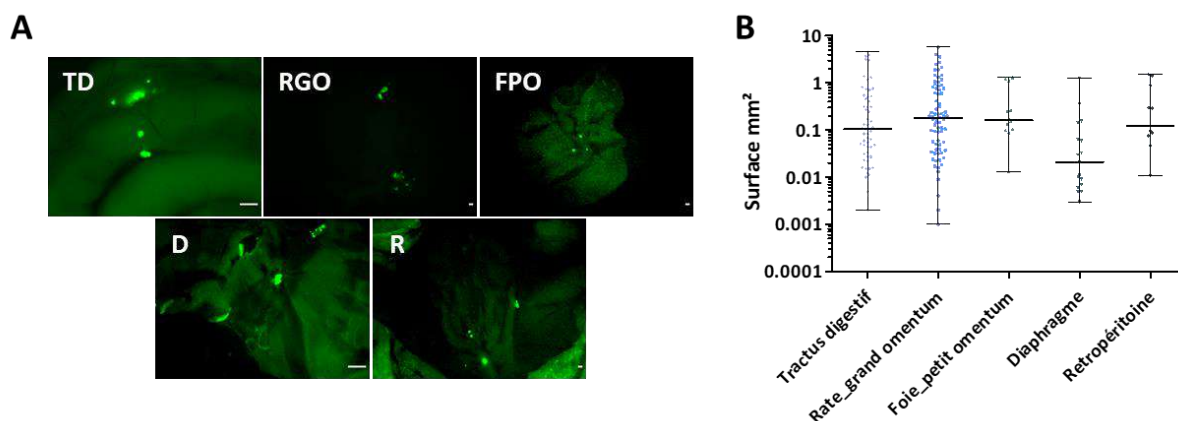


Figure 41 : Dissémination péritonéale dans un modèle murin de carcinose péritonéale ovarienne. (A) Macroscopie de fluorescence sur les masses tumorales développées sur les sites préférentiels des carcinoses péritonéales. Les images de fluorescence sont acquises avec le filtre adapté pour détecter l'expression de la GFP des cellules SKOV-3 Luc GFP. Une image représentative pour chaque site parmi les 8 souris xénogreffées. TD: Tractus Digestif; RGO: Rate et grand omentum; FPO: Foie petit omentum; D: Diaphragme; R: Rétropéritoine. Barres de tailles = 1mm. **(B)** Quantification de la taille des nodules implantés par analyse d'images. Le graphe a été obtenu avec le logiciel Prism et les surfaces en mm² sont représentées en médianes et « range », soit la répartition de toutes les données autour de la médiane. n=8.

Cette première expérience a donc permis de déterminer la faisabilité de ce type de suivi (bioluminescence) sur le modèle et de s'assurer que les masses tumorales étaient bien réparties dans le péritoine des animaux pour être le plus représentatif possible de la pathologie observée en clinique.

Par la suite, une deuxième expérience de validation du modèle a été mise en œuvre en utilisant un traitement de référence en clinique, la doxorubicine. L'objectif était de déterminer s'il est possible d'évaluer l'efficacité d'un traitement sur la carcinose péritonéale ovarienne en imagerie non invasive de bioluminescence et *ex vivo* en macroscopie de fluorescence. Une fois que l'intensité de bioluminescence des masses tumorales a commencé à augmenter (J28), les souris xénogreffées ont été divisées en 2 groupes, un groupe d'animaux contrôles ayant reçu le solvant de la doxorubicine (eau) et un groupe ayant reçu le traitement intrapéritonéal (10 animaux/groupe). La doxorubicine a été administrée à 10 mg/kg à J27 et J34 après la xénogreffe des cellules SKOV-3 Luc GFP (Figure 42A). Le suivi quantitatif a permis d'observer une diminution de l'intensité de bioluminescence pour le groupe d'animaux ayant reçu la doxorubicine en comparaison du groupe contrôle (Figure 42B).

Cependant, à ces doses le traitement a engendré des pertes de poids conséquentes chez les animaux (Figure 42C), ce qui a conduit à l'euthanasie de 4 animaux par atteinte de points limites (perte de plus de 20% du poids initial) sur les 10 qui composaient le groupe traité.

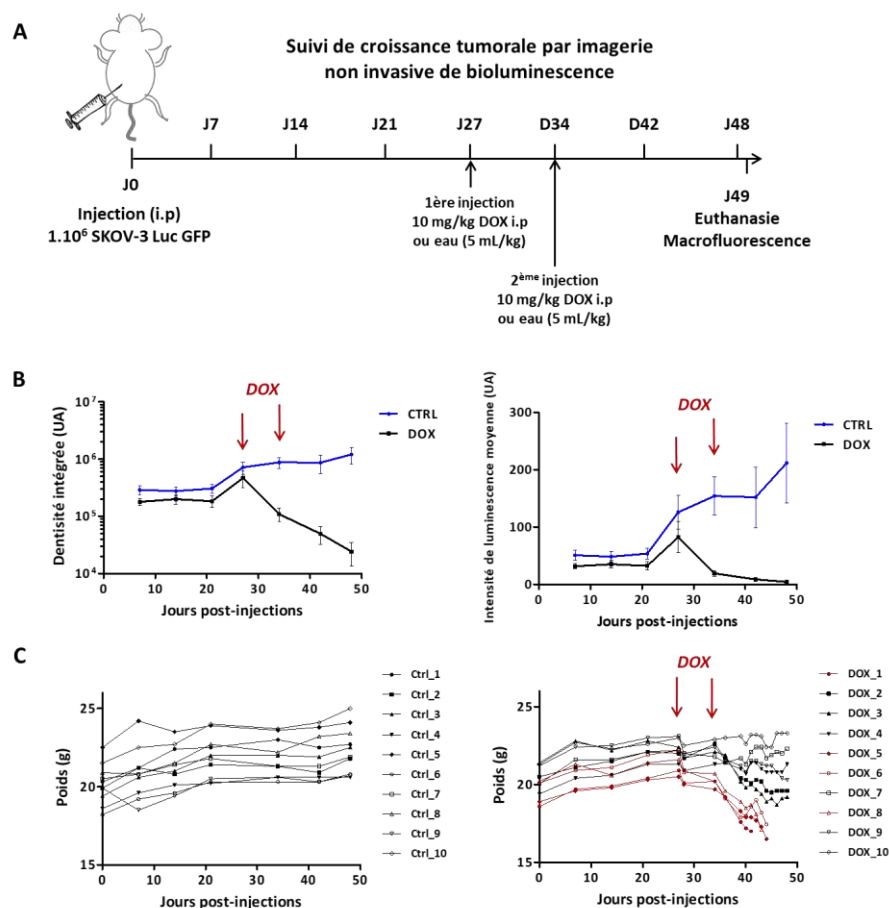


Figure 42 : Validation du modèle de carcinose péritonéale ovarienne (1). (A) Schéma du protocole (B) Quantification de la croissance tumorale par analyse d'images de bioluminescence (voir matériels et méthodes). Quatre semaines après les xénogreffes, les animaux sont séparés en 2 groupes en faisant une randomisation en fonction des intensités de bioluminescence. Groupe contrôle (CTRL) $n=10$; groupe traité (DOX) $n=10$. La croissance est exprimée en densité intégrée (graphe de gauche, UA = unité arbitraire) et intensité de bioluminescence moyenne (graphe de droite). (C) Courbes de poids : groupe contrôle (graphe de gauche) ; groupe traité (graphe de droite), les 4 animaux représentés en rouge ont perdu plus de 20% de leur poids initial (point limite) et ont été sacrifiés avant la fin de l'expérience. Les graphes ont été obtenus avec le logiciel Prism et sont représentés en moyennes \pm SEM. Les flèches rouges indiquent les jours de traitement i.p (intrapéritonéale) de doxorubicine à 10mg/kg ou son solvant à 5mL/kg pour les animaux du groupe contrôle.

La doxorubicine est connue pour sa cardiotoxicité, ce qui peut expliquer les effets observés. Cette toxicité n'étant pas acceptable, une autre expérience a été effectuée en diminuant les doses du traitement. Dans cette 3^{ème} expérience, lorsque l'intensité de bioluminescence des masses tumorales a commencé à augmenter (toujours à J28), les animaux sont séparés en 2 groupes. Le groupe traité a reçu 5 mg/kg de doxorubicine en i.p et les animaux du groupe contrôle ont été injectés avec le solvant de la doxorubicine (eau) à 5 mL/kg (Figure 43A). Deux semaines après ce premier traitement, l'imagerie de bioluminescence va permettre de déterminer s'il y a eu ou non une reprise de la carcinose dans le groupe d'animaux traités. Le suivi quantitatif a montré une reprise de la croissance des tumeurs à J43 (Figure 43B), ainsi les animaux du groupe traité ont reçu une 2^{ème} injection de doxorubicine (2,5 mg/kg, i.p) et les animaux du groupe contrôle ont reçu de l'eau à 5 mL/kg. La dernière série d'imagerie

non invasive réalisée à J48 indiquait une progression de la carcinose dans le groupe contrôle, et pas de reprise de croissance dans le groupe traité (Figure 43B). De plus, il est important de souligner qu'en comparaison de l'expérience précédente, la doxorubicine à ces nouvelles doses n'a pas posé de problème de toxicité (perte de poids) chez les animaux (Figure 43C).

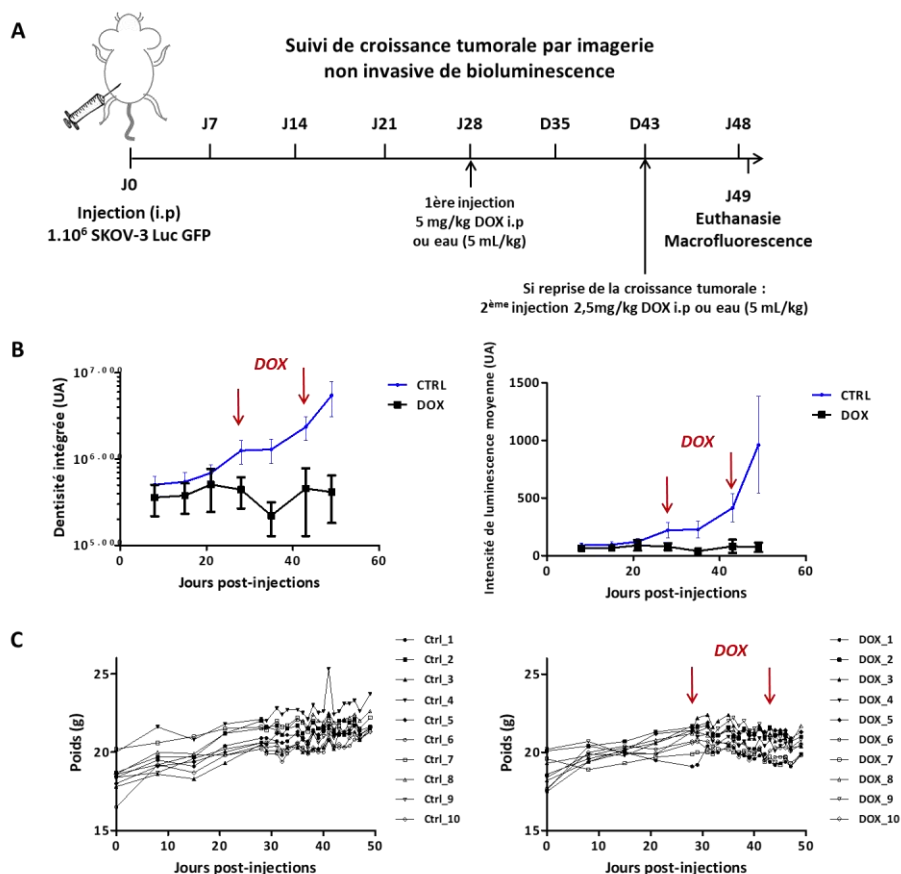
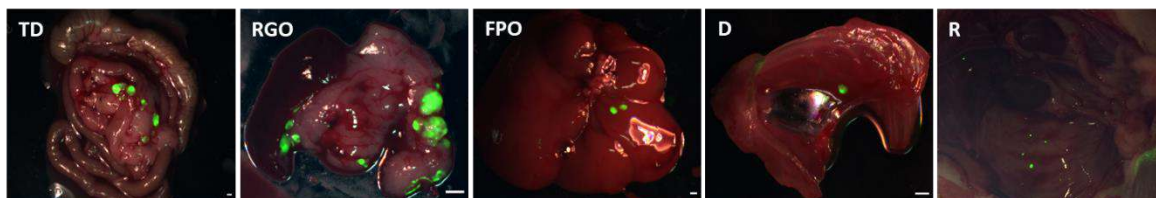


Figure 43 : Validation du modèle de carcinose péritonéale ovarienne (2). (A) Schéma du protocole. (B) Quantification de la croissance tumorale par analyse d'images de bioluminescence. Quatre semaines après les xénogreffes, les animaux sont séparés en deux groupes en faisant une randomisation en fonction des intensités de bioluminescence. Groupe contrôle (CTRL) $n=10$; groupe traité (DOX) $n=10$. La croissance est exprimée en densité intégrée (graphe de gauche, UA = unité arbitraire) et intensité de bioluminescence moyenne (graphe de droite). (C) Courbes de poids : groupe contrôle (graphe de gauche) ; groupe traité (graphe de droite). Les graphes ont été obtenus avec le logiciel Prism et sont représentés en moyennes \pm SEM. Les flèches rouges indiquent les jours de traitement i.p (intrapéritonéale) de doxorubicine à 5 (J28) puis 2,5 mg/kg (J43) ou son solvant à 5mL/kg pour les animaux du groupe contrôle.

Pour pouvoir évaluer l'efficacité du traitement en point final avec la macroscopie de fluorescence, un index péritonéal a été mis en place. Cet index se base sur le même principe que celui réalisé en clinique pour évaluer l'étendue d'une carcinose durant une chirurgie. Il consiste à faire faire des acquisitions d'images *ex vivo* de groupes d'organes définis (Figure 44A), qui seront ensuite analysées en considérant le nombre et la taille des nodules recensés pour lesquels des scores ont été attribués (voir matériels et méthodes) (Figure 44B). Dans cette expérience, l'index péritonéal (graphe de gauche) a mis en évidence que pour chaque groupe d'organes, il y a une diminution de la valeur de l'index entre le groupe contrôle et le groupe traité avec la doxorubicine. Un index péritonéal global a également été

calculé, celui-ci prenait en compte les scores attribués à l'ensemble des nodules détectés dans la cavité abdominale des animaux contrôles et traités (graphe de droite), indépendamment de l'organe sur lequel ils se trouvaient. Cet index global a démontré qu'il y a une différence significative concernant l'étendue de la carcinose entre les 2 groupes d'animaux.

A



B

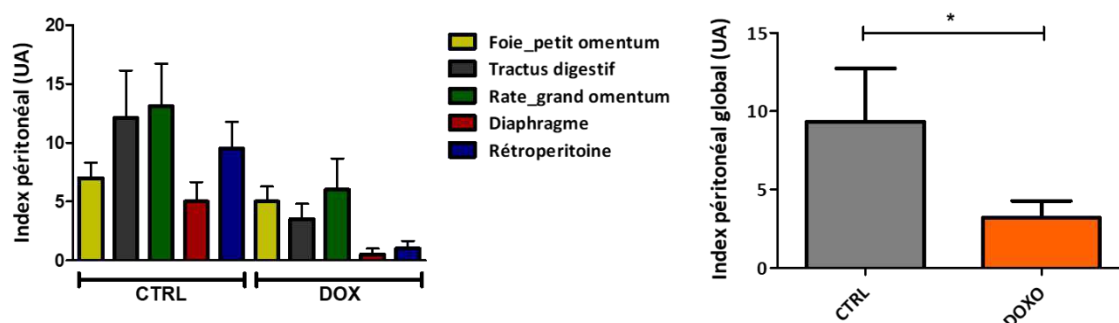


Figure 44 : Validation du modèle de carcinose péritonéale ovarienne (3). (A) Macroscopie de fluorescence des masses tumorales développées sur les sites préférentiels des carcinoses péritonéale. Les images de fluorescence sont acquises avec le filtre adapté pour détecter l'expression de la GFP des cellules SKOV-3 Luc GFP, puis l'image monochrome de fluorescence et l'image couleur de lumière blanche sont superposées. Une image représentative pour chaque site parmi les 10 souris contrôles xénotransplantées. TD : Tractus Digestif ; RGO : Rate et grand omentum ; FPO : Foie petit omentum ; D : Diaphragme ; R : Rétropéritoine. Barres de tailles = 1mm. (B) Index péritonéaux des groupes d'animaux contrôles et traités sur chaque groupe d'organe (graphe de gauche) et global (graphe de droite), UA = unité arbitraire. Analyse statistique : t-test * $p < 0.05$.

En réalisant cette analyse en point final sur le groupe d'animaux contrôles en comparaison du groupe d'animaux traités, l'efficacité d'un traitement sur ce modèle est évaluée de 2 manières, au cours du temps *in vivo* par bioluminescence et en fin d'expérience *ex vivo* par imagerie de fluorescence.

Le modèle murin de carcinose péritonéale ovarienne développé à partir de la lignée cellulaire SKOV-3, présenté et validé dans cette partie, peut être utilisé pour l'évaluation de l'efficacité thérapeutique d'un candidat médicament sur cette pathologie. Ce modèle n'a pas été utilisé dans les expériences présentées dans les parties suivantes de ce manuscrit. En effet, chronologiquement nous nous sommes d'abord concentré sur un modèle, développé à partir de la lignée cellulaire IGROV-1. Cependant, et malgré de nombreux essais, le suivi quantitatif de la croissance tumorale en imagerie non invasive de bioluminescence n'était pas réalisable avec ce modèle. La société Urosphere souhaitant proposer un modèle permettant d'évaluer un candidat médicament au cours du temps (imagerie non invasive) et en point final (macroscopie de fluorescence), nous avons donc développé ce second modèle, à partir des cellules SKOV-3. Celui-ci pourrait également être utilisé dans les développements *in vivo* de délivrance ciblée de molécules thérapeutiques confinées dans la lectine.

Partie II : Caractérisation biochimique de la protéine XCL, création de mutants et preuve de concept du confinement et de la délivrance ciblée de molécules thérapeutiques *in vitro*

1. Résumé de l'article, *Nanoscale* 2019

Pour rappel, les données établies à priori de ce travail, et présentées dans la partie I de l'introduction de ce manuscrit, sont le mécanisme d'internalisation cellulaire de la protéine XCL, la reconnaissance d'un motif glycosidique (l'antigène TF, marqueur des carcinomes) et la structure tridimensionnelle. Cette lectine est donc un homotétramère présentant une cavité au centre de sa structure et 4 sites de reconnaissance de l'antigène TF. Lorsque ce marqueur est reconnu par XCL à la surface d'une cellule épithéliale tumorale, la protéine est internalisée par une endocytose clathrine dépendante.

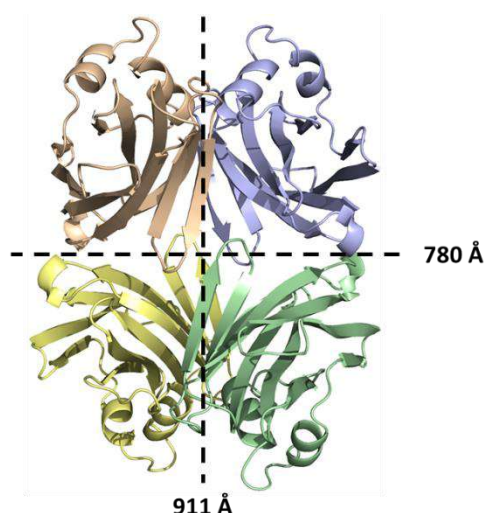
L'objectif du travail présenté dans l'article publié dans le journal *Nanoscale* était d'amener la preuve de concept du développement d'un mutant d'XCL comme nanocontainer pour la vectorisation ciblée de molécules thérapeutiques dans des adénocarcinomes, compte-tenu de la spécificité de cette protéine pour l'antigène TF.

Pour commencer, des expériences de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) ont permis de déterminer que la protéine XCL réalise des échanges permanents entre ses protomères induisant une ouverture spontanée du tétramère et donc l'accès à la cavité. Cependant, l'objectif étant d'utiliser cette protéine en tant que nanocontainer, il était nécessaire de pouvoir contrôler la dynamique d'ouverture du tétramère. Pour cela, des mutants ont été réalisés pour introduire des liaisons covalentes entre les monomères. La stratégie globale a consisté à substituer des résidus par des cystéines pour établir des ponts disulfures dont l'état d'oxydo-réduction est contrôlable. Il fallait en outre qu'il ne reste aucune cystéine libre à la surface de la protéine pour éviter une probable réactivité inter-tétramères. La symétrie de la structure 3D permettait d'envisager la substitution d'un seul résidu par monomère pour générer deux ponts disulfures. En effet, deux résidus dans la structure tétramérique, T12 et A38, sont en vis à vis de leur homologue sur deux monomères et à des distances compatibles pour établir une liaison cystine (Figure 2, *Nanoscale*). Le mutant T12C sécurise la plus petite interface du tétramère. Le mutant A38C crée un double pontage transversal permettant de bloquer l'ensemble du tétramère et de réduire au niveau de la cavité le mouvement des boucles la délimitant, ce qui devait restreindre une éventuelle fuite de molécules confinées dans le tétramère. Expérimentalement, la formation effective des ponts est spontanée (aucun agent oxydant nécessaire) et s'effectue lors de la purification de la protéine. Des expériences de DSF (Differential Scanning Fluorimetry) montrent que les deux simples mutants, sous forme oxydée, présentent une

augmentation de leur stabilité thermique (+5°C) et que le double mutant (A38C-T12C) cumule cette augmentation (+10°C) par rapport à la protéine XCL sauvage (T_m : 68°C). Cependant, il fallait s'assurer qu'il était possible de réduire ces ponts disulfures, c'est-à-dire de retrouver le comportement thermodynamique d'XCL. Seul le mutant A38C, réduit en présence de DTT, donne le même T_m qu'XCL en DSF, impliquant la possibilité d'une ouverture spontanée du tétramère et donc la libération d'une molécule confinée dans un environnement réducteur. Les expériences de FRET réalisées sur A38C oxydé ont démontré l'absence d'ouverture spontanée du tétramère. Ce résultat constituait l'objectif de l'ingénierie protéique mise en œuvre et nous a conduit à sélectionner le variant A38C pour le développement du nanocontainer. D'une manière générale, il faut également noter la très forte stabilité thermique de cet objet même sous sa forme sauvage.

Différentes expériences ont été réalisées pour estimer une constante de dissociation apparente du tétramère. La protéine sauvage a été utilisée ici pour s'affranchir d'une éventuelle oxydation d'A38C au cours des expériences. Ainsi, que ce soit en FRET, en chromatographie d'exclusion ou en ITC, des échanges entre la forme tétramérique et dimérique de la protéine ont été observés, avec des constantes de dissociation apparente de l'ordre du micro molaire. Par ailleurs, à pH acide, XCL passe sous forme dimérique alors qu'A38C reste sous forme tétramérique. Sachant que les lysosomes, dans lesquels est adressé le nanocontainer après endocytose, ont un pH acide et un environnement réducteur, l'ouverture d'A38C dans ces vésicules sera obtenue après réduction des ponts disulfures sécurisant la cavité et déstabilisation de la structure tétramérique par le pH acide pour permettre la libération d'une molécule confinée.

Les surfaces d'interaction entre les interfaces du tétramère, ne sont pas équivalentes ; 780 Å pour l'une



et 911 Å pour l'autre (Figure 45). Ainsi, pour déterminer les paramètres d'oligomérisation d'XCL, des expériences de FRET ont démontré que la protéine suit deux voies de dissociation puisque deux vitesses ont été obtenues : l'une des interfaces entre les dimères semble se dissocier 3,5 fois plus vite que la deuxième. Pour résoudre le mécanisme d'ouverture du tétramère, le comportement du mutant T12C oxydé a été comparé à celui de la protéine sauvage et d'A38C oxydé à pH acide (4,5). Les résultats montrent que le T_m de T12C est équivalent à celui d'A38C en DSF, impliquant l'absence de formation de dimères pour T12C dans ces conditions puisque nous savons qu'A38C reste sous forme tétramérique à pH acide. Ainsi, sachant que T12C sécurise l'interface la plus petite (780 Å)

Figure 45 : Les deux surfaces d'interaction des interfaces du tétramère

et n'ayant pas détecté de forme dimérique, cette interface est probablement celle qui cède en premier au moment de l'ouverture du tétramère (Figure 5B et 5D, Nanoscale). Ces données nous ont permis de déterminer sur quel dimère les analyses *in silico* pouvaient être réalisées.

Pour établir s'il existe des affinités entre une molécule thérapeutique et les chaînes latérales d'acides animés tapissant la cavité d'A38C, des expériences *in silico* de docking et dynamique moléculaire (MD) ont été réalisées sur le dimère A/B de la protéine. Concernant la doxorubicine, molécule largement utilisée en clinique mais connue pour sa cardiotoxicité, les énergies d'interaction obtenues à l'intérieur de la cavité et à l'extérieur du nanocontainer démontrent une affinité 5 fois plus forte pour les chaînes latérales d'acides aminés dans la cavité. Ces données suggèrent que le confinement de cette molécule est tout à fait envisageable expérimentalement. Par ailleurs, ce confinement pourrait participer à la stabilisation du nanocontainer sous forme tétramérique puisque les interactions entre la doxorubicine et les acides aminés à l'intérieur de la cavité impliquent trois des quatre monomères de la protéine. Le docking et la DM de nombreuses autres molécules thérapeutiques ont été réalisés dans le cadre du projet de maturation financé par la SATT-TTT. Ces données seront présentées et discutées dans le deuxième paragraphe de cette partie des résultats.

Le processus permettant le confinement d'une molécule dans la cavité du nanocontainer (A38C) est schématisé dans la Figure 46.

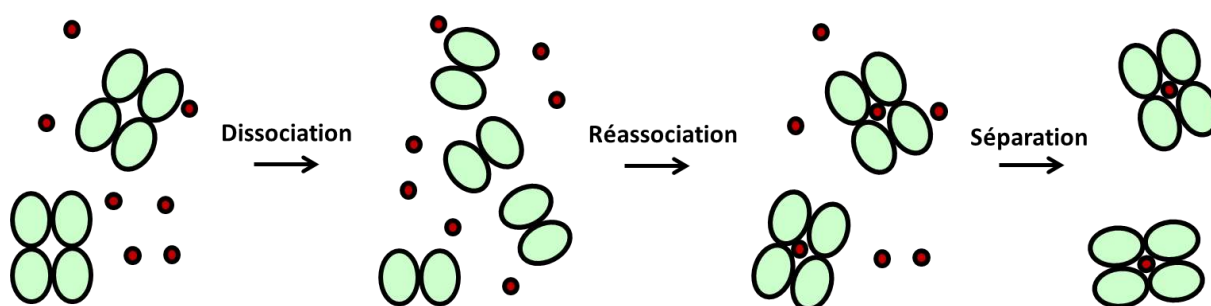


Figure 46 : *Processus de confinement d'une molécule (rond rouge) dans la cavité du nanocontainer protéique (homotétramère A38C, vert). La **dissociation** correspond aux échanges permanents entre dimères impliquant une ouverture spontanée du tétramère et donc l'accès à la cavité, après réduction des ponts disulfures d'A38C par le DTT. La deuxième étape représente le retour à la forme tétramérique par **réassociation** de deux formes dimériques de la protéine. Une fois les ponts disulfures d'A38C reconstitués (oxydation spontanée), la cavité est sécurisée empêchant la fuite de la molécule et les échanges entre dimères et tétramères ne sont plus possibles. La séparation correspond à la chromatographie d'exclusion réalisée à la fin de l'incubation d'A38C avec la molécule pour éliminer les molécules libres non confinées.*

Le chargement d'une molécule de doxorubicine par molécule de tétramère (A38C) est estimé par spectrophotométrie, à 490 nm pour la doxorubicine et 280 nm pour A38C, après purification du mélange par chromatographie d'exclusion pour éliminer les molécules de doxorubicine libres. 53% des tétramères d'A38C sont chargés en doxorubicine. En conditions oxydantes, assurant le maintien des ponts disulfures d'A38C, et malgré le pouvoir réducteur intrinsèque de la doxorubicine, le chargement n'est plus que de 14% ce qui peut correspondre au taux de fixation de la molécule à l'extérieur du tétramère.

L'incubation du nanocontainer chargé en doxorubicine (0,8 μ M, 53% de chargement) avec des adénocarcinomes ovariens humains (cellules OVCAR-3), en présence de 32 nM de nanocontainer vide marqué dans le NIR (alexa647), a prouvé que la localisation intracellulaire de la doxorubicine est conditionnée par l'endocytose du nanocontainer. En effet, une colocalisation des signaux fluorescents de la doxorubicine confinée et d'A38C-alexa647 dans des vésicules périnucléaires a été observée en microscopie confocale. Par contre, pour des cellules OVCAR-3 incubées avec une quantité équivalente de doxorubicine libre non confinée, le signal fluorescent de la molécule est retrouvé dans le noyau.

Des expériences de dose-réponse du nanocontainer chargé en doxorubicine sur les cellules OVCAR-3 ont permis d'obtenir l' EC_{50} de la molécule confinée et adressée par le nanocontainer (979 nM) en déterminant la viabilité cellulaire. Par ailleurs, des analyses en cytométrie de flux (FACS) montrent qu'il n'y a pas de modification au niveau du cycle cellulaire lorsque les cellules sont incubées avec le nanocontainer vide (3,2 μ M). En revanche, en présence de nanocontainer chargé en doxorubicine (3,2 μ M, 53% de chargement) les 10% de cellules viables restantes en fin d'expérience sont majoritairement en phase G2.

L'effet cytotoxique observé ici est dû au relargage de la doxorubicine par le nanocontainer. En effet, l'état de protonation de la doxorubicine à pH acide va lui permettre de passer la membrane lysosomale pour se retrouver dans le cytoplasme des cellules ciblées avant d'accéder au noyau lors de la division cellulaire. L'accumulation des cellules en phase G2 du cycle reflète le blocage de la réplication (inhibition de la topoisomérase II) induit par la doxorubicine et donc l'inhibition de la division cellulaire qui conduit à la mort des cellules.

L'article ci-après regroupant et détaillant tous ces résultats a été publié dans le journal *Nanoscale* en janvier 2019.



Cite this: *Nanoscale*, 2019, **11**, 3248

A protein nanocontainer targeting epithelial cancers: rational engineering, biochemical characterization, drug loading and cell delivery†

Caroline Ladurantie,[‡] Mathilde Coustets,^{§‡} Georges Czaplicki, Pascal Demange,^{ID} Serge Mazères,^{ID} Stéphanie Dauvillier, Justin Teissié,^{ID} Marie-Pierre Rols,^{ID} Alain Milon,^{ID} Vincent Ecochard, Grégori Gross[¶] and Laurent Paquereau^{ID} *

The development of drug delivery and imaging tools is a major challenge in human health, in particular in cancer pathologies. This work describes the optimization of a protein nanocontainer, belonging to the lectin protein family, for its use in epithelial cancer diagnosis and treatment. Indeed, it specifically targets a glycosidic marker, the T antigen, which is known to be characteristic of epithelial cancers. Its quaternary structure reveals a large hydrated inner cavity able to transport small therapeutic molecules. Optimization of the nanocontainer by site directed mutagenesis allowed controlling loading and release of confined drugs. Doxorubicin confinement was followed, both theoretically and experimentally, and provided a proof of concept for the use of this nanocontainer as a vectorization system. In OVCAR-3 cells, a human ovarian adenocarcinoma cell line that expresses the T antigen, the drug was observed to be delivered inside late endosomes/lysosomes. These results show that this new type of vectorization and imaging device opens new exciting perspectives in nano-theranostic approaches.

Received 19th December 2018,

Accepted 17th January 2019

DOI: 10.1039/c8nr10249j

rsc.li/nanoscale

1 Introduction

Drug delivery systems have been extensively studied over the last few decades to limit the side effects of chemotherapeutic treatments, in particular in cancer pathologies. Different types of molecules of either synthetic or natural origin were used as drug-carrier platforms. Among these macromolecular assemblies, protein-based platforms display characteristics that make them very good candidates for nanomedicine applications.¹ Indeed, they can show good biocompatibility and biodegradability coupled with low toxicity. A variety of proteins have been used as drug delivery systems. They constitute macromolecular assemblies of different types including virus-like particle-based nanocages^{2,3} from plant viruses^{4,5} or bacteriophages MS2⁶ and Q β ⁷ and natural structure-based nanocages such as ferritin/apoferritin,^{8–10} small heat shock

proteins,^{11–13} vault proteins^{14–16} and a number of other cage structures.^{17,18} These protein cargos display geometries as diverse as microspheres, nanoparticles, minirods, hydrogels, films and protein cages.¹⁷ Drug loading in these protein-based nanocages is realized through non-covalent or covalent attachments. For the non-covalent association, drugs are generally packaged inside an internal cavity through the affinity of the cage for molecules. The encapsulation of drugs is enabled by a disassembly/reassembly phenomenon triggered by an environmental change such variations of salt concentration, pH, temperature or osmotic shock. For example, ferritin/apoferritin cages are separated into subunits at acidic pH, allowing the dissociation of the nanocage, which can be reversibly reassembled by increasing the pH.^{19,20} The covalent attachment of drugs can be realized on specific amino acid side chains localized into the interior cavity or onto the surface of the protein nanocage. Obviously, the attachment of a drug onto the external surface may completely eliminate the protective effect of the nanocage and thus the control of drug release.²¹

The efficacy of drug delivery requires targeting specific cells such as tumour cells and thus functionalizing protein-based nanocages accordingly. This functionalization can be carried out either genetically or chemically. The protein nature of these assemblies greatly facilitates genetic modifications. For instance, an addressing peptide such as the RGD peptide can

Institut de Pharmacologie et Biologie Structurale, IPBS, Université de Toulouse, CNRS, UPS, 205 Route de Narbonne, BP64182, 31077 Toulouse, France.
E-mail: Laurent.Paquereau@ipbs.fr

†Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c8nr10249j

‡These authors contributed equally to the work.

§Present address: Urosphere, Parc technologique du canal, Canal Biotech II, 3 rue des satellites 31400 Toulouse, France.

¶Present address: GTP Technology, Bâtiment Gould – 52 l'Occitane, 31670 Labège Cedex-France.

easily be recombinantly fused to the nanocage subunits to target integrin receptors and enhance transport to tumoral cells.^{22,23} Chemical functionalization consists of grafting, in different ways, a specific moiety allowing cellular addressing. It can be a small ligand like folic acid which has been widely used to target cancer cells,^{24,25} aptamers,²⁶ cell-penetrating peptides^{27,28} and affibodies.²⁹ This targeting requires identifying a relevant membrane surface marker of the pathology. This marker allows both the detection and delivery of therapeutic molecules to tumour cells, the so-called theranostic approach. The majority of these markers are membrane proteins whose expression rate is up-regulated in cancer pathologies. Among these, the mucin protein family serves both as membrane and circulating markers in adenocarcinomas. For example, MUC1 and MUC16 are the classic markers of breast and ovarian carcinoma and their circulating forms, CA15.3 and CA125 respectively, are used as blood markers.^{30–33} In healthy epithelial tissues, mucins are highly *O*-glycosylated proteins. In contrast, carcinoma cells express truncated immature *O*-glycans through different mechanisms leading to incomplete *O*-glycosylations.³⁴ These immature *O*-glycans are represented by the disaccharide Thomsen-Friedenreich antigen (T antigen: Gal β 1–3GalNAc α 1-O-Ser/Thr) or its direct precursor (Tn: GalNAc α 1-O-Ser/Thr).^{35,36} Therefore, carcinoma cells can be targeted by specific recognition of these modified immature *O*-glycans. This specific recognition can be achieved with a well-known class of carbohydrate-binding proteins, the lectins.^{37,38}

We isolated from a higher edible mushroom, *Xerocomus chrysenteron*, a protein belonging to the lectin family, which presents the characteristics of a potential drug delivery system. Indeed, this *Xerocomus chrysenteron* lectin (XCL) belongs to a group of proteins that selectively recognizes the T antigen.³⁹ The binding of XCL to the T antigen expressed by membrane proteins was determined by ITC experiments and presented a high affinity with dissociation constants of 1.6 μ M and 0.38 μ M for fetuin and asialofetuin, respectively.⁴⁰ After its binding on cell surface markers, XCL was quickly endocytosed by a clathrin-dependent mechanism to end up in late endosomes/lysosomes. This cellular binding was totally blocked in the presence of a competitive sugar highlighting the need for T antigen binding to achieve cellular uptake of the protein.⁴¹ The resolution of its 3D structure revealed that the tetrameric assembly of the XCL protein displays a complex network of protomer–protomer interfaces and generated a large, hydrated inner cavity of 1 nm³, which may become accessible to solutes after conformational changes of the protein.⁴² These intrinsic properties led us to investigate XCL as a new protein nanocontainer device for specific delivery of drugs. We deciphered and described the opening mechanism of the XCL homotetramer allowing access to its inner cavity. Several mutants were generated to control this reversible opening and their biochemical properties were studied. Finally, *in silico* experiments of docking and molecular dynamics gave guidelines to explore experimentally the loading of doxorubicin and its specific delivery to human adenocarcinoma cells.

2 Experimental

2.1 Protein preparation

All site-directed mutagenesis were made using the Quickchange mutagenesis kit (Stratagen). Recombinant proteins (XCL and its mutants, T12C, A38C and T12C/A38C) were produced and purified as previously described.³⁹ An additional purification step was achieved by size exclusion chromatography using a Sephacryl S300 column 600 mm \times 26 mm, equilibrated with buffer A (50 mM phosphate, 100 mM NaCl) pH 7.2 and run at a 1.5 mL per minute flowrate. The purified proteins were finally dialyzed against buffer A and concentrated on a VIVASPIN 15R column (Sartorius, 10 000 MWCO).

2.2 Labelling of protein

For labelling with FITC and RITC, XCL or A38C (30 μ M) were incubated at 25 °C in the dark for 1 h with continuous stirring in buffer A (pH 9) with either 1 mM FITC (Sigma) or 1 mM RITC (Sigma) solubilized in the same buffer. The reaction was stopped by the addition of 10 mM Tris-HCl (pH 9). The labeled protein samples were passed through a Sephadex G-25 column (Sigma) previously equilibrated with buffer A (pH 8.5). The stoichiometry of labeling was determined spectrophotometrically at pH 8.5. The protein-bound dye concentrations were calculated using the following extinction coefficients: $\epsilon_{494\text{ nm}} = 77\,000\text{ cm}^{-1}\text{ M}^{-1}$ for FITC and $\epsilon_{560\text{ nm}} = 85\,000\text{ cm}^{-1}\text{ M}^{-1}$ for RITC. Protein concentrations after labeling were calculated using $\epsilon_{280\text{ nm}} = 120\,000\text{ cm}^{-1}\text{ M}^{-1}$ with a previous correction from the absorption of the probes at this wavelength. The labelling stoichiometry was 4 moles of FITC and 0.9 moles of RITC per mole of tetramer protein, respectively.

For labelling with Alexa-647, A38C (30 μ M) was incubated overnight at room temperature in the dark with continuous stirring in a medium composed of 100 mM sodium bicarbonate (pH 8.5) and the reactive dye at a concentration of 80 μ M. The labeled protein samples were purified through a Bio-Gel P30 Gel (Biorad) previously equilibrated with buffer A (pH 8.5). The yield of labeling was determined by spectrophotometry. The protein-bound dye ratio was calculated using the following extinction coefficient for Alexa Fluor 647: $\epsilon_{650\text{ nm}} = 239\,000\text{ cm}^{-1}\text{ M}^{-1}$ (Molecular Probes handbook). The typical labeling ratio was 1–2 moles of Alexa-647 dye per mole of the nanocontainer.

2.3 FRET experiments

2.3.1 Equilibrium experiment. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) was used to highlight the exchange between XCL monomers. The exchange reaction was initiated by mixing an equal volume of 1 μ M XCL-RITC (or buffer alone as a reference) and 1 μ M XCL-FITC at 25 °C in buffer A pH 8.5. After one-hour incubation, the emission spectrum of the donor and acceptor (500–650 nm) was recorded upon excitation of the donor at 468 nm using a Photon Technology International QM-4 spectrofluorometer. The same experimental conditions were used with A38C-RITC and A38C-FITC.

2.3.2 Kinetic experiment. Fluorescence resonance energy transfer was used to determine the rate of XCL subunit exchange. The reaction was initiated by mixing an equal volume of 1 μM XCL-RITC and 1 μM XCL-FITC at 25 $^{\circ}\text{C}$ in buffer A pH 8.5. The excitation wavelength was set to 468 nm. Rhodamine fluorescence emission at 580 nm was recorded every 0.5 seconds. Fluorescence intensity was normalized using the following equation:

$$F_{\text{norm}}(t) = \frac{F(t) - F_0}{F_{\infty} - F_0}$$

where $F(t)$ is the 580 nm raw fluorescence value considered, F_0 is the initial fluorescence value, and F_{∞} the final fluorescence intensity value when steady-state is reached. Kinetic data were fit using GOSA software.⁴³ The data were best fit with a double exponential rise *i.e.* two dissociation steps, using the following equation:

$$F = 1 - [a \times e^{-k_1 t} + (1 - a) \times e^{-k_2 t}]$$

where a is the proportion of the molecule following the slower dissociation; k_1 is the kinetic constant of the slower dissociation; k_2 is the kinetic constant of the faster dissociation.

2.4 Size exclusion chromatography, SEC

SEC experiments were performed on a GE-healthcare Superose 12 PC 3.2/30 column. Buffer A (pH 7.2 or indicated pH) was used as the elution buffer on a column equilibrated with the same buffer. The flow rate was set at 0.5 mL min^{-1} . Bovine serum albumin and Ribonuclease A were used to calibrate the column with elution volumes of 12.6 mL and 15.5 mL, respectively.

2.5 Isothermal titration calorimetry, ITC

ITC was performed using a VP-ITC microcalorimeter from Microcal Inc. (Northampton, MA). XCL was prepared in buffer A and dialysis against the same buffer was realised overnight. This dialysis buffer was then used in ITC measurements to limit dilution effects. Calorimetric dilution experiments were done following instrumental procedures at 25 $^{\circ}\text{C}$ with a stirring speed of 300 rpm and a 296 μL computer-controlled injection microsyringe. After an initial delay of 500 min, small volumes (5 μL) of concentrated XCL (40 μM) were injected at an interval of 1200 seconds, into the sample cell (1.437 mL) containing dialysis buffer solution. The experimental data were fit to a theoretical dissociation curve using software supplied by Microcal (Origin), in terms of a simple tetramer-dimer equilibrium model to give an apparent equilibrium constant (K_{diss}) and an enthalpy of dissociation (ΔH_{diss} per mole of the dimer).

$$T \rightleftharpoons 2D; K_{\text{diss}} = \frac{[D]^2}{[T]}$$

2.6 Differential scanning fluorimetry, DSF

DSF experiments were performed in a white/clear 96-well PCR plate (Bio-Rad) with 10 μM of protein in buffer A (pH 7.2 or at

the indicated pH) and 5 \times SYPRO Orange (Invitrogen) as the dye. PCR plates were sealed with optical quality sealing tape (Bio-Rad). Fluorescence intensity was measured (CFX Connect™ Real-Time PCR detection System, Bio-Rad) with the 480/500 excitation and 560/580 emission filters for each temperature increment (from 20 $^{\circ}\text{C}$ to 95 $^{\circ}\text{C}$ with 0.3 $^{\circ}\text{C}$ step). Analysis was realized with CFX Manager software (BioRad) and the melting temperature was determined by plotting $-d(\text{RFU})/dT$ vs. T , where RFU is the relative fluorescence intensity and T , the temperature.

2.7 Docking and molecular dynamic simulations

Docking was done using the AutoDock Vina program.⁴⁴ Input files were prepared with MGLTools v1.5.6 software.⁴⁵ The docking program was run on a cluster with 200 CPUs, each of which generated 20 poses, thus creating a pool of 4000 poses. The pose with the best score was selected for subsequent molecular dynamics simulations. For this purpose, we have used the Amber 14 software suite.⁴⁶ The topology for the ligand was based on the GAFF force field, for the protein on the ff03 force field. The system was initially minimized, then equilibrated at 300 K and finally a production run of 20 ns was launched in order to verify the stability of the complex. The trajectory was analyzed by in-house software to determine persistent intermolecular contacts. The energy of intermolecular interactions was determined by the MMPBSA.py script.⁴⁷

2.8 Loading of molecules

Doxorubicin (Sigma) (500 μM) was incubated protected from light at room temperature for 24 h, with A38C (50 μM) equilibrated in buffer A (pH 7.2) in a final volume of 1.5 mL. For loading in the reduced form of A38C, 1 mM of DTT was added to the mixture. For loading in the oxidized form 10 mM of GSSG was added to the mixture. Free doxorubicin and DTT were simultaneously removed with two successive gel filtrations on PD miditrap (Dutcher) and pd10 columns G25 (Sigma) equilibrated with buffer A pH 7.2. The purification efficiency was verified beforehand by loading the column with 500 μM of doxorubicin. The eluted protein was concentrated to 500 μL with Amicon ultra 2 (Merck Millipore). In some cases, two successive dialysis of the loaded protein were realized overnight against 300 mL of buffer A (pH 7.2). Loading rates were estimated by measuring the absorbance at 280 nm and 490 nm using the following extinction coefficients $\epsilon_{280 \text{ nm}} = 120\,000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ for the protein and $\epsilon_{490 \text{ nm}} = 10\,800 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ for doxorubicin.

$$\text{Loading Rate}(\%) = \frac{[\text{Doxo}]}{[\text{Protein}]} \times 100$$

2.9 Cell delivery and dose response experiments

Human ovarian adenocarcinoma cell line NIH-OVCAR3 (OVCAR-3) was obtained from American type culture collection (ATCC®, HTB-161, Manassas, VA). OVCAR-3 cells were routinely cultured in a RPMI 1640 medium (Eurobio, CM1RPM00K) containing 10% fetal bovin serum (Sigma, F7524) sup-

plemented with 1% penicillin-streptomycin (Sigma, P0781), 2 mM glutamine (Eurobio, CSTGLU00), 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ human insulin (Sigma, I9278) and 20 ng mL^{-1} human recombinant epidermal growth factor (Sigma, E9644). Cells were cultured as monolayers at 37 °C in a humidified 5% CO_2 atmosphere. Cells were regularly checked for mycoplasma.

For confocal localization experiments, OVCAR-3 cells were seeded on four well cover-glass Lab-TEK devices (Nunc) at 5×10^5 cells per well. Once plated (9 h), 0.8 μM of the nanocontainer containing the doxorubicin and 32 nM of the empty nanocontainer labelled with Alexa-647 were added to the culture medium. For free doxorubicin localization, 0.4 μM (equivalent concentration to the loaded doxorubicin inside the nanocontainer) of doxorubicin was added to the culture medium. Cells were incubated for 15 hours at 37 °C (5% CO_2) before removing the medium and washing the cells with phosphate buffer saline (PBS, Eurobio). A similar experiment was realized in the presence of 2 mM fetuin (Sigma F2379) (+F) as the competitor. The nanocontainer containing the doxorubicin (0.8 μM) and the empty nanocontainer labelled with Alexa-647 (32 nM) were pre-incubated with 2 mM fetuin for 3 h directly in a culture medium. Afterwards, the pre-incubation mixture was added to the cells for a 15 h incubation at 37 °C (5% CO_2) before removing the medium and washing the cells with phosphate buffer saline (PBS, Eurobio). Fluorescence images were acquired using an Olympus FV-1000 confocal microscope with a 60 \times oil PLAPON OSC objective. Images were processed to filter the noise (PureDenoise plugin) with Fiji software, and this filter was similarly applied to all images.

For dose response experiments, OVCAR-3 cells were seeded on a 12 well plate at 10^6 cells per well. Once plated (24 h), various concentrations (0.4; 0.8; 1.2; 1.6 and 3.2 μM) of the nanocontainer containing the doxorubicin or 3.2 μM of the empty nanocontainer were added to the culture medium (1 ml). Cells were incubated for 24 h at 37 °C (5% CO_2) before removing the medium and washing cells with phosphate buffer saline (PBS, Eurobio). A fresh culture medium was added and cells were cultured for another 48 hours at 37 °C (5% CO_2). Afterwards, cells were washed and trypsinized. To assess viability, once harvested cells were counted and results were expressed in % of cell survival regarding the control conditions (OVCAR-3 cells alone). Then, cells were collected by centrifugation and resuspended in PBS supplemented with 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ propidium iodide, 0.1% Triton X100 and 2.5% SVF. Cells were incubated for 20 min at room temperature in the dark before flow cytometry analysis. FACS data were acquired with a FACSCalibur cytometer (BD Bioscience) and the cell cycle analysed using Modfit software.

2.10 Statistical analysis and molecular representations

Data analysis was performed by using the GraphPad Prism 6.0 program (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) and data were expressed as means \pm SEM for the number of experiments indicated in the legends of the figures. Multiple comparisons were performed using one-way analysis of variance (ANOVA)

followed by Bonferroni multiple comparison post-test: $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ and $****p < 0.0001$.

All molecular illustrations were made with PyMOL.⁴⁸

3 Results and discussion

3.1 Highlighting an exchange between protomer subunits

Structural RX resolution demonstrated that XCL self-organizes as a homotetramer with a complex network of protomer-protomer interfaces which generate a large inner hydrated cavity of 1 nm^3 (Fig. 1A).⁴² Previous studies (analytical ultracentrifugation and dynamic light scattering, Fig. S1†) showed systematically that XCL appeared tetrameric in solution. The aim is to validate the use of this protein as a nanocontainer. We tested whether an increase in temperature could displace the tetramer/dimer equilibrium. We chose this parameter because it does not modify the protonation state of the lateral chains likely to interact with a ligand. DOSY NMR experiments did not reveal any shift in this equilibrium with the temperature at a defined pH (data not shown). So, we looked for a more sensitive method to investigate if spontaneous exchange between tetrameric and dimeric forms could be highlighted. The XCL oligomerization equilibrium was characterized through fluorescence energy transfer (FRET) between two populations of XCL, labelled separately with FITC and RITC on lysine side chains. FRET provides information on molecular processes occurring at distances in the range of 10 to 100 Å.⁴⁹ As observed on the XCL structure (Fig. 1B), minimal and maximal distances of two ϵ -amino groups of lysines belonging to two different protomers and exposed to the surface of the protein are 21 Å and 67 Å, respectively and thus both in the typical range allowing FRET measurements since the Förster radius for this donor-acceptor pair is 55 Å.

The fluorescence emission spectra of XCL-FITC (black dashed line) and XCL-RITC (black continuous line) were recorded separately after being excited at 468 nm (Fig. 1C). The donor and the acceptor labeled proteins were mixed and incubated at room temperature. A decrease of the fluorescence intensity corresponding to the fluorescence of FITC, and simultaneously an increase of the fluorescence intensity of RITC were observed, indicating the existence of energy transfer between the fluorescent dyes (Fig. 1C, red and blue lines). In this figure, net FRET corresponds to the measured raw FRET minus the direct participation of RITC (acceptor) when excited at the donor wavelength. This analysis underestimates the FRET since the FITC labelling ratio is 4 times higher than that of the RITC one. As the transfer efficiency depends on the inverse sixth-power of the donor-acceptor distance and the dimensions of the XCL molecule are in the order of this Förster radius, the occurrence of energy transfer could only be possible if FITC-XCL monomers and RITC-XCL monomers have been reshuffled and finally belonged to the same tetra-

|| RCSB Protein Data Bank access codes 1X10 and 1X99.

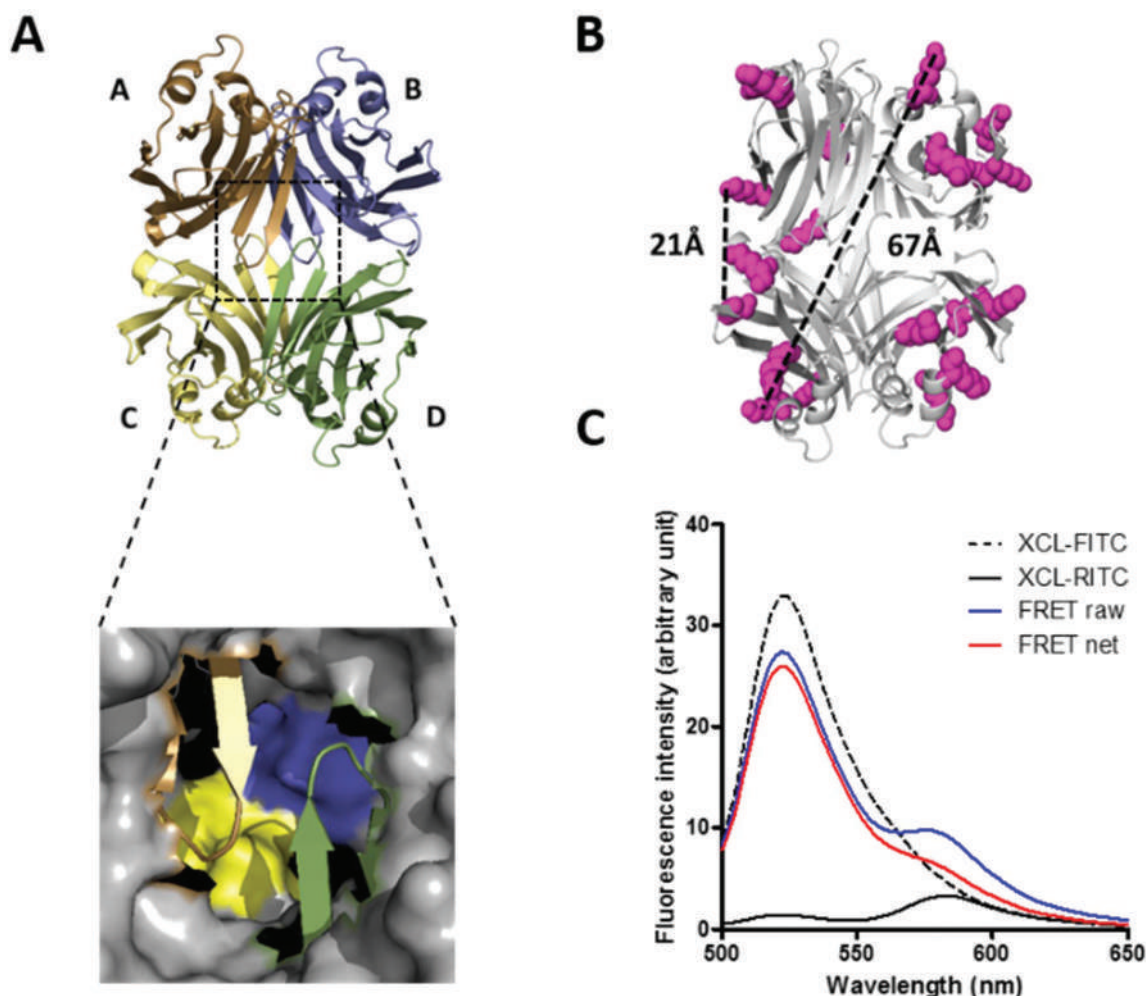


Fig. 1 (A) Structure representation (ribbon diagram) showing the overall organisation of the homotetrameric protein. The individual subunits are differently coloured and marked A to D. Insert shows the loops (ribbon representation) of chain A and chain D closing the upside cavity (surface representation). (B) Minimal and maximal distances between the ϵ -amino group of lysines belonging to different protomers. Minimum and maximum distances are indicated. (C) FRET experiment realized by mixing XCL-FITC and XCL-RITC for 1 hour at room temperature. Samples were excited at 468 nm and emission fluorescence was recorded between 500 and 650 nm. FRET net corresponds to fret raw minus the contribution of rhodamine.

mer. These results demonstrated a dynamic exchange between dimers constituting the protein. The access to the inner cavity of the protein can therefore be spontaneously achieved. However, as the purpose of this study is to use this tetrameric protein as a drug nanocontainer, the opening mechanism must be controlled *in vitro*.

3.2 Design of XCL variants by directed evolution

In order to control the stability and the dynamic of XCL's quaternary structure, we have designed variants of XCL in which monomers are covalently bonded. We adopted a strategy involving the formation of inter monomer disulfide bridges by substituting selected residues by cysteines. To minimize the number of substitutions we selected amino acids that were close to their counterparts in opposite monomers. According to the X-ray structure of XCL (Fig. 2), two amino-acids, threonine 12 and alanine 38, displayed such a propensity. The distance

between C β of threonine 12 and its counterpart is 3.9 Å and 3.4 Å for alanine 38 and its counterpart. These distances were in the typical range for C β of cysteines involved in a disulfide bridge.⁵⁰ Furthermore, the side chains of these residues were localized at the surface of the protein and expected accessible to oxidative and reductive agents. Energy minimizations using COOT software⁵¹ showed that the orientation of the side chain of cysteines in place of T12 and A38 and their structural environment were compatible with the formation of a disulfide bridge. In addition, the position of these residues does not interfere with the formation of the T antigen binding site (Fig. S2†).

These two mutants introduced different stabilizing constraints in the tetrameric assembly. The T12C mutant presents covalent bonds between monomers A and C and between monomers B and D (Fig. 2). The engineered T12C tetramer can split into two dimers, A/C and B/D. The inter-chain disulfide

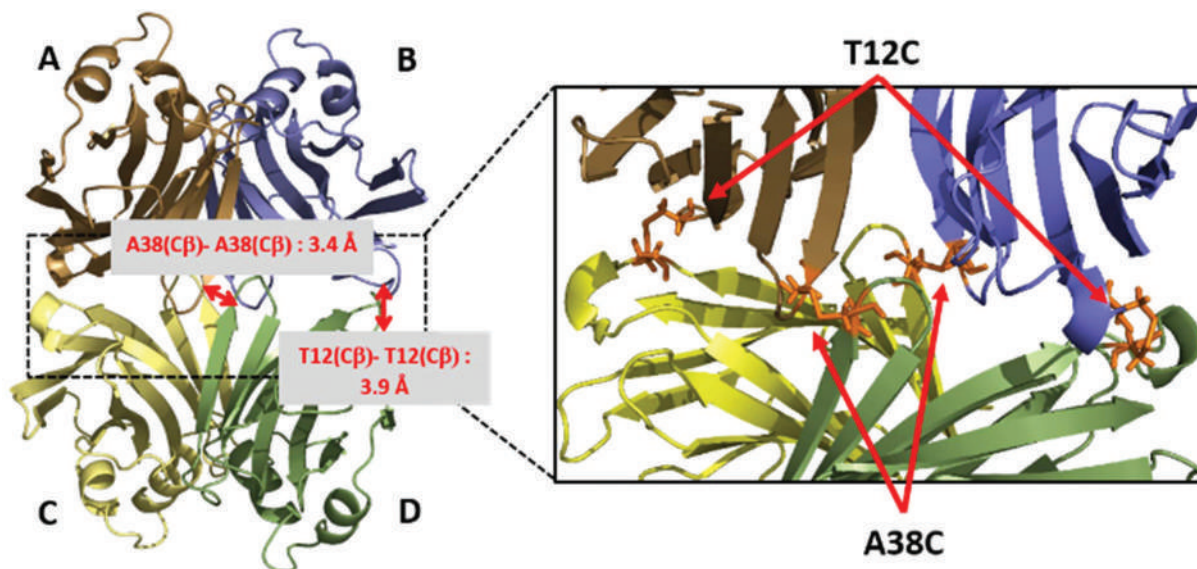


Fig. 2 Schematic representation of the position of disulfide bridges on the tetramer protein. (Left) Position of mutated residues, A38C and T12C, and theoretical distance between the lateral chains of cysteines. Only one of each bridge is shown. (Right) Due to the symmetry of the protein, each mutation introduces 2 disulfide bridges.

bonds of the A38C mutant provided two types of structural constraints. On one hand, the additional link reduced the capacity of the loops, which are closing the cavity, to move freely. Thus, it should restrain the leakage of a confined small molecule. On the other hand, the addition of those disulfide bonds in a crosswise manner implied that the dissociation of oxidized A38C tetramers would be possible only if all interfaces between protomers were broken to generate the dimers A/D and B/C. Finally, the double mutant (T12C/A38C) should combine these constraints and make it possible to obtain a better stability.

3.3 Properties of the variants: the emergence of the nanocontainer

The effective oxidation of disulfide bridges for each mutant has been tested by DSF. The oxidation was carried out spontaneously and rapidly (few hours) in an oxygenated buffer without any oxidizing agents (Fig. S3A†), which implied that the disulfide bond formation took place during the purification steps of the protein. This spontaneous reactivity of cysteines validated the design strategy of the different mutants. The single mutations under oxidative conditions (T12C Ox and A38C Ox) showed a T_m value increase of 5 °C compared to the wild type protein XCL (from 68 °C to 73 °C) (Fig. 3A). The presence of the four disulfide bridges in the double mutant (T12C/A38C Ox) led to an additional thermo-stability provided by each single mutant, with a T_m value increase of 10 °C compared to the wild type protein (from 68 °C to 78 °C). The introduction of disulfide bonds increased the T_m in all cases, thus the global strategy of mutagenesis was successful in terms of thermo-stability.

The possibility of using this protein as a nanocontainer requires the ability to effectively reduce disulfide bridges to

return to the spontaneous opening conditions of the wild type protein. Several reduction conditions were tested (Fig. S3B†) and the reversible formation of these disulfide bonds was assessed (Fig. 3A). In the presence of DTT as the reducing agent, the A38C variant was fully reduced. In contrast, the mutants T12C and T12C/A38C, in their reduced forms, presented a lower T_m than oxidized T12C but not returning to the level of XCL. To understand this behavior, which could only be due to a lack of complete reduction of the disulfide bridge common to these two mutants (the T12C position), we have analyzed *in silico* the environment of this bridge on each side of the protein. An asymmetry in surface charges in the vicinity of this disulfide bond on each side was observed (Fig. 3B). In addition, the bridges in one side were buried more deeply in the structure than its equivalent on the other side, which explained the difference in accessibility or effectiveness of the reducing agent. This observation showed that the structural symmetry of the protein is not perfect, in particular at the interfaces between the A/C monomers on one hand and B/D on the other hand, and that under the experimental conditions tested it was not possible to recover the thermal behavior of the wild type protein.

Consequently, in order to generate a protein nanocontainer, only the A38C mutant had a complete oxidation and reduction capacity. We therefore verified whether this mutation held the protein in a closed form, *i.e.* to block its spontaneous opening. The dynamic behavior of oxidized A38C tetramers was investigated by FRET experiments. The superposition of the fluorescence emission spectrum of XCL and oxidized A38C is shown in Fig. 3C. This experiment highlighted that A38C Ox dimers were not able to reshuffle and thus this mutant remained in a tetrameric state. Therefore, considering the

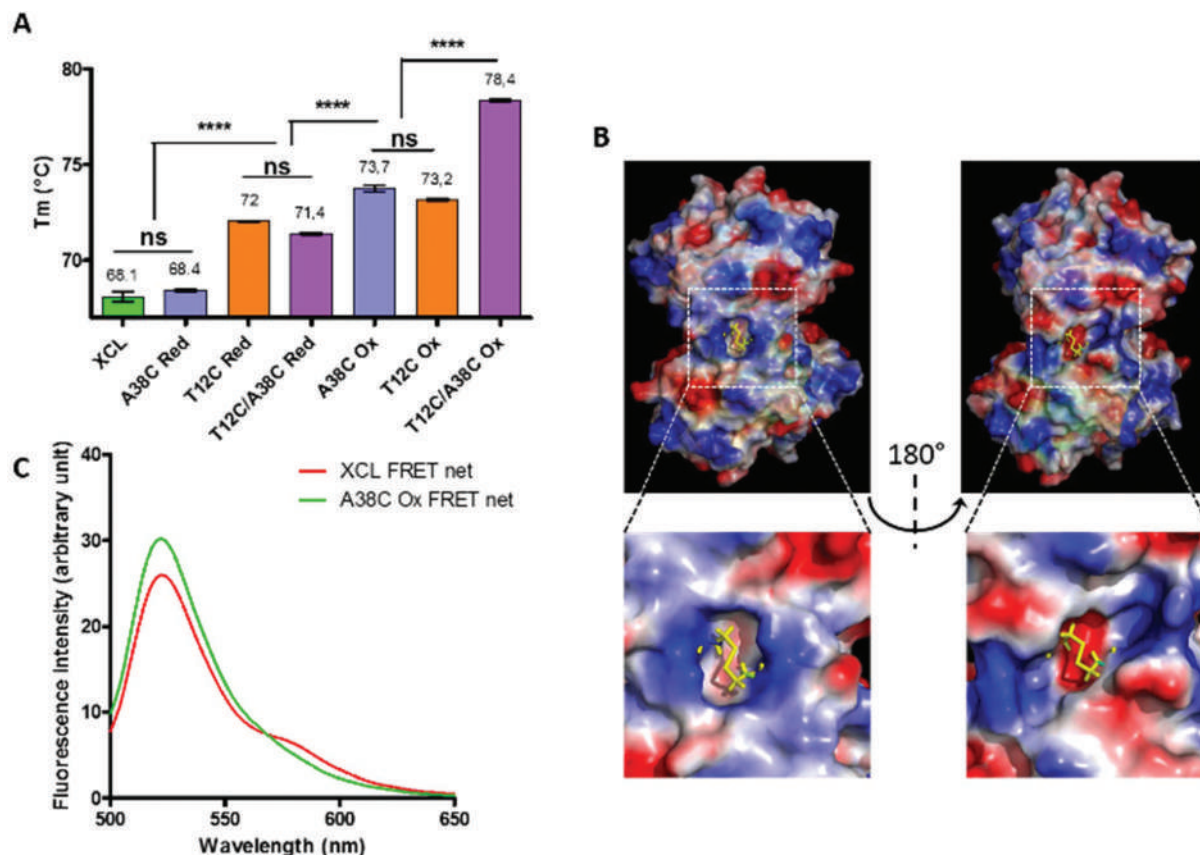


Fig. 3 (A) DSF experiments were realized with the indicated protein under oxidative (Ox) or reducing (Red) conditions. T_m is indicated above columns. $n \geq 5$ independent experiments. (B) Surface charges analysis showing the disulfide bridges T12C on each face of the protein. (C) FRET experiment: samples were excited at 468 nm and emission fluorescence were recorded between 500 and 650 nm. The graph shows the superposition of the FRET net for XCL and A38C Ox.

higher thermo-stability and the oxydo-reduction properties, the A38C mutant is a suitable candidate for a protein nanocontainer (i) a blocking of its spontaneous opening in an oxidized form which also maintained in place the loops allowing access to the internal cavity and (ii) a complete reversibility of its disulfide bridges.

3.4 Biochemical characterization of the nanocontainer

We explored several characteristics of this nanocontainer with different objectives: (i) quantifying the association dynamics by estimating the apparent equilibrium constant (ii) determining the behavior of the nanocontainer at an acidic pH corresponding to the lysosome compartment (iii) and finally deciphering the most likely mechanism of tetramer formation in order to predict *in silico* the loading mode inside the nanocontainer. In order to deepen the biochemical characterization of this nanocontainer we explored two central parameters: the estimation of the apparent equilibrium dissociation constant of the tetramer and its kinetics of formation.

3.4.1 Apparent equilibrium dissociation constant. The reversible dissociation equilibrium of XCL, previously highlighted by FRET, between the tetramer and dimer should be shifted to dissociation after dilution and thus allowing the

estimation of an apparent global dissociation constant. Several methods have been used to address this aspect, during which we used XCL in place of the A38C reduced form to avoid a possible oxidization during the experiment. Equilibrium displacement was assessed by size exclusion chromatography (SEC). At a concentration of 10 μ M, XCL displayed an elution volume of 13.2 mL close to the elution volume of BSA as expected for a tetrameric species (Fig. S4A†). We performed several injections using varying concentrations of XCL and observed the elution of the protein as a single peak. This peak was shifted toward longer elution volumes as the concentration was lowered, indicating a smaller molecular weight. In this experiment, the existence of a balance between tetrameric and dimeric forms should lead to an elution profile with two peaks. Nevertheless, Yu *et al.* demonstrated by numerical simulation that, depending on association rate, dissociation rate, flow rate and separation characteristics of the column, two populations of molecules exchanging can lead to a single elution peak in size exclusion chromatography.⁵² When volumes of elution were plotted against XCL concentrations, a transition was observed in the micromolar range (Fig. 4A).

The energy transfer efficiency should diminish upon dilution of the protein. We took advantage of this phenom-

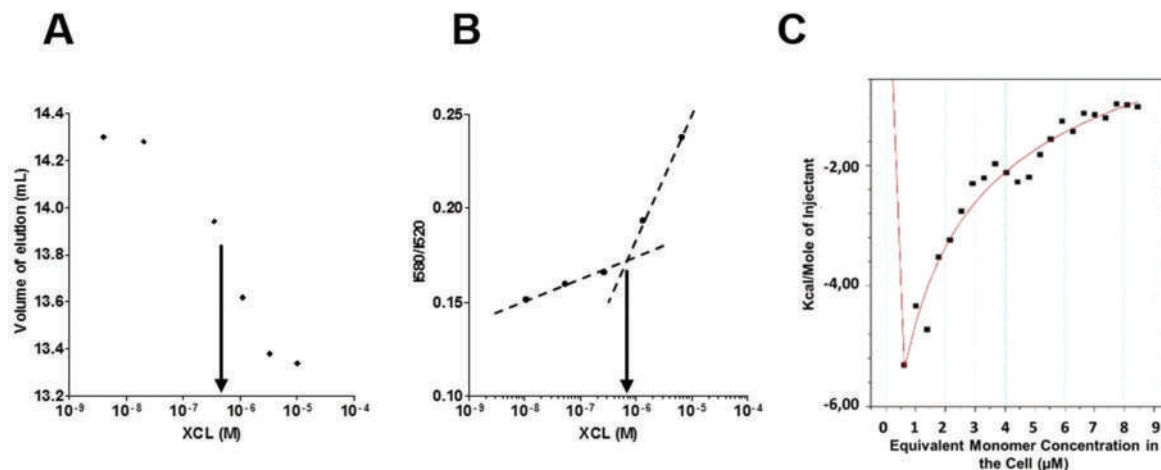


Fig. 4 (A) SEC was carried out with a concentration range between 10 μ M and 4 nM of XCL. Elution volume (UV absorbance 280 nm) was plotted as a function of XCL concentration. The arrow indicates the inflexion point of the experimental curve. (B) FRET was measured for different concentrations of the FITC-XCL and RITC-XCL mixture. $\lambda_{\text{exc}} = 468$ nm. I_{580}/I_{520} (i.e. $I_{\text{Rhod}}/I_{\text{Fluo}}$) was plotted as a function of XCL concentration. Dashed lines represented the linear regression fits. The arrow indicates the break point between the two slopes. (C) ITC was realized with 25 automatic injections (5 μ l) of XCL (40 μ M) in phosphate buffer. The integrated curve shows the experimental point (■) and the best fit (red line, monomer-dimer equilibrium model).

enon for the determination of the apparent dissociation equilibrium constant of XCL tetramers. The FITC-XCL/RITC-XCL mixture was diluted at different concentrations and incubated for 1 hour at room temperature in order to reach a steady state. Fluorescence spectra were recorded with a 468 nm excitation wavelength (Fig. S4B†). To sensitively determine the decrease in the transfer of energy and normalize fluorescence intensity, the I_{580}/I_{520} ratio was calculated for each concentration and plotted *versus* the XCL concentration (Fig. 4B). A transition in energy transfer was observed in the micromolar range which was consistent with previous results obtained by SEC experiments.

Finally, to improve the measurement of the tetramerization equilibrium constant and also determine the thermodynamic parameters of XCL tetramerization, we used isothermal titration calorimetry.⁵³ In this method, a concentrated solution of XCL was diluted into the buffer, and the heat of dissociation to dimers was measured (Fig. S4C†). The amount of heat released upon each injection is governed by the enthalpy change from tetramer to dimer and the tetramer-dimer equilibrium constant. Fitting the data presented in Fig. 4C yielded a K_{diss} of 4.5 μ M and a tetramerization enthalpy change of -16.6 kilocalories per mole of the tetramer (Fig. 4C). It must be noticed that the enthalpy change observed during the dissociation of the tetramer into dimers had a negative value indicating an exothermic process. Most of the polymeric proteins display an endothermic behavior although exothermic dissociations have already been reported.⁵³ Comparing our results to those previously recorded in the literature, it appeared that the enthalpy change obtained was in the typical range for the dissociation of an oligomeric protein of this size.^{54,55} However, the equilibrium dissociation constant was low compared to other polymeric proteins, which was coherent with the great stability of this oligomeric structure.

The exchange between tetrameric and dimeric forms highlighted by these three methods, which gave similar dissociation equilibrium constants in the μ M range, demonstrated that XCL tetramers permanently undergo an exchange between dimers and tetramers.

3.4.2 Acidic behavior, oligomerization kinetic and opening mechanism. The evidence of the protein opening at acidic pH was initially carried out to ensure that if a therapeutic molecule is confined inside the cavity of the nanocontainer, it would be delivered within the lysosomes once addressed to cells and internalized (see section 3.6).⁴¹ Experimentally, size exclusion chromatography analysis showed that XCL was eluted in its tetrameric form at pH 7 (Fig. 5A and Fig. S5†). When the experiment was carried out at pH 4.4, corresponding to lysosome acidic conditions, the presence of dimers was revealed. Therefore, the acidic lysosome environment leads to a destabilization of the tetrameric form of the native protein. We also analyzed, under the same conditions, the behavior of A38C in its oxidized form. Under non-reductive conditions, A38C was insensitive to pH 4.4 and remained in its tetrameric form.

These different behaviors at acidic pH between XCL and A38C provided information that also enabled us to elucidate the dominant opening mechanism of the nanocontainer. We knew that the interactions between the interfaces that made up the tetramer were not equivalent (Fig. 5B, left). Indeed, A/B and C/D dimers included an interface that buried 780 \AA^2 from the solvent whereas A/C and B/D dimers buried 911 \AA^2 .⁴² This structural characteristic was also highlighted by FRET kinetic experiments. The time course of oligomerization was studied by mixing FITC-XCL and RITC-XCL and we determined the fluorescence emission intensity at 580 nm as a function of time (Fig. 5C). The fluorescence intensity of RITC increased

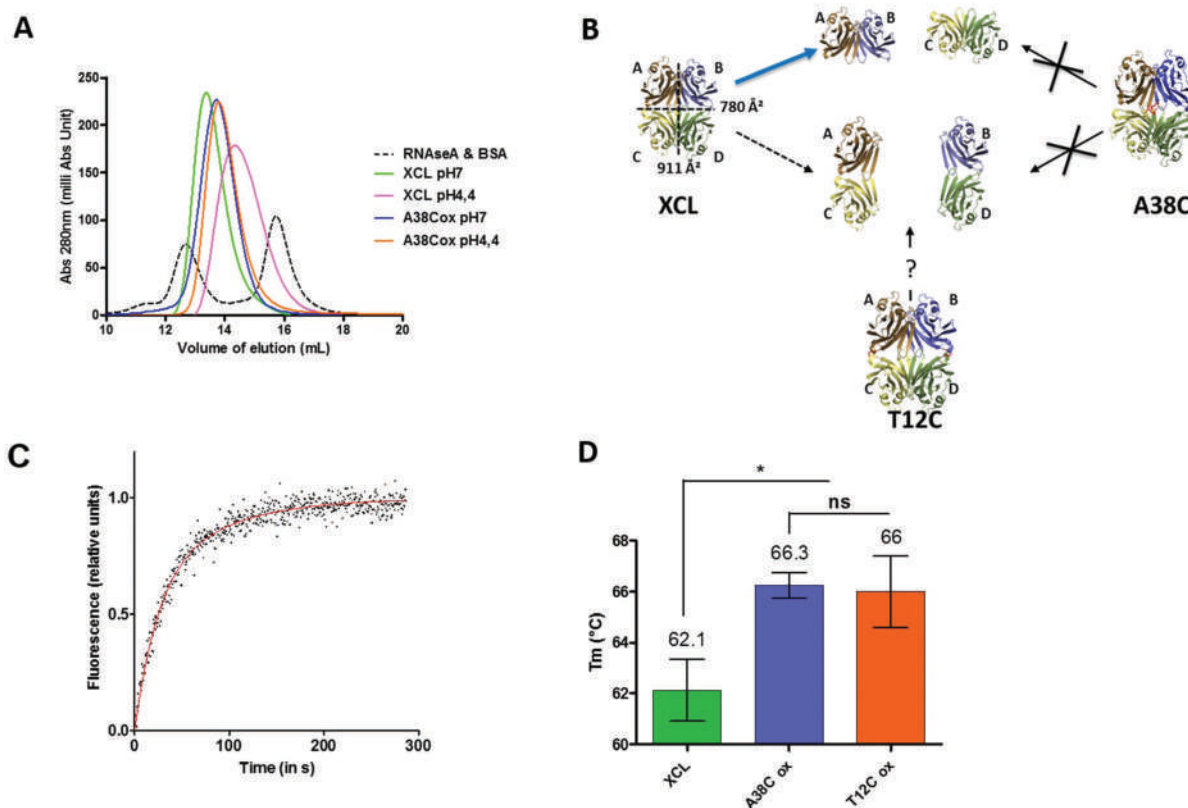


Fig. 5 (A) SEC was performed at two different pH values with XCL and the A38C oxidized mutant. BSA (66 kDa, elution volume 12.3 ml) and RNase A (13.7 kDa, elution volume 16 ml) were used as references. (B) Schematic representation of the opening possibilities of the nanocontainer at pH 4.5. XCL can generate two types of dimers (left) with a theoretical prevalence for the mechanism breaking the interface of 780 Å² (blue arrow). At this pH value the nanocontainer A38C remained in the tetrameric form (right). The T12C mutant is secured by disulfide bridges and therefore only the formation of A/C and B/D dimers is in theory possible (middle). (C) FRET kinetics was initiated by mixing an equal volume of FITC-XCL and RITC-XCL at 25 °C. Fluorescence emission at 580 nm was recorded every 0.5 seconds (λ_{exc} = 468 nm). The curve shows the experimental points (●) and the best fit (red line) (GOSA Software). (D) DSF was performed at pH 4.5 with XCL and the oxidized T12C and A38C mutants. $n \geq 5$ independent experiments.

reaching a steady state more than 300 seconds after the mixing, indicating a slow exchange between oligomer sub-units. The rise of fluorescence at 580 nm, and thus of energy transfer between fluorescein and rhodamine, was the result of two consecutive phenomena: firstly, the dissociation of tetramers into dimers and secondly their re-association. Considering the shape of the curve (Fig. 5C), no time-lag was observed in the initial phase, which implied that the rate of re-association was much greater than the rate of dissociation. The data were best fit with a double exponential rise and the following constants were obtained: $a = 0.39$; $k_1 = 0.72 \text{ min}^{-1}$; $k_2 = 2.52 \text{ min}^{-1}$. This double exponential behavior suggested that XCL could follow two distinct dissociation pathways leading to different dissociation rates, but one interface between dimers seemed to dissociate 3.5 times faster than the other.

The XCL tetrameric protein could theoretically be opened in two ways: either by breaking the interfaces between the A/C and B/D dimers (Fig. 5B, dashed black arrow) or between the A/B and C/D dimers (Fig. 5B, blue arrow), but it was expected that the predominant mechanism corresponded to the weakest interface split (Fig. 5B, blue arrow). This dimer formation was obtained experimentally at pH 4.4 for XCL while under this

condition the A38C mutant in its oxidized form remained tetrameric and therefore could not lead to the formation of dimers (Fig. 5B, black arrow).

To determine which of the two interfaces of the tetramer dissociates first, we compared the behavior of the T12C mutant with those of XCL and A38Cox. As the A/C and B/D interfaces of the mutant T12C are secured by a disulfide bridge, only the formation of A/C and B/D dimers is possible. Thus, DSF experiments were performed at pH 4.5 and T_m values of 62.1 °C and 66.3 °C were obtained for XCL and A38C, respectively (Fig. 5D). A T_m value of 66 °C, very close to that of A38C, was obtained for the T12C oxidized mutant, indicating the absence of dimer formation under these conditions. Therefore, the predominant opening mechanism of the nanocontainer leads to the formation of A/B and C/D dimers. The *in silico* docking experiments were then carried out on these dimers.

3.5 The nanocontainer loading: proof of concept

In order to validate this device as a nanocontainer, we tested the confinement of doxorubicin (413 Å³), a small therapeutic molecule already used in clinics, inside the cavity (1000 Å³). Doxorubicin was detected by spectrophotometry (490 nm)

which allowed us to estimate loading rates of this molecule inside the nanocontainer.

To ensure that doxorubicin was a good candidate for validation of this nanocontainer, we first analyzed by docking and molecular dynamic simulations whether doxorubicin was able to interact with the lateral chains of amino acids lining the cavity. Based on the opening mechanism of the tetramer, *in silico* docking was realized on the A/B dimer. The best docking hits were used to realize molecular dynamic studies (over 20 ns) on the tetramer. Doxorubicin interacted in the inner cavity and outside of the nanocontainer with persistent contacts. The potential energies of these interactions, calculated using Amber software, for the outer and the inner binding were $-7.4 \text{ kcal mol}^{-1}$ and $-39.6 \text{ kcal mol}^{-1}$, respectively (Fig. 6A). Therefore, this significant difference in energy presupposes a highly stronger affinity for the residues lining the cavity. Indeed, the confinement within the cavity involved interactions between doxorubicin and residues belonging to three protein chains (chains B, C and D). It is interesting to note that these interactions must participate in the stabilization of the nanocontainer (tetrameric form) since 3 chains

out of the 4 constituting the tetramer are involved. In contrast, only few polar contacts are predicted in the outside binding of the doxorubicin to the nanocontainer's D chain.

These *in silico* results led us to experimentally test the loading of doxorubicin inside the nanocontainer. The nanocontainer ($50 \mu\text{M}$) was incubated with doxorubicin ($500 \mu\text{M}$ *i.e.* 3×10^{-4} molecule per nm^3) for 24 h. Assuming that only one doxorubicin can be loaded per nanocontainer, the rate of confinement was evaluated by measuring the absorbance of doxorubicin per mole of the protein after the purification of the nanocontainer from free doxorubicin (and other small compounds). In the presence of DTT as the reducing agent, 53% of the nanocontainers were loaded (as compared with 0.03% for random confinement) (Fig. 6B). The stability of the complex was checked by overnight dialysis and no decrease of the loading rate was observed (data not shown). These high loading rates were directly related to the affinity of interaction between doxorubicin and the lateral chains of the residues lining the cavity. In order to determine the outside binding, oxidative conditions were applied by the addition of GSSG (10 mM) during incubation, thus preventing the opening of

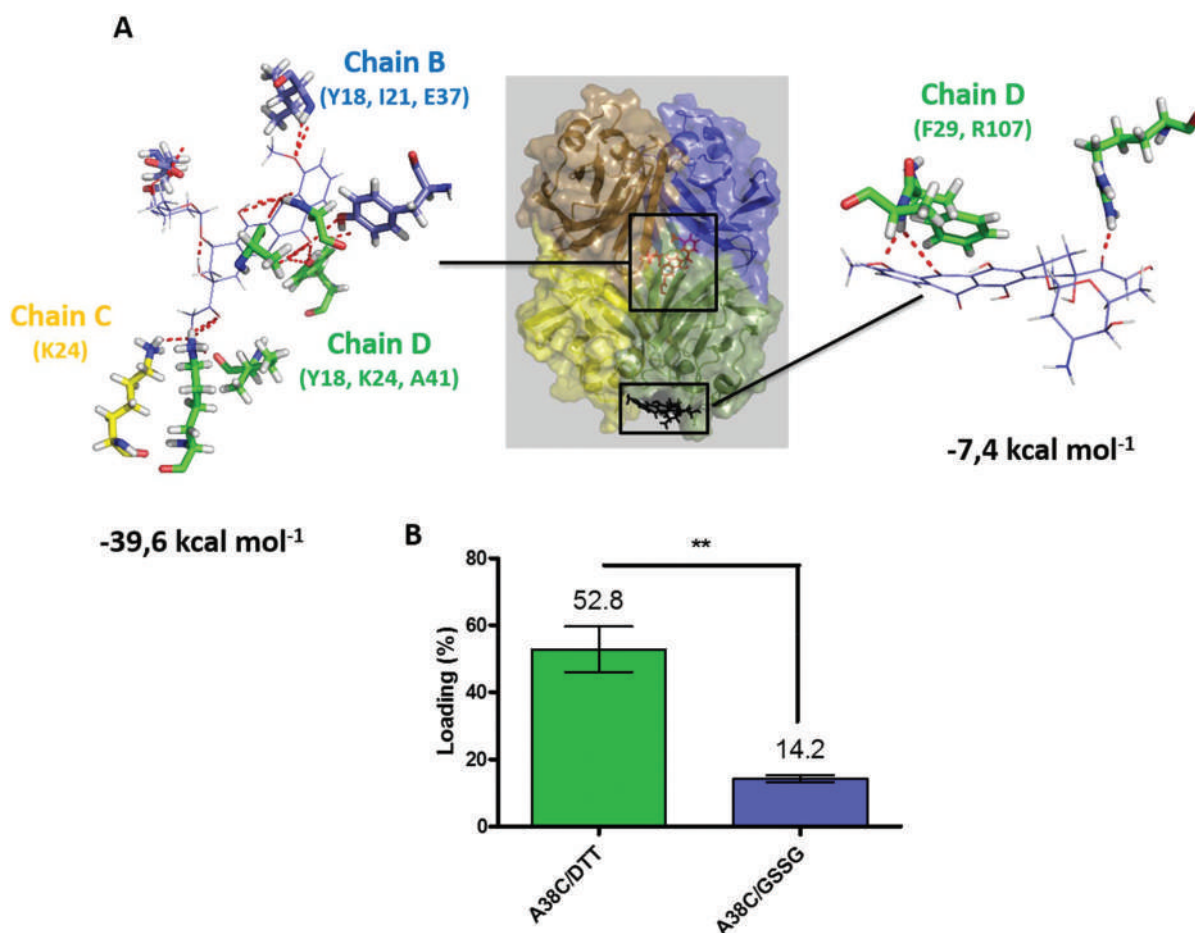


Fig. 6 (A) Docking and molecular dynamics were realized with doxorubicin inside and outside of the protein. The polar contacts of doxorubicin with protomers and the energies of interactions are indicated. (B) Doxorubicin was incubated for 24 h with A38C in the presence of DTT (A38C/DTT) or in the presence of GSSG (A38C/GSSG). $n \geq 5$ independent experiments.

the tetramer from direct reduction of disulfide bridges by doxorubicin (Fig. S6†).⁵⁶ Under these conditions, a loading rate of 14.2% was observed which might correspond to the binding of doxorubicin onto the nanocontainer surface.

3.6 Targeted cell delivery

Finally, we analyzed the delivery efficiency of doxorubicin loaded into the nanocontainer cavity. For this purpose, we used OVCAR-3 cells, a human ovarian adenocarcinoma cell line that expresses T antigen.⁵⁷ The internalization of XCL in epithelial human cells by clathrin dependent endocytosis and its localization in late endosomes/lysosomes after internalization were previously described.⁴¹ In a first instance, a mixture of the Alexa-647 labelled nanocontainer (32 nM) and doxorubicin-loaded nanocontainer (0.8 μ M, loading ratio 53%) was incubated for 15 h with the cells and the fluorescence of Alexa-647 and doxorubicin was analyzed by confocal microscopy (Fig. 7A). The Alexa-647 (A38C) fluorescence signals showed a

vesicular localization in living cells, which corresponds to the known late endosome/lysosome accumulation of the nanocontainer. The exact same pattern was observed with the doxorubicin fluorescence signal (Dox). This result indicated that the nanocontainer determined the localization of doxorubicin inside the cells. When the same experiment was performed in the presence of fetuin as a competitor, a very strong decrease of the fluorescent signals, for both Alexa-647 and doxorubicin, was observed (Fig. 7B). Therefore, the uptake of doxorubicin inside the cells was entirely dependent on the nanocontainer binding on T antigen. For the same incubation time, when the cells were incubated with free doxorubicin, the fluorescence signal was mainly found in the nucleus as expected (Fig. 7C). In a second set of experiments, the nanocontainer loaded with doxorubicin (loading ratio of 53%) was incubated at increasing concentrations with cells for 24 h, and cells were further cultured for 48 h. Surviving cells (only 13% of cells were still adherent at the higher concentration) were harvested, counted

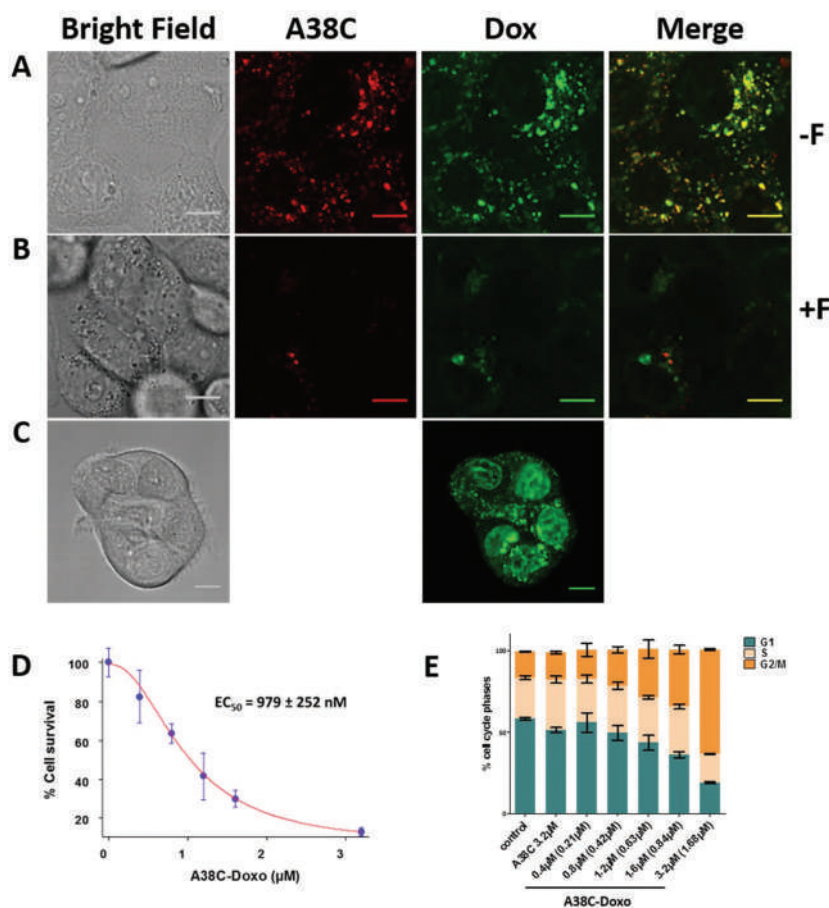


Fig. 7 (A) OVCAR-3 cells were incubated for 15 h with 0.8 μ M of the nanocontainer loaded with doxorubicin (53% loading) and with 32 nM A38C-Alexa647 nanocontainer. Fluorescence of Alexa-647 (A38C) and doxorubicin (Dox) was analysed by confocal microscopy. (B) The same experiment was realized in the presence of 2 mM fetuin (+F) as the competitor. (C) OVCAR-3 cells were incubated for 15 h with 0.4 μ M of doxorubicin alone (equivalent dose of doxorubicin loaded inside the nanocontainer). (D) Increasing concentration of A38C loaded with doxorubicin (A38C-Doxo, 53% loading) was incubated with OVCAR-3 cells for 24 h. 48 h later, cells were harvested and incubated with propidium iodide buffer. Cell survival was analysed by counting. Experimental points were fit with GOSA software to determine the EC_{50} . $n \geq 3$ (E) Survival cells were analysed by FACS for their cell cycle phases (Modfit software). Control is untreated cells; A38C: unloaded nanocontainer; A38C-Doxo: nanocontainer loaded with doxorubicin; F: fetuin. Concentrations referred to protein concentrations and doxorubicin in brackets. $n \geq 3$. Scale bar = 10 μ m.

and analyzed by FACS for cell cycle phase analysis. The cell counts were fit with GOSA software to determine EC₅₀ (979 nM) (Fig. 7D). Cell cycle analysis showed that the higher concentration tested of the empty A38C nanocontainer (3.2 μM) did not modify cell cycle phases and the same profile was observed for the control cells (Fig. 7E and Fig. S7†). The cells incubated with the highest loaded nanocontainer concentration showed a 1.9 fold increase of G2/M phases, which was observed concomitantly with a 3 fold decrease of the G1 phase. As the nanocontainer ends up located in lysosomes which represents the cells' waste disposal system displaying acid hydrolase enzymes, an acidic pH (4.5) and a reducing environment, the free doxorubicin was released inside these vesicles. Therefore, the nanocontainer allows the release of doxorubicin. The protonation state of doxorubicin at lysosomal pH allows it to pass through the vesicular membrane into the cytoplasm before accessing the nucleus during cell division.^{12,58,59} These results showed that cells were blocked in their division which corresponded to the known inhibitory action of doxorubicin.⁶⁰

4 Conclusions

We used a multidisciplinary approach to validate a new type of protein nanocontainer. Its intrinsic characteristics allow it to target adenocarcinoma cells thanks to its four T antigen recognition sites. Its three-dimensional structure characteristics make it a potential transporter of small therapeutic molecules. Rational engineering based on the 3D structure of this protein has made it possible to obtain a mutated variant. The opening and closing of the A38C mutant can be easily controlled and so allow access to its internal cavity. Cell delivery of doxorubicin is totally dependent on the nanocontainer targeting and leads to the blocking of the cell cycle, the intended effect of doxorubicin, without toxicity of the nanocontainer itself. Future developments will partly concern the loading of other classes of therapeutic molecules currently used in chemotherapy. To go further in the development of this nanocontainer and generalize its use as a theranostic tool, it will also be necessary to test its efficiency as a probe and drug delivery system.

Conflicts of interest

The authors have no conflicts to declare.

Acknowledgements

Financial support for this project was provided by the Région Occitanie (grant no. 08005117 and 09006150), the Direction de la Recherche et de la Valorisation of Toulouse III University (grant no. 08-126) and the SATT-Toulouse Tech Transfer (grant no. M 13-004). We would like thank the Imaging Core Facility

TRI-IPBS and the IBiSA Integrated Screening Platform of Toulouse (PICT, IPBS, CNRS - Université de Toulouse).

Notes and references

- 1 M. Uchida, M. T. Klem, M. Allen, P. Suci, M. Flenniken, E. Gillitzer, Z. Varpness, L. O. Liepold, M. Young and T. Douglas, *Adv. Mater.*, 2007, **19**, 1025–1042.
- 2 T. Douglas and M. Young, *Science*, 2006, **312**, 873–875.
- 3 Y. Ma, R. J. Nolte and J. J. Cornelissen, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2012, **64**, 811–825.
- 4 J. A. Speir, S. Munshi, G. Wang, T. S. Baker and J. E. Johnson, *Structure*, 1995, **3**, 63–78.
- 5 C. Porta, V. E. Spall, K. C. Findlay, R. C. Gergerich, C. E. Farrance and G. P. Lomonosoff, *Virology*, 2003, **310**, 50–63.
- 6 B. J. Cargile, S. A. McLuckey and J. L. Stephenson Jr., *Anal. Chem.*, 2001, **73**, 1277–1285.
- 7 A. E. Ashcroft, H. Lago, J. M. Macedo, W. T. Horn, N. J. Stonehouse and P. G. Stockley, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2005, **5**, 2034–2041.
- 8 H. A. Hosein, D. R. Strongin, M. Allen and T. Douglas, *Langmuir*, 2004, **20**, 10283–10287.
- 9 P. Sanchez, E. Valero, N. Galvez, J. M. Dominguez-Vera, M. Marinone, G. Poletti, M. Corti and A. Lascialfari, *Dalton Trans.*, 2009, 800–804.
- 10 Z. Wang, Y. Dai, O. Jacobson, F. Zhang, B. C. Yung, P. Zhang, H. Gao, G. Niu, G. Liu and X. Chen, *Nanoscale*, 2018, **10**, 1135–1144.
- 11 M. Murata, S. Narahara, T. Kawano, N. Hamano, J. S. Piao, J. H. Kang, K. Ohuchida, T. Murakami and M. Hashizume, *Mol. Pharm.*, 2015, **12**, 1422–1430.
- 12 R. Toita, M. Murata, K. Abe, S. Narahara, J. S. Piao, J. H. Kang, K. Ohuchida and M. Hashizume, *Int. J. Nanomed.*, 2013, **8**, 1989–1999.
- 13 R. Toita, M. Murata, K. Abe, S. Narahara, J. S. Piao, J. H. Kang and M. Hashizume, *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 7442–7444.
- 14 V. A. Kickhoefer, Y. Garcia, Y. Mityas, E. Johansson, J. C. Zhou, S. Raval-Fernandes, P. Minoofar, J. I. Zink, B. Dunn, P. L. Stewart and L. H. Rome, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2005, **102**, 4348–4352.
- 15 C. Y. Lai, C. M. Wiethoff, V. A. Kickhoefer, L. H. Rome and G. R. Nemerow, *ACS Nano*, 2009, **3**, 691–699.
- 16 U. K. Kar, M. K. Srivastava, A. Andersson, F. Baratelli, M. Huang, V. A. Kickhoefer, S. M. Dubinett, L. H. Rome and S. Sharma, *PLoS One*, 2011, **6**, e18758.
- 17 A. Maham, Z. Tang, H. Wu, J. Wang and Y. Lin, *Small*, 2009, **5**, 1706–1721.
- 18 E. J. Lee, N. K. Lee and I. S. Kim, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2016, **106**, 157–171.
- 19 G. Liu, J. Wang, H. Wu and Y. Lin, *Anal. Chem.*, 2006, **78**, 7417–7423.
- 20 G. Liu, J. Wang, S. A. Lea and Y. Lin, *ChemBioChem*, 2006, **7**, 1315–1319.

- 21 A. A. Aljabali, S. Shukla, G. P. Lomonosoff, N. F. Steinmetz and D. J. Evans, *Mol. Pharm.*, 2013, **10**, 3–10.
- 22 Z. Zhen, W. Tang, H. Chen, X. Lin, T. Todd, G. Wang, T. Cowger, X. Chen and J. Xie, *ACS Nano*, 2013, **7**, 4830–4837.
- 23 K. M. Choi, K. Kim, I. C. Kwon, I. S. Kim and H. J. Ahn, *Mol. Pharm.*, 2013, **10**, 18–25.
- 24 G. Destito, R. Yeh, C. S. Rae, M. G. Finn and M. Manchester, *Chem. Biol.*, 2007, **14**, 1152–1162.
- 25 Y. Ren, S. M. Wong and L. Y. Lim, *Bioconjugate Chem.*, 2007, **18**, 836–843.
- 26 G. J. Tong, S. C. Hsiao, Z. M. Carrico and M. B. Francis, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 11174–11178.
- 27 F. Heitz, M. C. Morris and G. Divita, *Br. J. Pharmacol.*, 2009, **157**, 195–206.
- 28 L. C. Wyatt, A. Moshnikova, T. Crawford, D. M. Engelman, O. A. Andreev and Y. K. Reshetnyak, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2018, **115**, E2811–E2818.
- 29 N. K. Lee, E. J. Lee, S. Kim, G. H. Nam, M. Kih, Y. Hong, C. Jeong, Y. Yang, Y. Byun and I. S. Kim, *J. Controlled Release*, 2017, **267**, 172–180.
- 30 R. C. Bast Jr., M. Feeney, H. Lazarus, L. M. Nadler, R. B. Colvin and R. C. Knapp, *J. Clin. Invest.*, 1981, **68**, 1331–1337.
- 31 T. L. Klug, R. C. Bast Jr., J. M. Niloff, R. C. Knapp and V. R. Zurawski Jr., *Cancer Res.*, 1984, **44**, 1048–1053.
- 32 A. Ravaioli, G. Pasini, A. Polselli, M. Papi, D. Tassinari, V. Arcangeli, C. Milandri, D. Amadori, M. Bravi, D. Rossi, P. P. Fattori, E. Pasquini and I. Panzini, *Breast Cancer Res. Treat.*, 2002, **72**, 53–60.
- 33 B. W. Yin and K. O. Lloyd, *J. Biol. Chem.*, 2001, **276**, 27371–27375.
- 34 D. J. Gill, H. Clausen and F. Bard, *Trends Cell Biol.*, 2011, **21**, 149–158.
- 35 G. Konska, J. Guillot, M. De Latour and Y. Fonck, *Int. J. Oncol.*, 1998, **12**, 361–367.
- 36 J. Liu, B. Yi, Z. Zhang and Y. Cao, *Front. Med.*, 2016, **10**, 204–211.
- 37 B. Liu, H. J. Bian and J. K. Bao, *Cancer Lett.*, 2010, **287**, 1–12.
- 38 G. Poiroux, M. Pitie, R. Culerrier, E. Lafont, B. Segui, E. J. Van Damme, W. J. Peumans, J. Bernadou, T. Levade, P. Rouge, A. Barre and H. Benoist, *PLoS One*, 2011, **6**, e23315.
- 39 V. Trigueros, A. Lougarre, D. Ali-Ahmed, Y. Rahbe, J. Guillot, L. Chavant, D. Fournier and L. Paquereau, *Biochim. Biophys. Acta*, 2003, **1621**, 292–298.
- 40 L. Damian, D. Fournier, M. Winterhalter and L. Paquereau, *BMC Biochem.*, 2005, **6**, 11.
- 41 F. Francis, C. Marty-Detraves, R. Poincloux, L. Baricault, D. Fournier and L. Paquereau, *Eur. J. Cell Biol.*, 2003, **82**, 515–522.
- 42 C. Birck, L. Damian, C. Marty-Detraves, A. Lougarre, C. Schulze-Briesse, P. Koehl, D. Fournier, L. Paquereau and J. P. Samama, *J. Mol. Biol.*, 2004, **344**, 1409–1420.
- 43 J. Czaplicki, G. Cornelissen and F. Halberg, *J. Appl. Biomed.*, 2006, **4**, 87–94.
- 44 O. Trott and A. J. Olson, *J. Comput. Chem.*, 2010, **31**, 455–461.
- 45 G. M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M. F. Sanner, R. K. Belew, D. S. Goodsell and A. J. Olson, *J. Comput. Chem.*, 2009, **30**, 2785–2791.
- 46 D. A. Case, T. E. Cheatham 3rd, T. Darden, H. Gohlke, R. Luo, K. M. Merz Jr., A. Onufriev, C. Simmerling, B. Wang and R. J. Woods, *J. Comput. Chem.*, 2005, **26**, 1668–1688.
- 47 B. R. Miller 3rd, T. D. McGee Jr., J. M. Swails, N. Homeyer, H. Gohlke and A. E. Roitberg, *J. Chem. Theory Comput.*, 2012, **8**, 3314–3321.
- 48 *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3*, Schrödinger, LCC.
- 49 P. Wu and L. Brand, *Anal. Biochem.*, 1994, **218**, 1–13.
- 50 C. Czaplewski, S. Oldziej, A. Liwo and H. A. Scheraga, *Protein Eng., Des. Sel.*, 2004, **17**, 29–36.
- 51 P. Emsley, B. Lohkamp, W. G. Scott and K. Cowtan, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.*, 2010, **66**, 486–501.
- 52 C. M. Yu, S. Mun and N. H. Wang, *J. Chromatogr. A*, 2006, **1132**, 99–108.
- 53 S. Barranco-Medina and K. J. Dietz, *Methods Enzymol.*, 2009, **466**, 409–430.
- 54 S. D. Burrows, M. L. Doyle, K. P. Murphy, S. G. Franklin, J. R. White, I. Brooks, D. E. McNulty, M. O. Scott, J. R. Knutson, D. Porter, *et al.*, *Biochemistry*, 1994, **33**, 12741–12745.
- 55 M. Lovatt, A. Cooper and P. Camilleri, *Eur. Biophys. J.*, 1996, **24**, 354–357.
- 56 S. Vandenwijngaert, M. Swinnen, A. S. Walravens, M. Beerens, H. Gillijns, E. Caluwe, R. E. Tainsh, D. I. Nathan, K. Allen, P. Brouckaert, J. Bartunek, M. Scherrer-Crosbie, K. D. Bloch, D. B. Bloch, S. P. Janssens and E. S. Buys, *Antioxid. Redox Signaling*, 2017, **26**, 153–164.
- 57 K. W. Chen, A. Gentry-Maharaj, M. Burnell, C. Steentoft, L. Marcos-Silva, U. Mandel, I. Jacobs, A. Dawnay, U. Menon and O. Blixt, *J. Proteome Res.*, 2013, **12**, 1408–1418.
- 58 P. Mohan and N. Rapoport, *Mol. Pharm.*, 2010, **7**, 1959–1973.
- 59 R. J. Lee, S. Wang, M. J. Turk and P. S. Low, *Biosci. Rep.*, 1998, **18**, 69–78.
- 60 J. Murai, *Int. J. Clin. Oncol.*, 2017, **22**, 619–628.

Electronic Supplementary Information

Tetrameric behavior in solution: Analytical Ultracentrifugation and Dynamic Light Scattering

Ultracentrifugation data showed that XCL displays a sedimentation coefficient of 4.53 Svedberg that fits a molecular weight of 58 kDa (Fig S1A), close to the 64 kDa weight of the homotetrameric assembly of XCL. Diffusion light scattering experiments confirmed this result. Indeed, we obtained a single peak displaying a hydrodynamic radius of 3 nm corresponding to a homotetrameric structure (Fig S1B).

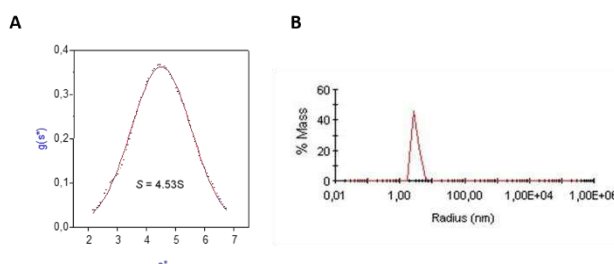


Figure S1: A) Velocity sedimentation studies were carried out à 20 °C with a Beckman model XL-A ultracentrifuge equipped with a four-hole AN-55 rotor and standard 1.2cm double sector cells. The native XCL protein at 25 μ M in 25mM sodium phosphate buffer pH7 was loaded into the protein compartment of the double-sector cell and the solvent compartment was loaded with the protein buffer. Centrifugation was realized at 40,000rpm and 200 radial scans of absorbance at 280nm were taken every minutes. The Sednterp program was used to calculated solvent density (1.0018g/cm) and partial specific volume (0.7268ml/g) from amino acid composition. The sedimentation data were analysed with the program Sedfit.35 Continuous C(s) and c(M) distributions were examined. B) DLS: samples of 150 μ M (filtered on disposable 0.1 μ m filters) were analysed at 20.5°C using DynaPro Nanostar instrument (Wyatt Technology). The data were analysed with Dynamics software (Wyatt Technology)

Overall topology of the native and mutated protein

The sequences of the XCL protein and the double mutant T12C/A38C were aligned using the structural data. The secondary structures are mainly composed of beta strands and explain the very high stability of the protein. The T12C and A38C mutations are localized in the regions involved in the formation of the tetramer and outside or at the end of the beta 1 and beta 3 strands.

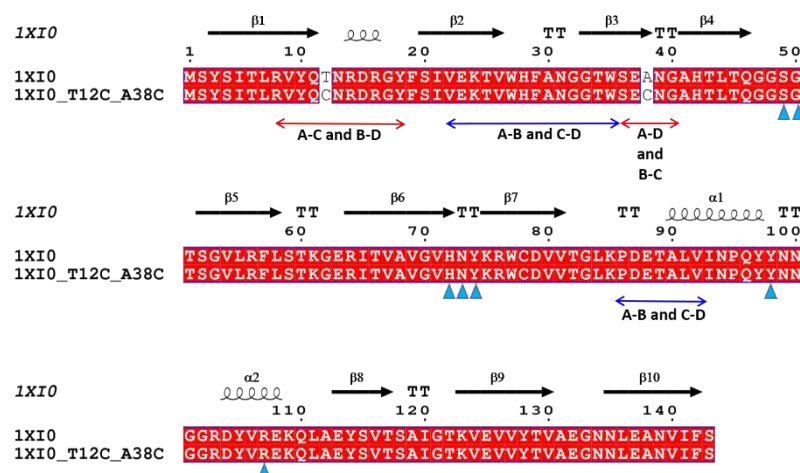


Figure S2: Primary sequence and secondary structures of XCL (1XI0) and the mutant T12C-A38C (1XI0_T12C_A38C). The interfaces of the dimeric assemblies are underline in blue. The interfaces leading to the tetrameric nanocontainer are underline in red. The residues involved in T antigen binding site are indicated (blue triangle). Figure was realized with EndScript¹.

Therefore, these positions do not have a negative impact on the overall stability of the protein. In addition, these two mutations do not interfere with the residues involved in the formation of the T antigen binding site.

(GenBank accession number: AF338359; RCSB Protein Data Bank access code: 1XI0).

Oxidation and reduction conditions

The oxidation of the A38C mutant was tested by DSF in the absence or presence of an oxidizing agent (GSSG-data not shown). The results showed spontaneous and rapid oxidation of the disulfide bridges for this mutant (Fig S3A). Alkylation of cysteines with iodoacetamide after reduction was also analyzed. It was interesting to note that the loops that closed the access to the inner cavity also contributed to the overall stability of the protein since the alkylated protein was less stable than the reduced form. The reduction of disulfide bridges in A38C mutant was tested with different reducing agents (DTT, TCEP, □ME). The effectiveness of the reduction was measured by DSF (Fig S3B). Only DTT allowed to reduced efficiently disulfides bonds of the A38C mutant.

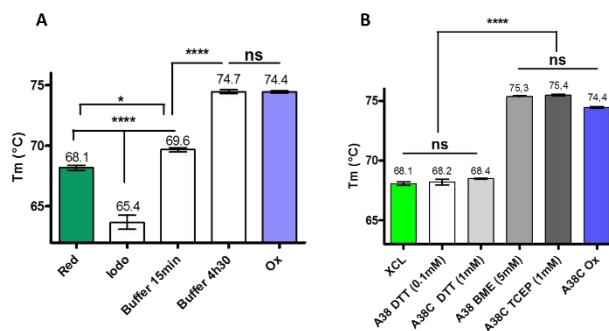


Figure S3: DSF experiments A) Oxidization of reduced A38C in phosphate buffer was analysed at the indicated times. Alkylation of reduced cysteines was also analysed after incubation with iodoacetamide. B) Different reducing compounds were analysed to test their effectiveness on the A38C mutant. DTT: Dithiotreitol; BME: β -mercaptoethanol; TCEP: tris(2-carboxyethyl)phosphine. $n \geq 5$ independent experiments.

Raw data of apparent K_{diss} measurement: Size Exclusion chromatography, FRET and Isothermal Titration Microcalorimetry experiments

The reversible dissociation equilibrium of XCL highlighted by FRET between tetramer and dimer should be shifted to dissociation after dilution and thus allowing the measurement of an apparent global dissociation constant. Equilibrium displacement was assessed by gel filtration chromatography (SEC). At high concentration (10 μ M), XCL displayed an elution volume of 13.2 mL close to the elution volume of BSA as expected for a tetrameric species (Fig S4A). We performed several injections using varying concentrations of XCL and observed the elution of the protein as a single peak. This peak was shifted toward longer elution volumes as the concentration was lowered, indicating a smaller molecular weight. The figure S3B showed the profile obtained in FRET with different concentrations of the FITC-XCL/RITC-XCL mix. Isothermal titration calorimetry (ITC) was used to determine thermodynamic parameters of the tetramer assembly. In this method, a concentrated solution of XCL was diluted into buffer, and the heat of dissociation to dimers was measured (Fig S4C).

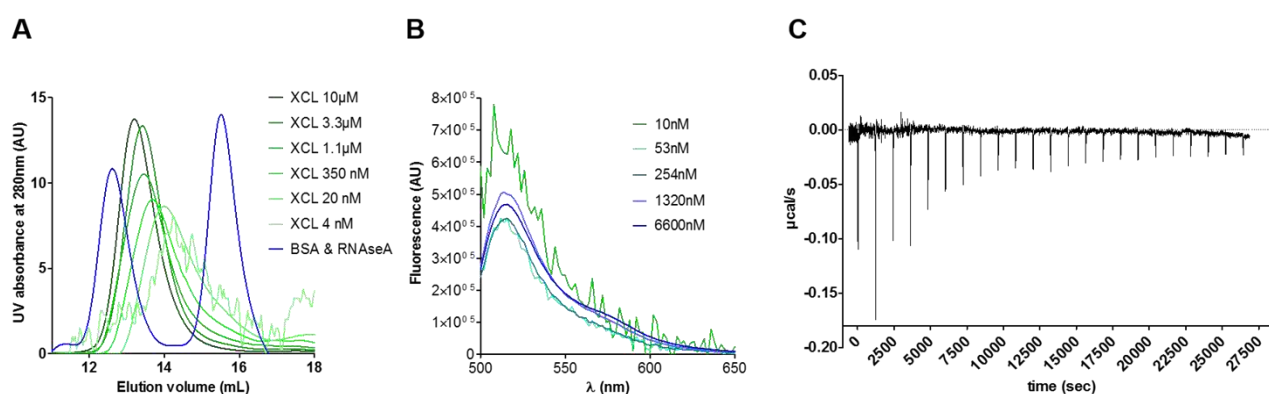


Figure S4: A) SEC was carried out with a concentration range between 10 μ M and 4 nM of XCL. UV absorbance (280 nm) was measured in function of elution volume B) The FITC-XCL/RITC-XCL mix was diluted at different concentrations and incubated 1 hour at room temperature in order to reach steady state. Fluorescence spectra were recorded with a 468 nm excitation light. To visualize all the curves, each fluorescence intensity diluted into buffer, and the heat of dissociation to dimers was measured by ITC.

Acidic behavior of XCL and A38C: Size Exclusion chromatography

We were able to demonstrate the formation of dimers and monomers by SEC carried out at two pH. At pH 7, XCL was eluted in tetrameric form and it was only at pH 4.4 that a dimeric form was detected. Only one experimental condition tested allowed us to highlight the monomeric forms of XCL by the addition of a very low concentration of SDS at pH 4.4 (Fig S5). In a way, it seems that SDS played the role of "lever" to separate dimers in monomers. The same "lever" effect was observed for A38C oxidized which highlighted the dimer formation (Fig S5). As the experience was not carried out under reducing conditions, obviously for this mutant the monomer cannot be generated.

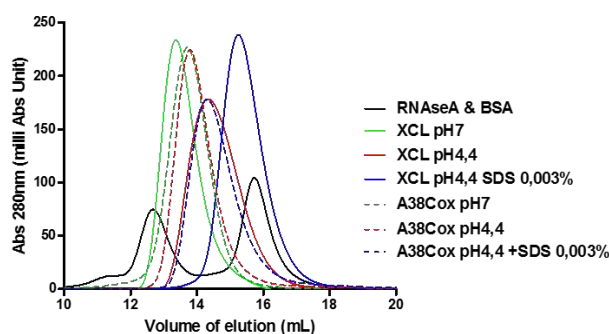


Figure S5: SEC was performed at different pH values with XCL and the A38C oxidized mutant. The monomer was only detected in the presence of 0.003% SDS. BSA (66KDa) and RNase A (13.7KDa) were used as references.

Redox potential of Doxorubicin

The redox potential of doxorubicin (-320mV^2) is in the same range to the one of DTT (-330mV). In presence of DTT as reducing agent, 53% of the nanocontainer was loaded and when the incubation was realized without DTT, a 45% loading rate was reached.

Therefore, doxorubicin was able to reduce itself the disulfide bridges of the A38C nanocontainer but DTT improved the loading rate.

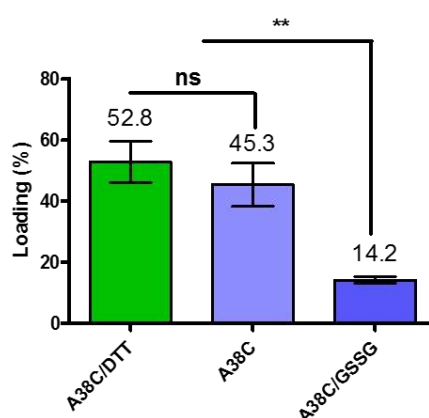


Figure S6: Doxorubicin was incubated for 24h with A38C in presence of DTT (A38C/DTT), with A38C alone (A38C) or in presence of GSSG (A38C/GSSG). $n \geq 5$ independent experiments.

Analysis of cell cycle by FACS

Cell cycle phases were analyzed by FACS after labelling of cells with propidium iodide. We checked the impact of high amount of empty nanocontainer on cell behavior by incubating OVCAR-3 cells with 5.5 μM (350 $\mu\text{g}/\text{ml}$) of empty nanocontainer and the results showed that the nanocontainer did not significantly modify the cell cycle (Fig S7B). Cells were incubated with the A38C-Doxo nanocontainer at 1.6 μM (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Fig S7C) and 5.5 μM (350 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Fig S7D). In these condition cells were mainly blocked in G2/M phase which was characteristic of the doxorubicin effect (compared to the doxorubicin effect alone Fig S7E).

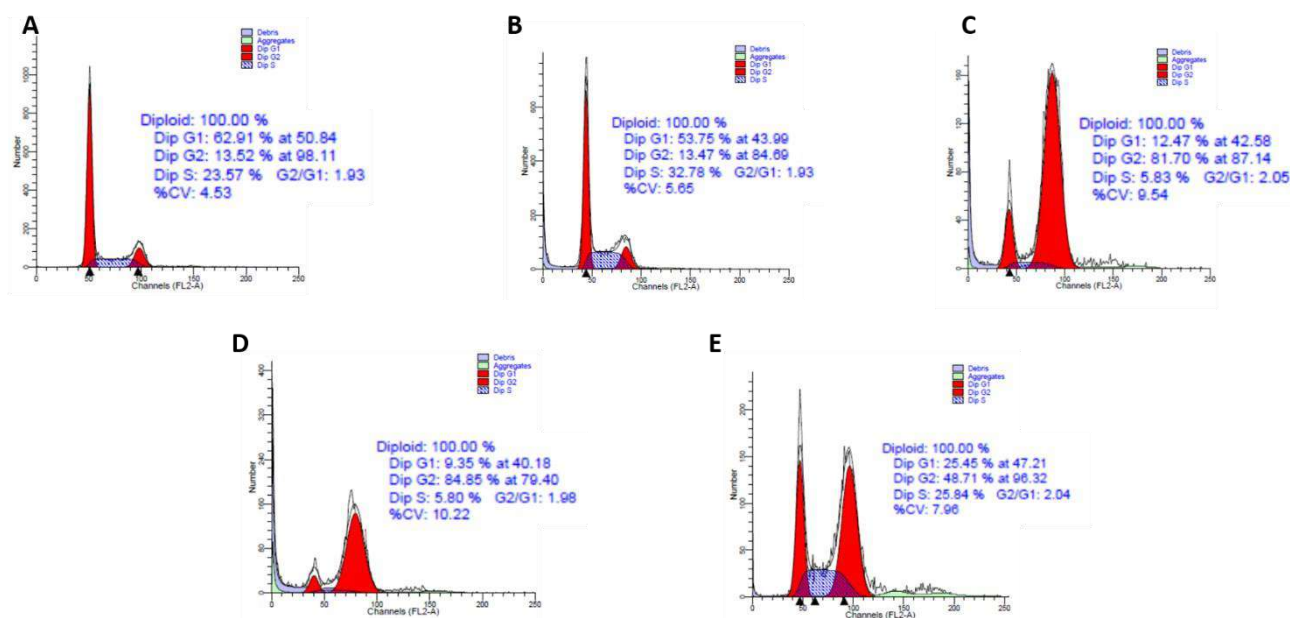


Figure S7: FACS profiles obtained for OVCAR3 cell A) untreated B) incubated with the empty A38C nanocontainer (5.5 μM - 350 $\mu\text{g}/\text{ml}$) C) A38C-Doxorubicine (1.6 μM - 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) D) A38C-Doxorubicine (5.5 μM - 350 $\mu\text{g}/\text{ml}$) E) 1 μM of doxorubicine incubated for 30 min with OVCAR-3 cells before PBS washing. Cells were then cultured 48h more before analysis of cell cycle.

1. X. Robert and P. Gouet, *Nucleic acids research*, 2014, 42, W320-W324.
2. S. Vandewijngaert, M. Swinnen, A. S. Walravens, M. Beerens, H. Gillijns, E. Caluwe, R. E. Tainsh, D. I. Nathan, K. Allen, P. Brouckaert, J. Bartunek, M. Scherrer-Crosbie, K. D. Bloch, D. B. Bloch, S. P. Janssens and E. S. Buys, *Antioxidants & redox signaling*, 2017, 26, 153-164.

3. Docking et Dynamique Moléculaire de 72 molécules thérapeutiques

Le docking (ou amarrage) est une technique de prédiction *in silico* permettant d'estimer l'interaction et la position optimale, c'est-à-dire avec une énergie d'interaction minimale (score), d'une molécule vis-à-vis d'une autre. La dynamique moléculaire quant à elle est une simulation *in silico* permettant de prédire l'évolution au cours du temps de l'interaction entre deux molécules.

Au cours du projet de maturation financé par la SATT-TTT (septembre 2013-mars 2015), qui a fait suite au dépôt de brevet en 2012 sur l'aspect nanocontainer de la lectine, le travail de docking et MD a été réalisé par le Pr. Georges Czaplicki et Alexandre Pocinho (stagiaire M2 Chimie-Santé) de l'équipe de RMN et Biologie intégrative de l'IPBS. L'objectif était d'identifier par ces méthodes des molécules thérapeutiques susceptibles d'être confinées dans la cavité du nanocontainer parmi les 72 molécules thérapeutiques d'intérêt, sélectionnées par des chercheurs et des cliniciens en amont du lancement du projet (société Novoptim). Le docking simple, initialement effectué par la société Ariana Pharmaceuticals, prédisait le meilleur score pour la doxorubicine. Cependant, ce docking ayant été réalisé sans cage de solvation (eau), la question de l'état de protonation de plusieurs molécules a été soulevée. Ce biais, introduit dans le docking d'Ariana, a été corrigé par le Pr. Georges Czaplicki qui a refait le docking et c'est à partir de ces données que la dynamique moléculaire a été réalisée. L'objectif est de déterminer les énergies apparentes d'interactions des molécules criblées avec le nanocontainer pour orienter le confinement expérimental. La MD autorise les molécules à adopter différentes conformations qui n'auraient pas été obtenues par un docking rigide. En effet, à l'état naturel les molécules ainsi que le tétramère possèdent des degrés de liberté qui peuvent modifier leurs interactions. Pour ce faire, des charges partielles ont été appliquées aux ligands (molécules thérapeutiques) pour chaque atome qui les composent avec un jeu de coordonnées associées. Puis, les coordonnées des atomes du ligand sont fusionnées avec celles des atomes du nanocontainer pour former le complexe ligand-nanocontainer. Ce complexe est ensuite mis en présence d'une cage de solvation. L'ensemble est porté à température ambiante (300°K) et le système évolue sur 10 ns avant d'être soumis aux équations de Newton à l'origine de la dynamique (Figure 47).

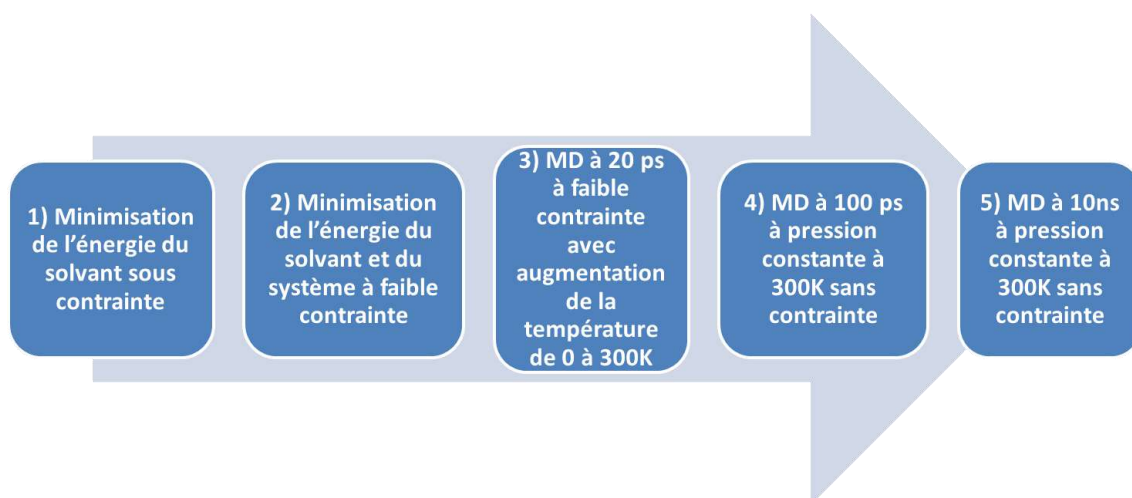


Figure 47 : Les cinq étapes de la *Dynamique Moléculaire* réalisée suite au docking de molécules thérapeutiques.

Les énergies moyennes du ligand, du tétramère et du complexe sont alors calculées sur les 2 dernières nanosecondes de la dynamique et les molécules sont classées en fonction de la valeur DELTA. Ce dernier est calculé de la manière suivante :

$$\text{DELTA} = [\text{énergie du complexe} - (\text{énergie ligand} + \text{énergie XCL})] \quad \text{Eq (1)}$$

La valeur d'un simple DELTA favorise les molécules pouvant interagir avec de nombreux points de contacts dans la cavité du nanocontainer. Il est également possible pour affiner ces résultats de classer les molécules selon la valeur du Ligand Efficiency (LE), qui prend en compte le nombre d'atomes (hors hydrogènes) constituant le ligand :

$$\text{LE} = (-\text{DELTA}) / \text{HAC} \quad \text{Eq (2)}$$

où HAC est Heavy Atom Count.

Enfin, le meilleur compromis retenu a consisté à classer ces molécules selon le Surface Ligand Efficiency (SLE) qui prend en compte la surface que présente la molécule envers les acides aminés bordant la cavité du nanocontainer.

$$\text{SLE} = (-\text{DELTA}) / \text{HAC}^{2/3} \quad \text{Eq (3)}$$

Les scores obtenus en MD ne prennent pas en compte certaines contraintes expérimentales. Si la molécule à confiner est peu ou pas hydrosoluble, la présence de solvant organique peut conduire à la précipitation du nanocontainer et le confinement ne sera pas réalisable. Il a donc été nécessaire de prédire la solubilité des molécules sélectionnées. Pour cela, un critère de solubilité a été établi à partir d'une revue de référence [429] qui propose de prédire la solubilité d'un composé en calculant le Solubility Forecast Factor (SFI), de formule suivante :

$$\text{SFI} = \text{cLogD}_{\text{pH}7,4} + \text{nombre de cycles aromatiques de la molécule} \quad \text{Eq (4)}$$

où cLogD est le log du coefficient de partage entre l'octanol et l'eau à un pH fixé. L'hydrosolubilité prédite des composés est représentée par un code couleur de la manière suivante :

Bonne solubilité < 1 < Solubilité acceptable < 3 < Solubilité très discutabile < 5 < Mauvaise solubilité

Enfin, une des limites de ce système de vectorisation protéique est qu'une fois la molécule transportée aux lysosomes et libérée de la cavité, il faut que son état de protonation à pH acide lui permette de passer la membrane lysosomale pour atteindre le cytoplasme. Ainsi, l'état de protonation à pH4 de plusieurs molécules a été prédit *in silico* (Figure 48).

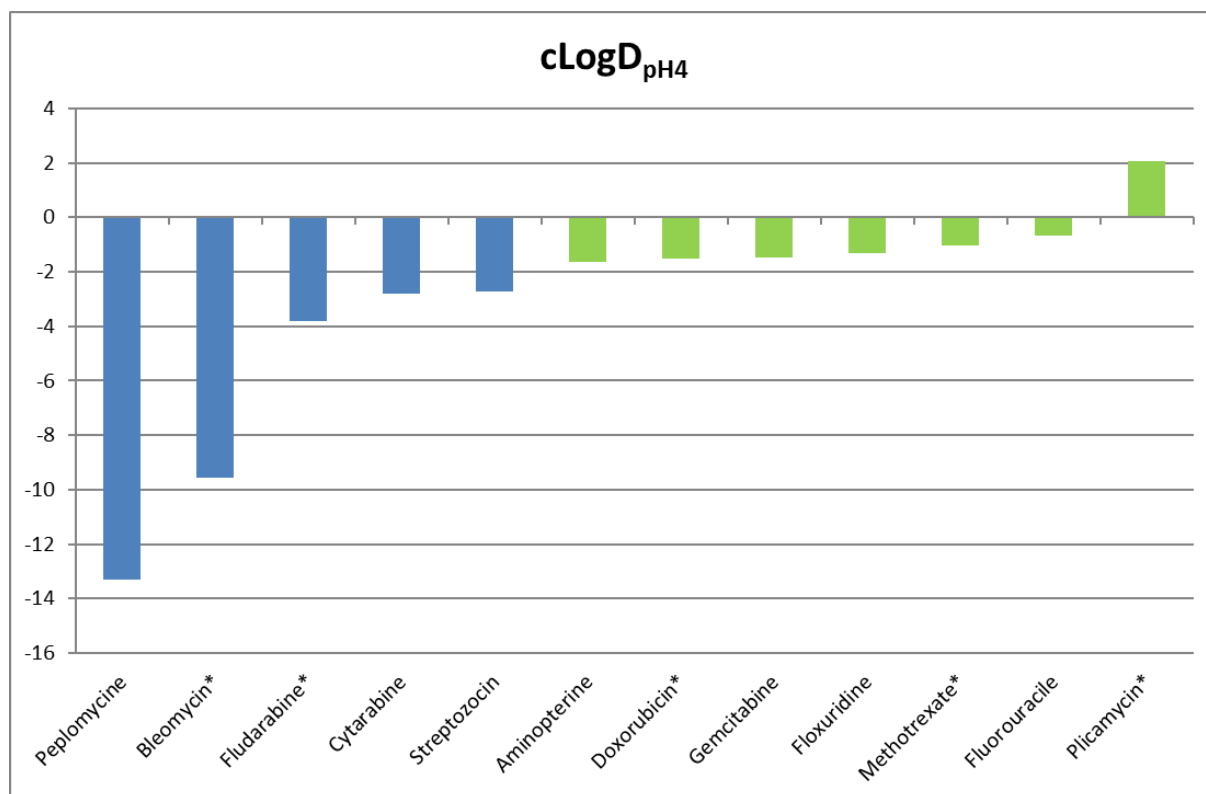


Figure 48 : Etat de protonation de différentes molécules thérapeutiques d'intérêt à pH4. Le cLogD est utilisé pour prédire l'état de protonation des molécules à pH4, soit le pH des lysosomes dans lesquels ces molécules seront relarguées après délivrance cellulaire. vert : molécules qui pourront passer la membrane lysosomale ; bleu : incertitude sur le passage de la membrane lysosomale; *molécules testées in vitro.

Il est admis qu'un $cLogD_{pH4} \geq -2$ implique que l'état de protonation de la molécule lui permettra de passer la membrane lysosomale une fois relarguée par le nanocontaineur, comme c'est décrit pour la doxorubicine ($cLogD_{pH4} = -1,52$) [430]. Lorsque $cLogD_{pH4}$ est inférieur à -2 le doute subsiste et le seul moyen de savoir si ces molécules pourront se retrouver dans le cytoplasme des cellules ciblées est de tester directement un confinement dans le nanocontaineur *in vitro* en évaluant la viabilité cellulaire.

En conclusion, les 72 molécules issues du docking d'Ariana ont donc été passées en dynamique moléculaire, puis leur solubilité a été prédite ce qui a permis de générer le classement présenté Figure 49.

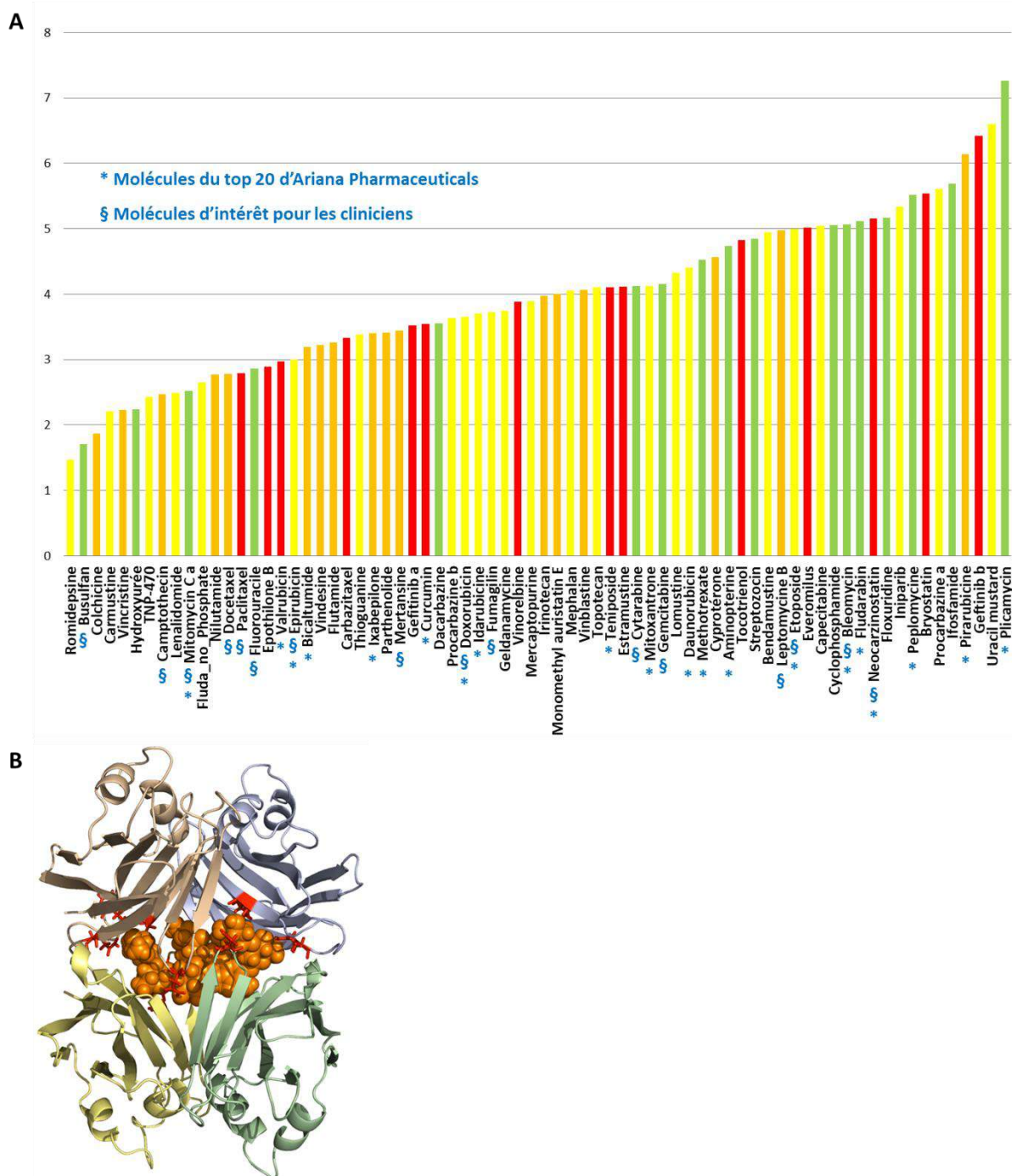


Figure 49 : Prédictions *in silico* du confinement de 72 molécules thérapeutiques par docking et dynamique moléculaire.

(A) Classement des molécules en fonction du score de Surface Ligand Efficiency (SLE), et des calculs de prédiction de solubilité.
Code couleur :

Bonne solubilité < 1 < **Solubilité acceptable** < 3 < **Solubilité très discutable** < 5 < **Mauvaise solubilité**

Les molécules qui avaient les 20 meilleurs scores à la sortie du Docking sont repérées par une *, et les molécules d'intérêt pour les cliniciens par un §.

(B) Représentation par le logiciel pymol du confinement de la mithramycine A ou plicamycine (meilleur score SLE) dans la cavité du nanocontainer A38C. Plicamycine : orange, contacts persistant entre la molécule et les chaînes latérales d'acides aminés des 4 monomères d'A38C : rouge, monomères A / B / C / D respectivement marron, bleu, jaune et vert.

4. Délivrance ciblée de molécules thérapeutiques par le nanocontainer dans un modèle cellulaire du cancer épithélial ovarien

a) Modèle cellulaire de cancer épithélial ovarien en culture 2D

Dans un premier temps, pour évaluer l'efficacité *in cellulo* de la délivrance ciblée de plusieurs molécules thérapeutiques par le nanocontainer, un modèle cellulaire devait être établi. Le marqueur protéique standard approuvé par la FDA dans le cadre des EOC est la Mucine 16, ou sa forme circulante après protéolyse à la membrane des cellules, le CA125. Ces glycoprotéines membranaires sont surexprimées dans les carcinomes et vont présenter le glycotope (antigène TF) reconnu par le nanocontainer. Pour rappel, celui-ci est démasqué à la surface de 90% des cellules épithéliales tumorales et peu ou pas exprimé par les épithélia sains. Nous avons donc choisi le cancer épithélial ovarien pour établir la preuve de concept de l'efficacité de cette nanovectorisation.

Il semblait pertinent de mettre au point un modèle basé sur des taux d'expression différents de l'antigène TF à la membrane de différentes lignées cellulaires. Nous avons utilisé des compétiteurs bloquant la liaison du nanocontainer aux cellules en tant que contrôle négatif dans cette étude. Ce type d'expérience avait déjà été effectué antérieurement avec du lactose [67]. Nous avons ici choisi la fétuine (protéine portant l'antigène TF) comme compétiteur car elle présente une affinité plus forte pour le nanocontainer (1,7 μ M). Ainsi, en présence de fétuine, le nanocontainer n'est pas endocyté et donc la molécule transportée n'est pas délivrée (Figure 7B, article Nanoscale).

Les cellules OVCAR-3, chimiorésistantes, ont été établies à partir d'ascites provenant d'une patiente atteinte d'un EOC séreux de haut grade qui a reçu une combinaison de chimiothérapies [431]. L'expression membranaire de la Mucine 16 est décrite pour ces cellules [272]. Pour commencer, nous voulions établir la présence du glycotope (antigène TF) sur cette glycoprotéine. Avec l'aide du Dr. Vincent Ecochard (IPBS), un shRNA ciblant le gène de la Mucine 16 a été incorporé dans l'ADN de ces cellules inhibant ainsi l'expression de MUC16. Ces cellules vont aussi exprimer de manière constitutive le gène de la GFP qui fait office de gène rapporteur de l'intégration du plasmide contenant le shRNA dans le génome des cellules OVCAR-3. La perte de l'expression a été vérifiée par immunofluorescence et imagerie confocale. Le signal de l'anticorps monoclonal anti-MUC16 n'est plus perceptible à la membrane des OVCAR-3 shRNA MUC16 GFP (OVCAR-3 shMUC16) (Figure 50A).

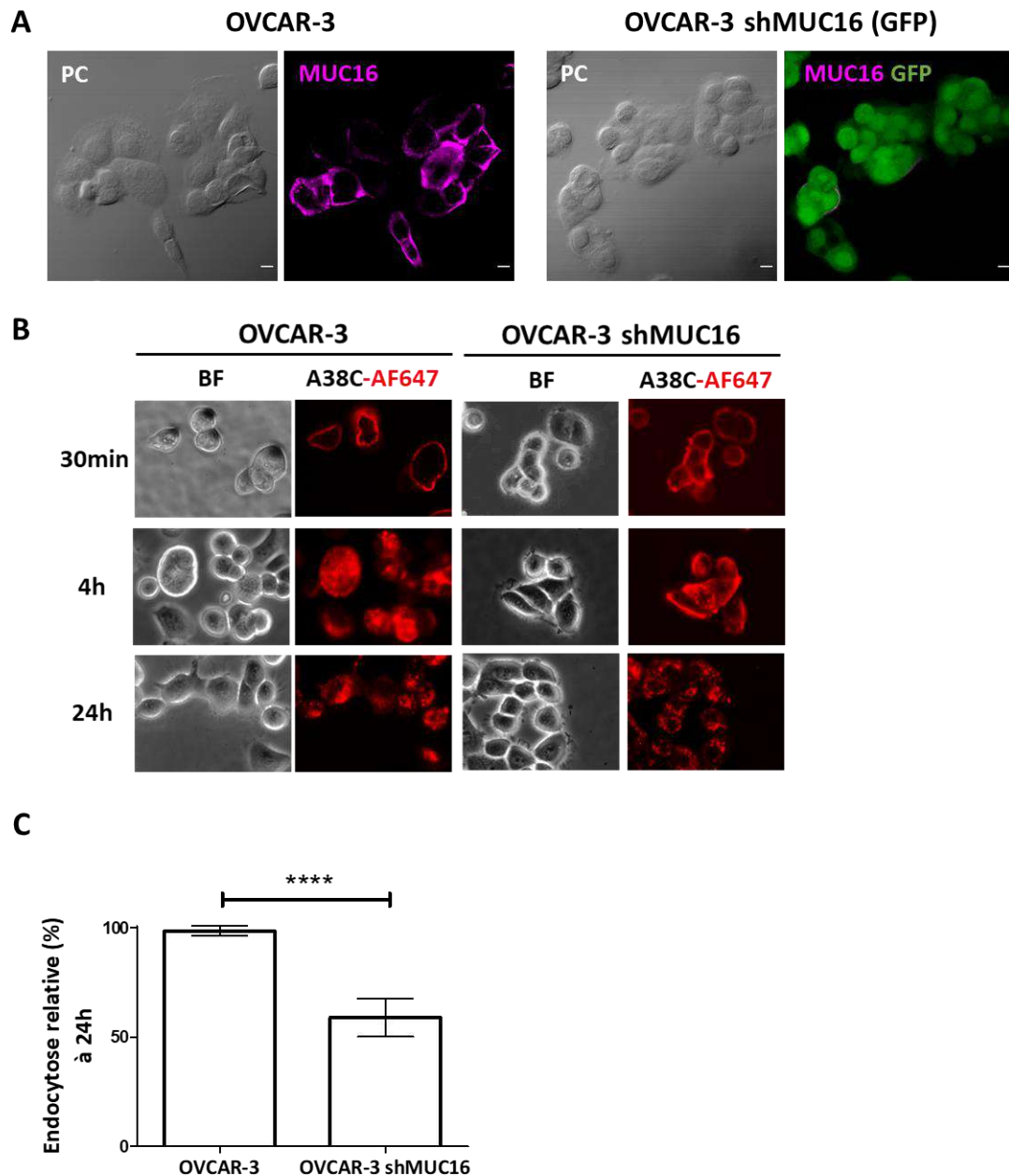


Figure 50 : Validation de la perte d'expression de la Mucine 16 par les cellules OVCAR-3 shMUC16, Cinétique d'entrée du nanocontainer et quantification de l'endocytose. (A) Immunofluorescence sur cellules fixées et incubées avec un anticorps monoclonal anti-MUC16 (Ov185:1) pendant 3h, puis avec un anticorps secondaire (couplé à un alexa fluor 405) pendant 30 minutes. Les images ont été acquises à l'objectif x40 sur un microscope confocal Olympus FV-1000. Le bruit de fond des images a été retiré avec le plugin PureDenoise du logiciel Fiji et de manière identique pour toutes les acquisitions. PC : Phase Contrast ; MUC16 (magenta) ; GFP (vert). Les images sont alignées sur la même dynamique de fluorescence et analysées avec le logiciel ImageJ. Barres de taille : 10µm. **(B) Visualisation de la cinétique d'entrée.** Les cellules sont incubées avec 160nM d'A38C-alexa647 (rendement de marquage = 1,2 mole dye/mole tétramère) pendant les durées indiquées. Microscopie de fluorescence avec un Cy5 TET filtercube. Les images sont alignées sur la même dynamique de fluorescence et analysées avec le logiciel ImageJ. BF : Bright Field. X63 **(C) Quantification de l'endocytose.** Les cellules sont incubées pendant 24h avec 160nM d'A38C-alexa647, et l'intensité de fluorescence est mesurée en FACS. Les données sont exprimées en fonction des valeurs obtenues pour les cellules OVCAR-3. n=5 expérimentations indépendantes. Analyse statistique t-test ****p<0.0001.

L'endocytose d'A38C dans les cellules OVCAR-3 et OVCAR-3 shMUC16 a été évaluée qualitativement en microscopie de fluorescence sur cellules vivantes et quantitativement en FACS (Figure 50 B et C). Pour ces deux méthodes, la protéine A38C marquée dans le NIR (alexa647) a été utilisée. Concernant la cinétique d'entrée sur les cellules OVCAR-3, après 30 minutes d'incubation le signal d'A38C-alexa647 est membranaire. Il devient vésiculaire (cytoplasme) au bout de 4h, puis finalement vésiculaire et périnucléaire après 24h. Sur les cellules OVCAR-3 shMUC16, un décalage dans la cinétique d'entrée du nanocontainer est observé puisqu'au bout de 4h d'incubation le signal membranaire subsiste et commence à apparaître dans des vésicules cytoplasmiques. Même si après 24h, le signal du nanocontainer est également vésiculaire et périnucléaire dans ces cellules. La quantification de l'entrée d'A38C-alexa647 réalisée en cytométrie en comparant les deux types cellulaires a permis de mettre en évidence qu'environ 40% de l'antigène TF reconnu par A38C est porté par la Mucine 16 sur les cellules OVCAR-3. Cela signifie que la majeure partie du glycotope est portée par d'autres mucines ou d'autres glycoprotéines s'apparentant aux mucines à la membrane des adénocarcinomes.

Pour faire en sorte d'être le plus représentatif possible de la diversité des cancers ovariens, deux autres lignées cellulaires ont également été étudiées : les SKOV-3 et les IGROV-1. Les cellules SKOV-3 proviennent de la tumeur d'une patiente atteinte d'un EOC séreux et ayant reçu une chimiothérapie à base d'agents alkylants [432,433]. Contrairement aux cellules OVCAR-3, les cellules SKOV-3 n'expriment pas la Mucine 16 [434]. Les cellules IGROV-1 sont elles considérées comme naïves puisqu'elles sont issues d'une patiente qui n'avait pas reçu de chimiothérapie et sont décrites comme un mélange de plusieurs types histologiques d'EOC [435,436]. L'expression de la Mucine 16, n'est pas décrite pour les cellules IGROV-1, nous avons donc commencé par réaliser des immunofluorescences pour déterminer si ces cellules expriment le biomarqueur protéique des EOC en prenant les cellules OVCAR-3 et SKOV-3 comme contrôles respectivement positif et négatif. Après un premier marquage avec l'anticorps primaire anti-MUC16, l'A38C-alexa647 a été ajouté en même temps que l'anticorps secondaire (marqué alexa fluor 488) révélant le marquage anti-MUC16 (Figure 51). Parmi les trois types cellulaires, les cellules OVCAR-3 sont les seules positives au marquage de la Mucine 16. En revanche, le nanocontainer marqué dans le NIR a révélé l'expression de l'antigène TF sur les 3 types cellulaires. Des zones de colocalisation du double marquage MUC16/A38C-alexa647 sont visibles à la membrane des cellules OVCAR-3. Certaines zones uniquement marquées par A38C-alexa647 ont également été mises en évidence. Ces données nous permettent d'affirmer que le nanocontainer reconnaît son marqueur glycosidique à la membrane d'adénocarcinomes ovariens indépendamment de l'expression de la Mucine 16. Ainsi, A38C est capable de marquer un plus grand panel de cellules cancéreuses ovariennes que l'anticorps monoclonal dirigé contre la Mucine 16. Ce marqueur protéique est donc

moins représenté que le glycotope des carcinomes, l'antigène TF reconnu par A38C, à la surface de cellules épithéliales cancéreuses ovariennes.

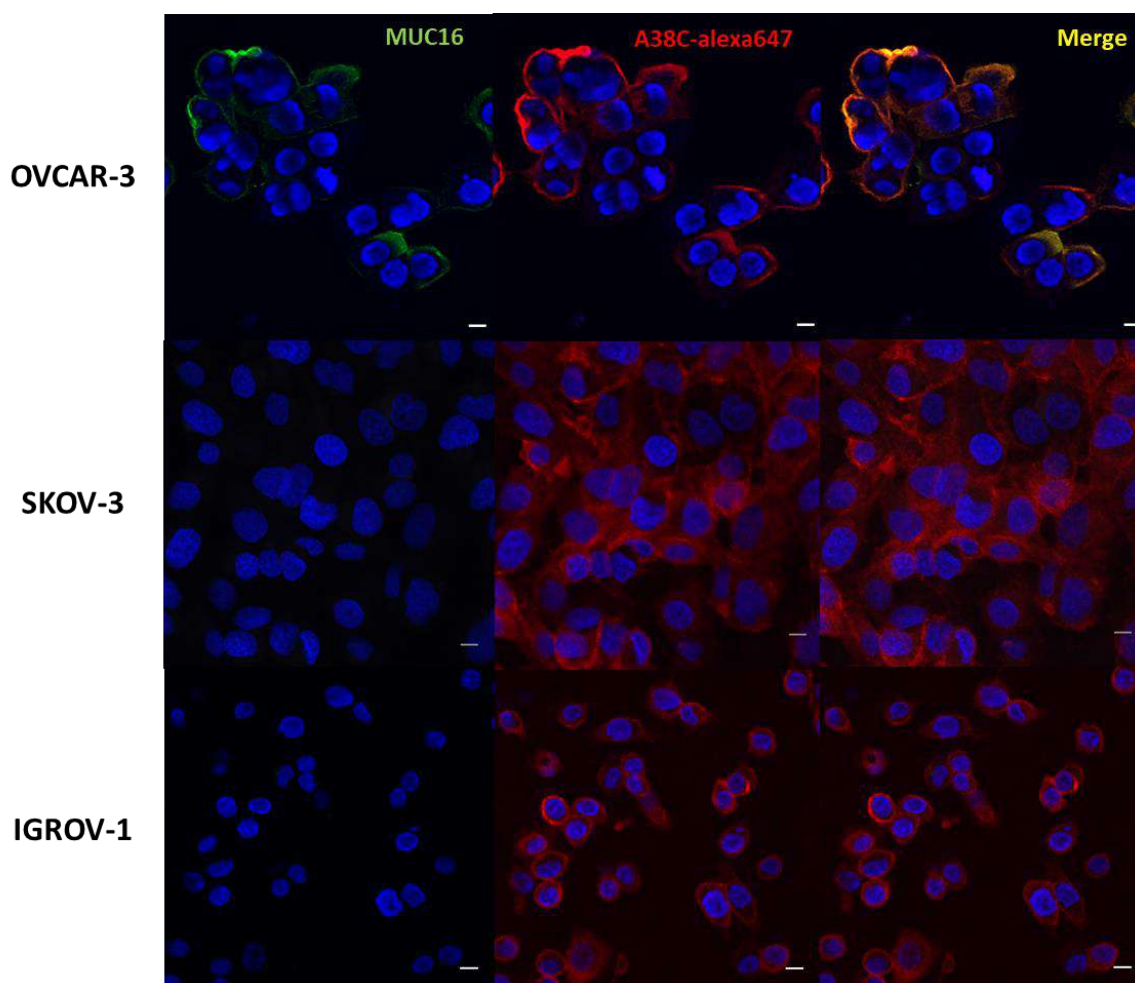


Figure 51 : Détection de l'antigène TF par A38C-alexa647 indépendamment de l'expression de MUC16. Les cellules sont incubées avec un anticorps monoclonal anti-MUC16 (Ov185:1). L'anticorps secondaire (marqué à l'alexa fluor 488) et A38C-alexa647 ont été incubés au même moment avec les cellules. Les noyaux ont été marqués au DAPI. Marquage MUC16 seul en vert ; Marquage A38C-alexa647 seul en rouge ; Double marquage dans la colonne Merge. Les images ont été acquises à l'objectif x40 sur un microscope confocal Olympus FV-1000. Le bruit de fond des images a été retiré avec le plugin PureDenoise du logiciel Fiji de manière identique pour toutes les acquisitions. Ces images sont représentatives de 2 expérimentations indépendantes. Barres de taille : 10µm.

De la même manière que pour les cellules OVCAR-3 et OVCAR-3 shMUC16, les cellules SKOV-3 et IGROV-1 ont été caractérisées pour la cinétique d'entrée du nanocontainer et la quantification de l'endocytose compte-tenu de leur taux d'expression de l'antigène TF (Figure 52 A et B). Concernant la cinétique, un marquage membranaire, plus faible que sur les OVCAR-3, est visible après 30 minutes d'incubation du nanocontainer sur les cellules SKOV-3, alors que les cellules IGROV-1 ne sont pas encore marquées. Au bout de 4h, le marquage membranaire est visible sur les deux types cellulaires, et est plus intense sur les cellules SKOV-3. A 24h, le marquage d'A38C-alexa647 est périnucléaire et vésiculaire pour toutes les lignées. Ainsi, pour une même quantité d'A38C-alexa647, ces données suggèrent différents taux d'expression du glycotope à la surface de ces cellules. La quantification de l'endocytose en FACS est faite après 24h d'incubation. Des différences significatives indiquent que les

cellules OVCAR-3 sont celles qui endocytent le plus de nanocontainer, donc celles qui expriment le plus haut taux d'antigène TF. Elles sont suivies par les cellules SKOV-3 qui présentent 60% d'antigène TF en moins, et les cellules IGROV-1 qui n'expriment que 30% de glycotope comparées aux cellules OVCAR-3. Les décalages observés pour la cinétique d'entrée d'A38C-alexa647 sont donc bien corrélés à des différences d'expression de marqueur à la membrane de chaque type cellulaire. Une expérience de dose-réponse a aussi été effectuée sur ces trois types cellulaires de manière à obtenir des constantes de dissociation apparente et des valeurs de B_{max} pour mieux caractériser l'interaction entre le nanocontainer et son biomarqueur glycosidique lorsqu'il est présenté à la surface des adénocarcinomes (Figure 52C).

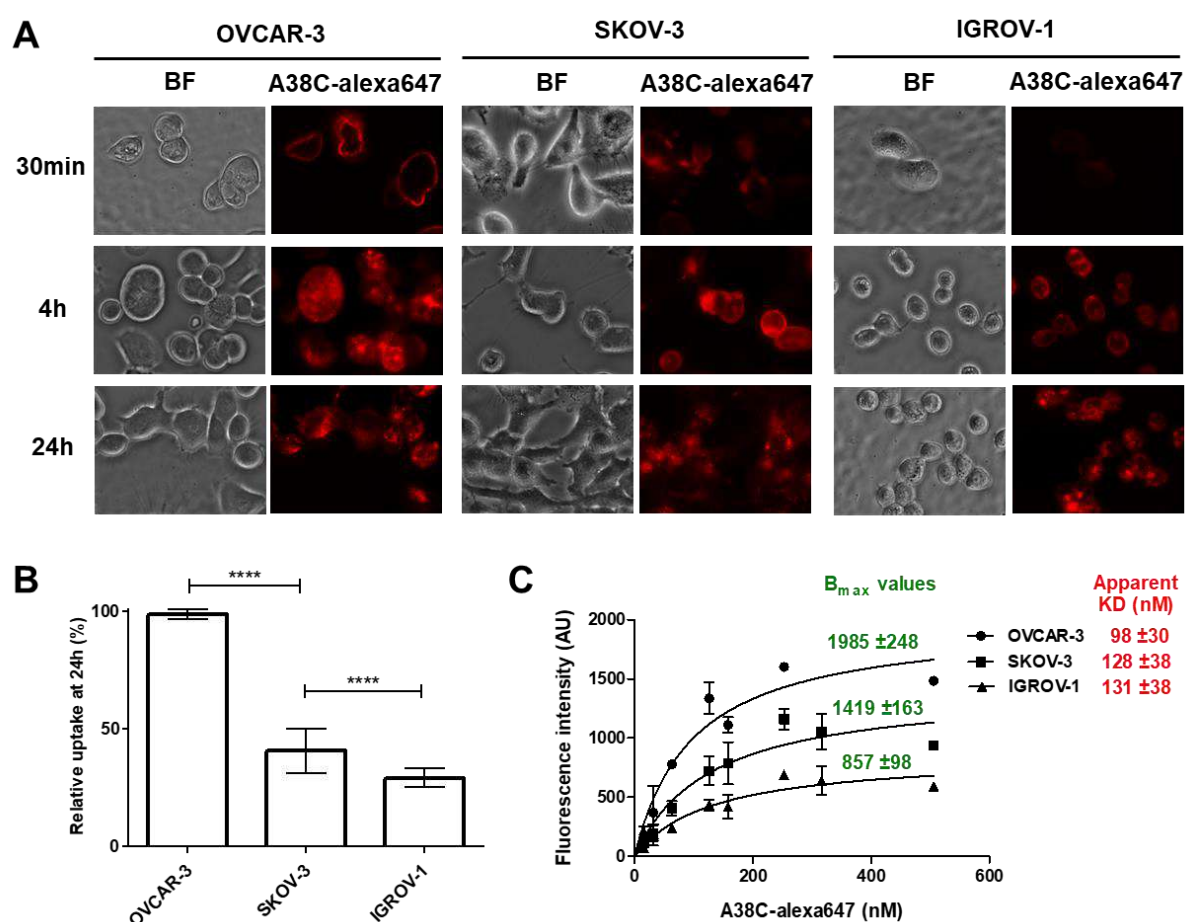


Figure 52 : Caractérisation de la cinétique d'endocytose d'A38C-alexa647 dans des lignées cellulaires de cancers ovariens.
(A) Visualisation de la cinétique d'entrée d'A38C-alexa647. Les cellules sont incubées avec 160nM d'A38C-alexa647 (rendement de marquage = 1,2 mole dye/ mole tétramère) pendant les durées indiquées. Microscopie de fluorescence avec un Cy5 TET filtercube. Les images sont alignées sur la même dynamique de fluorescence et analysées avec le logiciel ImageJ. BF : Bright Field. X63 **(B) Quantification de l'endocytose.** Les cellules sont incubées pendant 24h avec 160nM d'A38C-alexa647, et l'intensité de fluorescence est mesurée en FACS. Les données sont exprimées en fonction des valeurs obtenues pour les cellules OVCAR-3. n=5 expérimentations indépendantes en triplicata. Analyse statistique : ****p<0.0001. **(C) Evaluation des KD apparents et valeurs de Bmax.** Les cellules sont incubées 6h à 37°C avec différentes concentrations d'A38C-alexa647 (16, 32, 63, 126, 160, 253, 320 et 510 nM) et l'intensité de fluorescence est mesurée en FACS. Les valeurs de KD et Bmax ont été obtenues avec une régression non linéaire réalisée avec le logiciel Prism. n=3 expérimentations indépendantes.

Trois informations importantes sont ressorties de cette expérience. Tout d'abord, la régression non linéaire appliquée aux données obtenues indique une saturation du signal A38C-alexa647 après 6h d'incubation ce qui démontre la spécificité de l'interaction. En effet, la saturation observée indique que tous les dissacharides (antigène TF) portés par différentes glycoprotéines membranaires ont été reconnus par A38C-alexa647. Lorsqu'une interaction n'est pas spécifique, la saturation n'est pas observée. Par ailleurs, la régression nous a permis d'obtenir les KD apparents et les valeurs de B_{\max} pour chaque type cellulaire. Les KD apparents sont tous autour de 100 nM ce qui prouve que le nanocontainer reconnaît le même glycotope à la membrane des différentes cellules. De plus, les valeurs obtenues ici sont quatre fois plus basses, donc meilleures, que celles obtenues dans les expériences d'ITC (voir Introduction partie I.3.c, 400 nM). Un facteur déterminant pour cette augmentation d'affinité est sans doute la détection de l'antigène TF par le nanocontainer sur des clusters de glycoprotéines contrairement aux expériences d'ITC réalisées *in vitro* sur des ligands beaucoup plus simples. Les différences obtenues entre les trois types cellulaires pour les valeurs de B_{\max} sont du même ordre de grandeur que les différences de taux d'endocytose et sont donc dues à la variabilité d'expression du glycotope sur les protéines qui le présentent à la membrane de chaque type cellulaire.

b) Délivrance ciblée de molécules thérapeutiques

Le nanocontainer A38C possède certaines propriétés intrinsèques (affinité pour un biomarqueur, cavité, possibilité de marquage dans le NIR) faisant de lui un système de vectorisation très attractif. Cependant, certains paramètres sont limitant pour le confinement d'une molécule dans cette nanocage protéique et sa délivrance aux cellules cibles. En premier lieu, la molécule doit présenter une affinité pour les chaînes latérales d'acides aminés bordant la cavité du tétramère et cette affinité doit être supérieure à celle que pourrait avoir la molécule pour l'extérieur du nanocontainer. Il est aussi nécessaire de trouver les bonnes conditions expérimentales (parfois molécule dépendante) pour réaliser le confinement. Enfin, l'état de protonation de celle-ci doit lui permettre de passer la membrane lysosomale, or en dehors des prédictions faites *in silico*, il est impossible de s'en assurer expérimentalement de manière simple. Ainsi, seuls les effets sur la viabilité et/ou le cycle cellulaire permettent de voir si la molécule a pu exercer son effet cytotoxique.

• Délivrance de doxorubicine dans le modèle cellulaire

La preuve de concept de la délivrance cellulaire ciblée de doxorubicine par le nanocontainer, décrite dans l'article publié dans Nanoscale, peut être complétée par les résultats obtenus sur les deux autres types cellulaires du modèle. L'évaluation de la viabilité cellulaire chez ces deux autres lignées (SKOV-3 et IGROV-1, respectivement Figure 53A et B) a été réalisée en présence de seulement 2 concentrations

de nanocontainer chargé. La régression non linéaire appliquée aux données (logiciel GOSA, [437]) n'a pas permis de générer des EC_{50} pour ces cellules (3 expériences indépendantes mais pas assez de concentrations en nanocontainer chargé incubé avec les cellules). Sachant que les cellules SKOV-3 expriment moins d'antigène TF que les cellules OVCAR-3, pour une concentration équivalente en nanocontainer chargé (1,6 μ M), les résultats obtenus sont logiques puisqu'il reste 30 % de cellules OVCAR-3 contre 50% de cellules SKOV-3. Concernant les cellules IGROV-1, les résultats sont plus surprenants puisqu'elles sont presque aussi sensibles au traitement que les cellules OVCAR-3 alors qu'elles expriment 70% de glycotope en moins. En regardant les effets sur le cycle cellulaire (Figure 53C), pour 1,6 μ M de nanocontainer chargé (soit 0,8 μ M de doxorubicine, taux de chargement 50%), le pourcentage de cellules en phase G2/M est équivalent pour les cellules OVCAR-3 et IGROV-1, indiquant que la même proportion de cellules est bloquée dans la progression du cycle cellulaire pour une mortalité équivalente. Les cellules SKOV-3 ont un pourcentage en phase G2/M légèrement inférieur à celui des 2 autres lignées, en présence de 1,6 μ M de nanocontainer chargé, sachant qu'il y a plus de cellules en phase G1 dans le contrôle que pour les deux autres lignées.

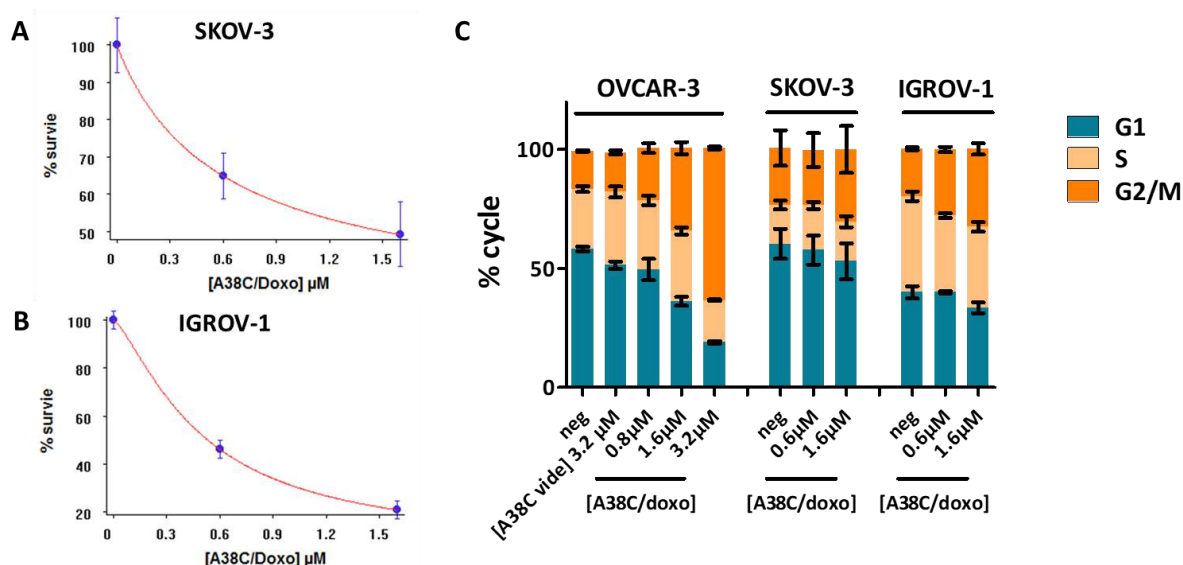


Figure 53 : Délivrance ciblée de doxorubicine dans 3 lignées d'adénocarcinomes ovariens humains. Après synchronisation à l'hydroxyurée, les cellules (A) SKOV-3 et (B) IGROV-1 sont cultivées pendant 24h en présence de 2 concentrations de nanocontainer chargé (0,6 μ M et 1,6 μ M) en doxorubicine (50% de chargement), puis récupérées, 48h après avoir enlevé les confinements du milieu de culture, et comptées pour évaluer la viabilité cellulaire. (C) Les cellules encore vivantes après 24+48h sont incubées avec de l'iodure de propidium puis passées en FACS pour visualiser le cycle cellulaire. Les résultats obtenus avec les cellules OVCAR-3 ont simplement été reportés ici pour pouvoir comparer les décalages du cycle avec les deux autres lignées cellulaires. [A38C/doxo] : concentrations du nanocontainer chargé ; [A38C vide] : concentration du nanocontainer non chargé; neg: cellules contrôles avec rinçages PBS et changement de milieu après 24h de culture, au même moment que pour les cellules incubées avec le confinement. n= 3 expérimentations indépendantes.

Une explication possible aux données obtenues avec les cellules IGROV-1 est la différence marquée entre les temps de dédoublement de ces deux types cellulaires (cf matériels et méthodes). En effet, les cellules OVCAR-3 vont se dédoubler en presque 70h, alors que les IGROV-1 ne mettent qu'environ 20h. Il y aura donc eu plus de 3 divisions cellulaires pour les cellules IGROV-1 contre seulement une

pour les cellules OVCAR-3 en 72h d'expérience. Compte-tenu du mode d'action de la doxorubicine qui va bloquer la topoisomérase II et donc la réplication du matériel génétique au moment de la division cellulaire, et bien que les IGROV-1 expriment beaucoup moins le marqueur reconnu par le nanocontainer que les OVCAR-3, il est possible que l'effet final sur la viabilité soit le même lors de la délivrance de la doxorubicine.

- **Délivrance de mithramycine A**

La mithramycine A (MTM), aussi appelée plicamycine, est un antibiotique naturel produit par l'espèce *Streptomyces plicatus* [438] qui va se lier à des séquences riches en GC sur l'ADN au niveau de sites de liaison de facteurs de transcription, inhibant ainsi l'expression de certains gènes [439]. La MTM est une molécule soluble qui avait donné le meilleur score SLE en dynamique moléculaire (Figure 49) et dont l'état de protonation à pH acide suggère qu'elle puisse passer la membrane lysosomale (Figure 48). Le confinement de la MTM dans le nanocontainer est effectué à pH 7.2 et en présence de DTT, et le taux de confinement est évalué en spectrophotométrie à 280nm pour la protéine et 405nm pour la MTM. Celui-ci varie entre 85 et 100%, il y a donc une molécule de MTM par tétramère d'A38C. Le nanocontainer chargé en MTM a été incubé à différentes concentrations avec les cellules OVCAR-3 et SKOV-3 et les effets sur la viabilité et le cycle cellulaire ont été évalués.

Les viabilités cellulaires permettent d'estimer un EC_{50} pour le nanocontainer chargé en MTM sur ces 2 types cellulaires (Figure 54A et B). Une comparaison aux résultats décrits sur les mêmes cellules avec le confinement de la doxorubicine (OVCAR-3 ; $EC_{50} = 979$ nM) indique que la délivrance de MTM est bien plus efficace puisque l' EC_{50} est presque 50 fois plus bas. Sur les cellules SKOV-3, l' EC_{50} est du même ordre de grandeur que sur les cellules OVCAR-3, pourtant les cellules OVCAR-3 expriment 60 % d'antigène TF en plus que les cellules SKOV-3. De la même manière que précédemment, il est possible que la différence marquée entre les temps de dédoublement de ces deux types cellulaires explique ces résultats (25h pour les cellules SKOV-3 contre 67h pour les cellules OVCAR-3). Le pourcentage de cellules en phase G2 du cycle est très marqué avec la délivrance ciblée de MTM à des concentrations en nanocontainer chargé bien plus faibles qu'avec le confinement doxorubicine (Figure 54C). Encore une fois celui-ci est plus important sur les cellules OVCAR-3 que sur les cellules SKOV-3. La MTM est donc une molécule très prometteuse pour les futurs développements *in vivo* de cette thérapie ciblée puisqu'en plus d'être soluble et de présenter une affinité importante pour des chaînes latérales d'acides aminés de la cavité présents sur les 4 monomères du nanocontainer, elle passe sans problème la barrière lysosomale et les doses nécessaires pour induire une cytotoxicité conséquente sont faibles.

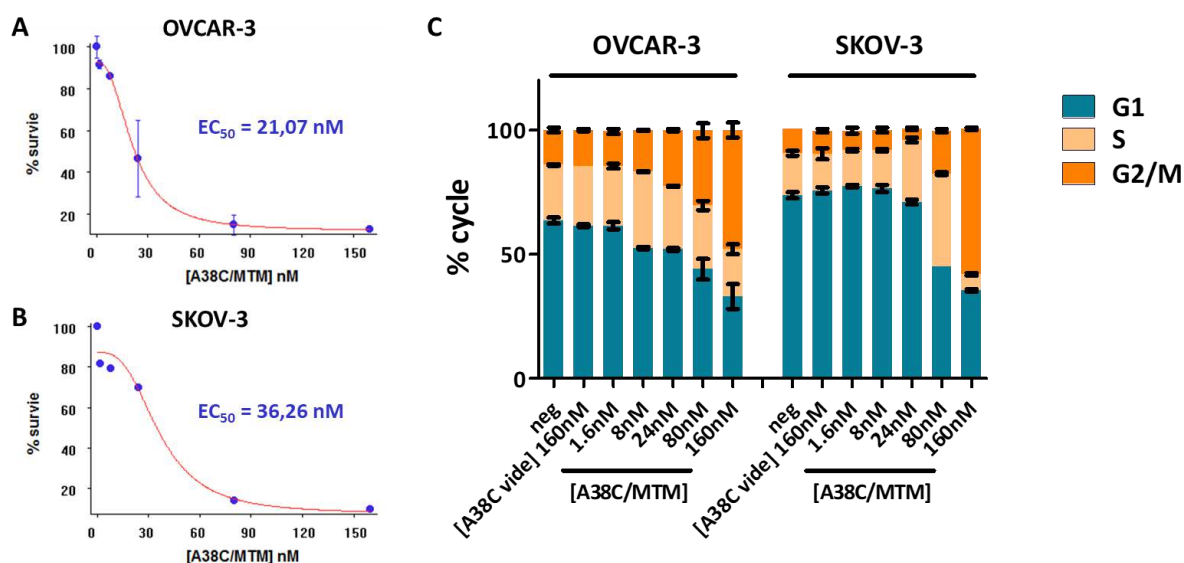


Figure 54 : Délivrance ciblée de mithramycine A (MTM) dans 2 lignées d'adénocarcinomes ovariens humains. Après synchronisation à l'hydroxyurée, les cellules **(A) OVCAR-3** et **(B) SKOV-3** sont cultivées pendant 24h en présence de plusieurs concentrations de nanocontainer chargé (0,6 ; 8 ; 24 ; 80 et 160nM) en MTM (85-100% de chargement), puis passées à la trypsine 48h après avoir enlevé les confinements du milieu de culture, et comptées pour évaluer la viabilité cellulaire. Les données ont été analysées avec le logiciel GOSA. **(C)** Les cellules encore vivantes après 24 + 48h sont incubées avec de l'iodure de propidium puis passées en FACS pour visualiser le cycle cellulaire. [A38C/MTM] : concentration du nanocontainer chargé ; [A38C vide] : concentration du nanocontainer non chargé; neg: cellules contrôles avec rinçages PBS et changement de milieu après 24h de culture, au même moment que pour les cellules incubées avec le confinement. $n = 3$ (OVCAR-3) et 2 (SKOV-3) expérimentations indépendantes.

• Autres molécules thérapeutiques

Beaucoup de conditions différentes ont été testées pour mettre au point un protocole de confinement simple et reproductible : variation du pH pour la déstabilisation du tétramère et présence ou non de sel dans le mélange nanocontainer/molécules à confiner. Il n'a pas été possible d'évaluer le taux de confinement de plusieurs molécules testées de manière simple, comme c'était le cas pour la doxorubicine ou la MTM (spectrophotométrie). Dans ces cas-là, l'efficacité des confinements a été évaluée directement *in vitro* sur les cellules OVCAR-3 en analysant les effets sur la viabilité et le cycle cellulaire. En plus de la doxorubicine et la MTM, trois autres molécules thérapeutiques ont été évaluées en confinement et délivrance cellulaire.

Bléomycine

La bléomycine est un glycopeptide antibiotique naturel extrait de *Streptomyces verticillus*. Cette molécule va inhiber la synthèse d'ADN et donc la réplication induisant un blocage en phase G2/M du cycle cellulaire [440,441]. La bléomycine a été confinée dans le nanocontainer sans estimer son taux de confinement. Deux expériences de délivrance *in vitro* ont été réalisées sur les cellules OVCAR-3 avec évaluation de la viabilité et du cycle cellulaire (Figure 55A et C). L' EC_{50} obtenu est du même ordre de grandeur que celui de la doxorubicine et le décalage du cycle cellulaire pour la plus haute concentration de nanocontainer chargé en bléomycine (3,2 μM) est aussi équivalent à celui obtenu avec la délivrance de doxorubicine à la même concentration. Cependant, dans ces expériences le nanocontainer chargé

en bléomycine est resté en contact avec les cellules durant 72h, donc bien que les effets de cette délivrance soient comparables à ceux obtenus avec la doxorubicine, il serait nécessaire de synchroniser les cellules et les incuber 24h avec le nanocontainer chargé pour réellement conclure. Pour finir, sachant que les prédictions de l'état de protonation ne garantissaient pas une sortie des lysosomes pour cette molécule, ces expériences démontrent qu'il est possible de délivrer de la bléomycine avec le nanocontainer et l'impact de cette délivrance sur la viabilité implique que celle-ci a bien atteint le cytoplasme des cellules cibles.

Méthotrexate

Le méthotrexate (MTX) est un dérivé du folate qui va contrecarrer l'action de plusieurs enzymes responsables de la synthèse de nucléotides, et donc la synthèse d'ADN en phase S du cycle cellulaire, conduisant à l'inhibition de la division cellulaire [442]. Le confinement du MTX dans le nanocontainer a été directement testé *in vitro* à deux doses différentes. L'évaluation de la viabilité cellulaire (Figure 55B) montre une diminution de 20% sur les cellules OVCAR-3 entre le témoin nanocontainer vide (3,2 μ M) et le nanocontainer chargé en MTX (3,2 μ M), ce qui suggère qu'il faudrait des doses plus importantes ou un meilleur taux de confinement pour augmenter l'efficacité de cette délivrance. Par ailleurs, cette molécule semble avoir passé la barrière lysosomale. Il n'y avait pas de modifications notables sur le cycle cellulaire (Figure 55C), en comparaison des témoins (cellules seules et nanocontainer vide), pour les cellules restantes en fin d'expérience cependant ces cellules n'étant pas synchronisées, il est donc difficile de conclure.

Fludarabine

La fludarabine (9- β -D-arabinosyl-2-fluoroadenine, F-ara-A) est un analogue des purines qui sera phosphorylé en intracellulaire par une kinase pour devenir de la F-ara-ATP (adénosine triphosphate). Ce métabolite va inhiber plusieurs enzymes impliquées dans la synthèse d'ADN [443]. Une seule expérience a été réalisée avec cette molécule sans pouvoir évaluer son taux de confinement dans le nanocontainer. Une diminution de presque 30% de la viabilité des cellules OVCAR-3 entre le témoin nanocontainer vide et 3,2 μ M de nanocontainer chargé a été observée, sans effet notable sur le cycle cellulaire (Figure 55B et C).

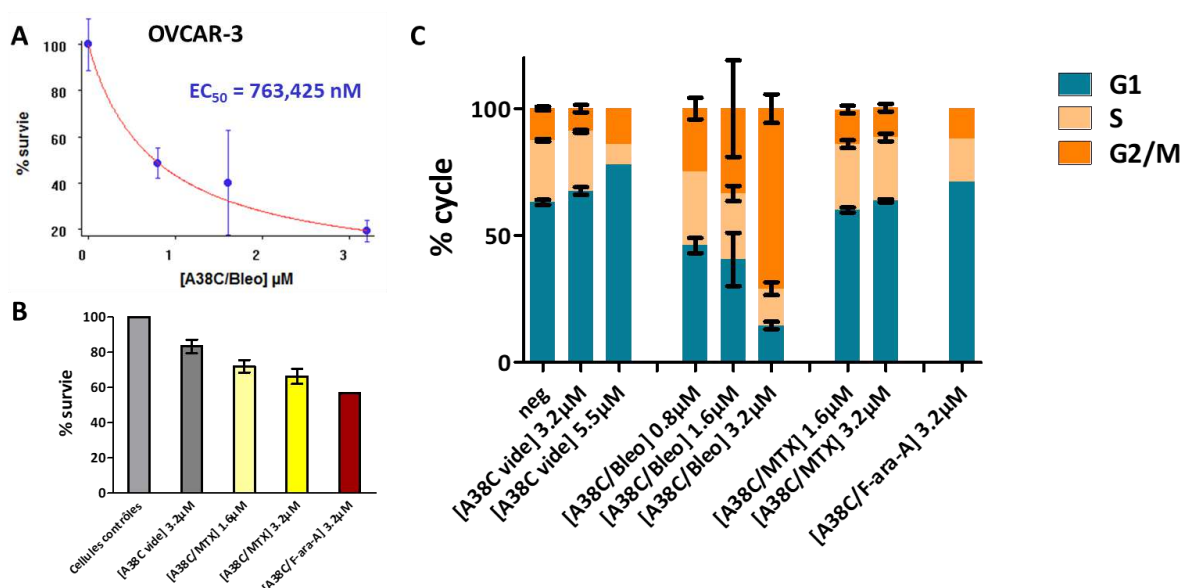


Figure 55 : Délivrance ciblée de bléomycine (Bleo), méthotrexate (MTX) et fludarabine (F-ara-A) dans les cellules OVCAR-3. Les cellules OVCAR-3 sont cultivées pendant 72h en présence de plusieurs concentrations de nanocontainer chargé en bleomycine (0,8 ; 1,6 et 3,2 μ M), méthotrexate (1,6 et 3,2 μ M) et fludarabine (3,2 μ M), puis passées à la trypsine et comptées pour évaluer la viabilité cellulaire. Les données ont été analysées avec le logiciel GOSA pour le confinement bléomycine sur les OVCAR-3 et ont permis de déterminer un EC₅₀ (A). L'effet des autres confinements sur la viabilité cellulaire a été analysé avec le logiciel Prism (B). Les cellules encore vivantes après 72h sont incubées avec de l'iodure de propidium puis passées en FACS pour visualiser le cycle cellulaire (C) neg : cellules témoins seules ; [A38C/molécule] : concentration du nanocontainer chargé ; [A38C vide] : concentration du nanocontainer non chargé. n = 2 OVCAR-3 + A38C/bleo; n = 3 OVCAR-3 + A38C/MTX; n=1 OVCAR-3 + A38C/F-ara-A.

5. Bilan des résultats (partie II)

Les simulations *in silico* ont permis de faire le docking et la dynamique moléculaire du confinement virtuel de 72 molécules thérapeutiques dans la cavité du nanocontainer. Par la suite, la solubilité théorique de chaque molécule a été calculée, ainsi que leur état de protonation à pH4 pour prédire si elles seront susceptibles de passer la membrane lysosomale une fois adressées par le nanocontainer. L'ensemble de ces résultats a permis de générer les graphes présentés en Figures 48 et 49.

Le modèle cellulaire a confirmé que l'antigène TF est bien porté par la Mucine 16 et a permis de mettre en évidence qu'il est aussi porté par d'autres mucines ou d'autres glycoprotéines membranaires apparentées. Nous avons démontré que ce nanocontainer est capable de marquer une plus grande variété de lignées cellulaire cancéreuses ovariennes, par détection de l'antigène TF, qu'un anticorps monoclonal anti-MUC16. Par ailleurs, les résultats présentés dans cette partie ont aussi révélé que la cinétique d'entrée et le taux d'endocytose d'A38C sont variables, dépendant du taux d'expression de l'antigène TF à la membrane des différentes cellules. A38C-alexa647 présente les mêmes constantes de dissociation apparente et donc la même affinité pour toutes les cellules cancéreuses ovariennes

puisqu'elle reconnaît le même motif glycosidique sur les différents types cellulaires et la saturation du signal démontre une fois de plus la spécificité du nanocontainer pour sa cible, l'antigène TF.

Pour finir, l'évaluation expérimentale de l'efficacité des confinements de la MTM, la bléomycine, le MTX et la fludarabine ont permis de déterminer que ces molécules ont un état de protonation à pH4 qui leur permet de passer la membrane lysosomale au vu de leur activité cytotoxique sur les cellules ciblées évaluée par le pourcentage de viabilité cellulaire. Le meilleur EC_{50} pour le nanocontainer chargé incubé avec les cellules OVCAR-3 et SKOV-3 a été obtenu avec le confinement de la MTM, respectivement 21 et 36nM. La différence de taux d'expression de l'antigène TF explique que cet EC_{50} soit meilleur sur les OVCAR-3. L'évaluation des effets de ces confinements sur le cycle cellulaire a démontré des blocages en phase G2/M marqués pour la doxorubicine, la MTM et la bléomycine. Aucun effet sur le cycle n'a été observé pour le MTX et la fludarabine.

Les études *in vitro* présentés dans cette partie sur l'aspect nanocontainer de la lectine ont permis d'établir la preuve de concept de la délivrance ciblée de doxorubicine et de MTM. La suite de ces développements sera réalisée *in vivo*. Le modèle SKOV-3, présenté en partie I des résultats de ce manuscrit, pourra être utilisé dans un premier temps puisqu'il permet de faire un suivi quantitatif de la croissance tumorale en imagerie non invasive de bioluminescence. Dans un second temps, les développements sur l'aspect nanocontainer seront effectués sur des modèles murins PDX (patients derived xenografts) obtenus par xénogreffes de tumeurs ou cellules cancéreuses issues de patientes atteintes de carcinose péritonéale ovarienne.

Partie III : Développement du mutant A38C de la protéine XCL comme nanosonde pour la détection de nodules submillimétriques *in vivo* et le repérage du marqueur associé sur des coupes histologiques

1. Résumé de l'article, *Biomaterials* 2020

Cette publication a pour objectif de présenter les développements de l'aspect sonde en imagerie de fluorescence du mutant A38C de la protéine sauvage XCL sur le modèle cellulaire et le modèle murin de carcinose péritonéale ovarienne développé à partir des cellules IGROV-1 Luc GFP.

Le facteur le plus déterminant pour le pronostic des patientes atteintes d'une carcinose péritonéale d'origine ovarienne est l'exhaustivité de la chirurgie cytoréductrice. Pour atteindre cet objectif, les chirurgiens doivent détecter et retirer toutes les masses tumorales présentes sur le site de la tumeur primaire et disséminées dans la cavité abdominale, notamment les plus petits nodules. En effet, ceux là sont les plus difficiles à détecter. De plus, lorsqu'ils restent dans la cavité et ne sont pas atteints par les chimiothérapies, ces nodules sont très souvent à l'origine des rechutes [384,385]. Cette problématique et les nombreuses avancées technologiques en microscopie de fluorescence nous a conduit à orienter une partie des développements de notre nano-objet vers l'imagerie intraopératoire, compte-tenu de sa spécificité pour le marqueur glycosidique des carcinomes, l'antigène TF.

La première partie de l'article décrit la grande stabilité de la protéine A38C au cours du temps et à différents pH, dont ceux correspondant à l'acidité du microenvironnement tumoral (Figure 1, Biomaterials). La stabilité de son marquage dans le NIR, réalisé par une liaison covalente NHS ester entre les lysines du tétramère et l'alexa fluor 647 (fluorophore synthétique), est aussi évaluée. Ce marquage est stable sur une période d'au moins un mois (Figure S1C, Biomaterials). Bien qu'ici la lectine ne soit pas utilisée pour ses propriétés de transporteur, le mutant A38C, créé pour sécuriser la cavité, a été choisi pour ces développements. En effet, le double pontage covalent entre les monomères permet aussi d'empêcher l'ouverture spontanée de la structure tétramérique et l'échange entre les monomères. Ainsi, lors du marquage du mutant A38C dans le NIR (rendement moyen = 1 mole d'alexa647 par mole de tétramère), le blocage de l'échange entre les monomères permet de s'affranchir de la présence de protéines n'ayant pas de marquage ou bien de protéines trop marquées et dont le site de fixation de l'antigène TF serait trop encombré pour adresser A38C aux cellules cibles.

Les études *in vitro* sur le modèle cellulaire ont déjà été présentées en partie II.3.a des résultats. Le modèle cellulaire basé sur des différences du taux d'expression de l'antigène TF a été créé pour établir la preuve de concept de la délivrance ciblée de molécules thérapeutiques par le nanocontainer A38C. Il a aussi été utilisé pour mettre en évidence l'aspect sonde de la protéine. Les figures correspondantes dans l'article présenté ici ont également été décrites et discutées dans la partie II.3.a.

Pour poursuivre le travail sur l'aspect nanosonde de la protéine A38C, un modèle murin de carcinose péritonéale ovarienne a été mis au point. Les cellules IGROV-1 ont été choisies pour réaliser ce modèle car leur potentiel pour le développement de carcinose péritonéale *in vivo* après une injection intrapéritonéale avait déjà été décrit [435]. De plus, parmi les trois lignées du modèle cellulaire, les IGROV-1 sont celles qui expriment le moins d'antigène TF à la membrane, ainsi si la détection de ce marqueur est possible *in vivo* sur ces cellules, elle sera également possible sur des cellules exprimant plus fortement ce marqueur que ce soit des lignées cellulaires ou des tumeurs primaires.

L'injection intrapéritonéale des IGROV-1 permet de mimer la dissémination de cellules tumorales, depuis le site de la tumeur primaire, dans la cavité abdominale. Il s'agit d'établir le nombre de cellules à injecter ainsi que la durée du protocole. Compte-tenu de la problématique des chirurgiens, l'objectif est de développer un modèle comportant principalement des nodules de taille submillimétrique retrouvés sur les sites d'implantation préférentiels des carcinoses. Pour rappel, ces sites ont été définis en clinique et comprennent : le tractus digestif (estomac, intestins et mésentère), la rate, le grand omentum et le pancréas, le foie et le petit omentum, le diaphragme et le rétropéritoine. Le petit et grand omentum (ou épiploon) correspondent à des replis péritonéaux reliant deux organes abdominaux et constituant des sites très permissifs pour l'implantation de cellules cancéreuses. Ils vont de l'estomac au foie (petit omentum) et de l'estomac au duodénum et à la rate (grand omentum). Ainsi, avec une injection i.p de 2.10^6 IGROV-1 Luc GFP et 3 semaines de croissance tumorale, la plupart des nodules présentaient une taille inférieure à 1 mm² (la limite de visibilité de l'œil humain) et s'étaient implantés au niveau de tous les sites décrits ci-dessus.

Le modèle SKOV-3 présenté dans la partie I des résultats de ce manuscrit aurait également pu être utilisé pour les développements de l'aspect sonde puisqu'il présente majoritairement des nodules de taille submillimétrique. Cependant, chronologiquement le modèle IGROV-1 a été développé en premier et bien qu'il ne permette pas de faire de suivi quantitatif de croissance tumorale en imagerie non invasive de bioluminescence, il est tout à fait pertinent dans le contexte du développement de la nanosonde A38C. Par conséquent, dans le modèle IGROV-1 l'imagerie de bioluminescence est utilisée pour vérifier la présence des xénogreffes chez les animaux (qualitatif).

Pour évaluer le potentiel d'A38C-alexa647 comme nanosonde pour la détection *in vivo* de nodules submillimétriques, deux procédures ont été mises en place. Le protocole séquentiel mime une assistance intraopératoire en injectant 0,8 μ M d'A38C-alexa647 la veille de l'euthanasie des animaux xénogreffés. La macroscopie de fluorescence *ex vivo* a démontré qu'il est possible de détecter tous les nodules, indépendamment de leur taille, dans toute la cavité abdominale avec un marquage spécifique d'A38C-alexa647 (peu de bruit de fond) et des SNR allant de 5,5 à 7,6 en fonction du site d'implantation des nodules (Figure 5, Biomaterials). Le protocole de co-injection constitue un modèle pour la détection des disséminations iatrogéniques de cellules tumorales durant la chirurgie de cytoréduction. L'injection concomitante des IGROV-1 et d'A38C-alexa647 a permis de marquer tous les nodules avec une résolution submillimétrique, de bons SNR (4,9 à 8,9 dépendant du site d'implantation) et une persistance du signal fluorescent d'au moins 3 semaines (Figure 6, Biomaterials). Il serait donc possible d'utiliser la nanosonde A38C-alexa647 pour le suivi post-opératoire des CRS.

La microscopie confocale sur les coupes histologiques de nodules prélevés a été utilisée par la suite pour caractériser l'interaction entre l'A38C-alexa647 et les nodules. Pour le protocole séquentiel, quel que soit le site sur lequel a été prélevé le nodule, le signal de la nanosonde se retrouve autour du nodule en suivant sa forme (Figure 7A, Biomaterials). Une couche intermédiaire de cellules entre le signal fluorescent du nodule (GFP) et celui de la sonde a été observée. Le signal A38C-alexa647 est donc situé sur des cellules non identifiées du microenvironnement tumoral, au-delà de cette couche intermédiaire. Une coloration des coupes à l'hématoxyline et l'éosine a révélé que des cellules de forme fibroblastique se trouvent au niveau de cette couche intermédiaire (Figure 7C, Biomaterials). Pour s'assurer de leur nature, l'utilisation de l'imagerie multiphotonique par la génération de signaux de seconde harmonique a permis de révéler la présence de collagène dont le signal se situe au niveau de cette couche intermédiaire (Figure 7D, Biomaterials). Nous en avons déduit qu'il s'agit effectivement de fibroblastes. Cette capsule de collagène pourrait faire barrière empêchant une interaction directe entre la nanosonde et les cellules tumorales.

Pour le protocole de co-injection, le signal d'A38C-alexa647 se retrouve aussi autour des nodules mais également en partie à l'intérieur puisque des zones de colocalisation entre les deux signaux (alexa647 et GFP) sont visibles (Figure 7B, Biomaterials). Dans cette procédure, l'interaction de la nanosonde avec les nodules est donc directe et indépendante de leur taille. Sachant que la protéine A38C est également un nanocontainer pour le confinement et la délivrance ciblée de traitements, une approche de nanothéranostique intrapéritonéale mérite d'être considérée avec ce protocole en combinant les deux propriétés.

Pour identifier les cellules marquées par la nanosonde situées au-delà de la capsule de collagène dans le microenvironnement tumoral (protocole séquentiel), des immunohistofluorescences (IHF) ont été réalisées avec un anticorps anti-CD45 qui marque les cellules immunitaires. L'imagerie confocale a révélé que le signal A38C-alexa647 se trouve sur des cellules positives au marquage CD45. Pour aller plus loin dans l'identification de ces cellules, des nodules prélevés chez les animaux ont été dissociés et des panels immunitaires ont été réalisés en FACS. Ces expériences ont permis de déterminer que 80% des cellules marquées A38C-alexa647 sont CD45⁺, confirmant les observations faites en IHF, et 60% sont aussi CD11b⁺ (marqueur de la lignée myéloïde).

L'expression par des cellules immunitaires du marqueur des carcinomes (antigène TF, CD176) était déjà décrite sur des lymphocytes B et T immatures et dans le cadre de leucémies, sachant qu'il n'est pas exprimé sur les LB et LT matures. De plus, pour la lignée myéloïde, il a été démontré que le CD176 est exprimé sur les macrophages dans les organes lymphoïdes mais pas dans les tissus. Par ailleurs, nous n'avons pas observé de signaux non spécifiques *in vivo*, ainsi la nanosonde A38C-alexa647 ne semble marquer que les cellules immunitaires associées au cancer. Nous en avons conclu que la détection des nodules en procédure séquentielle est possible par l'accumulation des cellules immunes exprimant le glycotope autour du tissu tumoral. Cela impliquerait qu'A38C pourrait détecter des nodules dès les premiers stades de développement tumoral.

Pour envisager une approche théranostique avec cette procédure, il sera nécessaire de déterminer l'effet d'une délivrance de molécules thérapeutiques aux cellules immunes du microenvironnement tumoral.

Les développements futurs de notre nano-objet seront réalisés sur des modèles PDX plus pertinents de la situation clinique. Ces modèles sont obtenus par xénogreffes de cellules cancéreuses primaires issues de patientes chez des souris immuno-déprimées. Cependant, ces modèles étant réalisés chez des animaux immunodéprimés, l'identification des cellules immunitaires marquées par la nanosonde pourra être affinée mais aucune information ne sera obtenue sur les lymphocytes T puisque les souris en sont dépourvues.

L'article ci-après détaillant ces résultats a été accepté en février 2020 dans le journal Biomaterials. En plus du résumé ci-dessus, et des résultats *in vitro* traités en partie II.3.a, la section Matériels et Méthodes a été traduite dans ce manuscrit puisqu'elle constitue la majeure partie des expériences réalisées pendant ce projet de thèse.



Development of a near infrared protein nanoprobe targeting Thomsen-Friedenreich antigen for intraoperative detection of submillimeter nodules in an ovarian peritoneal carcinomatosis mouse model

Mathilde Coustets^{a,b}, Caroline Ladurantie^a, Elisabeth Bellard^a, Mélissa Prat^c, Marie-Pierre Rols^a, Vincent Ecochard^a, Gwenaél Ferron^{d,e,f}, Sophie Chabot^b, Muriel Golzio^a, Laurent Paquereau^{a,*}

^a Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, IPBS, Université de Toulouse, CNRS, UPS, 205 Route de Narbonne, BP64182, 31077, Toulouse, France

^b Urosphere, Parc Technologique Du Canal, Canal Biotech II, 3 Rue des Satellites, 31400, Toulouse, France

^c UMR 152 Pharma Dev, Université de Toulouse, IRD, UPS, France

^d INSERM U1037, Cancer Research Center in Toulouse (CRCT) 19, 31037, Toulouse, France

^e Institut Universitaire Du Cancer de Toulouse - Oncopole, Toulouse, France

^f Department of Surgical Oncology Institut Universitaire Du Cancer de Toulouse - Oncopole, Toulouse, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Protein nanoprobe
Cancer imaging
Ovarian peritoneal carcinomatosis
Thomsen-friedenreich antigen
Near infrared fluorescence

ABSTRACT

The epithelial ovarian cancer is one of the most lethal gynecological malignancy due to its late diagnostic and many relapses observed after first line of treatment. Once diagnose, the most important prognostic factor is the completeness of cytoreductive surgery. To achieve this goal, surgeons have to pinpoint and remove nodules, especially the smallest nodules. Recent advances in fluorescence-guided surgery led us to develop a recombinant lectin as a nanoprobe for the microscopic detection of nodules in the peritoneal cavity of tumor-bearing mice. This lectin has an intrinsic specificity for a carcinoma-associated glycan biomarker, the Thomsen-Friedenreich antigen. In this study, after its labelling by a near infrared dye, we first demonstrated that this nanoprobe allowed indirect detection of nodules already implanted in the peritoneal cavity, through tumor micro-environment targeting. Secondly, in a protocol mimicking the scattering of cells during surgery, we obtained a direct and long-lasting detection of tumor cells *in vivo*. This lectin as already been described as a nanocontainer able to do targeted delivery of a therapeutic compound to carcinoma cells. Future developments will focus on the combination of the nanoprobe and nanocontainer aspects in an intraperitoneal nanotheranostic approach.

1. Introduction

Carcinoma is a generic term including all cancers originating from the epithelial tissue. Those solid tumors represent the most common form of cancer and a major cause of lethality [1]. Among them, the epithelial ovarian cancer (EOC) has a relatively low incidence compare to other cancers in women, but it is one of the most lethal gynecological malignancy [2] due to the lack of symptoms and reliable diagnosis methods at early stages of the disease. Indeed, over 75% of cases are diagnosed at advanced stages [3,4]. Those advanced stages, IIb to IV in FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics) classification, lead to the spread of cancer cells, emerging from the primary tumor site, throughout the peritoneal cavity resulting in peritoneal carcinomatosis (PC) mainly responsible for poor prognosis [5]. This metastasis process is atypical because clusters of cells are driven to their

implantation sites by peritoneal flow [6]. Despite improvements during the last decade in five-year overall survival, from 30% to 55%, thanks to the concentration of cases in expert centers and the development of new strategies including maintenance treatment with antiangiogenics [7] and PARP inhibitors [8], the majority of patients recurred inside the peritoneal cavity [9]. In initial management, the standard of care for patient diagnosed with ovarian PC is a cytoreductive surgery (CRS) as complete as possible followed by intraperitoneal and/or systemic chemotherapy [10,11]. Here lies a major challenge, since it is indispensable to remove every residual cancerous cells from the peritoneal cavity to prevent tumor recovery. Peritoneal metastasis implants are variable in size, ranging from microscopic nodules to several centimeters tumor masses [12,13]. Residual microscopic nodules, undetectable to the naked eye ($< 1 \text{ mm}^2$), are often the cause of relapses after cytoreductive surgery and remain despite chemotherapy [14–16]

* Corresponding author. Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, IPBS, Université de Toulouse, CNRS, UPS, 205 Route de Narbonne, BP64182, 31077, Toulouse, France.

E-mail address: laurent.paquereau@ipbs.fr (L. Paquereau).

<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.119908>

Received 4 December 2019; Received in revised form 12 February 2020; Accepted 19 February 2020

Available online 22 February 2020

0142-9612/ © 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

which compromises long term patient survival. Intraoperative imaging techniques, in particular fluorescence-guided surgery (FGS), promise to improve significantly the detection and resection of tumors especially from the peritoneal cavity [13,17–20]. Indeed, the quality of the CRS is a major factor to reduce recurrence of the disease. To date few intraoperative imaging techniques are available in clinic and most of them lack of specificity. One of the few Food and Drug Administration (FDA) approved near infrared (NIR) agent is the Indocyanine green (ICG) [21]. Even though ICG is well tolerated and has a rapid hepatic clearance, this probe remains passive thus nonspecific of cancer tissue. After intravenous injection, it accumulates in the vessels irrigating tumors because of its affinity for plasma proteins and in the tumor masses due to the enhanced permeability and retention effect (EPR). Thus, nowadays, surgeons are using high-resolution fluorescence cameras to detect it and do intraoperative evaluation of cancerous tissue perfusion [13,21]. Although ICG presents some advantages, its lack of specificity results in a high rate of false positives (62%) [22]. The oral or intraperitoneal administration of 5-aminolevulinic acid (ALA), a nontoxic photosensitizer naturally formed in mitochondria, and the subsequent accumulation of endogenous protoporphyrin IX (precursor of heme) in tumor cells, has also been tested in diagnosis for biopsies assistance in second-look laparoscopy [23] and CRS assistance [24]. The detection of peritoneal nodules was improved by 30% in comparison to white light for non-microscopic implants, and precaution has to be taken after 5-ALA administration regarding patient photo sensibility [23–26]. An emerging class of NIR-emitting nanoparticles, with promising developments for clinical application in diagnostic imaging, is the aggregation-induced emission dots. They offer several advantages over other types of NIR-emitting nanoparticles, such as stronger fluorescent signals that can last several days and a high tumor to normal tissue ratio generating low background signals [27,28]. The first tumor-specific imaging agent used in clinic targets folate receptor (FR α), overexpressed in 90% of ovarian cancer [29]. A folate analogue (OTL38) conjugated to a NIR fluorescent dye enabled a 29% improvement in malignant nodules detection compared to conventional methods (palpation) on a small cohort of patients [30]. However, no threshold of nodules' size and no effect on overall survival has been established. Despite those existing imaging agents, there is still room for the development of specific probes for intraoperative assistance of CRS to enable higher specificity and intra-abdominal microscopic nodules detection.

In epithelial ovarian cancer, the mucin 16 glycoprotein (MUC16) and its circulating form, the cancer antigen 125 (CA125), are overexpressed. CA125 is the standard FDA approved biomarkers for EOC. This overexpressed protein marker is mainly used in treatment monitoring but not as a diagnostic marker. Indeed, elevated CA125 serum levels are also associated to other malignancies, to benign gynecological conditions, and to early pregnancy and menstruation [31,32]. More generally in carcinoma tissue, cancer-associated mucins show reduced expression of complex O-glycans and increased expression of short oligosaccharides due to the altered expression of selective glycosyltransferases in the Golgi [33–36]. Among those abnormal O-glycosylations, the Thomsen-Friedenreich antigen (TF antigen or CD176), a disaccharide (β -D-Gal (1–3) D-GalNAc), or its direct precursor Tn-antigen (GalNAc), are rarely seen in normal epithelia [37,38] but are highly expressed by about 80–90% of human carcinomas [39–41]. The TF antigen is also detected on several hematopoietic cells including the myeloid and lymphoid lineages [42–45]. The increased expression of TF antigen, and therefore the decreased expression of complex O-glycans, perturb normal cellular functions, which will favor cancer progression [35]. Thus, TF antigen is considered as a glycan cancer biomarker that is recognized by antibodies and lectins [35,37].

In this context, we previously reported the specific recognition of TF antigen by a recombinant lectin protein cloned from *Xerocomus Chrysenteron* mushroom (XCL) [46,47]. Isothermal titration calorimetry experiments demonstrated a high affinity between XCL and the TF

antigen with dissociation constants of 1.6 μ M and 0.38 μ M for Fetuin and Asialofetuin, respectively (protein carrying a TF antigen sialylated or not) [47]. Studies at cellular level showed that XCL was endocytosed by a clathrin-dependent pathway and delivered to late endosome/lysosome compartments [48]. The 3D structure of the XCL protein was resolved by X-ray crystallography and revealed that its homo-tetrameric assembly displayed a complex network of protomer–protomer interfaces and generated a large, hydrated inner cavity of 1 nm³ [49]. We have recently described the biochemical development and use of this lectin as a nanocontainer enables to specifically deliver *in vitro* a chemotherapeutic agent [50]. To achieve this objective, it was necessary to control the stability and the dynamic of XCL's quaternary structure by designing XCL variants in which monomers were covalently bonded to each other. The addition of disulfide bonds in a crosswise manner prevented the dissociation of oxidized A38C tetramers, a variant of the wild type XCL protein, and we showed that the position of these mutated residues did not interfere with the formation of the TF antigen binding site.

In the present study, we labeled the A38C variant in NIR and characterized its interaction with three human ovarian carcinoma cell lines *in vitro*, determining that those cells can be stained independently of their MUC16 expression. Indeed, TF antigen is carried by others mucins and membrane glycoproteins on cancer cells [33]. Then, in order to evaluate the efficiency of A38C-alexa647 as an *in vivo* imaging probe, we established a murine model of ovarian peritoneal carcinomatosis and performed two different detection procedures mimicking clinical situations. We demonstrated that the A38C probe was able to highlight microscopic nodules inside the peritoneal cavity by per-operative imaging with a high specificity and a good signal to noise ratio. The characterization of the interaction between our probe and the nodules in mice was addressed by histological and flow cytometry analysis. Altogether, our data demonstrated that the A38C probe could be a valuable tool for intraoperative nodules detection. This work opens the possibility of developing nanotheranostic approaches by combining the nanoprobe and nanocontainer aspects of A38C.

2. Materials and methods

2.1. Recombinant protein labeling

Recombinant protein was produced and purified as previously described [46,50]. After purification, the recombinant A38C protein was labeled with a near infrared emitting dye (alexa fluor 647), with an NHS ester covalent bound to ϵ -amine lysine residues, using CF[®]647 SE Protein labeling kit (cat n°92218, Biotium, USA). A38C (30 μ M) were incubated overnight at room temperature in the dark in a medium composed of 100 mM sodium bicarbonate (pH 8.3) and CF[™]647 dye. After elimination of unconjugated free dye by gel filtration (Biogel P-30, Bio-rad, USA), the labeled protein was recovered and the yield of labeling was determined by spectrophotometry. The protein-bound dye ratio was calculated using the following extinction coefficient for CF[™]647: $\epsilon_{650\text{nm}} = 240,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Protein concentrations after labeling were calculated using $\epsilon_{280\text{nm}} = 119,640 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ with a previous correction from the absorption of the probes at this wavelength. The typical labeling ratio was 1 mol of dye per mole of protein.

2.2. Cell lines, products and reagents

The human ovarian adenocarcinomas cell lines NIH: OVCAR-3 (ATCC[®] HTB-161[™]) and SKOV-3 (ATCC[®] HTB-77[™]) were purchased from American Type Culture Collection and IGROV-1 were obtained from the Gustave Roussy Institute [51]. Cells were routinely cultured in RPMI 1640 medium (CM1RPM00K, Eurobio, France) supplemented with 2 mM L-Glutamine (CSTGLU00, Eurobio, France), 1% penicillin/streptomycin (P0781, Sigma, USA), 10% fetal calf serum (FCS) (F7524, Sigma, USA), 10 μ g/mL human Insulin (I9278, Sigma, USA) and 20 ng/

mL human recombinant epidermal growth factor (E9644, Sigma, USA). Cells were cultured as monolayers at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere, and were tested every other week for mycoplasma (MycoAlert Mycoplasma Detection kit, cat n°#LT07-318, Lonza, Switzerland).

For *in vivo* experiments, the lentiviral vectors used for stable gene expression of Firefly luciferase (Luc) and Green Fluorescent Protein (GFP) were supplied by Flash Therapeutics (Toulouse, France). The GFP expression level was assessed by flow cytometry after double transfection and cells were 99% GFP positive compared to IGROV-1 wild type.

2.3. Immunofluorescence staining and confocal imaging of tumor cell lines

For the detection of MUC16 expression and A38C-alexa647 staining, 1.10⁵ OVCAR-3, 7.5.10⁴ SKOV-3 and 7.5.10⁴ IGROV-1 cells were cultivated, into chamber slides device (PEZGS0496, Millipore, USA). Once cells were plated, they were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) (102,091–904, VWR, USA) for 20 min, PFA was neutralized with PBS (phosphate buffered saline, CS1PBS01K, Eurobio, France) NH₄Cl 50 mM for 2 min and a blocking with PBS 10% FCS, 2% BSA (Bovine Serum Albumin) was performed for 30 min at room temperature. Cells were labeled with CA-125/MUC16 (Ov185:1) mouse monoclonal antibody (MA5-11579, Thermo Fisher Scientific, USA) at 1:250 dilution in PBS, 2% FCS and incubated for 3 h at room temperature. After 3 washes with PBS, cells were labeled simultaneously with Goat anti-Mouse IgG (H + L) alexa488 (A11017, Thermo Fisher Scientific, USA) at 1:200 dilution and A38C-alexa647 at 160 nM, in PBS, 2% FBS and incubated 30 min at room temperature. After 3 washes with PBS, nuclei were stained with Vectashield® antifade mounting medium containing DAPI (H-1200, Clinisciences, USA) and slides were kept at –20 °C prior confocal imaging. Fluorescence images were acquired using an Olympus FV-1000 confocal microscope with a UPLSAPO40X2 objective.

2.4. Cellular uptake kinetic by fluorescence microscopy imaging

For the uptake kinetic experiments, 1.10⁵ OVCAR-3, 5.10⁴ SKOV-3 and 5.10⁴ IGROV-1 cells were seeded on 4 wells cover glass Lab Tek devices (155,383, Thermo Fisher Scientific, USA). Once all cells were plated, the labeled A38C protein was added at 160 nM per well, while keeping a well without protein for negative control. Fluorescence imaging acquisitions were made at indicated times after cells/protein incubation. PBS washes (x2) were performed to remove unbound A38C-alexa647. Cells were imaged on an inverted digitized videomicroscope (DMIRB, Leica Microsystems SA, Rueil-Malmaison, France) equipped with a Cool Snap HQ2 Camera (Roper Scientific, Photometrics, Tucson, AZ, USA) and a 63 × 0.7 NA objective. Cells were imaged by fluorescence using appropriate filters: Leica L4 block filter (excitation filter, BP: 480/40 nm, emission filter, BP: 527/30 nm) was used to see the cells expressing constitutively GFP, and Leica Cy5 TET filtercube (excitation filter, BP 620/60 nm, emission filter, BP 700/75 nm) was used to view the labeled protein (exposure time = 1s).

The bright field acquisitions have been modified by image processing using ImageJ software to appear clearer on the illustration. A normalization procedure has been applied on these images using the plugin Local normalization created by EPFL (École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Biomedical Imaging Group).

2.5. Cellular uptake quantification and dose response assessments by flow cytometry

For quantification experiment, 1.10⁵ OVCAR-3, 5.10⁴ SKOV-3 and 5.10⁴ IGROV-1 cells were seeded on 12 wells plate. Once all cells were plated, the labeled A38C protein was added at 160 nM per well, while keeping a well without protein for negative control. After 24 h' incubation with A38C-alexa647, cells were washed twice with PBS,

harvested with trypsin and fluorescence intensity was analyzed by flow cytometry. Fluorescence of alexa647 was measured with a BD FACSCalibur™ cell analyzer (10⁴ events counted) and results were analyzed with Cell Quest Pro software (BD Biosciences) to determine fluorescence intensities. For dose-response assessments, 7.5.10⁴ OVCAR-3, 5.10⁴ SKOV-3 and 5.10⁴ IGROV-1 cells were seeded on 12 wells plate. Once all cells were plated, the labeled A38C-alexa647 protein was added at various concentrations (16, 32, 63, 126, 160, 253, 320 and 510 nM). Cells were incubated 6 h at 37 °C with A38C-alexa647, harvested and fluorescence intensity was measured by flow cytometry as described above.

2.6. Mice xenografts, labeled protein administration and tumor growth monitoring

Female nude mice (BALB/c nu/nu from Janvier Labs, France) 8 weeks of age and weighing between 18 and 23 g were used in this study. All animal experiments were conducted in accordance with ARRIVE guidelines, European Union Directive 2010/63/EU and French procedural guidelines for animal handling, with approval from the ethical committee (C2EA-01) of the Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (MESRI) (agreement number #2017080816182218). In the sequential procedure, nude mice were intraperitoneally injected with 2.10⁶ IGROV-1 Luc/GFP cells (cellular suspension in PBS) at day 0 (D0). Three weeks later the labeled protein was administrated intraperitoneally (0.8 µM) one day before euthanasia. In the coinjection procedure, IGROV-1 Luc/GFP cells (2.10⁶ cells in PBS) were intraperitoneally injected into nude mice simultaneously with the labeled protein (0.8 µM) at day 0 (D0). In either case, one week after cells injection, noninvasive bioluminescence imaging was performed to ensure that animals developed peritoneal carcinomatosis. D-luciferin sodium salt (150 mg/kg, cat n°#LN10000, OZ Biosciences, France) were intraperitoneally injected 5 min before imaging. Bioluminescence was carried out on a customized device equipped with a black Box (Photek, UK), a Schneider objective VIS-NIR Cinegon 1.4/12–0515 and a heating pad (37 °C) (Harvard Apparatus, USA). Animals were anaesthetized using isoflurane inhalation anesthesia (Vetflurane, Virbac, France) throughout the experiment. Mice were imaged with a Camera Ikon M and data stored with Solis acquisition software (ANDOR Technology). Six acquisitions of 5 min (exposition time) at binning 2 were made. The same day, noninvasive fluorescence imaging was performed to detect the labeled nanoprobe using a Fluobeam®700 (Fluoptics, Grenoble, France) device which is a highly sensitive CCD camera able of real-time imaging in the near infrared window. In both procedures, mice were euthanized 3 weeks after tumor cells injection.

Non-xenograft mice received the same amount of A38C-alexa647 (0.8 µM) as the tumor-bearing mice by intraperitoneal injections, one day or 21 days before euthanasia for control mouse of sequential and coinjection protocol, respectively.

2.7. Ex vivo tumor tissues fluorescence macroscopy imaging

After euthanasia, autopsies were performed under fluorescence monitoring. Macroscopy was carried out on an upright "Macrofluor" fluorescence macroscope (Leica Microsystems SA, Rueil-Malmaison, France), equipped with a Cool Snap HQ2 Camera (Roper Scientific, Photometrics, Tucson, AZ, USA) and a PlanApo 0.5x, WD 187 mm objective. Images were stored with image acquisition software (Metavue, Metamorph, Molecular devices, Sunnyvale, CA, USA). To identify tumor tissues, GFP constitutive expression of implanted human cells was detected using appropriate filter: L5 (excitation filter, BP: 480/40 nm; emission filter, BP: 527/30 nm). Tissues were also imaged using Cy5 filter (excitation filter, BP: 620/60 nm, emission filter, BP: 700/75 nm) in order to see the bio distribution of A38C-alexa647 administrated into xenografts mice.

2.8. Nodules' surfaces assessment

Fluorescence images (GFP) of each carcinomatosis sites were processed using Fiji software. The images were first scaled according to calibration of the fluorescence macroscope camera and objective (mm/pixel, depending on the magnification used during acquisition). Then a threshold was applied to the images and the analyze particles function of the software was used to get the number of nodules and their area in mm².

2.9. Signal to noise ratio (SNR) calculations

To evaluate signal to noise ratio on the fluorescence images of tumor-bearing mice, the mean fluorescence intensities (MFIs) of three regions of interest (ROI) per frame have been calculated. One ROI was located on the brightest NIR fluorescence point of the frame (ROI 1), the second on the darkest point inside the tissue (ROI 2) and the third on the frame out that surrounds the tissue (ROI 3). The MFIs of each ROI were calculated with ImageJ software. The SNR were calculated according to the formula:

$$\text{SNR} = (\text{ROI1} - \text{ROI3}) / (\text{ROI2} - \text{ROI3})$$

This evaluation, inspired by Ref.[52], was realized on three mice from each protocol, and all images were taken at the same magnification.

2.10. Treatment and confocal microscopy imaging of tissue samples

Once removed and imaged, tumor tissues were incubated overnight in a fixative buffer (phosphate buffer 50 mM pH7.4, lysine 0.1 M, sodium periodate 2 mg/mL, PFA 1%). To insure removal of water from tissue samples before cryopreservation, each sample was incubated at 4 °C in 3 consecutives sucrose baths (starting at 10%, 20% and 30% sucrose in 0.1 M phosphate buffer). Then tumor tissues were snap-frozen, embedded in optimal cutting temperature (O.C.T.) gel medium (Cell Path, UK) and stored at −80 °C. Twenty μm frozen sections were cut with a Cryostat device (Cryostat CM1950, Leica, Germany), and mounted on slides. After PBS bath to wash off remaining O.C.T., a NeoMount fluorescence mounting medium containing DAPI (NB-23-00159-2, Clinisciences, USA) was dispensed onto the specimen. Coverslips were permanently sealed around the perimeter with nail polish. Mounted slides were stored at −20 °C and protected from light before imaging. Fluorescence confocal images were acquired using an Olympus FV-1000 confocal microscope with a UPLSAPO10X2, a UPLSAPO20X or a UPLSAPO40X2 objectives.

2.11. Hematoxylin and eosin (H&E) staining and imaging

Frozen sections (thickness = 10 μm) were stained with Hematoxylin and Eosin according to standard protocols. Digital images of H&E staining were captured with a Zeiss Axioimager M2 (Carl Zeiss S.A.S., Jena, Germany) and a 20× objective (NA 0.8). The microscope was equipped with an Axiocam 503 color camera (14 bits) for color imaging and with an ORCA-Flash 4 LT digital sCMOS camera (Hamamatsu, 4.2 Megapx) for bright field and fluorescence imaging with appropriate filters for alexa647 (excitation BP 640/30 and emission BP 690/50).

2.12. Multiphoton microscopy

Second harmonic generation (SHG) was used to visualize the collagen capsule surrounding the peritoneal nodules on nodule's frozen section (thickness = 80 μm) using multiphoton microscopy. The acquisitions were made in sequential mode on a 7 MP upright fluorescence microscope (Carl Zeiss S.A.S., Jena, Germany), equipped with a 20× objective (NA 0.95) and coupled to a Ti:Sapphire femtosecond

laser, Chameleon Ultra 2 (Coherent Inc). The laser was tuned at 800 nm to detect the alexa647 (BP 640/710) and SHG (BP 390/410) signals, and at 920 nm to detect GFP (BP 500/550) signals.

2.13. Immunohistochemistry staining of tumor tissues

Twenty μm frozen sections were dry in ambient air during 1 h and remaining O.C.T washed off by a PBS bath during 30 min. Tissue sections underwent permeabilization in a PBS 0.1% Triton-X-100 bath for 10 min. Two 10 min washes in PBS were performed before surrounding each sections with a PAP pen for immunostaining (Z6725481EA, Sigma, USA). A blocking was performed during 30 min with Maxblock (15252, Active motif, USA). Tissue sections were stained, overnight at 4 °C and protected from light, with a CD45 monoclonal antibody (30-F11 clone) efluor405 (48-0451-80, Thermo Fisher Scientific, USA) or its rat IgG2b Kappa isotype control (eB149/10H5) efluor405 (48-0431-82, Thermo Fisher Scientific, USA) diluted at 1/200° in PBS 20% Maxblock. After 10 min washes in PBS thrice, a NeoMount fluorescence mounting medium without DAPI (NB-23-00158-2, Clinisciences, USA) was dispensed onto the specimen. Coverslips were permanently sealed around the perimeter with nail polish. Mounted slides were stored at −20 °C and protected from light before imaging. Fluorescence confocal images were acquired using an Olympus FV-1000 confocal microscope with a UPLSAPO20X or a UPLSAPO40X2 objectives and processed to filter the noise (PureDenoise plugin) with Fiji software. This filter was similarly applied to all images within an experimental group.

2.14. Tumor dissociation and flow cytometry

Nodules were resected from mice which underwent the sequential procedure (n = 10), and mechanically dissociated using the plunger of a syringe on a cell strainer membrane to break the collagen capsule. Then an enzymatic dissociation was realized in HBSS + Ca²⁺/Mg²⁺ (14025-092, Thermo Fisher Scientific, USA) supplemented with 100 μg/mL DNase I (11284932001, Sigma, USA) and 50 μg/mL Liberase™ TL (5401020001, Sigma, USA) for 30 min at 37 °C on a rotating mixer. Afterwards nodules suspensions were filtered through 70 μm cell strainers, spun down for 5 min, 500 g at room temperature and red blood cells were lysed in ACK lysis buffer (A1049201, Thermo Fisher Scientific, USA) for 5 min. Samples were resuspended in PBS 2% FCS 2 mM EDTA and maintained on ice until staining with antibody panels. All analyses were gated on viable cells after a Live/Dead Staining (Molecular Probes® LIVE/DEAD Fixable Violet Dead Cell Stain Kit, Life technologies™, USA). Antibodies used for each panel are listed below:

2.15. Macrophage panel

CD45-Viogreen (clone 30F11, Miltenyi, USA), F4/80-PE (clone REA126, Miltenyi, USA), CD206 BV605 (clone C068C2, Biolegend, USA), MHC class II-PerCP-Vio700 (clone M5/114.15.2, Miltenyi, USA) and CD279 (PD1)-PeCy7 (clone 29F.1A12, Biolegend, USA).

2.16. MDSCs (myeloid-derived suppressor cells) panel

Gr1-PE (clone REA810, Miltenyi, USA), F4/80-PerCP-Vio700 (clone REA126, Miltenyi, USA), CD11b-BV605 (clone M1/70, Biolegend, USA).

For every channels, fluorescence minus one controls (FMOs) were used to gate positive cells (see gating strategy in supplementary data). Macrophage population was analyzed by surface expressed MHCII and F4/80 detection and MDSCs by Gr1 and CD11b detection. All staining were performed on 100 μL of PBS (without Ca²⁺ & Mg²⁺) 1% heat-inactivated fetal calf serum. A population of at least 30,000 live cells was analyzed for each data point. All analyses were done in a BD Fortessa flow cytometer with Diva software for acquisition and FlowJo

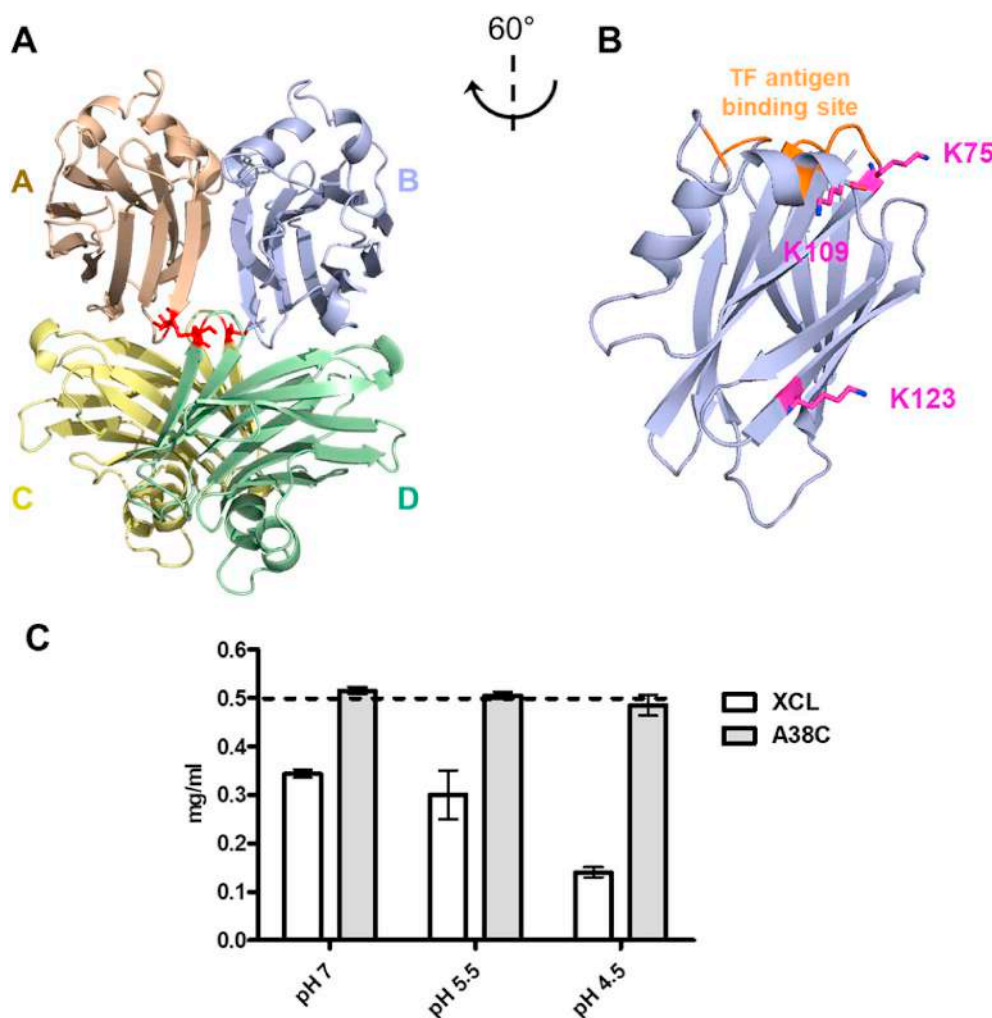


Fig. 1. A38C (XCL variant): Structure, NIR labelling and stability. (A) **Structure representation** (ribbon diagram) showing the overall organization of the homo-tetrameric A38C variant with the protomers noted A to D, position of mutated residues A38C and the resulting disulfide bridges (red). Due to the symmetry of the protein, this mutation introduces two disulfide bridges [50]. Figure was prepared with Pymol software. (B) **Localization of the TF antigen binding site** (orange) and lysine residues (magenta backbone) on one protomer. (C) **Monitoring of stability** over a 6 months' period at different pH for the XCL protein and its variant A38C. Spectrophotometry at 280 nm. The dashed line represents the initial concentration of both XCL and A38C; Mean \pm SEM; n = 3 production batches (pH 7) n = 2 production batches (pH 5,5 and 4,5). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

software for analysis.

2.17. Statistical analysis

Data analysis was performed using GraphPad Prism 6.0 program (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) and data were expressed as means \pm SD for the number of experiments indicated in the legends of the figures. Multiple comparisons were performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni multiple comparison post-test.

Molecular illustration was made with PyMOL software [53].

3. Results

3.1. Description and labeling of the nanoprobe

The A38C variant of the XCL protein was designed by directed evolution as previously described (Fig. 1A) [50]. In order to first study its interaction with cell lines *in vitro* and later evaluate its efficiency as a nanoprobe *in vivo*, A38C was labeled with a NIR dye to be followed by micro and macroscopic fluorescence imaging. The protein was labeled with alexa fluor 647 by a NHS ester linkage with ϵ -amine of lysines. Three ϵ -amine were exposed on the surface of each protomer and therefore 12 lysines could be potentially labeled. Only one lysine (K75) by protomer, the closest to the sugar site, would have been able to interfere with this recognition site, but the lateral chain of K75 had an orientation that took it away from the sugar-binding site (Fig. 1B). Once labeled at a recurring output of 1 mole of dye per mole of protein, no

obstruction of binding on TF antigen allowing the endocytosis was observed (Figure S1A). Interestingly, the formation of disulfide bridges on this variant, induced by the A38C mutation, prevented any redistribution of protomers and thus that of the labeling ratio (Figure S1B) [50]. This structural constraint made it possible to maintain the labeled protein in the same state over time, i.e. the absence of exchange between protomers prevented a fraction of A38C from being labeled with 4 fluorophores and the remaining fraction without labeling. In order to perform *in vivo* detection in small animals, and later on in humans, the probe must be stable over time and easy to use. Biochemical data showed very high temperature stability with T_m in the range of 70 °C [50]. We have completed this characterization by evaluating the stability of the protein and its labeling over time. Samples from different production batches, either of the wild type protein XCL or the variant A38C, were stored at room temperature and at different pH levels over a 6 months' period (Fig. 1C). These data showed an extreme stability of the A38C variant at pH7 over time with an initial concentration of 0.5 mg/mL. The XCL wild type protein, was also very stable but after reaching a steady state at lower concentrations (0.35 mg/mL). For acidic pH (5.5 and 4.5) conditions, the A38C mutant showed once more an excellent stability, since no protein loss was observed over this monitoring period. It is interesting to note that acidic pH values are found in tumor microenvironment and will have no impact on the stability of the probe. Finally, we checked the stability of the binding to the chromophore over a one-month period. After labeling reaction, the free alexa647 was separated by exclusion chromatography. After one month, a new exclusion gel column was performed to remove unbound alexa647, which may have been detached from the protein. Our results

indicated that there was no loss of labeling over this period, regardless of the initial labeling yield, ranging from 0.8 to 1.2 mole of dye per mole of protein (Figure S1C). This A38C-alexa647 nanoprobe was used in all experiments.

3.2. Characterization of A38C-alexa647 interaction with human ovarian adenocarcinoma cell lines

Before evaluating the efficiency of A38C-alexa647 as an imaging agent on xenograft mice, we first assessed it on different ovarian cancer cell lines presenting various characteristics depending on their origin. We selected three cell lines to characterize *in vitro* their interaction with the nanoprobe: OVCAR-3, SKOV-3 and IGROV-1. The OVCAR-3 cells were established from the malignant ascites of a patient with a high grade serous EOC who received a combination of chemotherapy and became chemo resistant [54]. SKOV-3 were retrieved from a patient with a serous type EOC who also underwent chemotherapy with an alkylating drug [55,56]. IGROV-1 cells have been considered as naïve because the patient from whom they were sampled did not receive any chemotherapy, and they have been described as a mix of several histological types of EOC [51,57]. Regarding EOC, the MUC16 glycoprotein and its circulating form (CA125) are the standard FDA approved biomarkers. OVCAR-3 cells have been described expressing MUC16 [58] whereas it has not been found on SKOV-3 cell line [59] and there was no available information about MUC16 expression on IGROV-1 cell line. Thus, we first performed immunofluorescence staining to determine whether MUC16 was expressed by IGROV-1 cells using, OVCAR-3 and SKOV-3 as positive and negative controls respectively. The experiment was realized on fixed cells, after a first staining with a monoclonal antibody specific of MUC16. A38C-alexa647 was added at the same time as the secondary antibody revealing the anti-MUC16 (labeled with alexa488). Among the three cell lines tested only OVCAR-3 showed staining with anti-MUC16 monoclonal antibody (Fig. 2, MUC16 panel). In contrast, A38C-alexa647 fluorescence staining

revealed the expression of TF antigen on all three cell lines (Fig. 2, A38C-alexa647 panel). The double staining with both MUC16 monoclonal antibody and A38C-alexa647 (Fig. 2, Merge panel) pointed out co-localization regions on OVCAR-3 cell membranes and also simple stained regions with A38C-alexa647. The A38C-alexa647 nanoprobe labeled all three cell lines independently of MUC16. Those results confirmed that TF antigen was carried by the MUC16 and highlighted its expression on other mucins or mucin-like protein. Overall, we showed that the nanoprobe was able to stain a wider range of human adenocarcinoma cell lines, by detecting TF antigen, than the monoclonal antibody directed against MUC16.

3.3. Uptake kinetics and quantification of the nanoprobe interaction with cell lines *in vitro*

To go deeper in the *in vitro* characterization of the nanoprobe, we then looked at the interaction of A38C-alexa647 with living cells as a function of incubation time. After an incubation period of 30 min, OVCAR-3 cells membranes were entirely stained by A38C-alexa647, membrane staining has begun for SKOV-3 cells and there was no detectable signal on IGROV-1 (Fig. 3A). After 4 h, the nanoprobe labeled all cell lines and OVCAR-3 cells presented a vesicular signal. At 24 h, all three cell lines presented a vesicular and perinuclear signal as previously described [48]. Thus, for a fixed quantity of A38C-alexa647, these kinetic experiments suggested different levels of marker expression at the surface of the three cell lines.

We quantified the uptake of the nanoprobe by flow cytometry after a 24 h incubation period for each cell line (Fig. 3B). We obtained significant differences showing that OVCAR-3 was the one with the highest uptake rate thus expressing the most TF antigen followed by SKOV-3, expressing 60% less TF antigen compared to OVCAR-3, and IGROV-1 that showed the lowest uptake rate. We concluded that the difference in uptake kinetics was due to a significant difference in marker expression level at the membrane of each cell line. Dose-response assessments of A38C-alexa647 have been performed on each three cell line to obtain apparent dissociation constants (KD) and Bmax values in order to better characterize the interaction between the nanoprobe and its glycan marker at the cell surface (Fig. 3C). With this experiment, we obtained 3 important informations. First, the non-linear regression fit revealed a saturation of the A38C-alexa647 signal after a 6 h incubation period demonstrating the specificity of the interaction between the nanoprobe and TF antigen. Then, the fit enabled us to obtain apparent KD and Bmax values for each cell lines. Those apparent KD were all in the range of 100 nM showing that the nanoprobe at the membrane of every tested cells recognizes the same glycan marker. On top of that we determined that this apparent KD was four times lower on cells surface than the one previously obtained with ITC experiments *in vitro* [47]. We can assume that cluster of glycoproteins at the plasma membrane was a contributing factor to this quantifiable improvement. The differences in Bmax values between the cell lines was in the same range as the differences observed in the uptake experiments (Fig. 3B) due to the variability in amount of TF antigen expressed by protein carrier at the plasma membrane of each cell line.

Taken together, those results revealed that the uptake and the kinetic were variable depending on the TF antigen expression rate of cell lines in the *in vitro* model. This observation let us to hypothesize that the use of the nanoprobe could be generalized to all adenocarcinoma cells from various origin, not only ovarian. A38C-alexa647 presented a similar affinity for all ovarian adenocarcinoma cells because it recognizes the same glycan on each of them and the saturation of the signal showed once again the specificity of the nanoprobe for its target, the TF antigen. All data considered, we chose to use the IGROV-1 cells for the development of the *in vivo* model. Indeed, IGROV-1 cells have been described for their imitating capability to develop a peritoneal carcinomatosis *in vivo* after intraperitoneal injection into mice [51]. Moreover, among the three cell lines, the IGROV-1 cells presented the

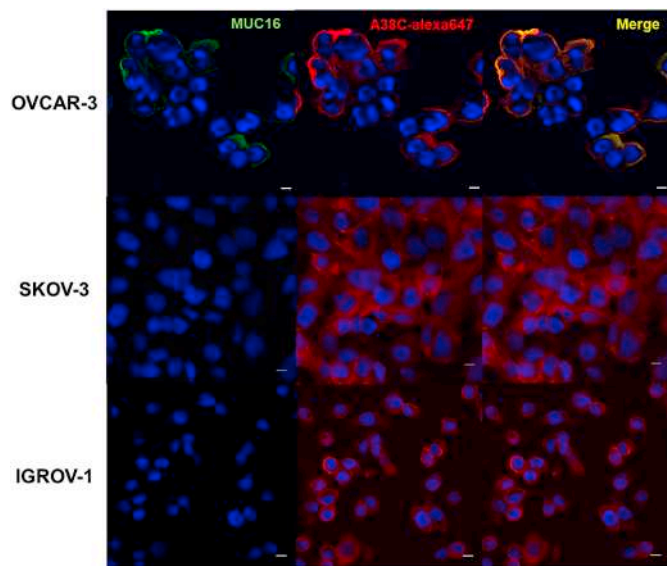


Fig. 2. TF antigen detection by A38C-alexa647 independently of MUC16 expression. Confocal 40x processed images of fixed cells incubated with MUC16 (Ov185:1) mouse monoclonal antibody for 3 h at room temperature and labeled simultaneously with the secondary antibody (goat anti mouse alexa488) and A38C-alexa647 for 30 min. Nuclei were stained with DAPI in blue. MUC16 staining in green (left); A38C-alexa647 staining in red (middle); double staining in yellow (merge panel). Representative images of two independent experiments. Scale bars: 10 μ m. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

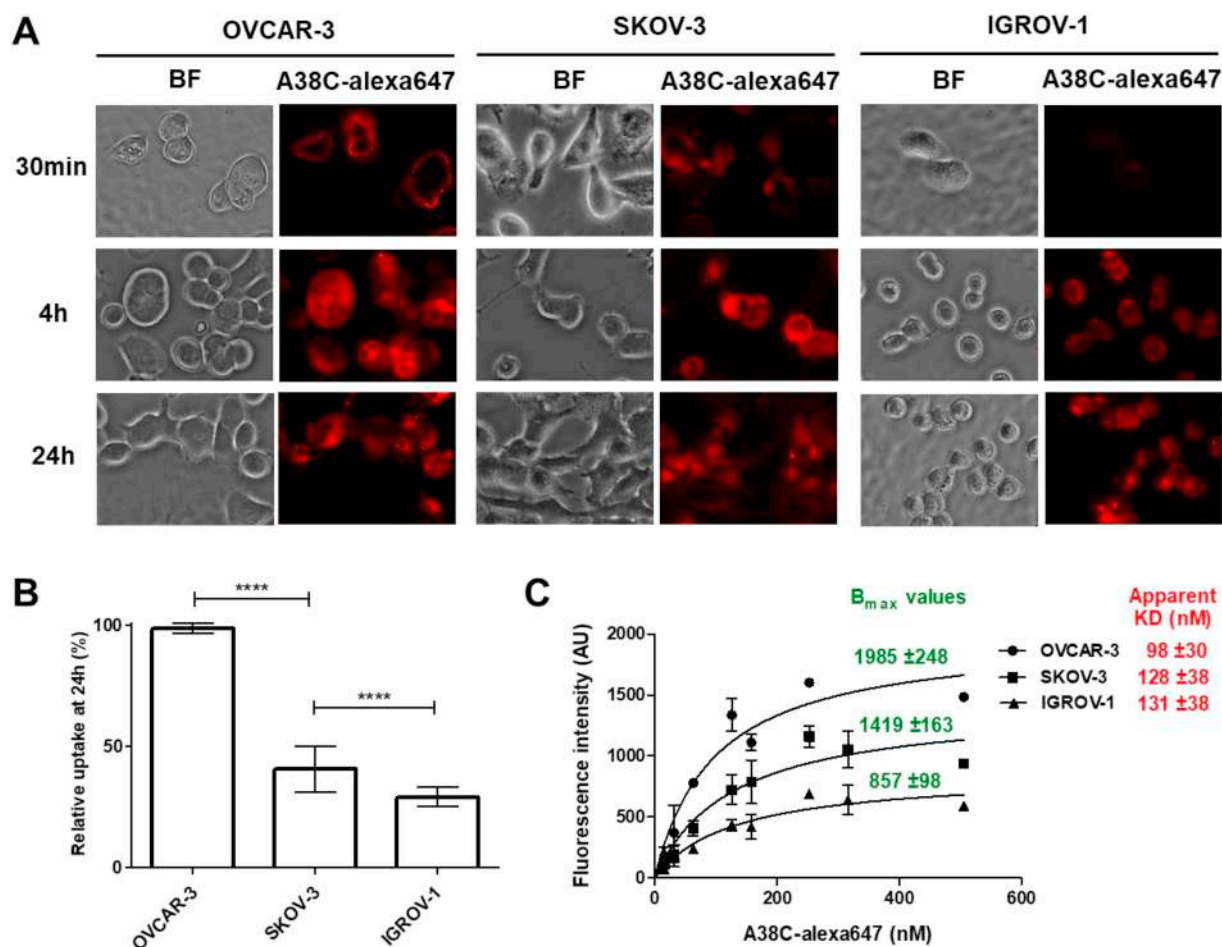


Fig. 3. Characterization of the kinetics of A38C-alexa647 cellular uptake in ovarian cell lines. (A) Visualization of A38C-alexa647 uptake kinetics: Cells were incubated with 160 nM of A38C-alexa647 (labelling ratio = 1.2) for the indicated times. Fluorescence images were acquired with a Cy5 TET filtercube. BF: Bright Field. Representative images of 5 independent experiments with equal dynamic range fluorescence intensity. (B) Quantification of cellular uptake: Cells were incubated 24 h with 160 nM of A38C-alexa647 and fluorescence intensity was measured by flow cytometry. Data are expressed as a rate regarding OVCAR-3 values. $n = 5$ independent experiments. Statistical analysis: **** $p < 0.0001$. (C) B_{max} and apparent dissociation constants (KD) evaluation: Cells were incubated 6 h at 37 °C with different concentrations (16, 32, 63, 126, 160, 253, 320 and 510 nM) of A38C-alexa647 and fluorescence intensity was measured by flow cytometry. Apparent dissociation constants (KD) and B_{max} values were determined by a nonlinear regression fit with a one site-specific binding model (Prism software). $n = 3$ independent experiments.

lowest expression level of TF antigen at their membranes. Therefore, in order to be in the most stringent conditions, we decided to use this cell line for the *in vivo* imaging proof of concept.

3.4. Establishment of the mouse model and nodules' size evaluation

The main clinic problematic regarding peritoneal carcinomatosis is the dissemination of secondary tumors within the peritoneal cavity. The cytoreductive surgery aim to eliminate all those secondary tumors that present various sizes depending on their state of growth. In order to remove all the cancerous tissues, surgeons must be able to detect even the smallest implantation sites given that what will be left is able to redevelop and spread in the cavity, so to give birth to new cancerous sites.

To assess the efficiency of A38C-alexa647 as a nanoprobe for sub-millimeter detection, we had to establish a mouse model with various tumor size implanted at the same sites as ovarian PC development sites found in patients. We first transduced the IGROV-1 cells with two reporter genes, green fluorescent protein (GFP) and luciferase (Luc). Their constitutive expression allowed an easy detection of engrafted cells by bioluminescence non-invasive imaging and, after euthanasia, by fluorescence macroscopy (Figure S2A-B). We chose an intraperitoneal injection of the cells to mimic the spreading within the

peritoneal cavity, as described in Refs. [51,60]. The duration of the experiment and the number of injected cells had to be determined to ensure that the implanted nodules were in the mm² range. We started with 10.10⁶ injected cells that developed tumor masses in less than 2 weeks (Figure S3A-B). The tumor growth was quick but the resulting tumor masses were too big and did not implant on many sites in peritoneal cavity. To obtain a peritoneal carcinomatosis with mostly sub-millimeter nodules, which implanted on several sites as observed in clinical situations, we set our protocol on 2.10⁶ injected cells and a 3 weeks monitoring period. One week after cells injection, we visualized mice by whole body non-invasive bioluminescence imaging to verify that the xenograft cells implanted. After euthanasia, peritoneal nodules have been detected with GFP constitutive expression of IGROV-1 cells using fluorescence macroscopy (Fig. 4A). The peritoneal carcinomatosis development sites were defined as follow: digestive tract (stomach, pancreas, intestines), spleen and large omentum (peritoneum extension), liver and small omentum, diaphragm and retroperitoneum. We detected the implanted nodules with fluorescence macroscopy and evaluated their surface by image processing (Fig. 4B). The resulting median nodule diameter on all development sites was in the sub-millimeter range (around 0.4 mm). The detection of microscopic nodules on all organs of the peritoneal cavity allowed us to validate the cell implantation protocol.

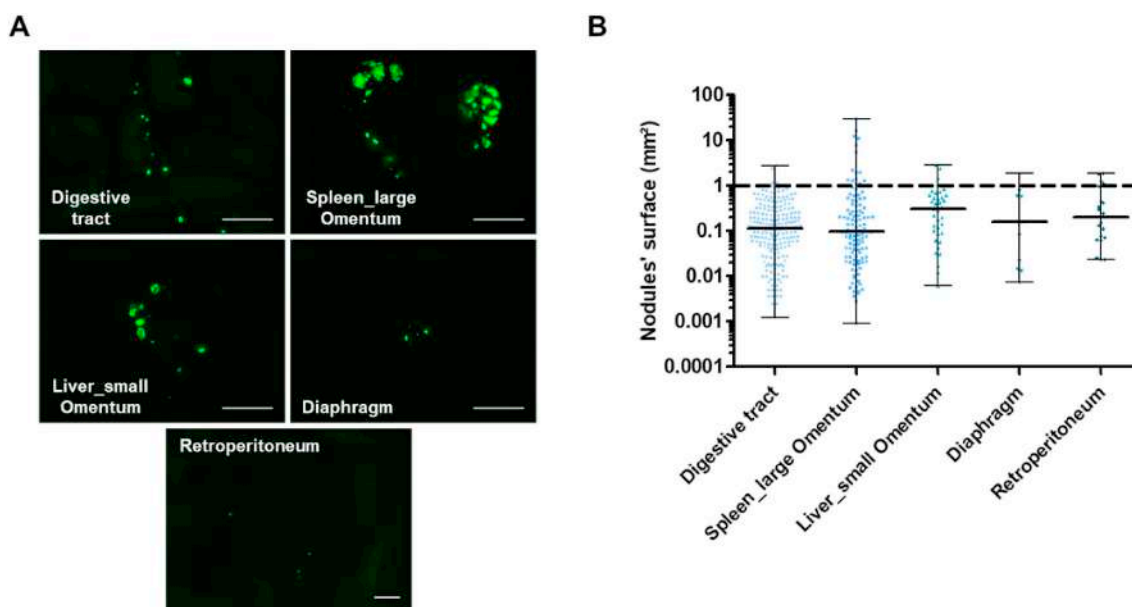


Fig. 4. Peritoneal spread of microscopic nodules mouse model. (A) Macrofluorescence imaging of peritoneal tumors developed on preferential peritoneal carcinomatosis sites 3 weeks after tumor cells implantation. Fluorescence images were acquired with an upright fluorescence microscope using proper filters to detect GFP constitutive expression of implanted human cells. One representative image for each site among 6 mice. Scale bars = 5 mm. (B) Nodules' surface assessments: evaluation of nodule sizes at different preferential peritoneal carcinomatosis sites by image processing of macrofluorescence acquisitions using the GFP constitutive expression of IGROV-1. The dashed line at 1 mm² represents the human eye detection threshold.

3.5. *In vivo* detection procedures of microscopic nodules with A38C-alexa647

Beforehand, a biodistribution assay has been conducted on mice which received a daily intraperitoneal or oral administration of 2.4 μ M A38C-alexa647 (three times the detection procedures dose) during 5 days (i.e. a total of 15 times the detection procedure dose). As showed by non-invasive fluorescence imaging, the signal lasted longer with intraperitoneal injections and no toxicity has been observed on animals whatever the administration route (Figure S4). Afterwards, two different protocols (sequential and coinjection) have been used to evaluate the nodule detection efficiency of the nanoprobe in our mouse model. Both procedures lasted 3 weeks to minimize the impact on animals and ensure that implanted nodules were in the submillimeter range. The first protocol, named sequential, consisted in an intraperitoneal injection of 2.10^6 cells to induce peritoneal carcinomatosis and then, 3 weeks later, an intraperitoneal injection of the nanoprobe (0.8 μ M) the day before euthanasia (Fig. 5A). The goal was to mimic an injection of the nanoprobe before CRS to use it as intraoperative assistance. The specific nanoprobe fluorescent signal in the peritoneal cavity was easily distinguishable from the background signal allowing the detection of every implanted nodule (Fig. 5B and S5). Indeed, when a non-tumor bearing mouse received an intraperitoneal injection of the same amount of nanoprobe one day before euthanasia as control, no specific labelling was observed (Figure S6A).

The signal to noise ratios of the nanoprobe were calculated on tumor-bearing mice images (five frame per mice, one for each peritoneal carcinomatosis site) and ranged from 5.5 to 7.6 depending on the site of observation (Fig. 5C and S6B). This procedure highlighted that it was possible to detect all implanted nodules, independently of their sizes, all around the peritoneal cavity with a specific labeling of the nanoprobe surrounding them.

In a second procedure, called coinjection, 2.10^6 cells and 0.8 μ M A38C-alexa647 were intraperitoneally simultaneously injected (Fig. 6A) to mimic what can happen in clinical situations. Indeed, during surgery, an iatrogenic spreading of tumor cells occurs in the abdominal cavity. These cells might re-implant and lead to relapses [61]. This coinjection procedure also have enabled us to analyze the

persistence of adenocarcinoma labeling *in vivo* through time. During this procedure, we verified that the presence of the nanoprobe did not interfere neither with the sites of tumor implantation nor the surfaces of the implanted nodules. The surface assessment in this coinjection procedure revealed that it was comparable to the one of control mice that did not receive the nanoprobe (Figs. 6B and 4B). With this procedure, every nodule was found labeled with the nanoprobe and a strong fluorescence signal persisted for at least 3 weeks. The nanoprobe detected those tumors at every preferential peritoneal carcinomatosis sites with a submillimeter resolution (Fig. 6C and S7). As expected, no signal was detectable in non-tumor bearing mice that received an intraperitoneal injection of the same amount of nanoprobe and were euthanized 3 weeks later (Figure S8A). The signal to noise ratios of the nanoprobe were also calculated for this procedure on tumor-bearing mice images (five frame per mice, one for each peritoneal carcinomatosis site) (Fig. 6D and S8B). These SNRs were similar to those obtained with the sequential procedure ranging from 4.9 to 8.9 depending on the site of observation.

Altogether, our results demonstrated that the *in vivo* model of ovarian peritoneal carcinomatosis were relevant to the clinical situation. The nanoprobe successfully detected every nodule with two different procedures. The fluorescence signal was specific and persistent over time, with a microscopic resolution and a good signal to noise ratio.

3.6. Characterization of the interaction between the nanoprobe and peritoneal nodules

The histological samples obtained from the mice in both procedures were fixed and frozen sections were observed by confocal microscopy to better characterize the *in vivo* interaction between the nanoprobe and the cancerous tissues. In both procedures, the same labeling pattern was found on every nodule, independently of its implantation site in the peritoneal cavity. Concerning the sequential procedure (Fig. 7A and S9A and C), the nanoprobe fluorescent signal was outlining the cancerous tissues by labelling cells outside the nodule following its shape, leaving a small space between the GFP-tumor cells and the labeled cells. In the coinjection procedure (Fig. 7B and S9B and D), part of the signal

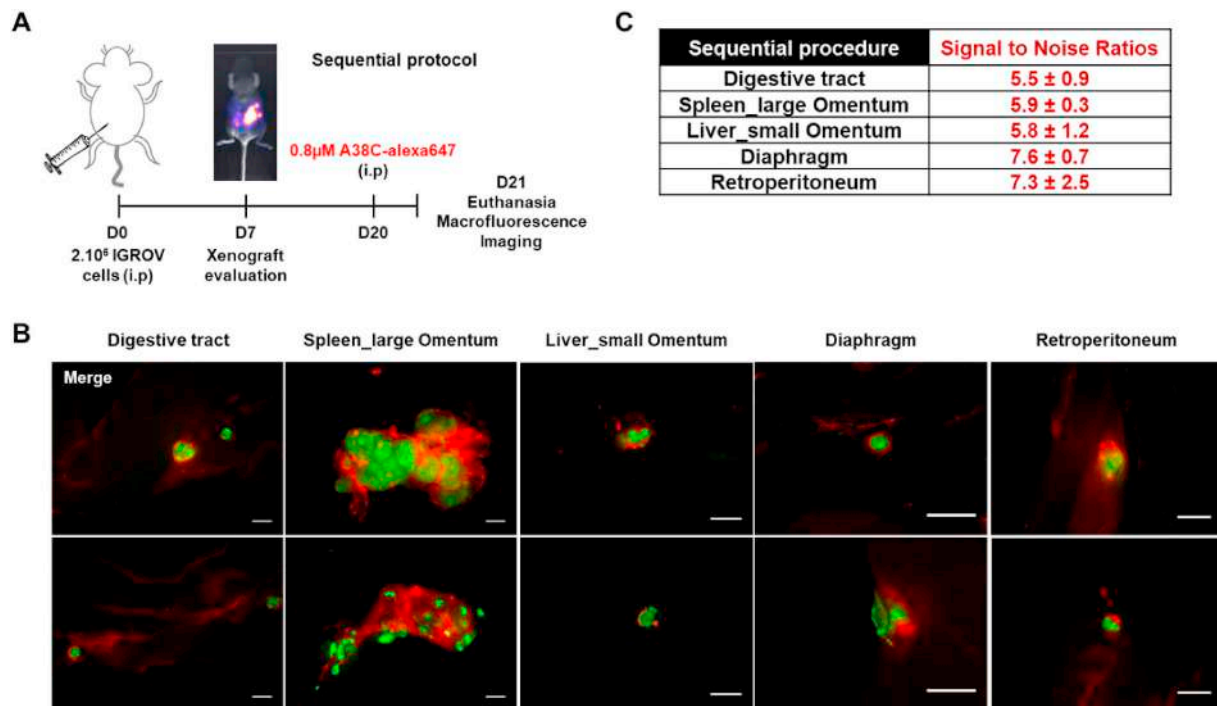


Fig. 5. Peritoneal carcinomatosis microscopic nodule detection in the sequential procedure. (A) Schematic illustration of the sequential experimental procedure: mice were xenograft with 2.10⁶ IGROV-1 cells by intraperitoneal injection and one day before euthanasia 0.8 μM of A38C-alexa647 was administrated by i.p injection. Xenografts were evaluated by non-invasive luminescence imaging at day 7 and animals were euthanized at day 21. (B) Macrofluorescence imaging of peritoneal tumors developed on preferential peritoneal carcinomatosis sites. Fluorescence images were acquired with an upright fluorescence microscope using proper filters to detect GFP constitutive expression of implanted human cells and the labeled protein A38C-alexa647. Tumor masses in green and A38C-alexa647 in red. Two representative mice are shown for each site. Scale bars = 1 mm. (C) Signal to noise ratios (SNR) calculated by image processing on tumor-bearing mice images (n = 3). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

was also surrounding the nodule, in a less clearly defined manner than the labelling obtained in the sequential protocol. The A38C fluorescent signal was also found inside nodules, and part of it co-localized with tumor cells (GFP signal). Healthy peritoneal tissue from non-tumor bearing mice (controls of both procedures) were also collected and prepared for confocal microscopy. Images from controls were processed the same way as images from tumor-bearing mice and presented to display equal dynamic range fluorescence intensity as images of nodules' frozen sections, as shown in figure S9E and F, for sequential and coinjection controls respectively. No background signal of the probe was visible in absence of tumor, so the signal observed on nodules' sections was specific. Our observations showed that the entire probe signal was found outside of nodules with the sequential procedure and most of it was not on the cancerous cells with the coinjection procedure. To get a more precise localization of cells interacting with the probe *in vivo*, we performed hematoxylin and eosin (H&E) staining on nodule's frozen section from the sequential protocol (Fig. 7C). It showed a putative fibroblast layer surrounding the peritoneal nodules and another layer of unidentified cells labeled by the A38C probe. To determine if it was a fibroblast layer, multiphoton microscopy and second harmonic generation (SHG) were used to visualize the collagen capsule synthesized by fibroblasts (Fig. 7D). The SHG signal was located on this first layer of cells surrounding nodules thereby identified as fibroblasts. The signal of the nanoprobe was found on an outer layer of unidentified non-GFP cells in the tumor microenvironment. The *in vivo* model was developed with immunodeficient mice that only conserved their innate immunity (lack of T cells, B cells remains). Among the variety of cells present in tumor microenvironment, the myeloid lineage is heavily represented, tumor associated macrophages (TAMs) and Myeloid Derived Suppressor cells (MDSCs) in particular [62–64]. Thus, we hypothesized that the cells labeled by the nanoprobe could be immune cells.

3.7. Identification of peritumoral cells labeled by A38C nanoprobe

To determine if immune cells within the tumor microenvironment were labeled by A38C-alexa647 in our model, we first realized immunohistofluorescence staining on nodules' frozen sections, from mice which underwent the sequential procedure, with a mouse anti-CD45 monoclonal antibody that revealed all immune cells from lymphoid and myeloid lineages. In Fig. 8A (see control isotype staining Figure S10), the CD45 signal on the bottom panel was more extended than on the top panel, pointing out two different stages of tumor microenvironment's development. However, in both cases the A38C-alexa647 signal was found at the periphery on cells stained with the anti-CD45 antibody. This observation suggested that the nanoprobe was able to detect peritoneal nodules independently of their microenvironment extent. In order to better qualify which type of immune cells were labeled by the nanoprobe, we then dissociated peritoneal nodules from mice which underwent the sequential protocol and used flow cytometry to identify populations. Thus, we started by isolating all cells positive for the A38C-alexa647 signal. More than 80% of these were positive for CD45 staining and almost 60% for CD11b staining, which showed that indeed immune cells (lymphoid and myeloid cells) were labeled by the nanoprobe and the majority of them were from the myeloid lineage (Fig. 8B). Among myeloid cells around 20% of cells stained with the nanoprobe were identified as TAMs and 35% as MDSCs and neutrophils (see gating strategies Figure S11, TAMs' gating strategy adapted from Ref. [65], and MDSCs' gating strategy from Ref. [66]). We also determined the percentage of TAMs (M1-like and M2-like phenotypes), MDSCs and neutrophils labeled with A38C-alexa647. Thus, around 60% of M1-like and M2-like macrophages and almost 40% of MDSCs and neutrophils were stained by the nanoprobe (Fig. 8C). Thus, in the sequential protocol, nodules' detection was made possible by the accumulation of immune cells expressing CD176 around the cancerous

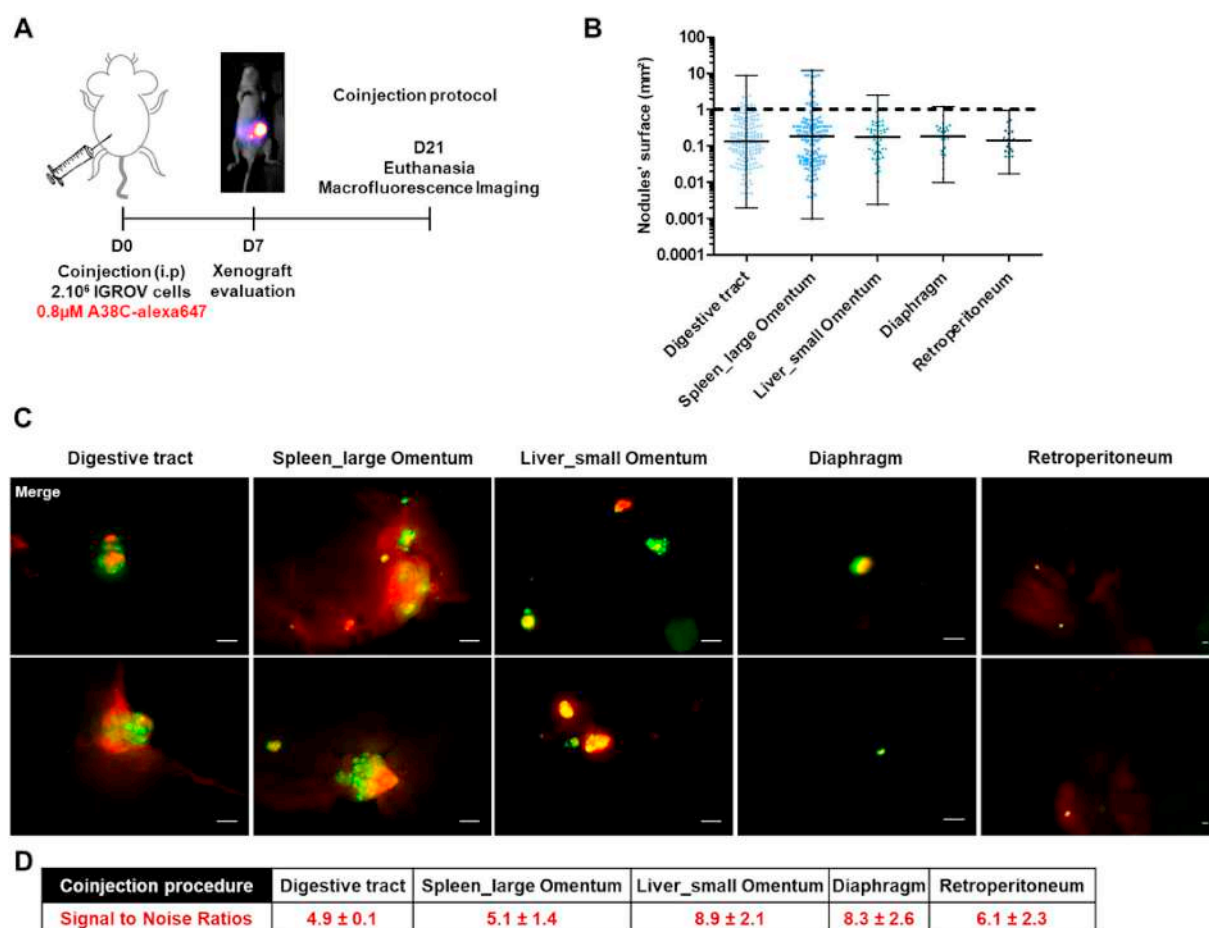


Fig. 6. Peritoneal carcinomatosis microscopic nodule detection in the coinjection procedure. **(A)** Schematic illustration of the coinjection experimental procedure: 2.10⁶ human ovarian adenocarcinoma cells (IGROV-1) are xenograft into nude mice by intraperitoneal (i.p) coinjection with 0.8 μM of A38C-alexa647. **(B)** Nodules surface assessments: evaluation of nodules' sizes at different preferential peritoneal carcinomatosis sites by image processing of macrofluorescence acquisitions using the constitutive GFP expression of IGROV-1 and the calibration of the camera. The dashed line at 1 mm² represents the human eye detection threshold (n = 6). **(C)** Macrofluorescence imaging of peritoneal tumors developed on preferential peritoneal carcinomatosis sites. Fluorescence images were acquired with an upright fluorescence macroscope using proper filters to detect GFP constitutive expression of implanted human cells and the labeled protein A38C-alexa647. Tumor masses in green and A38C-alexa647 in red. Two representative mice are shown for each site (n = 5). Scale bars = 1 mm. **(D)** Signal to noise ratios (SNR) calculated by image processing on tumor-bearing mice images (n = 3). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

tissues. This suggested that the nanoprobe would be able to detect microscopic nodules even at their earliest development stages.

4. Discussion

In this project, we focused on EOC as a generic model but the approach developed here could be extended to other epithelial cancers since the TF antigen detected by the nanoprobe is a carcinoma biomarker. The choice of the model to evaluate the potential of A38C-alexa647 as a nanoprobe was conditioned by the established characteristics and stability of the A38C protein, which could answer several challenges raised by surgeons. On top of that the already existing FDA approved protein marker for EOC (MUC16) is known to carry the TF antigen, specific target of our nano object. The *in vitro* model comprised 3 human adenocarcinoma cell lines chosen in order to evaluate the membrane recognition of the glycan marker carried by MUC16 and other mucins or mucin-like proteins. We saw that A38C-alexa647 stained all 3 cell lines independently of their MUC16 expression. It is important to underline that the glycan recognized by the A38C protein is only expressed on proteins at the membrane of cancerous cells and masked on healthy cells by more complex and ramified glycosylations of the same proteins [37,38]. These are the same on healthy and

cancerous cells, but they are overexpressed in the context of cancer. The detection of the circulating form of MUC16, CA125, in the blood stream is not used in diagnostic because of high false positives rate, however targeting the glycan marker carried by CA125, or other circulating mucin-like protein, would permit to select only the CA125 coming from ovarian carcinoma and thus increase the sensitivity of detection.

Once the *in vivo* model established, we expected to directly detect tumor masses developed with the IGROV-1 cells intraperitoneally injected in mice. As demonstrated here, macrofluorescence imaging proved that the detection of submillimeter nodules within the peritoneal cavity of small animals was doable, and the A38C-alexa647 signals seemed to co-localize with the GFP nodule signals. The confocal microscopy on nodules' frozen sections demonstrated that direct detection of the tumor cells was only possible with the coinjection procedure. In this protocol, developed to imitate the detachment of cells during the cytoreductive surgery, the nanoprobe signal was found inside and outside the nodules, mostly on non-GFP cells but also in part on IGROV-1 GFP cells. Those experiments also showed a persistence of the labelling for at least 3 weeks in the peritoneal cavity, a property of the nanoprobe that can be exploited for a post-operative follow up by non-invasive fluorescence imaging. As previously described [50], the A38C protein is also a nanocontainer able to carry a therapeutic molecule,

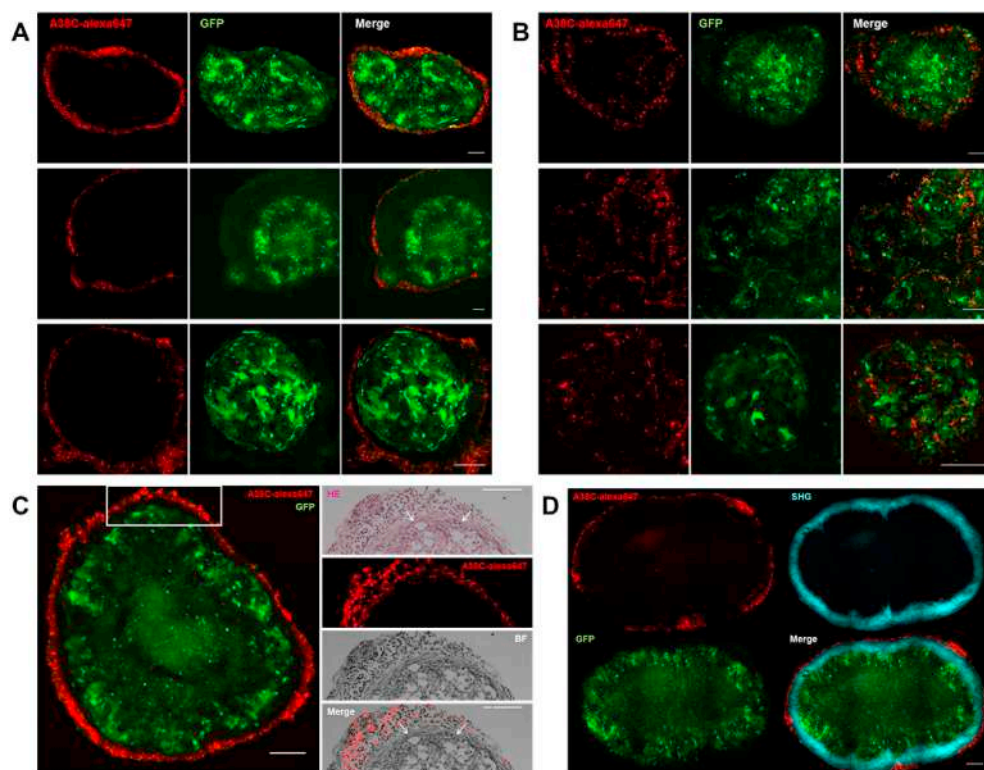


Fig. 7. Characterization of A38C interaction with nodules *in vivo*. Confocal imaging of peritoneal nodules' frozen sections developed on preferential peritoneal carcinomatosis sites. (A) **Sequential** and (B) **Coinjection protocols**. Images were analyzed with Fiji software. Tumor masses fluorescent signal (GFP) and A38C probe fluorescent signal (alexa647) are intrinsic. Three representative nodules from various sites are presented for each procedure. $n = 6$ mice. (C) Left panel: Confocal imaging of a peritoneal nodule from a mouse that underwent sequential protocol; right panel (white square region of the left panel): H&E staining of the next serial frozen section, color, fluorescence (alexa647) and bright field images (BF). The arrows on the HE and merge images point to the fibroblast layer surrounding the nodule. (D) **Multiphoton microscopy**: tumor masses fluorescent signal (GFP) and A38C probe fluorescent signal (alexa647) are intrinsic, second harmonic generation (SHG) was used to visualize the collagen capsule. $n = 2$ mice. Images were analyzed with Fiji software. Confocal, HE staining and Multiphoton frozen sections thicknesses = 20 μm /10 μm /80 μm . Scale bars = 100 μm . (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

confined in its cavity, to carcinoma cells and deliver it to endosomes and late lysosomes after specific recognition of the TF antigen and subsequent endocytosis. In light of those results, the combination of imaging and targeted drug delivery in a nanotheranostic approach is worth considering with the coinjection procedure.

Secondly, the sequential procedure did not demonstrate a direct detection of tumor cells in nodules but rather an indirect one with the staining of immune cells in tumor microenvironment. It is conceivable that the collagen capsule, seen in multiphoton microscopy surrounding the nodules, presented as a barrier which prevented direct interaction of cancerous cells with the nanoprobe *in vivo*. Our results suggested that the glycan cancer biomarker (TF antigen), described on 80–90% of epithelial tumors, was also expressed by various immune cell types in the tumor microenvironment. Indeed, expression of the TF antigen was already described on cells from the lymphoid and myeloid lineages. By comparing reactivity of peanut agglutinin (PNA) and monoclonal antibodies specific of TF antigen, staining was found on pre-B cells in bone marrow, immature thymocytes and blastic cells in most cases of acute leukemia, but there was no staining in normal mature peripheral blood lymphocytes because the glycan marker was not present in mature B cells and masked by sialic acid in mature T cells [43–45]. Knowing that only B cells were present in our mouse model, we assumed that part of the $\text{CD45}^+/\text{CD11b}^-$ cells, among cells labeled by the nanoprobe, could be cancer-associated B cells. As for the myeloid lineage, monoclonal antibodies and PNA positively stained CD176 on macrophages in lymphoid organs (Thymus gland, Spleen and Lymph nodes) but there was no expression on macrophages in connective tissues [38]. The TF antigen was also found on acute myeloid leukemia cells carried by other proteins than in carcinoma cells [67], indeed co-staining of CD45 and CD176 has already been described on human leukemic cells [68]. Although as previously shown, there was no background signal within the peritoneal cavity of tumor bearing or non-tumor bearing mice, so the A38C-alexa647 nanoprobe did not stain immune cells, such as peritoneal resident macrophages, other than cancer-associated ones.

Moreover, this sequential procedure being developed to mimic an intraoperative assistance to the surgeons during CRS, the labelling of tumor microenvironment might allow the detection of even smaller niches of carcinomatosis. However, in this case before considering a theranostic development, the effect of targeted drug delivery on the immune cells labeled by the nanoprobe has to be addressed.

The mice model used here was developed with immortalized cell lines because they were easy to handle, cultivate and transduce with reporter genes. The proof of concept being now established for both the nanocontainer and nanoprobe aspects of the A38C protein, better models of peritoneal carcinomatosis have to be developed to pursue a theranostic approach. Patient Derived Xenograft (PDX) models consist in the engraftment of a small piece of tumor extracted surgically from a patient, established after several passages in animals and verification of patient-like clinical features preservation (histological and genomic profiles) [69–71]. These kind of PDX models would permit to determine the efficiency of an intraperitoneal nanotheranostic setting using the A38C protein as an imaging probe and a cargo transporting therapeutic molecules. PDX from chemo resistant patients could also be developed to evaluate the ability of the A38C nanocontainer to bypass the chemo resistance often acquired during carcinomatosis relapse.

5. Conclusions

The present work first demonstrated the specific detection of a cancer-associated glycan biomarker *in vitro* on three human adenocarcinoma cell lines, independently of MUC16 expression. This interaction was specific, fast and with an apparent KD around 100 nM. In accordance with surgeons' specifications we obtained a microscopic detection of nodules in the peritoneal cavity of IGROV-1 tumor bearing mice, this cell line being the one expressing the smallest rate of glycan biomarker among the 3 cell lines composing the *in vitro* models. The A38C-alexa647 nanoprobe allowed a direct detection of tumor cells *in vivo* with the coinjection procedure, thus its utilization during surgery

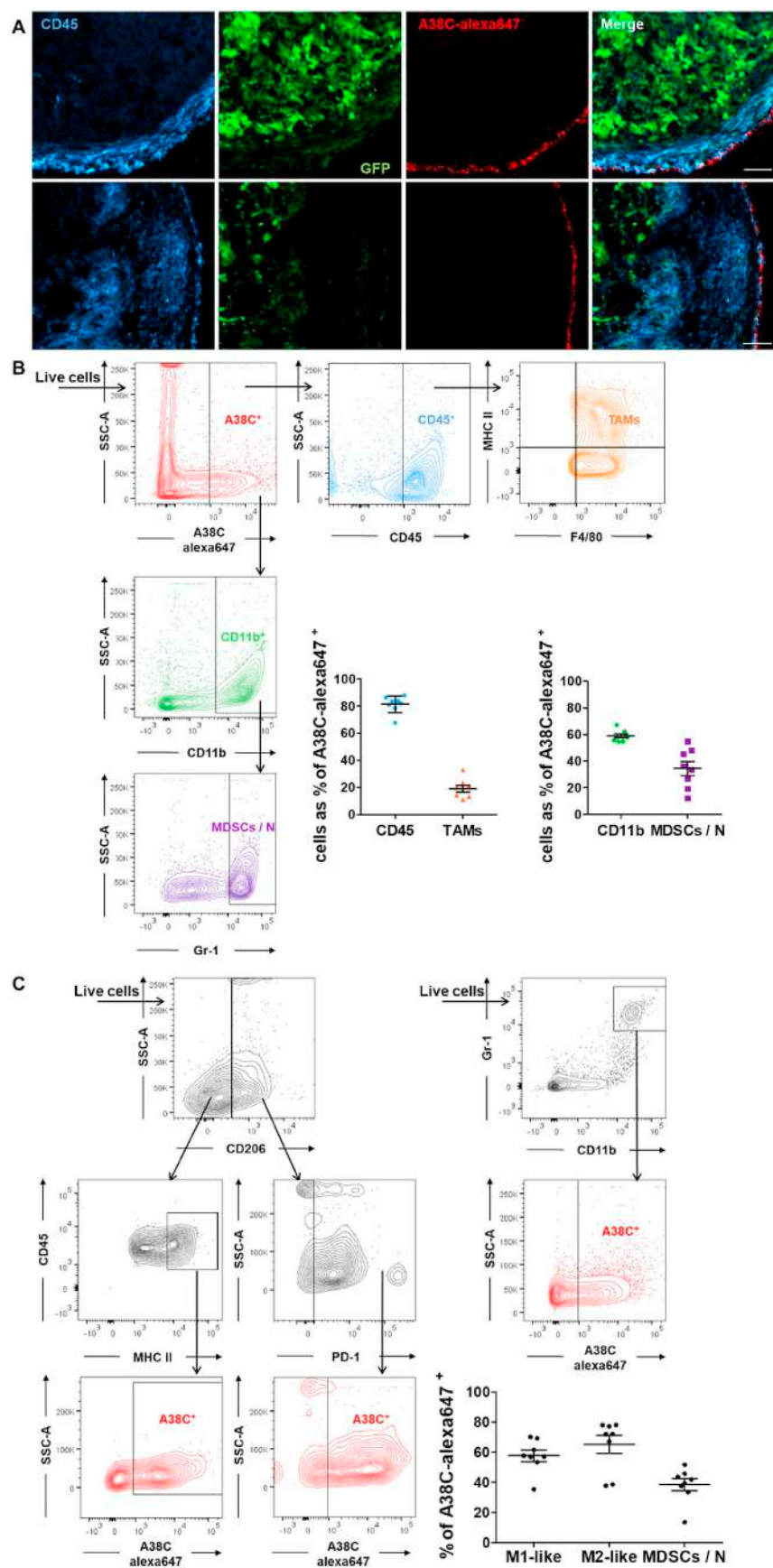


Fig. 8. Tumor microenvironment labeled by A38C nanoprobe (A) Immunohistofluorescence on peritoneal nodules' frozen sections stained with a mouse anti-CD45 monoclonal antibody coupled to an alexa405 dye. Tumor masses fluorescent signal (GFP) and A38C probe fluorescent signal (alexa647) are intrinsic. Representative images from 2 mice. Frozen sections thickness = 20 μ m. Scale bars = 50 μ m. (B and C) Flow cytometry analysis with two antibodies panels on peritoneal nodules' dissociation, after debris, doublets and dead cells exclusion (see figure S10 for gating strategies). (B) Percentage of CD45 (immune cells), CD11b (myeloid cells), tumor associated macrophages (TAMs) and Myeloid Derived Suppressor cells (MDSCs) and neutrophils (N) within the cells labeled by A38C-alexa647. (C) Percentage of A38C-alexa647 positive cells within M1-like, M2-like macrophages, Myeloid Derived Suppressor cells (MDSCs) and neutrophils (N). Representative contour plots from $n = 8$ mice in each antibody panel.

can be considered. It was also possible to use the nanoprobe to detect nodules already implanted in the peritoneal cavity. It is interesting to notice that in this case the immune cells surrounding the nodules were targeted. In future developments, we will work on PDX models of ovarian peritoneal carcinomatosis to be as close as possible to the clinic situation, and test the combination of the nanoprobe and nanocontainer aspects of the A38C variant in an intraperitoneal nanotheranostic approach.

CRedit authorship contribution statement

Mathilde Coustets: Conceptualization, Methodology, Resources, Investigation, Formal analysis, Data curation, Writing - original draft, Writing - review & editing, Visualization. **Caroline Ladurantie:** Resources, Investigation, Writing - review & editing. **Elisabeth Bellard:** Methodology, Resources, Investigation, Formal analysis, Data curation, Writing - review & editing. **Mélissa Prat:** Methodology, Resources, Investigation, Formal analysis, Data curation, Writing - review & editing. **Marie-Pierre Rols:** Writing - review & editing. **Vincent Ecochard:** Resources, Investigation, Writing - review & editing. **Gwenaél Ferron:** Methodology, Formal analysis, Data curation, Writing - review & editing, Visualization. **Sophie Chabot:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Data curation, Writing - review & editing, Visualization, Funding acquisition. **Muriel Golzio:** Conceptualization, Methodology, Resources, Investigation, Formal analysis, Data curation, Writing - original draft, Writing - review & editing, Visualization, Funding acquisition. **Laurent Paquereau:** Conceptualization, Methodology, Resources, Investigation, Formal analysis, Data curation, Writing - original draft, Writing - review & editing, Visualization, Funding acquisition, Supervision.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

Financial support for this project was provided and by a CIFRE fellowship co-funded by Urosphere and the French Ministry of Higher Education and Research through a doctoral fellowship (grant no. 168155). This work was part of the “MAGENTA” Program overseen by the BPI (Banque publique d'investissement, France). This work was also supported by the Région Occitanie (grant no. 19000680) and by GTP Technology (grant no. 159649). The authors gratefully thank Pr Bettina Couderc for the retrieval of IGROV-1 cells from the Gustave Roussy Institute, Dr Agnes Coste for her help in the characterization of immune cells, the flow cytometry platform of Rangueil university hospital for their availability and technical support, Dr Emma Lefrançois for her help in flow cytometry data analysis and Laetitia Hellaudais for her help with animal homing and well-being. We would like to thank the TRI Imaging Core Facility and the Anexplo facility of IPBS.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.119908>.

Data availability

The raw/processed data required to reproduce these findings cannot be shared at this time as the data also forms part of an ongoing study.

References

- [1] G.P. Dotto, Multifocal epithelial tumors and field cancerization: stroma as a primary determinant, *J. Clin. Invest.* 124 (2014) 1446–1453, <https://doi.org/10.1172/JCI72589>.
- [2] P. Jessmon, T. Boulanger, W. Zhou, P. Patwardhan, Epidemiology and treatment patterns of epithelial ovarian cancer, *Expert Rev. Anticancer Ther.* 17 (2017) 427–437, <https://doi.org/10.1080/14737140.2017.1299575>.
- [3] S. Banerjee, S.B. Kaye, New strategies in the treatment of ovarian cancer: current clinical perspectives and future potential, *Clin. Canc. Res.: Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 19 (2013) 961–968, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-2243>.
- [4] S. Lheureux, M. Braunstein, A.M. Oza, Epithelial ovarian cancer: evolution of management in the era of precision medicine, *CA, A Cancer J. Clin.* 69 (2019) 280–304, <https://doi.org/10.3322/caac.21559>.
- [5] J. Prat, FIGO's staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum: abridged republication, *J. Gynecol. Oncol.* 26 (2015) 87–89, <https://doi.org/10.3802/jgo.2015.26.2.87>.
- [6] A.P. Singh, S. Senapati, M.P. Ponnusamy, M. Jain, S.M. Lele, J.S. Davis, S. Remmenga, S.K. Batra, Clinical potential of mucins in diagnosis, prognosis, and therapy of ovarian cancer, *Lancet Oncol.* 9 (2008) 1076–1085, [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(08\)70277-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(08)70277-8).
- [7] A.M. Oza, A.D. Cook, J. Pfisterer, A. Embleton, J.A. Ledermann, E. Pujade-Lauraine, G. Kristensen, M.S. Carey, P. Beale, A. Cervantes, T.W. Park-Simon, G. Rustin, F. Joly, M.R. Mirza, M. Plante, M. Quinn, A. Poveda, G.C. Jayson, D. Stark, A.M. Swart, L. Farrelly, R. Kaplan, M.K. Parmar, T.J. Perren, Standard chemotherapy with or without bevacizumab for women with newly diagnosed ovarian cancer (ICON7): overall survival results of a phase 3 randomised trial, *Lancet Oncol.* 16 (2015) 928–936, [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00086-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00086-8).
- [8] K. Moore, N. Colombo, G. Scambia, B.G. Kim, A. Oaknin, M. Friedlander, A. Lisysanskaya, A. Floquet, A. Leary, G.S. Sonke, C. Gourley, S. Banerjee, A. Oza, A. Gonzalez-Martin, C. Aghajanian, W. Bradley, C. Mathews, J. Liu, E.S. Lowe, R. Bloomfield, P. DiSilvestro, Maintenance olaparib in patients with newly diagnosed advanced ovarian cancer, *N. Engl. J. Med.* 379 (2018) 2495–2505, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1810858>.
- [9] L.A. Baldwin, B. Huang, R.W. Miller, T. Tucker, S.T. Goodrich, I. Podzielinski, C.P. DeSimone, F.R. Ueland, J.R. van Nagell, L.G. Seamon, Ten-year relative survival for epithelial ovarian cancer, *Obstet. Gynecol.* 120 (2012) 612–618, <https://doi.org/10.1097/AOG.0b013e318264f794>.
- [10] Z. Lu, J. Wang, M.G. Wientjes, J.L. Au, Intraperitoneal therapy for peritoneal cancer, *Future Oncol.* 6 (2010) 1625–1641, <https://doi.org/10.2217/fon.10.100>.
- [11] D.F. Silver, D.S. Chi, N. Bou-Zgheib, Clinical approach to diagnosis and management of ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma, *Surg. Pathol. Clin.* 4 (2011) 261–274, <https://doi.org/10.1016/j.path.2010.12.003>.
- [12] S.H. Chandrasekhara, G.S. Triveni, R. Kumar, Imaging of peritoneal deposits in ovarian cancer: a pictorial review, *World J. Radiol.* 8 (2016) 513–517, <https://doi.org/10.4329/wjr.v8.i5.513>.
- [13] T. Mangeolle, I. Yakavets, S. Marchal, M. Debayle, T. Pons, L. Bezdetnaya, F. Marchal, Fluorescent nanoparticles for the guided surgery of ovarian peritoneal carcinomatosis, *Nanomaterials* 8 (2018), <https://doi.org/10.3390/nano8080572>.
- [14] F. Raspagliesi, S. Kusamura, J.C. Campos Torres, G.A. de Souza, A. Ditto, F. Zanaboni, R. Younan, D. Baratti, L. Mariani, B. Laterza, M. Deraco, Cytoreduction combined with intraperitoneal hyperthermic perfusion chemotherapy in advanced/recurrent ovarian cancer patients: the experience of national cancer institute of Milan, *Eur. J. Surg. Oncol.: J. Eur. Soc. Surg. Oncol. Br. Assoc. Surg. Oncol.* 32 (2006) 671–675, <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2006.03.011>.
- [15] W.E. Winter, G.L. Maxwell, C. Tian, M.J. Sundborg, G.S. Rose, P.G. Rose, S.C. Rubin, F. Muggia, W.P. McGuire, Tumor residual after surgical cytoreduction in prediction of clinical outcome in stage IV epithelial ovarian cancer: a gynecologic oncology group study, *J. Clin. Oncol.: Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 26 (2008) 83–89, <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.13.1953>.
- [16] H. Azais, J.P. Estevez, P. Foucher, Y. Kerbage, S. Mordon, P. Collinet, Dealing with microscopic peritoneal metastases of epithelial ovarian cancer. A surgical challenge, *Surg. Oncol.* 26 (2017) 46–52, <https://doi.org/10.1016/j.suronc.2017.01.001>.
- [17] A.L. Vahrmeijer, M. Hutteman, J.R. van der Vorst, C.J. van de Velde, J.V. Frangioni, Image-guided cancer surgery using near-infrared fluorescence, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 10 (2013) 507–518, <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2013.123>.
- [18] D. Asanuma, M. Sakabe, M. Kamiya, K. Yamamoto, J. Hiratake, M. Ogawa, N. Kosaka, P.L. Choyke, T. Nagano, H. Kobayashi, Y. Urano, Sensitive beta-galactosidase-targeting fluorescence probe for visualizing small peritoneal metastatic tumours in vivo, *Nat. Commun.* 6 (2015) 6463, <https://doi.org/10.1038/ncomms7463>.
- [19] L. Zhao, W. Yuan, J. Li, L. Yang, Y. Su, J. Peng, R. Chen, H.P. Tham, H. Chen, W.Q. Lim, H. Xiang, P. Xing, F. Li, Y. Zhao, Independent of EPR effect: a smart delivery nanosystem for tracking and treatment of nonvascularized intra-abdominal metastases, *Adv. Funct. Mater.* 28 (2018) 1806162, <https://doi.org/10.1002/adfm.201806162>.
- [20] H. Azais, G. Canlorbe, Y. Kerbage, A. Grabarz, P. Collinet, S. Mordon, Image-guided surgery in gynecologic oncology, *Future Oncol.* 13 (2017) 2321–2328, <https://doi.org/10.2217/fon-2017-0253>.
- [21] M.B. Reinhardt, C.R. Huntington, L.J. Blair, B.T. Heniford, V.A. Augenstein, Indocyanine green: historical context, current applications, and future considerations, *Surg. Innovat.* 23 (2016) 166–175, <https://doi.org/10.1177/1553350615604053>.
- [22] Q.R. Tummers, C.E. Hoogstins, A.A. Peters, C.D. de Kroon, J.B. Trimbois, C.J. van de

- Velde, J.V. Frangioni, A.L. Vahrmeijer, K.N. Gaarenstroom, The value of intraoperative near-infrared fluorescence imaging based on enhanced permeability and retention of indocyanine green: feasibility and false-positives in ovarian cancer, *PLoS One* 10 (2015) e0129766, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129766>.
- [23] M. Loning, H. Diddens, W. Kupker, K. Diedrich, G. Huttman, Laparoscopic fluorescence detection of ovarian carcinoma metastases using 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX, *Cancer* 100 (2004) 1650–1656, <https://doi.org/10.1002/cncr.20155>.
- [24] Y. Yonemura, E. Canbay, H. Ishibashi, E. Nishino, Y. Endou, S. Sako, S. Ogura, 5-Aminolevulinic acid fluorescence in detection of peritoneal metastases, *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP: Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* 17 (2016) 2271–2275, <https://doi.org/10.7314/apjcp.2016.17.4.2271>.
- [25] B. Krammer, K. Plaetzer, ALA and its clinical impact, from bench to bedside, *Photochem. Photobiol. Sci.: Off. J. Eur. Photochem. Assoc. Eur. Soc. Photobiol.* 7 (2008) 283–289, <https://doi.org/10.1039/b712847a>.
- [26] Y. Liu, Y. Endo, T. Fujita, H. Ishibashi, T. Nishioka, E. Canbay, Y. Li, S. Ogura, Y. Yonemura, Cytofluorescence imaging under aminolevulinic acid-mediated photodynamic diagnosis plus hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in patients with peritoneal carcinomatosis from ovarian cancer and primary peritoneal carcinoma: results of a phase I trial, *Ann. Surg. Oncol.* 21 (2014) 4256–4262, <https://doi.org/10.1245/s10434-014-3901-5>.
- [27] X. Ni, X. Zhang, X. Duan, H.-L. Zheng, X.-S. Xue, D. Ding, Near-infrared afterglow luminescent aggregation-induced emission dots with ultrahigh tumor-to-liver signal ratio for promoted image-guided cancer surgery, *Nano Lett.* 19 (2019) 318–330, <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.8b03936>.
- [28] C. Chen, X. Ni, H.-W. Tian, Q. Liu, D.-S. Guo, D. Ding, Calixarene-based supramolecular AIE dots with highly inhibited nonradiative decay and intersystem crossing for ultrasensitive fluorescence image-guided cancer surgery, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* (2020), <https://doi.org/10.1002/anie.201916430>.
- [29] G.M. van Dam, G. Themelis, L.M. Crane, N.J. Harlaar, R.G. Pleijhuis, W. Kelder, A. Sarantopoulos, J.S. de Jong, H.J. Arts, A.G. van der Zee, J. Bart, P.S. Low, V. Ntziachristos, Intraoperative tumor-specific fluorescence imaging in ovarian cancer by folate receptor- α targeting: first in-human results, *Nat. Med.* 17 (2011) 1315–1319, <https://doi.org/10.1038/nm.2472>.
- [30] C.E. Hoogstins, Q.R. Tummers, K.N. Gaarenstroom, C.D. de Kroon, J.B. Trimbos, T. Bosse, V.T. Smit, J. Vuyk, C.J. van de Velde, A.F. Cohen, P.S. Low, J. Burggraaf, A.L. Vahrmeijer, A novel tumor-specific agent for intraoperative near-infrared fluorescence imaging: a translational study in healthy volunteers and patients with ovarian cancer, *Clin. Cancer Res.: Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 22 (2016) 2929–2938, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2640>.
- [31] I. Jacobs, R.C. Bast, The CA 125 tumour-associated antigen: a review of the literature, *Hum. Reprod.* 4 (1989) 1–12, <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a136832>.
- [32] M.K. Tuxen, G. Soletormos, P. Dornbrowsky, Tumor markers in the management of patients with ovarian cancer, *Canc. Treat. Rev.* 21 (1995) 215–245, [https://doi.org/10.1016/0305-7372\(95\)90002-0](https://doi.org/10.1016/0305-7372(95)90002-0).
- [33] F.G. Hanisch, S.E. Baldus, The Thomsen-Friedenreich (TF) antigen: a critical review on the structural, biosynthetic and histochemical aspects of a pancarcinoma-associated antigen, *Histol. Histopathol.* 12 (1997) 263–281.
- [34] T. Ju, R.D. Cummings, A unique molecular chaperone Cosmc required for activity of the mammalian core 1 β -galactosyltransferase, *Proceed. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 16613–16618, <https://doi.org/10.1073/pnas.262438199>.
- [35] L.G. Yu, The oncofetal Thomsen-Friedenreich carbohydrate antigen in cancer progression, *Glycoconj. J.* 24 (2007) 411–420, <https://doi.org/10.1007/s10719-007-9034-3>.
- [36] I. Hauselmann, L. Borsig, Altered tumor-cell glycosylation promotes metastasis, *Front. Oncol.* 4 (2014) 28, <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00028>.
- [37] M. Yuan, S.H. Itzkowitz, C.R. Boland, Y.D. Kim, J.T. Tomita, A. Palekar, J.L. Bennington, B.F. Trump, Y.S. Kim, Comparison of T-antigen expression in normal, premalignant, and malignant human colonic tissue using lectin and antibody immunohistochemistry, *Canc. Res.* 46 (1986) 4841–4847.
- [38] Y. Cao, P. Stosiek, G.F. Springer, U. Karsten, Thomsen-Friedenreich-related carbohydrate antigens in normal adult human tissues: a systematic and comparative study, *Histochem. Cell Biol.* 106 (1996) 197–207, <https://doi.org/10.1007/bf02484401>.
- [39] G.F. Springer, P.R. Desai, I. Banatwala, Blood group MN antigens and precursors in normal and malignant human breast glandular tissue, *J. Natl. Cancer Inst.* 54 (1975) 335–339.
- [40] G.F. Springer, P.R. Desai, M.S. Murthy, H. Tegtmeier, E.F. Scanlon, Human carcinoma-associated precursor antigens of the blood group MN system and the host's immune responses to them, *Prog. Allergy* 26 (1979) 42–96.
- [41] G.F. Springer, Immunoreactive T and Tn epitopes in cancer diagnosis, prognosis, and immunotherapy, *J. Mol. Med. (Berl.)* 75 (1997) 594–602, <https://doi.org/10.1007/s001090050144>.
- [42] S.E. Baldus, J. Thiele, Y.O. Park, A. Charles, C. Mross, F.G. Hanisch, T.K. Zirbes, C. Wickenhauser, R. Fischer, Carbohydrate and peptide antigens in macrophage populations derived from human bone marrow and milk: an immunomorphological and immunochemical analysis, *Histochem. J.* 27 (1995) 630–638.
- [43] R.A. Newman, M.A. Boss, Expression of binding sites for peanut agglutinin during murine B lymphocyte differentiation, *Immunology* 40 (1980) 193–200.
- [44] Y. Reisner, L. Itzicovitch, A. Meshorer, N. Sharon, Hemopoietic stem cell transplantation using mouse bone marrow and spleen cells fractionated by lectins, *Proceed. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 75 (1978) 2933–2936, <https://doi.org/10.1073/pnas.75.6.2933>.
- [45] Y. Reisner, M. Biniaminov, E. Rosenthal, N. Sharon, B. Ramot, Interaction of peanut agglutinin with normal human lymphocytes and with leukemic cells, *Proceed. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 76 (1979) 447–451, <https://doi.org/10.1073/pnas.76.1.447>.
- [46] V. Trigueros, A. Lougarre, D. Ali-Ahmed, Y. Rahbe, J. Guillot, L. Chavant, D. Fournier, L. Paquereau, Xerocomus chrysenteron lectin: identification of a new pesticidal protein, *Biochim. Biophys. Acta* 1621 (2003) 292–298, [https://doi.org/10.1016/s0304-4165\(03\)00098-9](https://doi.org/10.1016/s0304-4165(03)00098-9).
- [47] L. Damian, D. Fournier, M. Winterhalter, L. Paquereau, Determination of thermodynamic parameters of Xerocomus chrysenteron lectin interactions with N-acetylglucosamine and Thomsen-Friedenreich antigen by isothermal titration calorimetry, *BMC Biochem.* 6 (2005) 11, <https://doi.org/10.1186/1471-2091-6-11>.
- [48] F. Francis, C. Marty-Detraves, R. Poincloux, L. Baricault, D. Fournier, L. Paquereau, Fungal lectin, XCL, is internalized via clathrin-dependent endocytosis and facilitates uptake of other molecules, *Eur. J. Cell Biol.* 82 (2003) 515–522, <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00338>.
- [49] C. Birk, L. Damian, C. Marty-Detraves, A. Lougarre, C. Schulze-Briese, P. Koehl, D. Fournier, L. Paquereau, J.P. Samama, A new lectin family with structure similarity to actinoporins revealed by the crystal structure of Xerocomus chrysenteron lectin XCL, *J. Mol. Biol.* 344 (2004) 1409–1420, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.10.007>.
- [50] C. Ladurantie, M. Coustets, G. Czaplicki, P. Demange, S. Mazeres, S. Dauvillier, J. Teissie, M.P. Rols, A. Milon, V. Ecochard, G. Gross, L. Paquereau, A protein nanocontainer targeting epithelial cancers: rational engineering, biochemical characterization, drug loading and cell delivery, *Nanoscale* 11 (2019) 3248–3260, <https://doi.org/10.1039/c9nr10249j>.
- [51] J. Benard, J. Da Silva, M.C. De Blois, P. Boyer, P. Duvillard, E. Chiric, G. Riou, Characterization of a human ovarian adenocarcinoma line, IGROV1, in tissue culture and in nude mice, *Canc. Res.* 45 (1985) 4970–4979.
- [52] M. Shrivastav, E. Gounaris, M.W. Khan, J. Ko, S.H. Ryu, M. Bogoy, A. Larson, T.A. Barret, D.J. Bentrem, Validation of near infrared fluorescence (NIRF) probes in vivo with dual laser NIRF endoscope, *PLoS One* 13 (2018) e0206568, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206568>.
- [53] L.C.C. Schrödinger, The PyMOL Molecular Graphics System, (2015).
- [54] T.C. Hamilton, R.C. Young, W.M. McKoy, K.R. Grotzinger, J.A. Green, E.W. Chu, J. Whang-Peng, A.M. Rogan, W.R. Green, R.F. Ozols, Characterization of a human ovarian carcinoma cell line (NIH:OVCA-3) with androgen and estrogen receptors, *Canc. Res.* 43 (1983) 5379–5389.
- [55] J. Fogh, J.M. Fogh, T. Orfeo, One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice, *J. Natl. Cancer Inst.* 59 (1977) 221–226, <https://doi.org/10.1093/jnci/59.1.221>.
- [56] E. Lengyel, J.E. Burdette, H.A. Kenny, D. Matei, J. Pilrose, P. Haluska, K.P. Nephew, D.B. Hales, M.S. Stack, Epithelial ovarian cancer experimental models, *Oncogene* 33 (2014) 3619–3633, <https://doi.org/10.1038/onc.2013.321>.
- [57] C.M. Beaufort, J.C. Helmijr, A.M. Piskorz, M. Hoogstraat, K. Ruigrok-Ritstier, N. Besselink, M. Murtaza, I.J.W.F. van, A.A. Heine, M. Smid, M.J. Koudijs, J.D. Brenton, E.M. Berns, J. Helleman, Ovarian cancer cell line panel (OCCP): clinical importance of in vitro morphological subtypes, *PLoS One* 9 (2014) e103988, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103988>.
- [58] B.W. Yin, K.O. Lloyd, Molecular cloning of the CA125 ovarian cancer antigen: identification as a new mucin, MUC16, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 27371–27375, <https://doi.org/10.1074/jbc.M103554200>.
- [59] I. Matte, D. Lane, M. Boivin, C. Rancourt, A. Piche, MUC16 mucin (CA125) attenuates TRAIL-induced apoptosis by decreasing TRAIL receptor R2 expression and increasing c-FLIP expression, *BMC Canc.* 14 (2014) 234, <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-234>.
- [60] M.F. Burbridge, L. Kraus-Berthier, M. Naze, A. Pierre, G. Atassi, N. Guilbaud, Biological and pharmacological characterisation of three models of human ovarian carcinoma established in nude mice: use of the CA125 tumour marker to predict antitumour activity, *Int. J. Oncol.* 15 (1999) 1155–1162, <https://doi.org/10.3892/ijo.15.6.1155>.
- [61] L. Picaud, B. Thibault, E. Mery, M. Ouali, A. Martinez, J.P. Delord, B. Couderc, G. Ferron, Evaluation of the effects of hyaluronic acid-carboxymethyl cellulose barrier on ovarian tumor progression, *J. Ovarian Res.* 7 (2014) 40, <https://doi.org/10.1186/1757-2215-7-40>.
- [62] A. Mantovani, P. Allavena, A. Sica, F. Balkwill, Cancer-related inflammation, *Nature* 454 (2008) 436–444, <https://doi.org/10.1038/nature07205>.
- [63] A. Mantovani, A. Sica, Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity, *Curr. Opin. Immunol.* 22 (2010) 231–237, <https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.01.009>.
- [64] M.C. Schmid, J.A. Varner, Myeloid cells in tumor inflammation, *Vasc. Cell* 4 (2012) 14, <https://doi.org/10.1186/2045-824X-4-14>.
- [65] S.R. Gordon, R.L. Maute, B.W. Dulken, G. Hutter, B.M. George, M.N. McCracken, R. Gupta, J.M. Tsai, R. Sinha, D. Corey, A.M. Ring, A.J. Connolly, I.L. Weissman, PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity, *Nature* 545 (2017) 495–499, <https://doi.org/10.1038/nature22396>.
- [66] V. Bronte, S. Brandau, S.H. Chen, M.P. Colombo, A.B. Frey, T.F. Greden, S. Mandruzzato, P.J. Murray, A. Ochoa, S. Ostrand-Rosenberg, P.C. Rodriguez, A. Sica, V. Umansky, R.H. Vonderheide, D.I. Gabrilovich, Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards, *Nat. Commun.* 7 (2016) 12150, <https://doi.org/10.1038/ncomms12150>.
- [67] Y. Cao, A. Merling, U. Karsten, S. Goletz, M. Punzel, R. Kraft, G. Butschak, R. Schwartz-Albiez, Expression of CD175 (Tn), CD175s (sialosyl-Tn) and CD176 (Thomsen-Friedenreich antigen) on malignant human hematopoietic cells, *Int. J. Canc.* 123 (2008) 89–99, <https://doi.org/10.1002/ijc.23493>.
- [68] B. Yi, M. Zhang, R. Schwartz-Albiez, Y. Cao, Mechanisms of the apoptosis induced by CD176 antibody in human leukemic cells, *Int. J. Oncol.* 38 (2011) 1565–1573, <https://doi.org/10.3892/ijo.2011.992>.

- [69] J.D. Boone, Z.C. Dobbin, J.M. Straughn, D.J. Buchsbaum, Ovarian and cervical cancer patient derived xenografts: the past, present, and future, *Gynecol. Oncol.* 138 (2015) 486–491, <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2015.05.022>.
- [70] J. Liu, C. Chen, S. Ji, Q. Liu, D. Ding, D. Zhao, B. Liu, Long wavelength excitable near-infrared fluorescent nanoparticles with aggregation-induced emission characteristics for image-guided tumor resection, *Chem. Sci.* 8 (2017) 2782–2789, <https://doi.org/10.1039/c6sc04384d>.
- [71] S.J. Werooha, M.A. Becker, S. Enderica-Gonzalez, S.C. Harrington, A.L. Oberg, M.J. Maurer, S.E. Perkins, M. AlHilli, K.A. Butler, S. McKinstry, S. Fink, R.B. Jenkins, X. Hou, K.R. Kalli, K.M. Goodman, J.N. Sarkaria, B.Y. Karlan, A. Kumar, S.H. Kaufmann, L.C. Hartmann, P. Haluska, Tumorgrafts as in vivo surrogates for women with ovarian cancer, *Clinical Cancer Research, Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 20 (2014) 1288–1297, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-2611>.

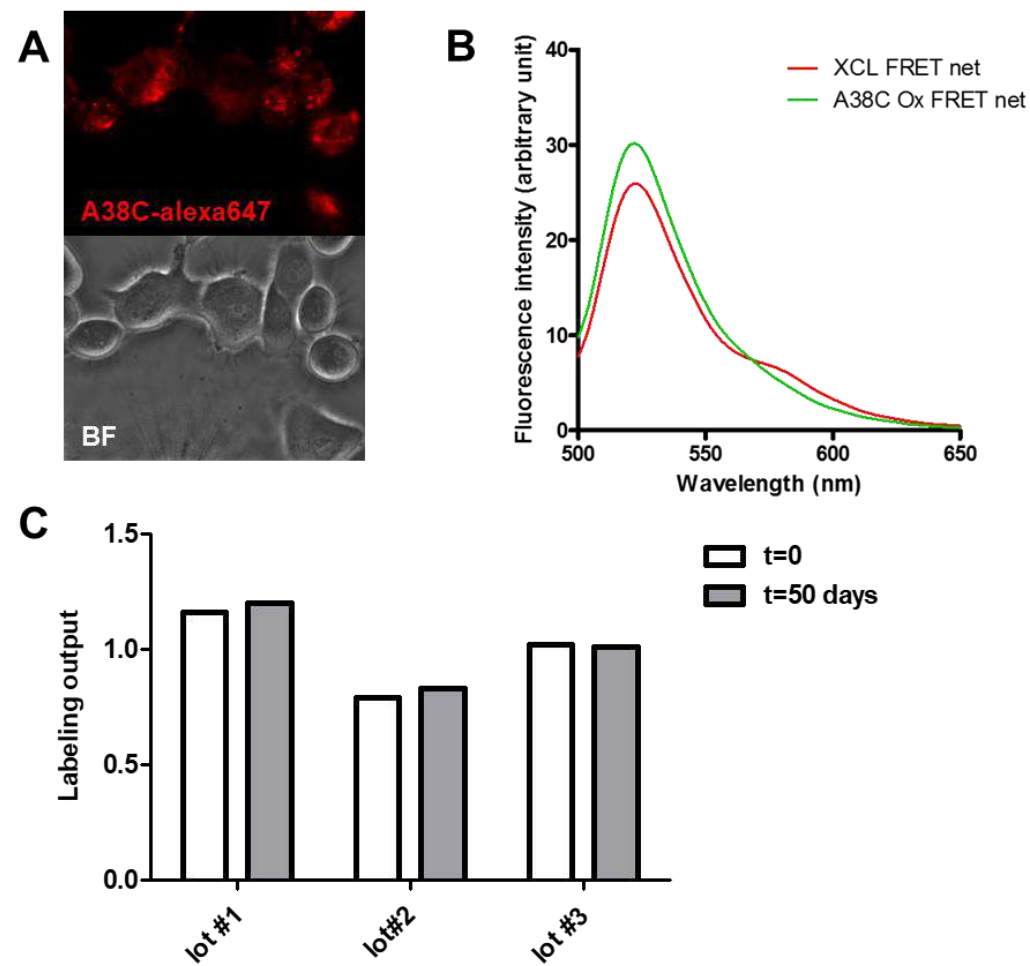


Figure S1: (A) **Visualization A38C-alexa647 uptake:** after its labelling with a near infrared dye (alexa 647), A38C-alexa647 (160nM) was incubated 24hours with human ovarian adenocarcinoma cells expressing TF antigen (OVCAR-3). Fluorescence images were acquired with a Cy5 TET filtercube. BF: Bright Field. (B) **FRET experiments** realized by mixing XCL-FITC and XCL-RITC, or A38C Ox-FITC and A38C Ox-RITC, for 1hour. Samples were excited at 468nm and emission fluorescence were recorded between 500 and 650 nm. FRET net corresponds to fret raw minus the contribution of rhodamine. The graph shows the superposition of the FRET net for XCL and A38C Ox (Ox=under oxidative conditions) from [50]. (C) **Labeling output monitoring** of 3 different A38C-alexa647 samples over a 50 days period by spectrophotometry at 280nm and 650nm.

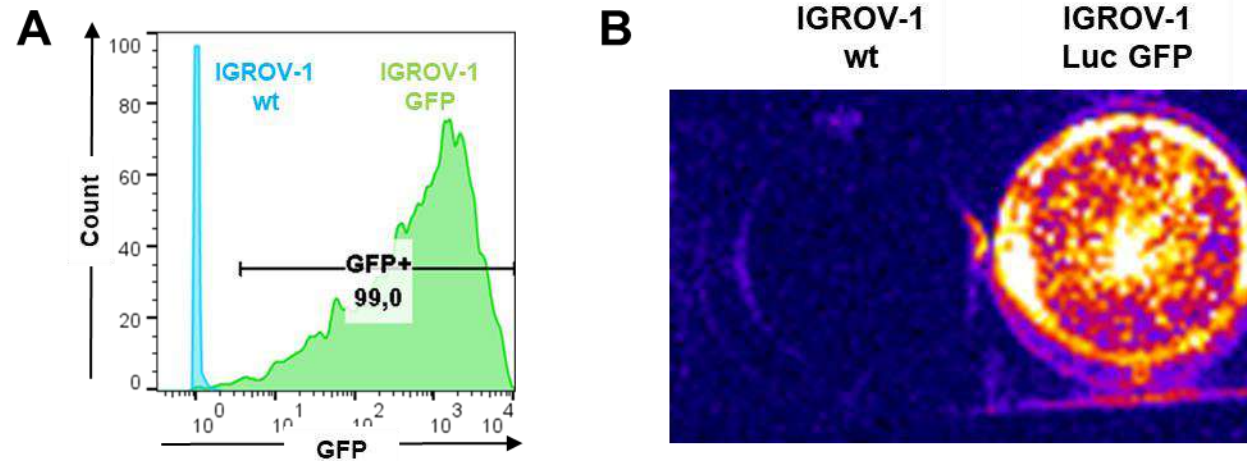


Figure S2: Double transduction of IGROV-1 cells for in vivo model monitoring. (A) Flow cytometry evaluation of the percentage of GFP positive cells after transduction with a lentivirus for the stable expression of turbo GFP at a MOI (multiplicity of infection) 100. IGROV wt were used to gate positive cells in the transduced sample. (B) Bioluminescence imaging using the same device and settings as in vivo experiments to evaluate the luciferase expression of the double transduced cells after addition of 150 μ g/mL of luciferin substrate in the culture medium. Left panel: IGROV wt, right panel: IGROV transduced with both lentivirus at a MOI 100.

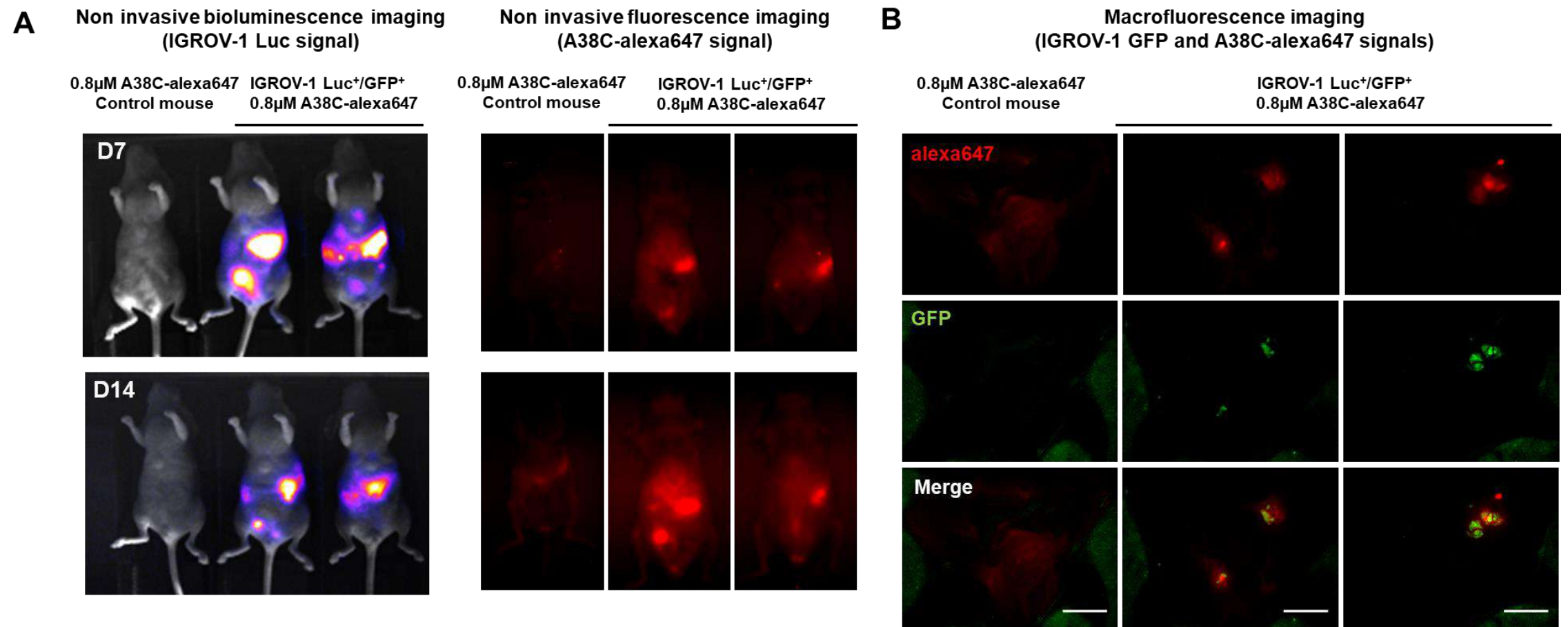


Figure S3: (A) Method: intraperitoneal injection of 0.8μM A38C-alexa647 (control mouse) and intraperitoneal coinjection of A38C-alexa647 (0.8μM) and $10 \cdot 10^6$ IGROV-1 Luc⁺/GFP⁺ cells (n=2). Monitoring of tumor growth by non invasive imaging modalities (bioluminescence and fluorescence) at day 7 (D7) and 14 (D14). Bioluminescence images: exposure time = 5minutes; binning 2. Fluorescence images: exposure time = 250ms. (B) Day 14: Mice were euthanized and peritoneal cavity was visualized by macrofluorescence imaging (green = GFP expression of IGROV1 cells and red = alexa647 labelling of A38C). One representative mouse is shown. Exposure time = 1s; scale bars = 5mm.



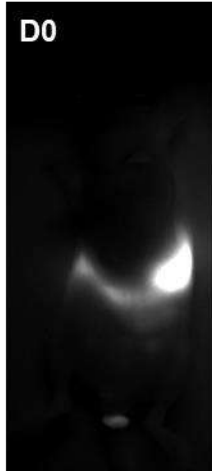

Administration routes	Intraperitoneal		Per os	
Protocol	<div><div>2.4μM</div><div>2.4μM</div><div>2.4μM</div><div>2.4μM</div><div>2.4μM</div></div> <div><div>D0</div><div>D1</div><div>D2</div><div>D3</div><div>D4</div></div>			
Non-invasive fluorescence imaging	<div>D0</div> 	<div>D7</div> 	<div>D0</div> 	<div>D7</div> 

Figure S4: Biodistribution assessment of A38C-alexa647 throughout two administration routes: intraperitoneal and per os. Mice received daily injections of 2.4μM A38C-alexa647 (three times the detection procedures dose) either by intraperitoneal or per os administration. n=2 mice per administration route. The subsequent distribution of the nanoprobe has been assessed by non-invasive fluorescence imaging (exposure time = 250ms) after the first injection at day 0 (D0) and 3 days after the last injection (D7).

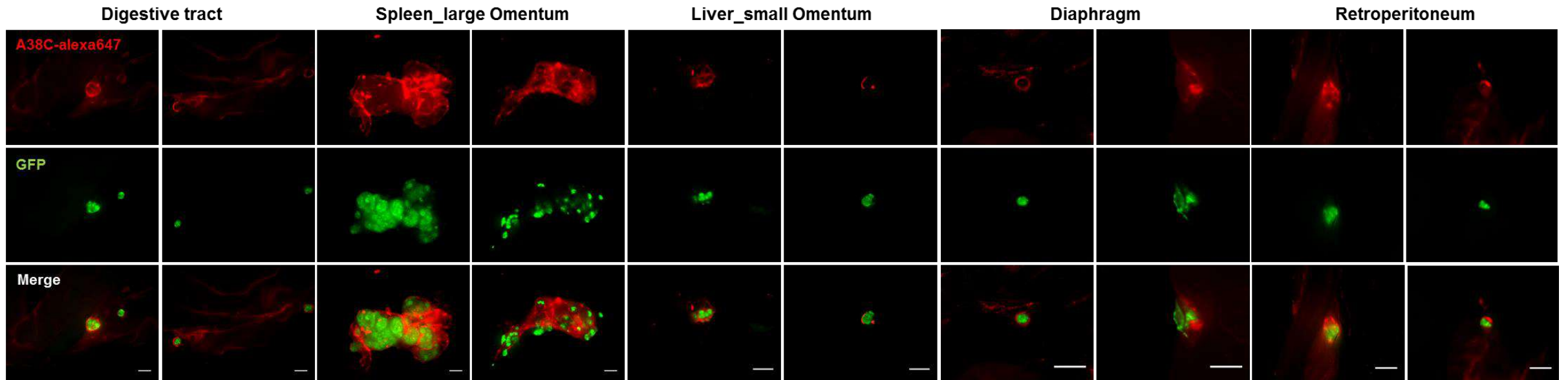
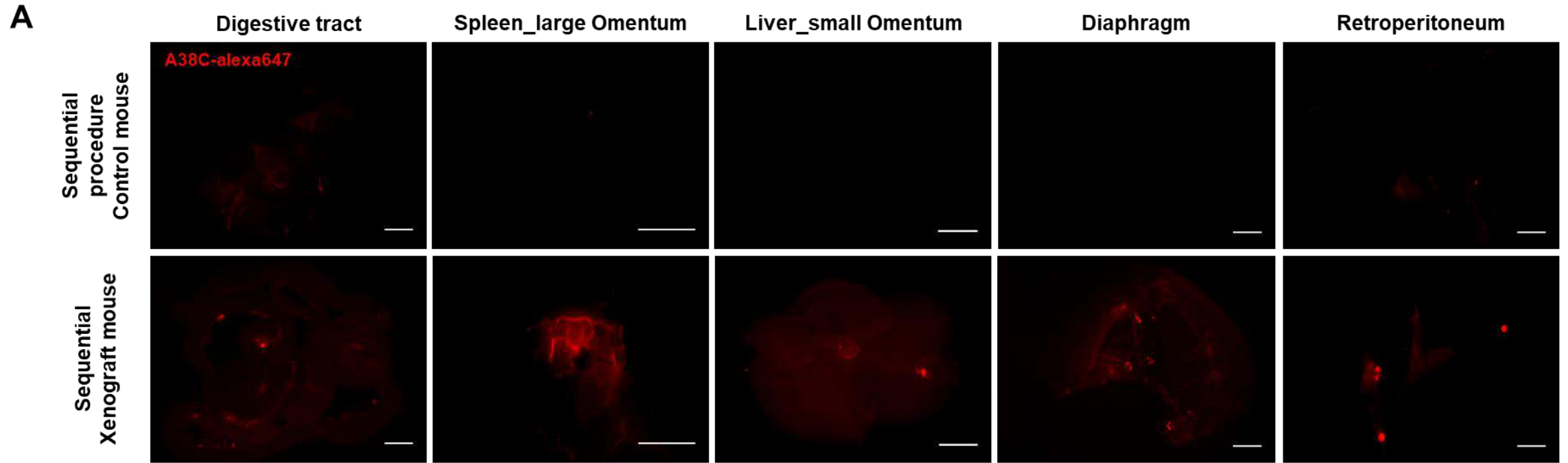


Figure S5: Sequential procedure: Macrofluorescence imaging of peritoneal tumors developed on preferential peritoneal carcinomatosis sites. Fluorescence images were acquired with an upright fluorescence microscope using proper filters to detect GFP constitutive expression of implanted human cells and the labelled protein A38C-alexa647. Tumor masses in green and A38C-alexa647 in red. Scale bars= 1mm.



B

Sequential procedure	Digestive tract	Spleen_large Omentum	Liver_small Omentum	Diaphragm	Retroperitoneum
Signal to Noise Ratio	4.5	6.1	4.8	8.2	7.5

Sequential procedure	Digestive tract	Spleen_large Omentum	Liver_small Omentum	Diaphragm	Retroperitoneum
Signal to Noise Ratio	5.9	5.6	7.1	6.8	4.7

Sequential procedure	Digestive tract	Spleen_large Omentum	Liver_small Omentum	Diaphragm	Retroperitoneum
Signal to Noise Ratio	6.2	5.8	5.5	7.8	9.7

Figure S6: (A) **Macrofluorescence imaging** of preferential peritoneal carcinomatosis sites of a non tumor-bearing mouse that received the same amount (0.8 μ M) of A38C-alexa647 as a mouse which underwent the sequential procedure. Images were processed to display equal dynamic range fluorescence intensity between xenograft and control mice for each sites. Scale bars= 5mm (B) **Signal to noise ratios** calculated by image processing n=3.

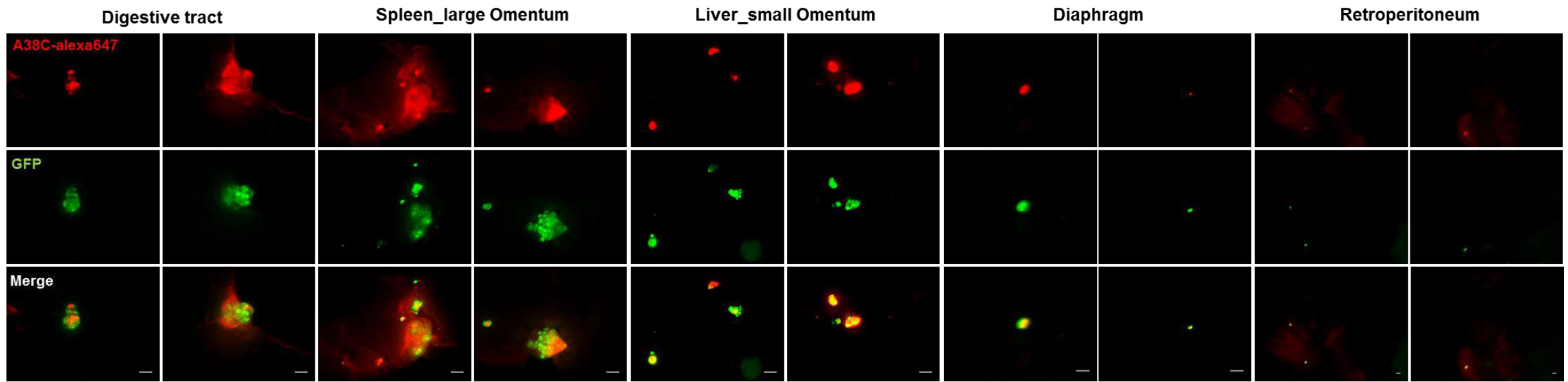
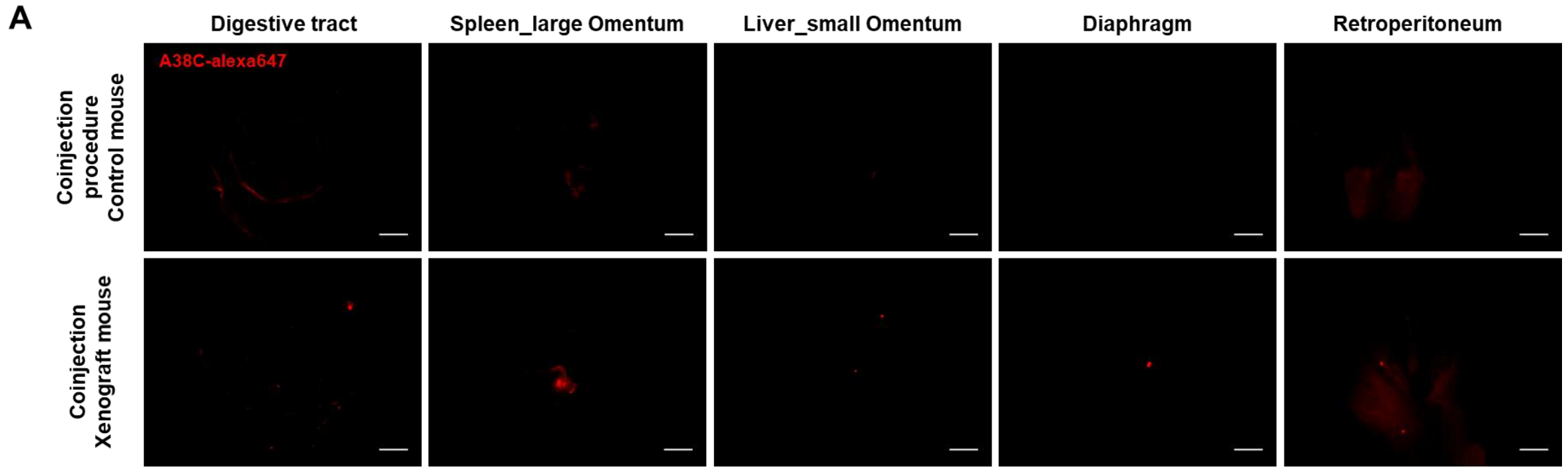


Figure S7: Coinjection procedure: Macrofluorescence imaging of peritoneal tumors developed on preferential peritoneal carcinomatosis sites. Fluorescence images were acquired with an upright fluorescence macroscope using proper filters to detect GFP constitutive expression of implanted human cells and the labelled protein A38C-alexa647. Tumor masses in green and A38C-alexa647 in red. Scale bars= 1 mm.



B

Coinjection procedure	Digestive tract	Spleen_large Omentum	Liver_small Omentum	Diaphragm	Retroperitoneum
Signal to Noise Ratio	5.0	6.7	10.5	5.8	7.5

Coinjection procedure	Digestive tract	Spleen_large Omentum	Liver_small Omentum	Diaphragm	Retroperitoneum
Signal to Noise Ratio	4.9	4.4	6.5	8.1	7.5

Coinjection procedure	Digestive tract	Spleen_large Omentum	Liver_small Omentum	Diaphragm	Retroperitoneum
Signal to Noise Ratio	4.7	4.1	9.5	10.9	3.5

Figure S8: (A) Macrofluorescence imaging of preferential peritoneal carcinomatosis sites of a non tumor-bearing mouse that received the same amount (0.8 μ M) of A38C-alexa647 as a mouse which underwent the coinjection procedure. Images were processed to display equal dynamic range fluorescence intensity between xenograft and control mice for each sites. Scale bars= 1mm **(B) Signal to noise ratios** calculated by image processing n=3 mice.

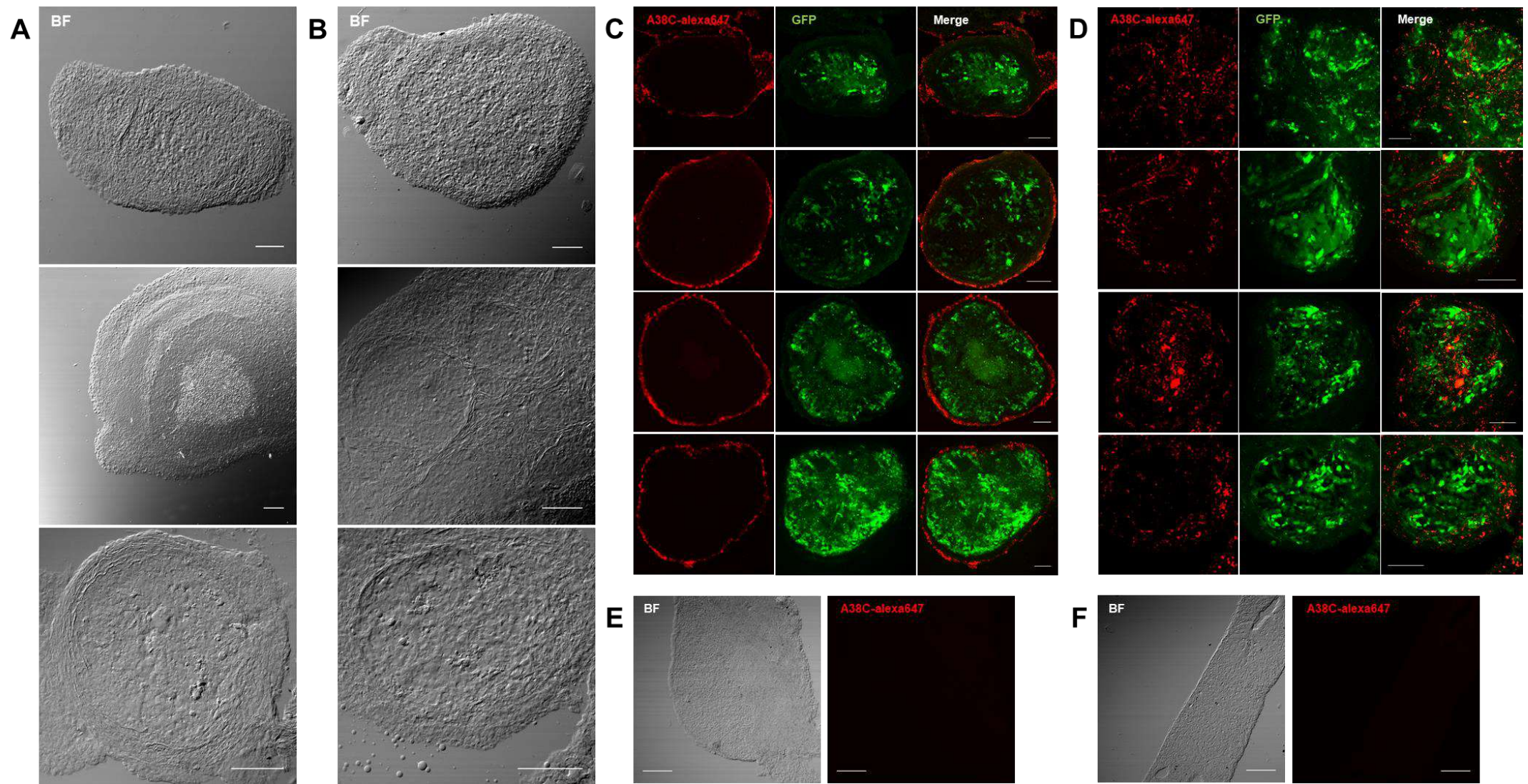


Figure S9: Confocal imaging. Bright field images of peritoneal nodules' frozen sections from mice who underwent the sequential (A) and coinjection (B) protocol, corresponding to the fluorescent images in figure 7A and 7B. **Fluorescence images** of peritoneal nodules' frozen sections from mice who underwent the sequential (C) and coinjection (D) protocol. Four representative nodules from various sites are presented for each procedure. n=4 mice. **Bright field and fluorescence** images of non tumor-bearing mice that received the same amount (0.8 µM) of A38C-alexa647 as mice which underwent the sequential (E) and coinjection (F) procedure, images were processed to display equal dynamic range fluorescence intensity as images of peritoneal nodules. Images were analyzed with Fiji software. Tumor masses fluorescent signal (GFP) and A38C probe fluorescent signal (AF647) are intrinsic. BF: Bright field. Frozen sections thickness = 20µm. Scale bars= 100µm

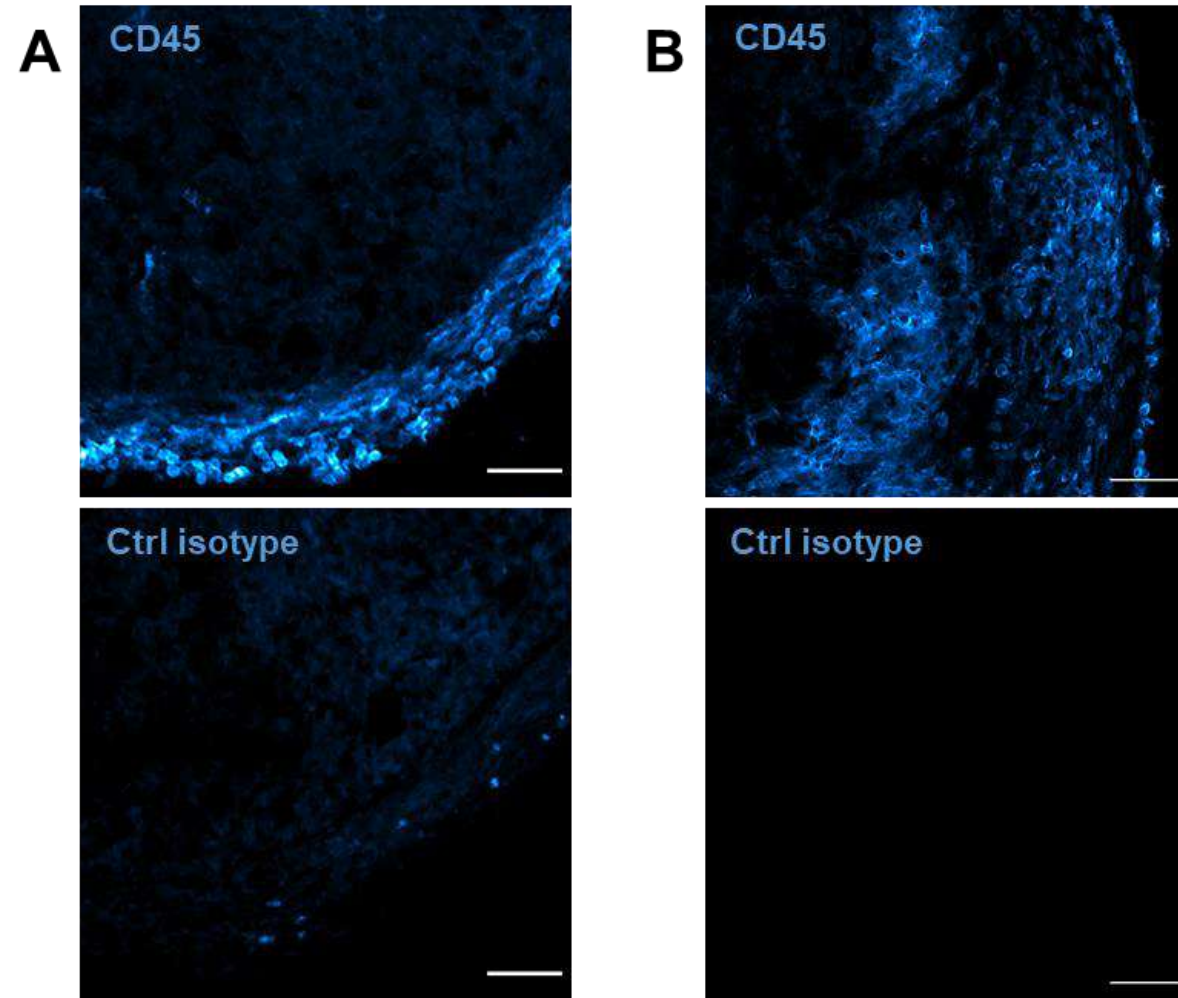


Figure S10: Immunohistofluorescence with anti-CD45 mouse control isotype. (A) and (B) represent two nodules sampled from two mice at different stages of tumor microenvironment's development. Frozen tissue sections have been stained with the control isotype of the anti-CD45 antibody (see material and methods section). Confocal imaging was done using the same parameters as the one used for images made after the anti-CD45 antibody staining. Images were processed to display equal dynamic range fluorescence intensity as the anti-CD45 antibody images. Images were analyzed with Fiji software. n=2 mice. Frozen sections thickness = 20 μ m. Scale bars= 50 μ m.

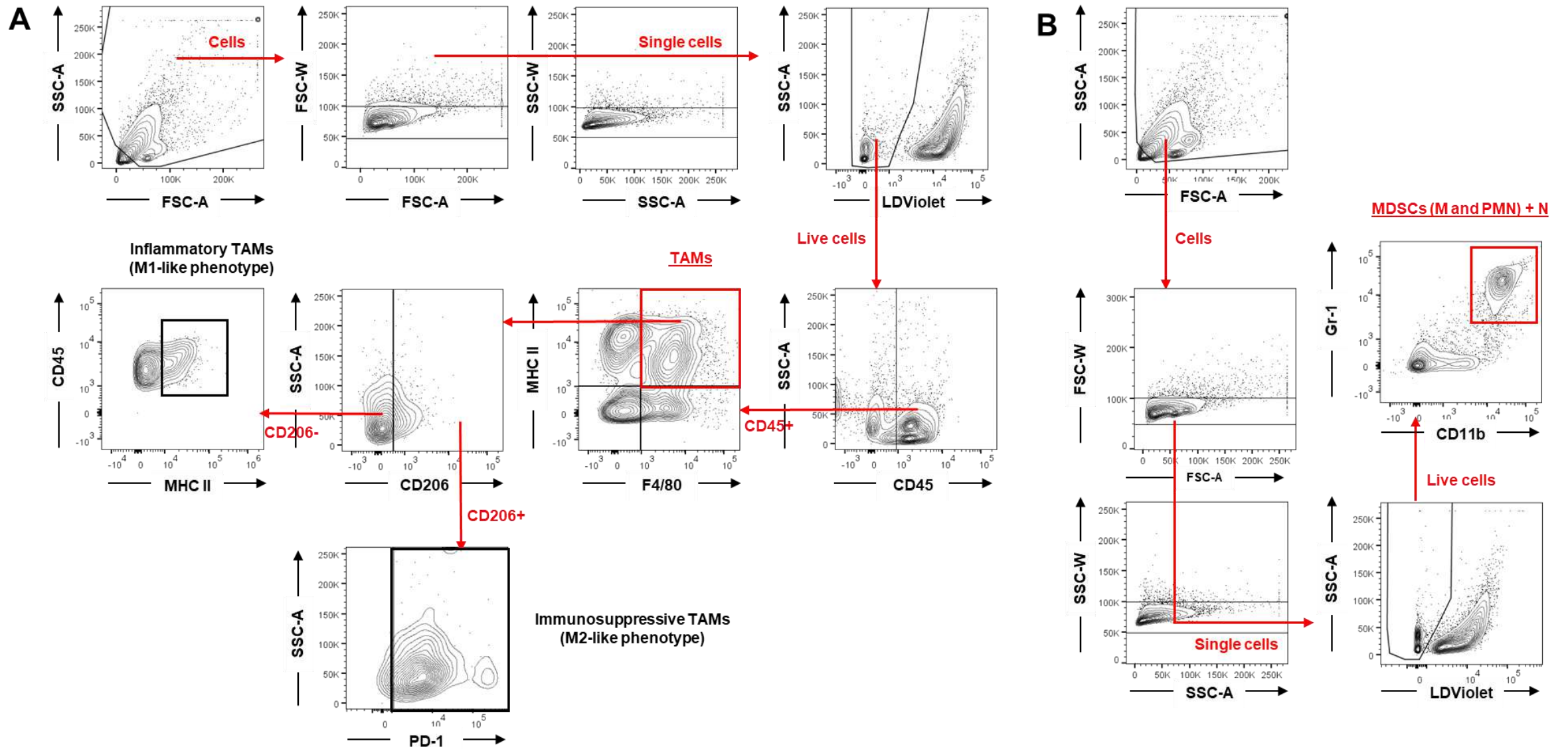


Figure S11: FACS Gating strategies for (A) Tumor-associated macrophages (TAMs) (B) monocytic (M) and polymorphonuclear (PMN) Myeloid Derived Suppressor cells (MDSCs) and neutrophils (N). After debris and doublets removal, live cells were isolated as LDViolet-. TAMs were assessed as CD45+ F4/80+ MHCII+ and MDSCs and N as CD11b+ Gr1+. All gates were determined using fluorescence minus one controls (FMOs).

3. Extension des applications de la nanosonde A38C-alexa647

a) Expériences *in vitro* sur des cellules cancéreuses épithéliales d'origine pulmonaire

Le choix du modèle d'étude dans ce projet s'est porté sur le cancer épithélial ovarien, cependant les développements de notre nano-objet ne s'y limitent pas. Sachant qu'A38C reconnaît un marqueur glycosidique exprimé par 90% carcinomes, les applications tant en matière de délivrance ciblée que d'imagerie, sont transposables à tous les autres carcinomes dans la mesure où ils expriment le glycotope.

Des carcinomes pulmonaires humains (A-549) ont été utilisés pour vérifier dans un premier temps *in vitro*, qu'il est possible de les détecter avec la nanosonde. La même expérience de cinétique d'entrée d'A38C-alexa647 a été réalisée sur ces cellules et les images sont comparées à celle des cellules OVCAR-3 (Figure 56A).

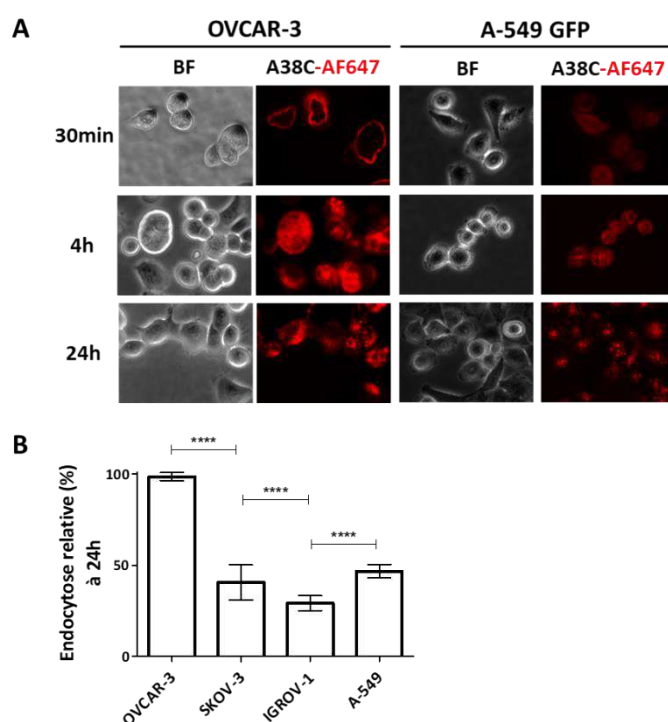


Figure 56 : Caractérisation de la cinétique d'endocytose d'A38C-alexa647 dans les carcinomes pulmonaires. (A) Visualisation de la cinétique d'entrée d'A38C-alexa647. Les cellules sont incubées avec 160nM d'A38C-alexa647 (rendement de marquage = 1,2 mole dye/mole tétramère) pendant les durées indiquées. Microscopie de fluorescence avec un Cy5 TET filtercube. Les images sont alignées sur la même dynamique de fluorescence et analysées avec le logiciel ImageJ. BF : Bright Field. X63 **(B) Quantification de l'endocytose.** Les cellules sont incubées pendant 24h avec 160nM d'A38C-alexa647, et l'intensité de fluorescence est mesurée en FACS. Les données sont exprimées en fonction des valeurs obtenues pour les cellules OVCAR-3. n=5 expérimentations indépendantes. Analyse statistique : ****p<0.0001.

Les cellules A-549 montrent un marquage membranaire après 30 minutes d'incubation avec la nanosonde moins intense que celui des cellules OVCAR-3. Après 4h, le marquage membranaire est plus prononcé, toujours moins intense que sur les cellules OVCAR-3 et commence à devenir vésiculaire. Au bout de 24h d'incubation avec A38C-alexa647, le signal est vésiculaire et périnucléaire. Ces observations suggèrent qu'il est effectivement possible de détecter des cellules cancéreuses épithéliales d'une autre origine, et également que les cellules A-549 expriment moins d'antigène TF que les cellules OVCAR-3. Pour vérifier ce dernier point, une quantification de l'endocytose d'A38C dans les cellules A-549 a été effectuée selon les mêmes paramètres que pour les adénocarcinomes ovariens (Figure 56B). Il apparaît donc que l'endocytose de la nanosonde dans ces cellules pulmonaires est équivalente à celle déterminée sur les cellules SKOV-3, soit 40% de celle effectuée par les cellules OVCAR-3.

b) Permissivité du péritoine et détection de masses tumorales

Le péritoine et ses prolongements (omentum) sont propices aux développements de masses tumorales. En effet, le stroma péritonéal va influencer la progression tumorale en communiquant avec les cellules cancéreuses et en leur permettant de s'implanter facilement. Pour illustrer ce concept, les cellules A-549 Luc GFP ont été xénogreffées par injection intrapéritonéale chez une souris immunodéprimée. Deux jours après, la prise de greffe est évaluée en imagerie non invasive de bioluminescence (Figure 57A). Le signal des cellules A-549 est observé à plusieurs endroits de la cavité abdominale suggérant que les cellules ont pu se disséminer et s'implanter. Après huit jours de croissance tumorale, la souris est injectée en i.p avec 0,32 μ M d'A38C-alexa647. Environ 6h après, l'animal est euthanasié et l'observation au microscope de fluorescence a permis de déterminer que la xénogreffe des adénocarcinomes pulmonaires a bien donné lieu à une carcinose péritonéale même si ces cellules tumorales ne provenaient pas d'un organe normalement contenu dans la cavité abdominale. Le signal d'A38C-alexa647 était observable au niveau des masses tumorales. Pour se faire une idée plus précise de sa répartition, des nodules ont été prélevés sur le grand omentum pour faire de l'imagerie confocale et voir si le signal de la nanosonde est équivalent à celui observé avec le protocole séquentiel pour la détection des nodules tumoraux dans le modèle IGROV-1 (Figure 57B et C). Les acquisitions de microscopie confocale ont permis de déterminer que le signal de la sonde se positionne autour d'une nappe confluente de nodules en suivant sa forme. Comme pour le modèle IGROV-1, le signal d'A38C-alexa647 n'est pas directement sur le signal fluorescent GFP (vert) du nodule mais tout autour.

Cette expérience, bien qu'il ne s'agisse que d'un essai, illustre bien qu'il est possible de détecter un autre type de carcinome d'origine pulmonaire donc provenant d'un organe situé en dehors de la cavité

abdominale. Le développement d'une carcinose à partir de ces cellules démontrent la permissivité du péritoine pour le développement de tumeurs épithéliales.

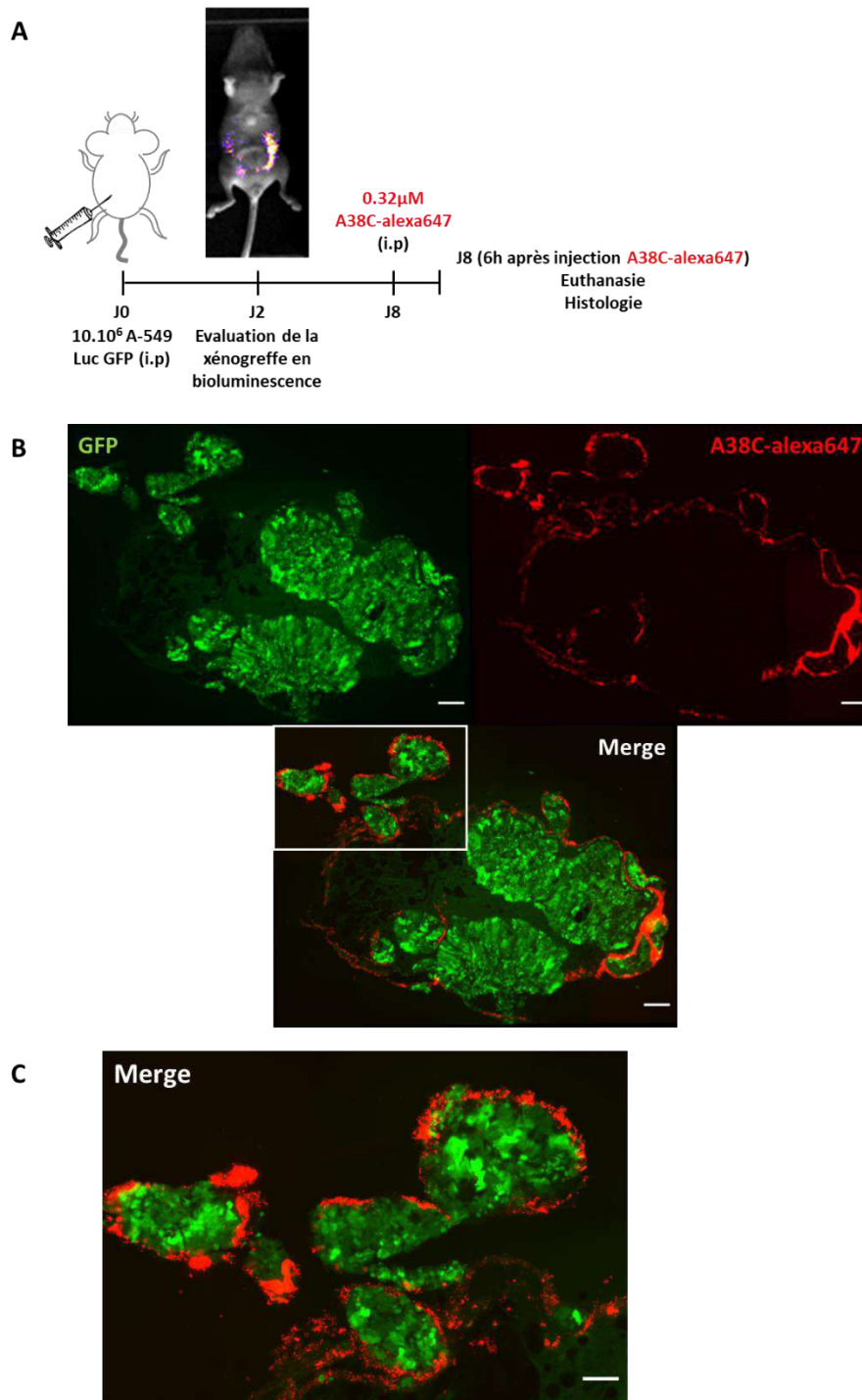


Figure 57 : Permissivité du péritoine: carcinoses péritonéales à partir de carcinomes pulmonaires. (A) Procédure séquentielle : la souris est xénogeffée avec $10 \cdot 10^6$ cellules A-549 Luc GFP en i.p. A J2, la xéno greffe est évaluée qualitativement par imagerie non invasive de bioluminescence. A J8, $0,32 \mu\text{M}$ d'A38C-alexa647 sont administrés en i.p 6h avant l'euthanasie de l'animal. (B) Microscopie confocale sur une cryocoupe de nodule en nappe confluente développée au niveau du gand omentum. Les images ont été analysées avec le logiciel Fiji. Les signaux fluorescents des masses tumorales (GFP) et de la nanosonde (A38C-alexa647) sont intrinsèques à l'échantillon. n=1 souris. Barre de taille = $200 \mu\text{m}$. (C) Agrandissement de la région délimitée par un carré blanc sur le merge de (B). Barre de taille = $100 \mu\text{m}$.

4. Détection de l'antigène TF sur des coupes histologiques d'exérèses de chirurgies

Une collaboration avec le Pr. Philippe Rochaix, responsable de l'unité de support biopathologique des essais cliniques (SBEC) de l'Institut Universitaire du Cancer de Toulouse (IUCT), nous a permis de réaliser quelques essais de marquage avec A38C-alexa647 sur des coupes d'inclusion en paraffine d'exérèses de chirurgies ou biopsies issues d'une patiente atteinte de carcinose péritonéale ovarienne. La nanosonde a été incubée ces coupes, réalisées au SBEC en supplément de celles destinées à l'anatomopathologie, à la place des anticorps habituels et selon le même protocole qui utilise un automate de marquage (voir Matériels et Méthodes). Cinq prétraitements sont utilisés en routine en anatomopathologie pour les immunohistochimies (H ; H_S ; L_S ; D ; D_S) et décrits dans la section Matériels et Méthodes. Le marquage avec la nanosonde a donc été testé à différentes concentrations après avoir appliqué ces différents traitements. Les acquisitions d'images ont été réalisées en microscopie de fluorescence champs large à l'IPBS une fois les lames sorties de l'automate et montées avec du DAPI au SBEC. Dans un premier temps, nous avons simplement regardé si le marquage était visible et spécifique avec les différents prétraitements appliqués aux lames. En effet, la coupe choisie par le Pr. Rochaix comprend plusieurs histotypes dont des zones de carcinose. Nous avons pu observer que seules les zones correspondant à la carcinose étaient marquées par la nanosonde, quel que soit le prétraitement réalisé au préalable. Les signaux détectés sont bien positionnés sur les zones de la coupe correspondant aux tissus épithéliaux cancéreux, et en imageant des zones de transition il est possible d'observer qu'il n'y a pas de marquage sur les autres tissus (Figure 58A). Des mises au point ont ensuite été effectuées pour déterminer à quelle dilution il faudrait incuber l'A38C-alexa647 avec les lames pour avoir le meilleur SNR (Figure 58B). Il est évident que la dilution 1/100° n'est pas assez suffisante compte-tenu du bruit de fond et des marquages non spécifiques observés, en revanche la dilution 1/250° fait mieux ressortir le signal de la nanosonde, sans signal non spécifique, à un grossissement (10x) permettant de voir la totalité de la coupe. Il n'est pas possible d'aligner les acquisitions des dilutions 1/100° et 1/250° sur la même dynamique de fluorescence pour la comparaison car le signal d'A38C-alexa647 sur l'image 1/100° serait totalement saturé. Pour la représentation, la dynamique de l'acquisition de la dilution 1/100° a été augmentée 5 ou 10 fois. La dilution 1/1000° testée en premier permettait sans problème de visualiser le signal à un plus fort grossissement (x20) mais pas pour avoir une image de la coupe entière. Les temps d'exposition auraient dû être excessivement augmentés pour faire cette acquisition à cette dilution (1/1000°) au grossissement 10x. Ces premières observations ont donc permis de déterminer la meilleure dilution d'A38C-alexa647 à utiliser (1/250°). Par ailleurs, le marquage de la nanosonde s'est effectivement révélé spécifique. Enfin, ces essais

suggèrent que la nanosonde peut être utilisée en parallèle d'autres immunomarquages avec des anticorps.

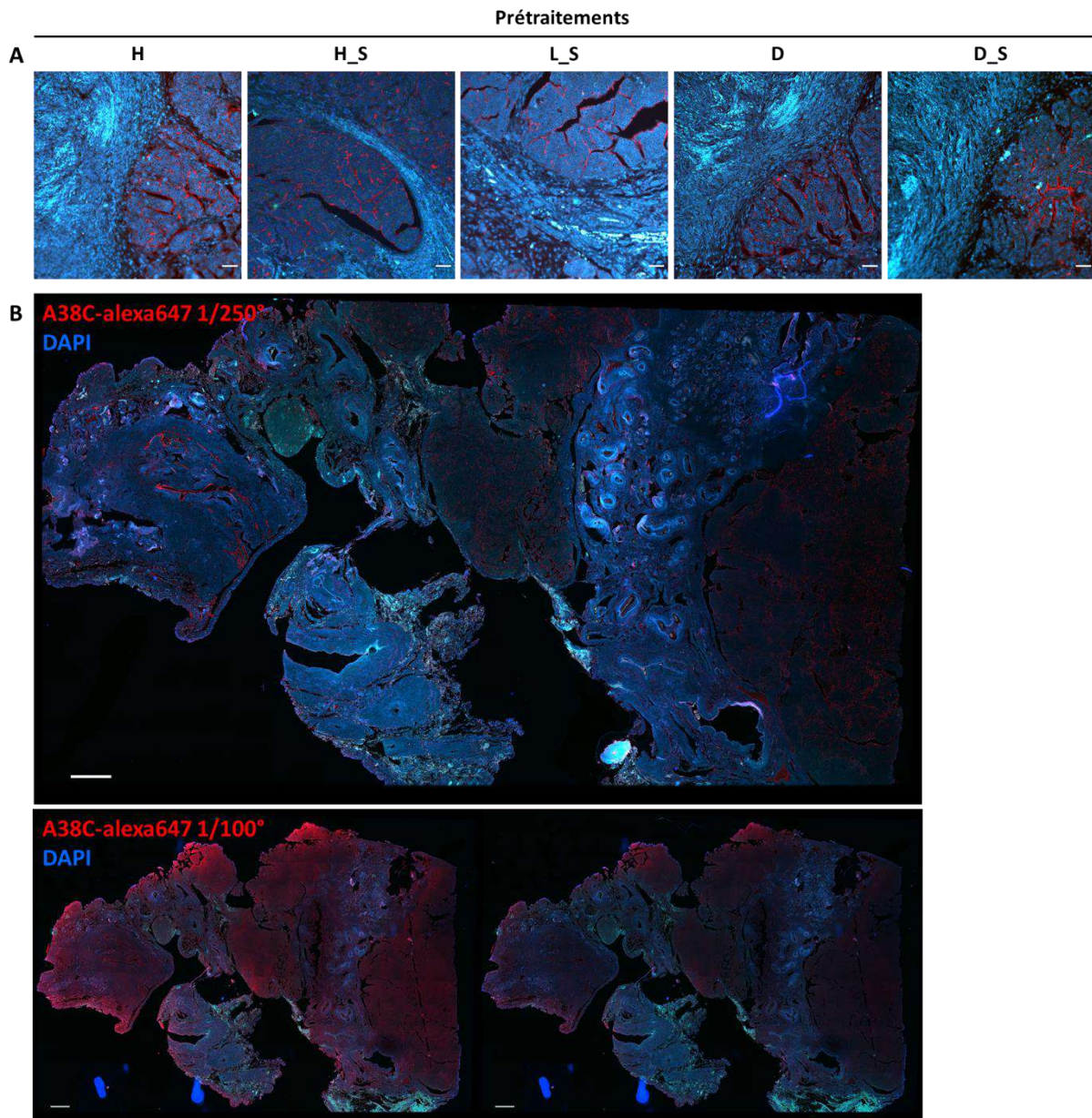


Figure 58 : Caractérisation du marquage de la nanosonde (A38C-alexa647) sur des coupes histologiques d'exérèse de chirurgie provenant d'une patiente atteinte de carcinose péritonéale ovarienne. (A) Différents prétraitements (H ; H_S ; L_S ; D ; D_S) ont été appliqués (voir matériels et méthodes), puis l'A38C-alexa647 a été incubé avec les lames dans un automate de marquage à la dilution 1/1000°. X20. Barre de taille = 100µm (B) Essais pour la visualisation de la coupe entière avec différentes dilutions : 1/250° (panel du haut) et 1/100° (panel du bas) d'A38C-alexa647. Les images à la dilution 1/100° ne peuvent pas être alignées sur la même dynamique de fluorescence que celle à la dilution 1/250°. Pour pouvoir visualiser le marquage à la dilution 1/100°, la dynamique de fluorescence a été augmentée 5 fois (panel du bas, gauche) ou 10 fois (panel du bas, droite). X10. Barre de taille = 1mm. Les images ont été analysées avec le logiciel Zen.

Par la suite, un tissu sain provenant d'une biopsie sur les trompes de Fallope a été marqué avec A38C-alexa647 selon la dilution déterminée ci-dessus et le prétraitement L_S. L'acquisition de la coupe de tissu sain a été faite avec les mêmes paramètres que ceux appliqués à la coupe de carcinose, et la comparaison des deux, après avoir aligné les images sur la même dynamique de fluorescence,

démontre qu'il n'y a pas de marquage sur la coupe de tissu sain (Figure 59A). En multipliant par 2 le temps d'exposition dans le NIR (alexa647) sur le tissu sain, il n'y a toujours pas de marquage non spécifique de la nanosonde (Figure 59B).

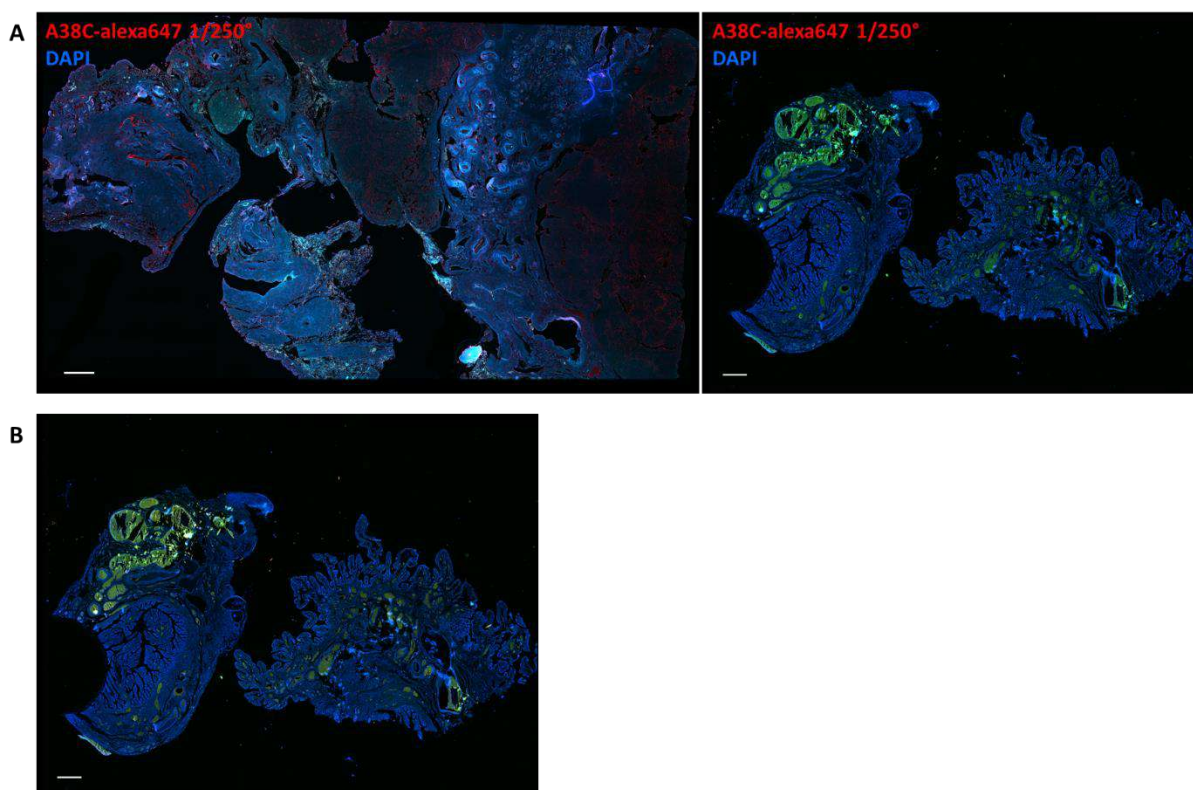


Figure 59 : Spécificité du marquage de la nanosonde sur des coupes histologiques. (A) Comparaison d'une coupe de carcinose (à gauche) et d'un tissu sain prélevé au niveau des trompes de Fallope (à droite). L'incubation d'A38C-alexa647 sur les lames a été faite à la dilution 1/250° après un prétraitement L_S pour les deux coupes. Les images sont alignées sur la même dynamique de fluorescence. **(B)** Le temps d'exposition dans le NIR (alexa647) a été multiplié par deux pour l'acquisition de la coupe de tissu sain. X10. Barres de taille = 1mm. Les images ont été analysées avec le logiciel Zen.

En conclusion de ce travail, le marquage de coupes histologiques est donc possible avec la nanosonde selon des paramètres compatibles avec les immunomarquages pratiqués en routine en anatomopathologie. Le signal de la nanosonde est bien spécifique puisqu'il est détecté dans les zones de carcinoses et qu'aucun signal n'est détectable sur une coupe de tissu sain. La détection du glycotope par A38C-alexa647 n'a donc été observée que sur la coupe issue d'une patiente atteinte d'une carcinose péritonéale ovarienne.

5. Bilan des résultats (partie III)

Les travaux présentés dans cette partie des résultats du manuscrit étaient dédiés à l'aspect imagerie du nano-objet. Ils ont tout d'abord permis de démontrer la détection spécifique du biomarqueur cancéreux glycosidique *in vitro* sur trois lignées d'adénocarcinomes ovariens humains, indépendamment de l'expression de la Mucine 16 (marqueur protéique de l'EOC). Cette interaction est spécifique, rapide et avec une affinité apparente de l'ordre de la centaine de nanomolaire.

Les détections de nodules microscopiques dans la cavité abdominale ont été démontrées par deux procédures différentes (co-injection et séquentiel) sur un modèle murin de carcinose péritonéale ovarienne.

Cette interaction est directe avec le protocole de co-injection *in vivo*, comme le démontre les zones de colocalisation entre le signal alexa647 de la nanosonde et le signal GFP des nodules. Ainsi, l'utilisation du variant A38C de la protéine XCL, marqué dans le NIR (sonde) et chargé avec une molécule thérapeutique (container), pourrait être considérée en chirurgie dans une approche nanothéranostique intrapéritonéale. Celle-ci permettrait la détection intra et post-opératoire (persistance du signal sur au moins 3 semaines) de disséminations tumorales iatrogéniques, et la délivrance ciblée d'une molécule cytotoxique à ces cellules cancéreuses de manière à prévenir les rechutes. Concernant ces futurs développements de la lectine, nous travaillerons sur des modèles PDX plus proches et pertinents de la situation clinique.

De plus, il est aussi possible d'utiliser la nanosonde pour le repérage de nodules déjà implantés dans la cavité abdominale comme le suggère le protocole séquentiel. Les colocalisations entre des marqueurs de cellules immunitaires et A38C-alexa647, obtenues en immunohistofluorescence et en FACS, démontrent que dans cette procédure la nanosonde a détecté les cellules immunitaires du microenvironnement tumoral qui entourent les nodules.

La protéine A38C détecte un glycotope, l'antigène TF, présent dans 90% des carcinomes. Nous avons démontré qu'il est possible de détecter un autre type de carcinomes tant *in vitro* qu'*in vivo* avec les expériences faites sur les cellules A-549. Le développement d'une carcinose péritonéale chez la souris à partir de cette lignée illustre le concept de permissivité du péritoine à l'origine du développement et de la progression des carcinoses quelles que soient leurs origines.

Pour finir, nous avons initié l'utilisation de la nanosonde sur des coupes de tissus humains provenant d'une patiente atteinte d'une carcinose péritonéale ovarienne. L'utilisation d'A38C-alexa647 à la place d'anticorps classiquement utilisés en immunomarquage pour l'anatomopathologie, a démontré que le signal est bien spécifique. Afin de caractériser l'interaction entre A38C-alexa647 et le tissu, il conviendra de confirmer que cette interaction est liée à la reconnaissance de l'antigène TF sur les cellules tumorales et/ou sur les cellules immunitaires du microenvironnement.

Ces dernières données, issues d'un échantillon de patiente, sont très encourageantes pour la validation de la nanosonde sur des modèles PDX.

Partie IV : Prévenir l'apparition des rechutes en exploitant la propriété anti-adhésive du nanocontainer

La capacité de la lectine XCL à empêcher l'adhésion de cellules en culture à une concentration donnée, et dépendante des cellules testées, a été décrite dans un article publié en 2004 par l'équipe [68]. En effet, l'impossibilité de s'implanter sur un support pour des cellules adhérentes conduit à une inhibition de leur prolifération rapidement suivie d'une mortalité cellulaire. Cette propriété peut être exploitée *in vivo* pour prévenir la ré-implantation de cellules tumorales conduisant aux nombreuses rechutes observées chez les patientes atteintes de carcinose péritonéale ovarienne.

1. Mise en évidence de la propriété anti-adhésive de la lectine dans le modèle murin de carcinose péritonéale ovarienne (IGROV-1)

De manière à évaluer l'efficacité de la propriété anti-adhésive du nanocontainer, la procédure de co-injection, exploitée dans les expériences de validation de la nanosonde A38C-alexa647 *in vivo*, a à nouveau été utilisée. En effet, cette procédure a été développée pour mimer le détachement iatrogénique des cellules tumorales cancéreuses dans la cavité abdominale des patientes durant les chirurgies. Suite à cette dissémination involontaire, la ré-implantation de ces cellules est favorisée par la permissivité du péritoine et conduit souvent à des rechutes de la carcinose.

La dose d'A38C permettant d'empêcher l'adhésion des cellules IGROV-1 est difficilement extrapolable des flasques de culture au péritoine des animaux. Ainsi, nous avons choisi de co-injecter 500 µg (soit 8 µM) d'A38C avec $2 \cdot 10^6$ IGROV-1 Luc GFP en intrapéritonéal *in vivo*. Cette dose est 10 fois supérieure à celle utilisée dans les procédures de détection de nodules par la nanosonde.

L'expression constitutive de la luciférase par les cellules IGROV-1 avait jusqu'ici permis d'évaluer qualitativement l'implantation des xénogreffes dans la cavité abdominale des animaux, car contrairement au modèle SKOV-3, il n'est pas possible de réaliser de suivi quantitatif longitudinal de la croissance tumorale sur le modèle IGROV-1. En effet, parmi les nombreuses expériences effectuées pour essayer de mettre au point ce modèle, aucune augmentation de l'intensité de bioluminescence n'a été observée. Tout se passe comme si une fois que les cellules ont adhéré dans la cavité abdominale des animaux, leur croissance stagne.

Ainsi, nous avons effectué quatre expériences indépendantes en comparant l'implantation tumorale d'animaux témoins (n=9) avec celle d'animaux ayant reçu la même densité cellulaire à laquelle sont ajoutés 500µg d'A38C en co-injection intrapéritonéale (n=12). Les séries d'imagerie non invasive de bioluminescence ont permis dans un premier temps de visualiser une diminution de l'intensité de bioluminescence chez les animaux co-injectés (Figure 60A). La quantification des intensités de

bioluminescence moyennes et des densités intégrées obtenues avec l'analyse des images acquises au cours de trois séries d'imagerie (une par semaine) traduisent une inhibition significative de l'implantation tumorale chez les animaux co-injectés (Figure 60B et C).

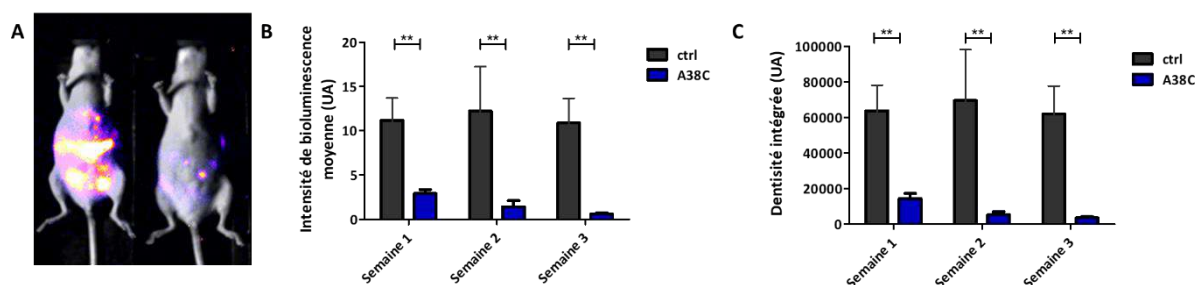


Figure 60 : Suivi non invasif de l'implantation tumorale. Les animaux ont été injectés en intrapéritonéal avec 2.10^6 IGROV-1 Luc GFP (ctrl) ou co-injectés avec 2.10^6 IGROV-1 Luc GFP et $500\mu\text{g}$ d'A38C (A38C). L'imagerie non invasive de bioluminescence est effectuée une fois par semaine (3 séries d'imagerie). **(A)** Image représentative d'une série, obtenue une semaine après l'injection des animaux, et montrant un animal témoin (gauche) et un animal co-injecté (droite) **J7**. Ces images sont analysées avec le logiciel ImageJ. Les graphes ont été obtenus avec le logiciel Prism et sont représentés en moyennes \pm SEM. Analyse statistique : $**p<0.01$. **(B)** Intensité de bioluminescence moyenne (UA : unité arbitraire) **(C)** Densité intégrée (UA). $n=9$ ctrl; $n=12$ A38C; 4 expérimentations indépendantes.

Par ailleurs, ces données permettent également de constater que les intensités de bioluminescence et les densités intégrées n'évoluent pas au cours du temps. Ceci suggère qu'une fois que les cellules IGROV-1 Luc GFP sont implantées dans la cavité abdominale des animaux elles ne se divisent plus. Ainsi, les quantifications en imagerie de bioluminescence sont équivalentes d'une semaine à l'autre dans ce modèle, contrairement au modèle SKOV-3.

A la fin de l'expérience, la macroscopie de fluorescence, exploitant l'expression constitutive de la GFP par les cellules IGROV-1, a été utilisée pour déterminer le nombre et la surface des nodules implantés dans la cavité abdominale des animaux (Figure 61A et B). Ces données permettent de calculer un index péritonéal, déjà décrit dans la validation du modèle SKOV-3 (partie I.2 des résultats). Cet index, développé en clinique pour évaluer de manière quantitative l'étendue des carcinoses durant les chirurgies cytoréductrices, a été transposé à nos modèles murins. Le calcul de l'index péritonéal clinique donne un poids important aux gros nodules ou masses tumorales sur la valeur finale. Compte-tenu des caractéristiques de notre modèle murin, nous avons développé un index péritonéal adapté qui va considérer de manière équivalente les nodules de surfaces petite, moyenne et grande selon des bornes de taille définies (voir Matériels et Méthodes). Ces deux index péritonéaux, clinique et adapté, ont été calculés de manière globale pour l'ensemble des nodules retrouvés dans la cavité abdominale des animaux témoins et co-injectés (Figure 61C et D), ainsi que pour chaque groupe d'organes représentant les zones préférentielles d'implantation des carcinoses (Figure 61E et F). Ces deux calculs donnent des résultats similaires puisqu'entre le groupe d'animaux témoins et co-injectés les mêmes différences sont retrouvées. Ces données démontrent que la co-injection de $500\mu\text{g}$ d'A38C avec les cellules IGROV-1 conduit à une réduction du nombre total de nodules et de leur taille ce qui se traduit

par une diminution des index péritonéaux. Ceci peut s'expliquer par une inhibition de l'implantation des cellules tumorales dans la cavité abdominale des animaux. Lorsque ces index sont représentés par sites d'implantation, nous constatons que la co-injection d'A38C est efficace sur le tractus digestif, la rate et le grand omentum, le foie et le petit omentum, et le diaphragme avec une diminution significative de l'implantation tumorale par rapport aux animaux témoins. Par contre, aucune différence significative n'est observée pour le rétropéritoine.

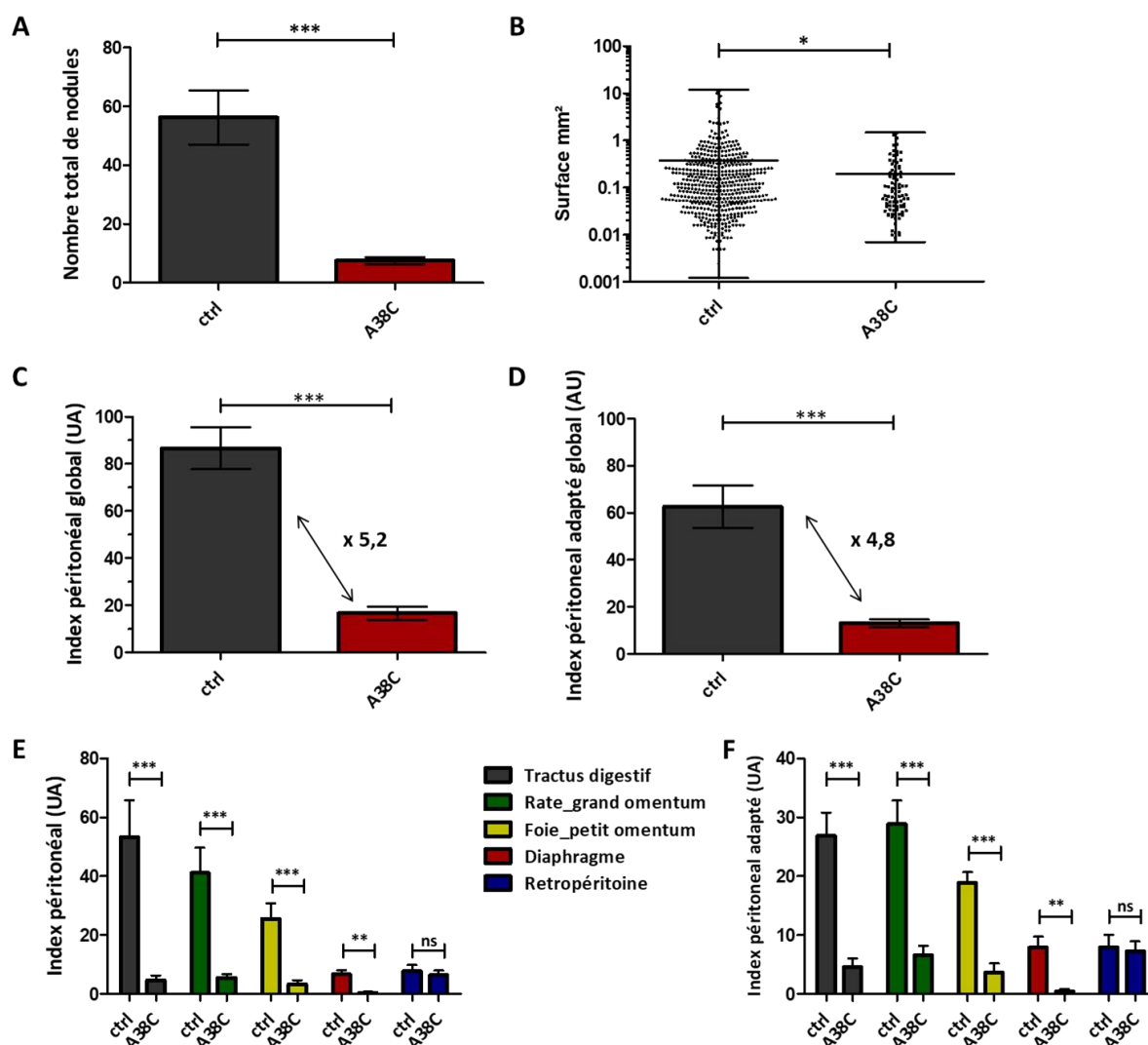


Figure 61 : Quantification de l'implantation tumorale. Les animaux ont été injectés en i.p avec 2.10^6 IGROV-1 Luc GFP (ctrl) ou co-injectés avec 2.10^6 IGROV-1 Luc GFP + 500µg A38C (A38C). Après 3 semaines, la macroscopie de fluorescence (signal GFP des cellules IGROV-1) est réalisée sur chaque groupe d'organes à l'autopsie des animaux. Le nombre (A) et la surface (B) de chaque nodule sont évalués par analyses d'images avec le logiciel ImageJ. Ils permettent d'obtenir l'index péritonéal et l'index péritonéal adapté (voir matériels et méthodes) global, respectivement (C) et (D), et pour chaque groupe d'organes, respectivement (E) et (F). Les proportions des index péritonéaux entre les deux groupes d'animaux sont indiquées sur les graphes (C) et (D). Les graphes ont été obtenus avec le logiciel Prism et sont représentés en moyennes \pm SEM ou moyennes avec la gamme de données pour les surfaces de nodules. Analyse statistique : *** $p < 0.001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; ns: non significatif. $n = 9$ ctrl; $n = 12$ A38C; 4 expérimentations indépendantes.

2. Influence des endotoxines

a) Toxicité

Au cours d'une expérience *in vivo*, une toxicité de la protéine A38C a été observée sur les animaux injectés en intrapéritonéal avec 500 µg d'A38C (changement de la couleur de peau, diarrhées et perte de poids), bien que cette dose n'ait pas posé de problème notable auparavant. La production de la protéine recombinante étant effectué chez *E. coli*, la question de la présence de lipopolysaccharides (LPS), ou endotoxines, dans les solutions de protéine A38C injectées aux animaux s'est rapidement posée. En effet, la toxicité dues aux LPS chez des modèles murins a déjà été soulevée [444]. Les endotoxines ont été dosées dans plusieurs lots de production d'A38C par la société GTP Technology (Labège). Les résultats obtenus ont conduit à la mise en place d'un protocole de lavage des colonnes de purification, inspiré de ceux pratiqués à plus grande échelle chez GTP Technology. De plus, une colonne dédiée à l'élimination des endotoxines a été ajouté en fin de protocole (voir matériels et méthodes) avant de concentrer et stériliser la protéine. Depuis ces modifications dans le protocole de purification, aucune toxicité n'est à signaler chez les animaux injectés avec 500µg d'A38C.

b) Diminution des LPS et conséquences sur la dose d'A38C prévenant l'implantation des cellules tumorales *in vivo*

Suite à la modification du protocole de purification de la protéine A38C, une expérience *in vivo* a été lancée et a conduit aux résultats présentés en Figure 8 de l'article Biomaterials (partie III.1 des résultats). Il s'agissait de déterminer quelles cellules du microenvironnement tumoral étaient marquées par la nanosonde. Au départ, il était prévu 10 animaux pour chaque procédure de marquage (séquentielle et co-injection) de manière à avoir assez de cellules, suite à la dissociation des nodules tumoraux prélevés dans la cavité abdominale des animaux, pour pouvoir faire les deux panels immunitaires en FACS. Lors des autopsies de ces 20 animaux, une différence notable a été observée chez les animaux ayant reçu les cellules IGROV-1 co-injectées avec 50µg (0,8µM) d'A38C-alexa647. En effet, le nombre de nodules retrouvés dans les animaux était jusque-là équivalent entre les deux procédures. Dans cette expérience en revanche, les souris de la procédure co-injection étaient bien moins envahies de nodules péritonéaux que les souris de la procédure séquentielle. Il n'a donc pas été possible de réaliser les panels immunitaires sur les nodules dissociés issus de la procédure de co-injection par manque de cellules.

La modification du protocole de purification ayant conduit à la production d'un lot plus « propre » de protéine A38C, et utilisé dans cette expérience, nous nous sommes demandés si jusqu'ici les LPS avaient pu masquer une partie des sites de liaison sur la lectine permettant la reconnaissance

spécifique du marqueur tumoral glycosidique, l'antigène TF. Ce biais induit par la présence de LPS suggère que les doses nécessaires, que ce soit pour la détection des nodules (0,8µM) ou pour prévenir leur implantation (8µM), ont été surestimées et que des résultats similaires seraient obtenus en présence de dose inférieure d'A38C produite avec le nouveau protocole.

3. Détermination de la dose d'A38C nécessaire pour prévenir l'implantation de cellules tumorales *in vivo*

L'expérience de dissociation de nodules tumoraux décrite ci-dessus suggérait que 50µg d'A38C d'un nouveau lot aurait la même efficacité pour prévenir l'implantation des nodules que 500µg d'A38C d'un ancien lot. Pour évaluer si la présence d'endotoxines avait influencé la détection de l'antigène TF et nous avait conduits à surestimer les doses nécessaires d'A38C pour exercer sa propriété anti-adhésive, nous avons mis en place une expérience préliminaire sur 10 animaux. Celle-ci consistait à faire des co-injections intrapéritonéales de cellules IGROV-1 ($2 \cdot 10^6$) avec des doses croissantes d'A38C. Ainsi, chaque animal a reçu une dose différente d'A38C (5, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250 et 500µg) et un animal a été injecté seulement avec les cellules IGROV-1 pour le témoin. Une série d'imagerie non invasive de bioluminescence a été réalisée tous les 3 jours pour suivre l'implantation des cellules IGROV-1 dans la cavité abdominale des animaux co-injectés. Les valeurs d'intensités de bioluminescence, obtenues par quantification du signal détecté, n'évoluent plus dès la 2^{ème} série d'imagerie soit six jours après les co-injections. Ainsi, et comme nous avons vu précédemment que ces valeurs n'évoluent pas au cours du temps, dans cette expérience les valeurs de 6 séries d'imagerie (de la 2^{ème}, soit J6, à la 7^{ème}, soit J21) ont été cumulées pour chaque animal et les données ont été traitées pour évaluer l' EC_{50} de la propriété anti-adhésive de la protéine A38C (Figure 62).

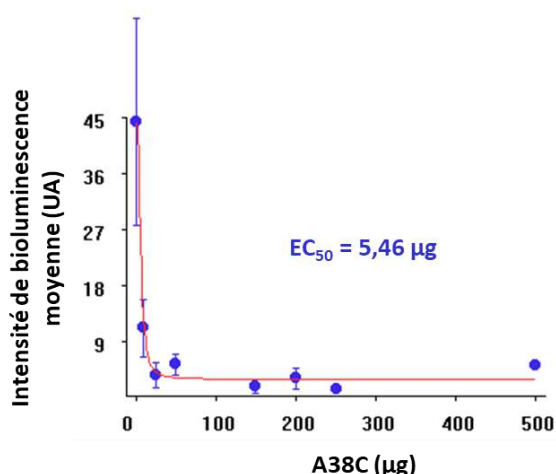


Figure 62 : Suivi non invasif de l'implantation tumorale. Les animaux ont été injectés en intrapéritonéal avec $2 \cdot 10^6$ IGROV-1 Luc GFP (0) ou co-injectés avec $2 \cdot 10^6$ IGROV-1 Luc GFP + 10, 25, 50, 150, 200, 250 ou 500µg A38C. L'imagerie non invasive de bioluminescence est effectuée tous les 3 jours et analysée avec le logiciel ImageJ. Les intensités de bioluminescence moyenne (UA : unité arbitraire) obtenues à chaque série d'imagerie ont été compilées et sont représentées en moyennes \pm SD ; 6 séries d'image. L'analyse effectuée avec le logiciel GOSA a permis d'obtenir un EC_{50} correspondant à la quantité d'A38C pour laquelle la moitié des cellules injectées ont pu adhérer dans la cavité abdominale des animaux. $n=1$ (ctrl, 0µg A38C) et $n=1$ par dose d'A38C co-injecté.

Cette évaluation reste très approximative puisqu'il n'y a qu'un animal par dose et la courbe montre que des doses inférieures à 5µg aurait été nécessaires pour mieux évaluer l'efficacité d'A38C pour

prévenir l'implantation tumorale. Par ailleurs, les souris ayant reçu 5 et 100µg d'A38C co-injectés avec les cellules IGROV-1 ne présentaient aucun signal de bioluminescence et ne sont donc pas représentées sur la courbe. Ainsi, il apparaît que les modifications dans le protocole de purification d'A38C, impliquant une diminution des endotoxines dans les lots de production, ont effectivement conduit à la diminution de la dose nécessaire pour observer un effet anti-adhésif de la protéine *in vivo*. A la fin de l'expérience, la macroscopie de fluorescence a permis de déterminer le nombre de nodules péritonéaux ainsi que leurs surfaces (Figure 63A et B). Ces données permettent de faire les calculs des index péritonéaux clinique et adapté globaux (Figure 63C et D).

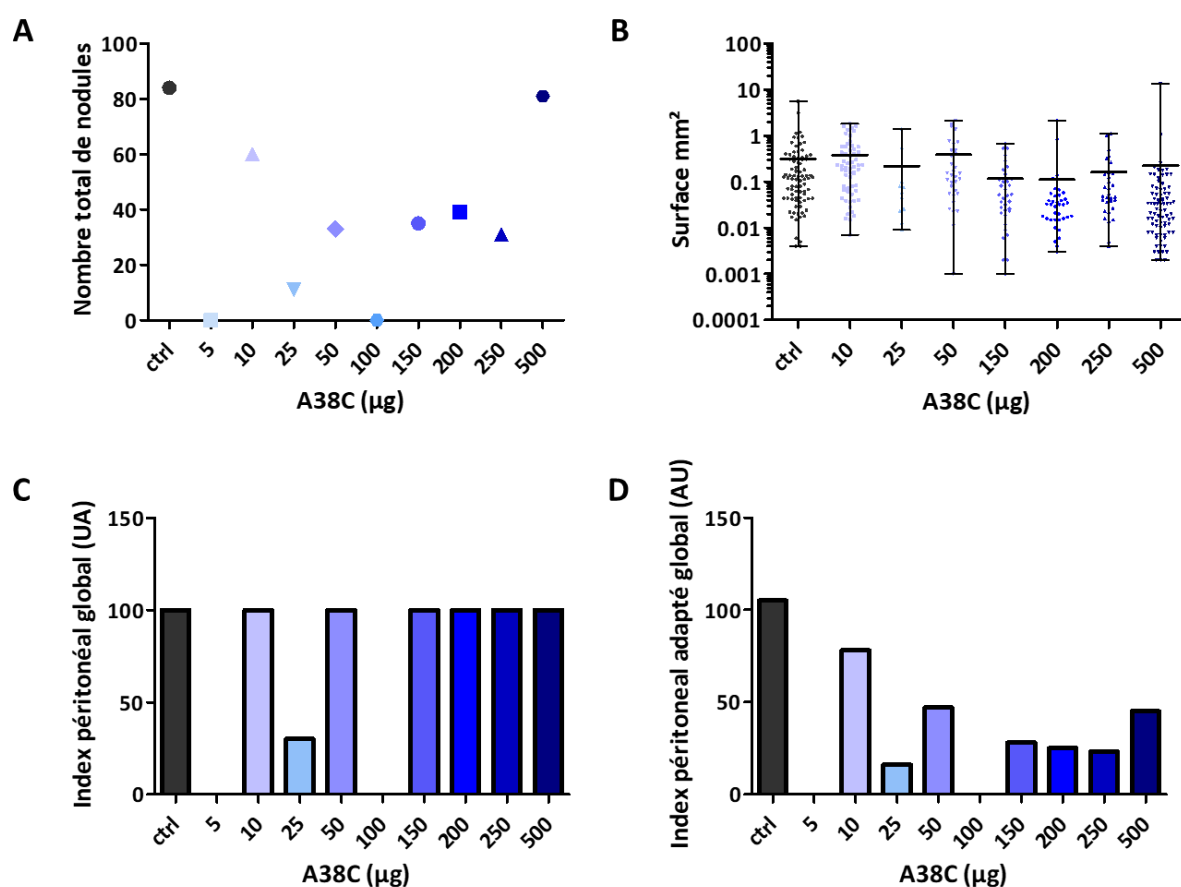


Figure 63 : Quantification de l'implantation tumorale. Les animaux ont été injectés en intrapéritonéal avec 2.10^6 IGROV-1 Luc GFP (ctrl) ou co-injectés avec 2.10^6 IGROV-1 Luc GFP + 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250 ou 500µg A38C. Après 3 semaines, la macroscopie de fluorescence (signal GFP des cellules IGROV-1) est réalisée sur chaque groupe d'organes à l'autopsie des animaux. Le nombre (A) et la surface (B) de chaque nodule sont évalués par analyses d'images avec le logiciel ImageJ, et permettent d'obtenir l'index péritonéal et l'index péritonéal adapté (voir matériels et méthodes) global, respectivement (C) et (D). Les graphes ont été obtenus avec le logiciel Prism et sont représentés en symboles uniques (nombre total de nodules par animal), moyennes avec la gamme de données (surfaces des nodules) ou histogrammes (index péritonéal). $n=1$ (ctrl) et $n=1$ par dose d'A38C co-injecté.

Au contraire de la dernière expérience, les deux index donnent des résultats différents. L'index utilisé en clinique suggère, à l'exception de la co-injection avec 25µg, que la protéine A38C n'a pas été efficace pour prévenir l'implantation de nodules dans le péritoine, alors que l'index adapté montre une diminution suggérant un effet anti-adhésif qui augmente avec la dose d'A38C co-injectés avec les

cellules IGROV-1. Si nous devons évaluer un EC_{50} de cet effet anti-adhésif à partir de l'index péritonéal adapté, celui-ci serait de 50 μ g soit environ 10 fois plus important que la valeur obtenue avec l'imagerie non invasive de bioluminescence. Bien que ces données ne représentent qu'un seul animal par dose d'A38C, ces résultats confirment que la présence d'endotoxines dans les lots de production de la protéine A38C avait conduit à la surestimation des doses nécessaires pour obtenir un effet anti-adhésif et donc prévenir l'implantation des nodules *in vivo*.

4. Bilan des résultats (partie IV)

Dans cette partie, des résultats préliminaires ont mis en évidence les propriétés anti-adhésives de la protéine A38C *in vivo*. Ces expériences ont permis de soulever le problème de l'influence des endotoxines sur les expériences réalisées avec notre nano-objet. La présence de LPS dans des productions chez *E. coli* est bien connue puisque la majorité des protéines recombinantes sont produites dans ce système bactérien, cependant l'influence de ces endotoxines sur les propriétés ou activités de ces protéines est rarement abordée.

La révélation de ce problème a permis de déterminer que les LPS entraient probablement en compétition pour la reconnaissance spécifique de l'antigène TF par la lectine et donc l'adressage de ce nanocontainer aux cellules tumorales épithéliales. Quelle que soit l'utilisation faite de cette protéine, en tant que nanocontainer, nanosonde ou pour prévenir les implantations tumorales avec sa propriété antiadhésive, les doses utilisées jusqu'ici ont été surestimées. Ainsi, nous avons retrouvé un effet antiadhésif similaire pour des doses considérablement plus faibles d'A38C (10 à 100 fois inférieure) depuis la modification du protocole de purification conduisant à la diminution des LPS dans les lots de protéines.

Par ailleurs, l'objectif du développement de la procédure de co-injection *in vivo* était de mimer le détachement iatrogène de cellules tumorales engendré par la chirurgie cytoréductrice. Ces cellules tumorales libres sont capables de se regrouper et de se réimplanter dans la cavité abdominale. En plus des nodules de taille submillimétrique difficile voire impossible à détecter, ces détachements et disséminations iatrogènes sont aussi responsables des rechutes observées après les chirurgies de première intention chez la majorité des patientes atteintes de carcinose péritonéale ovarienne. Compte-tenu des propriétés de notre nano-objet, il serait possible de cumuler l'anti-adhésion à la délivrance ciblée d'agents thérapeutiques par le nanocontainer dans une procédure similaire à la chimiothérapie hyperthermique intrapéritonéale administrée en fin de chirurgie. La reconnaissance de l'antigène TF à la membrane des cellules tumorales conduirait au relargage contrôlé de molécules cytotoxiques par le nanocontainer et empêcherait également la réimplantation de ces cellules dans la cavité abdominale.

Des expériences de délivrance ciblée de doxorubicine et mithramycine (MTM) basées sur la procédure de co-injection ont été réalisées in vivo sur quelques animaux. Celles-ci n'ont pas permis d'observer une efficacité du traitement en intrapéritonéal avec le nanocontainer chargé en comparaison du traitement avec la molécule seule non confinée. Ces résultats ne sont pas inclus dans ce manuscrit car ils ont été obtenus avec des lots d'A38C produits avant la modification du protocole, donc contaminés par des LPS. Il sera nécessaire de renouveler ces expériences sur un plus grand nombre d'animaux et avec une protéine A38C purifiée selon le nouveau protocole.

Conclusions générales

La production de la lectine de *Xerocomellus Chrysenteron* (XCL) sous forme recombinante a permis de mettre en évidence plusieurs caractéristiques intrinsèques de cette protéine, à savoir une cavité hermétique au centre de sa structure permettant de transporter des molécules thérapeutiques et quatre sites de liaison à l'antigène TF (disaccharide glycotope des carcinomes, KD = 400nM en ITC). Ces deux propriétés font de ce nano-objet un outil séduisant pour envisager son développement en thérapie anti-cancéreuses et imagerie diagnostique.

Notre collaboration avec un chirurgien oncologue, le Dr. Gwenaël Ferron, nous a permis d'identifier plusieurs problématiques cliniques liées au cancer épithélial ovarien (EOC) auxquelles la lectine pourrait s'adresser. Cette pathologie implique la dissémination de cellules tumorales, depuis la tumeur primaire, dans la cavité abdominale des patientes conduisant au développement de carcinomes péritonéales. Les traitements consistent en une chirurgie cytoréductrice et des chimiothérapies, sachant que le paramètre influençant le plus le pronostic est l'exhaustivité de la chirurgie. Pour atteindre cet objectif, il est indispensable de pouvoir détecter tous les foyers tumoraux, quelle que soit leur taille. En effet, les nodules de taille microscopique non détectés, et donc non excisés, sont souvent à l'origine des rechutes trop communément observées dans cette pathologie. Par ailleurs, l'acte chirurgical en lui-même induit le détachement iatrogénique de cellules tumorales qui peuvent se réimplanter dans la cavité abdominale des patientes et entraîner également des rechutes.

Pour les développements de l'aspect nanocontainer, des études de docking et dynamique moléculaire ont été réalisées pour prédire *in silico* quelles molécules thérapeutiques pouvaient être confinées dans la cavité de la structure tétramérique du nanocontainer, le mutant A38C de la protéine XCL, parmi les 72 molécules sélectionnées par des cliniciens. La reconnaissance spécifique de l'antigène TF par le nanocontainer nous a permis d'adresser plusieurs molécules thérapeutiques à des cellules épithéliales cancéreuses. La preuve de concept a ainsi été établie pour la délivrance ciblée de doxorubicine, confinée dans la cavité du nanocontainer A38C, à des lignées d'adénocarcinomes ovariens humains. D'autres molécules ont été chargées dans le nanocontainer et testées *in vitro*. La mithramycine A, qui possédait le meilleur score en dynamique moléculaire, a généré les meilleurs EC₅₀ sur un modèle cellulaire de cancer ovarien. Cette molécule semble donc être la plus prometteuse pour les futurs développements de thérapie ciblée *in vivo* avec le nanocontainer.

Pour les développements en imagerie diagnostique, la protéine A38C a été marquée dans le proche infrarouge (alexa647). L'interaction entre la protéine A38C et l'antigène TF est spécifique, rapide et présente une affinité de l'ordre de la centaine de nanomolaire. La détection du biomarqueur cancéreux

glycosidique *in vitro* a été observée sur trois lignées d'adénocarcinomes ovariens, humains indépendamment de l'expression de la Mucine 16 (marqueur protéique de l'EOC).

Suite à la mise au point d'un modèle murin de carcinose péritonéale ovarienne, la détection de nodules submillimétriques dans la cavité abdominale des animaux a été démontrée par deux procédures (co-injection et séquentiel) modélisant deux situations cliniques. Le protocole séquentiel permet de mimer une injection de la nanosonde avant la chirurgie de cytoréduction pour être utilisée en assistance intraopératoire. La protéine A38C-alexa647 a ainsi permis le repérage de nodules tumoraux déjà implantés dans la cavité abdominale des animaux, indépendamment de leur taille, à travers la reconnaissance spécifique de l'antigène TF exprimé à la membrane de cellules du microenvironnement tumoral. Le protocole de co-injection a été mis en place pour mimer les détachements iatrogéniques induits par l'acte chirurgical. Dans ce cas, l'interaction de la nanosonde *in vivo* avec les cellules tumorales est en partie directe ce qui permettrait une détection intra puis post-opératoire (persistance du signal sur au moins 3 semaines) de disséminations tumorales iatrogéniques.

Nous avons également initié l'utilisation de la nanosonde sur des coupes de tissus humains provenant d'une patiente atteinte d'une carcinose péritonéale ovarienne, et démontré que le signal observé est bien spécifique. Ces dernières données sont très encourageantes pour la validation de la nanosonde sur des modèles PDX.

Par ailleurs, l'antigène TF détecté par la nanosonde étant présent dans 90% des carcinomes, nous avons démontré qu'il est possible de détecter un autre type de carcinomes tant *in vitro* qu'*in vivo* avec les expériences faites sur la lignée d'adénocarcinomes pulmonaires. Le développement d'une carcinose péritonéale chez la souris à partir de cette lignée cellulaire a permis d'illustrer le concept de permissivité du péritoine à l'origine du développement et de la progression des carcinoses quelles que soient leurs origines.

Pour finir et compte-tenu de la propriété antiadhésive de notre nano-objet, nous avons effectué quelques expériences préliminaires pour déterminer la dose de protéine A38C nécessaire pour prévenir la réimplantation de cellules tumorales dans le protocole de co-injection. Cette propriété permettrait d'adresser le problème des rechutes dues à la réimplantation de détachements iatrogènes engendrés par la chirurgie cytoréductrice.

Perspectives

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont donné lieu à nombreuses nouvelles réflexions sur de futurs développements. Dans la suite de ce projet, plusieurs axes de recherche seront abordés, à savoir (i) la manipulation de l'objet pour le greffage d'autres traceurs, (ii) la caractérisation de glycoprotéines portant l'antigène TF à la membrane d'adénocarcinomes ovariens primaires issus d'exérèse de chirurgie, et (iii) le développement de la nanosonde en anatomopathologie.

Ces points ne sont pas développés dans ce manuscrit pour assurer la confidentialité de données nécessaires à l'éventuel dépôt d'un brevet.

Par ailleurs, il est également possible d'envisager la mise au point d'une sonde bi-spécifique avec notre nano-objet. Comme nous l'avons abordé dans l'introduction, la génération d'objets bi-spécifiques ciblant, sur le même marqueur moléculaire, un épitope glycosidique (l'antigène TF) et un épitope protéique (cible des anticorps monoclonaux utilisés actuellement dans les tests de suivi de traitement) serait un moyen d'augmenter la spécificité et la sensibilité d'un test diagnostique de l'EOC. Le greffage d'un scFv (single-chain fragment variable) spécifique du CA125 sur la nanosonde A38C permettrait la détection simultanée de l'antigène TF avec A38C, et de l'épitope peptidique du CA125 avec le scFv [437].

Pour l'imagerie diagnostique, la détection de nodules de taille submillimétrique dans la cavité abdominale des animaux par la nanosonde A38C-alexa647 sera validée sur des modèles PDX (patient-derived xenografts) plus proches et pertinents de la situation clinique. La société Olympus propose à notre collaborateur, le Dr Gwenaél Ferron, de lui fournir un prototype de caméra endoscopique pour la détection de signaux fluorescents dans le NIR et utilisable chez le petit animal. Ce dispositif permettrait au Dr. Ferron de tester le potentiel de la nanosonde pour la détection de nodules péritonéaux *in vivo*, dans un premier temps sur les modèles PDX murins. Suite à la chirurgie cytoréductrice, les animaux seront suivis en imagerie post-opératoire pour visualiser les éventuelles récidives des carcinomes. La survie des animaux ayant été opérés sous assistance de la nanosonde sera comparée à celle d'animaux ayant eu la chirurgie cytoréductrice non-assistée, et à celle d'animaux témoins non opérés.

De plus, concernant les rechutes des carcinomes dues à la réimplantation de cellules tumorales libres issues de détachements iatrogéniques engendrés par la chirurgie, nous envisageons de cumuler l'anti-adhésion à la délivrance ciblée de principes actifs par le nanocontainer dans une procédure similaire à la chimiothérapie hyperthermique intrapéritonéale administrée en fin de chirurgie. Le protocole de

co-injection *in vivo* appliquée à des modèles PDX permettra de mimer cette dissémination iatrogène de cellules tumorales. La reconnaissance de l'antigène TF à la membrane des cellules tumorales conduirait au relargage contrôlé de molécules cytotoxiques par le nanocontainer et empêcherait également la réimplantation de ces cellules dans la cavité abdominale.

Concernant la biocompatibilité et la toxicité du nano-objet, des expériences de biodistribution ont été effectuées pour déterminer d'une part quel serait la meilleure voie d'injection pour le nanocontainer, et d'autre part si des injections répétées de cette protéine, à des doses bien supérieures à celles administrées pour l'imagerie diagnostique, engendraient une toxicité. Nous avons vu qu'à l'exception de la présence massive d'endotoxines dans les lots de production de la protéine A38C, des doses allant jusqu'à 2,4 μ M (150 μ g) par jour administrées pendant 5 jours consécutifs ne posent pas de problèmes de toxicité chez la souris. Pour des applications en nanothéranostique intrapéritonéale cumulant les aspects container, sonde et anti-adhésion, pour envisager une utilisation du nanocontainer en clinique des études de pharmacocinétiques poussées devront être effectuées. Elles permettront de déterminer la concentration en principe actif délivré par le nanocontainer au niveau de la tumeur, et des EC₅₀ pour la délivrance ciblée cumulée à la propriété antiadhésive. Nous pourrions ainsi évaluer si le nanocontainer chargé est plus efficace que les chimiothérapies intrapéritonéales déjà existantes. De plus, l'adressage intracellulaire de la molécule par le nanocontainer devrait diminuer la toxicité du principe actif au niveau des tissus sains environnants et pourrait permettre de contourner les mécanismes de chimiorésistance développés par les cellules tumorales dans les rechutes des carcinoses péritonéales.

Matériels et Méthodes

Protéines recombinantes

1. Production et purification

Une fois l'ADNc codant pour la protéine XCL isolé, l'ORF a été sous-cloné dans un vecteur d'expression (plasmide) pour obtenir la protéine de fusion suivante : tag 6 histidine, site de coupure TEV et XCL. Le tag histidine a été ajouté pour faciliter la purification de la protéine recombinante sur une colonne d'affinité utilisant le nickel comme ligand [445]. Le site de coupure TEV sert à éliminer le tag histidine, une fois la protéine purifiée, en l'incubant avec une TEV protease [65]. La construction a été placée en aval d'un promoteur T7 inducible. La culture de la souche bactérienne *E. coli* BL21 (DE3), transformée avec le plasmide recombinant, est réalisée en milieu riche jusqu'à une densité optique de 0,8. La transcription médiée par la T7 RNA polymérase est induite par l'ajout de 1mM d'isopropyl- β -thiogalactopyranoside (IPTG) dans le milieu de culture, et la température de culture est baissée à 18°C. Les bactéries sont collectées par centrifugation, lysées par sonication et la protéine est purifiée sur colonne de nickel (Ni-NTA) puis éluée en ajoutant 250mM EDTA au tampon d'élution. Une deuxième et dernière étape de purification est faite sur chromatographie d'exclusion (Sephacryl S300, 600 mm \times 26 mm) équilibrée avec un tampon phosphate 50mM, 100mM NaCl pH 7.2. La protéine purifiée est enfin dialysée sur la nuit contre ce même tampon puis concentrée sur des vivaspin 15R (Sartorius, 10 000 MWCO). La pureté de la protéine ainsi obtenue est vérifiée sur gel SDS-PAGE avec une coloration au bleu de Coomassie. La concentration de la protéine est déterminée par spectrophotométrie à $\lambda = 280\text{nm}$ avec un coefficient d'extinction molaire $\epsilon_{280\text{nm}} = 29\,910\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Suite à des problèmes de toxicité chez les animaux, un protocole de lavage des colonnes de purification a été mis en place. L'eau utilisée pour tous ces lavages ou pour les tampons est de l'eau milliQ. Entre deux lots de production, un cycle de lavages est réalisé avec du NaCl 0.2M, puis du NaOH 1M et de l'eau (5 fois le volume de la colonne par tampon) sur les colonnes de chromatographie d'affinité et d'exclusion, respectivement Ni-NTA et S300. Ensuite, la colonne Ni-NTA est régénérée avec du sulfate de nickel, puis de l'eau pour rincer l'excédent (2 fois le volume de la colonne). Enfin, les deux colonnes sont ré-équilibrées avec le tampon de la protéine (3 fois le volume de la colonne). De plus, en fin de purification, la protéine est passée sur des colonnes dédiées à l'élimination des endotoxines (Pierce™ High Capacity Endotoxin Removal Spin Columns, cat n°#88274, Thermo Fisher Scientific, USA), avant d'être concentrée. Pour finir de l'azide est ajouté (0.005%) et la protéine est filtrée en conditions stériles (0.2 μm , cat n°#146560, Dutscher, France).

Pour les mutants A38C et T12C, toutes les mutagenèses dirigées ont été faite avec le kit Quickchange mutagenesis (Stratagen). Les plasmides obtenus ont été séquencés pour vérifier que la mutation a bien fonctionné.

Les illustrations moléculaires et de structure ont été faites avec le logiciel PyMOL [446].

2. Marquage des protéines dans le proche infrarouge

Après purification, la protéine A38C_{rec} est marquée avec un fluorophore émettant dans le proche infrarouge (Alexa Fluor 647), lié par un lien covalent NHS ester sur les lysines, en utilisant le kit de marquage CF[®]647 SE Protein labeling kit (cat n°#92218, Biotium, USA). A38C (30μM) est incubé, sur la nuit à température ambiante et à l'abri de la lumière, dans un milieu composé de 100mM de bicarbonate de sodium (pH 8.3) et du CF[®]647 dye. Après élimination du fluorophore libre restant par chromatographie d'exclusion (Biogel P-30, Bio-rad, USA), la protéine marquée est récupérée et le rendement de marquage est déterminé par spectrophotométrie. Le taux de protéine conjuguée au fluorophore est calculé avec un coefficient d'extinction molaire de $\epsilon_{650nm} = 240\,000\text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ pour CF[®]647. Les concentrations en protéine après marquage sont calculées avec $\epsilon_{280nm} = 119\,640\text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ avec une correction de l'absorption du fluorophore à cette longueur d'onde. Le rendement de marquage habituel est d'une mole de fluorophore par mole de protéine (tétramère).

Culture cellulaire : lignées, produits et réactifs

Les adénocarcinomes ovariens humains NIH: OVCAR-3 (ATCC[®] HTB-161[™]) et SKOV-3 (ATCC[®] HTB-77[™]) ont été obtenus de l'ATCC (American Type Culture Collection) et les IGROV-1 proviennent de l'institut Gustave Roussy [435]. Toutes ces cellules sont cultivées dans du milieu RPMI 1640 medium (CM1RPM00K, Eurobio, France) supplémenté par 2mM L-Glutamine (CSTGLU00, Eurobio, France), 1% penicillin/streptomycin (P0781, Sigma, USA), 10% fetal calf serum (FCS) (F7524, Sigma, USA), 10μg/mL d'insuline humaine (I9278, Sigma, USA) et 20ng/mL epidermal growth factor humain recombinant (E9644, Sigma, USA). Les cellules sont cultivées en monocouche à 37°C dans une atmosphère humide à 5% CO₂. L'absence de mycoplasmes dans les cultures est vérifiée toutes les deux semaines (MycoAlert Mycoplasma Detection kit, cat n°#LT07-318, Lonza, Switzerland).

Pour les expérimentations *in vivo*, les vecteurs lentiviraux utilisés pour l'expression de la Firefly luciférase (Luc) et de la GFP (Green Fluorescent Protein) ont été obtenus auprès de Flash Therapeutics (Toulouse, France). Les deux transductions ont été effectuées à des MOI (multiplicity of infection) 100. Le niveau d'expression de la GFP, après double transduction des cellules IGROV-1 et SKOV-3, a été évalué par FACS, et les cellules étaient positives pour le signal GFP à 99% comparées aux cellules wild type (wt) (Figure 64A). L'expression de la Luc a été évaluée avec le même dispositif et paramètres

d'acquisition que ceux utilisés pour les expérimentations *in vivo*, après addition de 150µg/mL de D-luciferin sodium salt (cat n°LN10000, OZ Biosciences, France) au milieu de culture (Figure 64B).

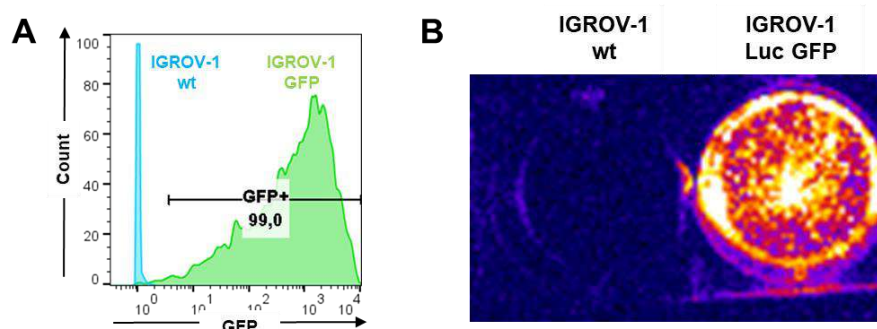


Figure 64 : Evaluation des doubles transductions (exemple des cellules IGROV-1) pour le suivi en imagerie des modèles *in vivo*. (A) Cytométrie en flux pour déterminer le % de cellules positives au signal GFP après double transduction avec les lentivirus pour l'expression stable de la GFP et la luciférase. Les IGROV wt ont été utilisées pour gater les cellules positives dans l'échantillon doublement transduit. (B) Imagerie de bioluminescence, avec le même dispositif et paramètres d'acquisition que ceux utilisés pour les expérimentations *in vivo*, pour évaluer l'expression de la luciférase après addition de 150µg/mL de substrat luciférine au milieu de culture. Panel de gauche : IGROV wt, panel de droite : IGROV transduites avec les deux lentivirus.

Les temps de dédoublement des lignées cellulaires OVCAR-3, SKOV-3 wt et IGROV-1 Luc GFP ont été calculés de deux façons. Tout d'abord, $3 \cdot 10^4$ OVCAR-3, $2 \cdot 10^4$ SKOV-3 et $2 \cdot 10^4$ IGROV-1 ont été cultivées 4 jours en plaque 12 puits. Chaque jour 2 puits sont passés à la trypsine et les cellules sont comptées en présence de bleu trypan (T8154, Sigma, USA) pour obtenir les taux de croissance (nombre de cellules vivantes J_x / nombre de cellules vivantes J_0). Les courbes sont tracées selon l'équation $f(x) = ae^{kx}$ pour une croissance exponentielle avec le logiciel GOSA [437]. Les temps de dédoublement sont calculés avec la formule $\ln(2)/k$ (Figure 65A, B et C). Concernant les cellules SKOV-3, le résultat obtenu avec cette expérience (temps de dédoublement = 46h) apparaît surestimé par rapport aux observations quotidiennes de ces différentes cultures. Ainsi, une deuxième expérience a été effectuée en ensemençant, en plaque 12 puits, les trois types cellulaires en triplicata aux mêmes densités que celles utilisées pour les expériences de délivrance cellulaire de molécules par le nanocontainer, à savoir $1 \cdot 10^5$ OVCAR-3, $5 \cdot 10^4$ SKOV-3 et $5 \cdot 10^4$ IGROV-1. Après 72h de culture, les cellules sont passées à la trypsine puis comptées. Le temps de dédoublement a été estimé selon l'équation : $[\text{durée de culture (h)} \times \log(2)] / [\log(\text{concentration finale}) - \log(\text{concentration initiale})]$ (Figure 65D).

Pour les cellules OVCAR-3 et les cellules IGROV-1, les résultats sont du même ordre de grandeur que ceux obtenus avec la première expérience, pour les SKOV-3 le résultat est beaucoup plus proche des observations. Ce sont donc ces temps de dédoublement qui seront retenus.

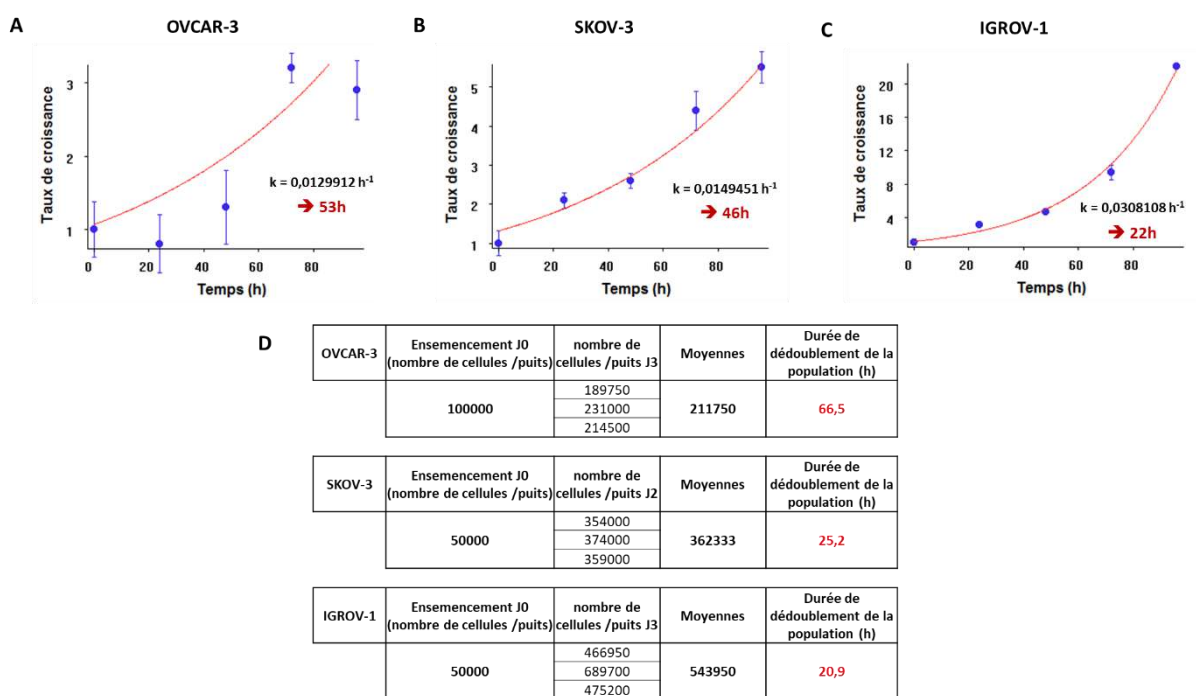


Figure 65 : Temps de dédoublement des différentes lignées d'adénocarcinomes ovariens humains. Les cellules ont été cultivées 96h en plaque 12 puits. Chaque jour deux puits sont passés puis comptés pour évaluer la croissance cellulaire. Les résultats ont été analysés avec le logiciel GOSA pour obtenir les temps de dédoublement des cellules **(A) OVCAR-3, (B) SKOV-3 et (C) IGROV-1**, selon la formule : $\ln(2)/k$. **(D)** Une 2^{ème} expérience est réalisée en cultivant les cellules aux mêmes densités que celles utilisées pour les expériences de délivrance cellulaire et en plaque 12 puits. Après 72h de culture, les cellules sont passées, comptées et leur temps de dédoublement est estimé avec la formule : $[\text{durée de culture} \times \log(2)] / [\log(\text{concentration finale}) - \log(\text{concentration initiale})]$.

Les cellules A-549 (carcinomes pulmonaires humains, ATCC® CCL-185™) ont été obtenus auprès du Pr. Bettina Couderc qui les avait doublement transduites avec des vecteur lentiviraux (Trono lab, Suisse), pour l'expression constitutive de la eGFP et de la luciférase. Les cellules A-549 sont cultivées en monocouche à 37°C dans une atmosphère humide à 5% CO₂, dans du milieu RPMI 1640 medium supplémenté par 2mM L-Glutamine, 1% penicillin/streptomycin et 10% FCS. L'expression de la GFP a été évaluée par microscopie de fluorescence (Figure 66A) et celle de la Luc a été évaluée avec le même dispositif et paramètres d'acquisition que ceux utilisés pour les expérimentations *in vivo*, après addition de 150µg/mL de D-luciferin sodium salt au milieu de culture (Figure 66B).

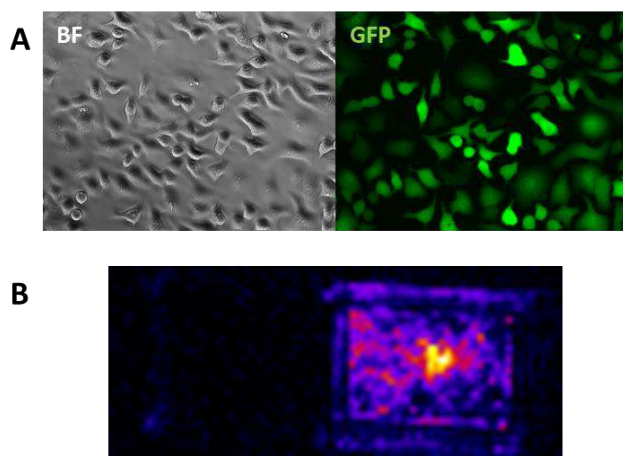


Figure 66 : Evaluation de la double transduction des cellules A-549 pour le suivi en imagerie du modèle *in vivo*. **(A)** Microscopie de fluorescence pour déterminer si les cellules expriment bien la eGFP après transduction avec un lentivirus. L'image a été acquise avec un L4 block filter. BF : Bright Field. **(B)** Imagerie de bioluminescence, avec le même dispositif et paramètres d'acquisition que ceux utilisés pour les expérimentations *in vivo*, pour évaluer l'expression de la luciférase après addition de 150µg/mL de substrat luciférine au milieu de culture. Panel de gauche : A-549 wt, panel de droite : A-549 transduites avec les deux lentivirus.

Chargement de molécules dans le nanocontainer A38C

La doxorubicine (D1515, MW=579.98g.mol⁻¹, Sigma, USA) à 500µM est incubée 72h, à température ambiante et protégée de la lumière, avec 50µM d'A38C dans un tampon phosphate 50mM, 100mM NaCl pH 7,2 pour un volume final de 1,5mL. A la fin de l'incubation, la doxorubicine libre est retirée avec deux chromatographie d'exclusion successives, une colonne PD miditrap (28-9180-11, GE Healthcare, USA) et une colonne PD10 (17085101, GE Healthcare, USA) équilibrées avec le même tampon que celui d'A38C. L'efficacité de purification du complexe a été vérifiée à priori en chargeant 500µM de doxorubicine seule sur la colonne et en s'assurant que tout soit récupéré en sortie de colonne. Une fois le confinement A38C/doxo élué, il est concentré jusqu'à un volume de 500µL avec des filtres à centrifuger Amicon ultra 2mL (UFC201024, 10kD, Merck Millipore, USA). Dans certains cas, deux dialyses successives de la protéine chargée sont réalisées sur la nuit contre 300mL du tampon de la protéine. Le taux de chargement est estimé en mesurant l'absorbance à 280nm et 490nm avec les coefficients d'extinction molaire suivant : $\epsilon_{280\text{ nm}} = 119\,640\text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ pour la protéine et $\epsilon_{490\text{ nm}} = 10\,800\text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ pour la doxorubicine. Le taux de chargement est calculé comme suit :

$$\text{Taux de chargement (\%)} = \frac{[\text{Doxo}]}{[\text{Protein}]} \times 100$$

La mithramycine A (CAYM11434-5, MW=1085.15g.mol⁻¹, VWR, USA) à 150µM est incubée 72h avec 50µM d'A38C dans les mêmes conditions que pour la Doxorubicine avec 1mM de DTT. Le taux de chargement est aussi évalué en spectrophotométrie à 280nm et 405nm avec le coefficient d'extinction molaire suivant pour la MTM $\epsilon_{405\text{ nm}} = 6\,309.4\text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

La Bléomycine (sc-200134, MW=1512g.mol⁻¹, Santa Cruz Biotechnology, USA), la Fludarabine sans phosphate (F2773, Sigma, USA), le Methotrexate (M031, Euromedex, France) et l'Ifosfamide (I4909, Sigma, USA) ont été incubés à 150µM pendant 72h avec 50µM d'A38C dans les mêmes conditions que pour la Doxorubicine avec 1mM de DTT. Il n'est pas possible d'évaluer simplement le taux de chargement de ces molécules, ainsi les confinements sont testés directement sur les cellules.

Délivrance cellulaire et expériences de dose-réponse

Pour l'expérience de localisation de la doxorubicine et d'A38C en microscopie confocale, les cellules OVCAR-3 sont cultivées sur des dispositifs Lab Tek à 4 puits (155383, Thermo Fisher Scientific, USA) à 5.10⁵ cellules/puits. Une fois platées, 0.8µM du nanocontainer A38C chargé en doxorubicine et 32nM de nanocontainer vide marqué à l'alexa647 sont ajoutés au milieu de culture. Pour la doxorubicine seule, 0.4µM (concentration équivalente à la doxorubicine chargée dans le nanocontainer) de doxorubicine sont ajoutés au milieu de culture. Les cellules sont incubées 15h en présence de

nanocontainer chargé ou de doxorubicine libre, avant de retirer le milieu et faire des rinçages PBS (phosphate buffer saline $-Ca^{2+}/-Mg^{2+}$, CS1PBS01K-BP, Eurobio, France) (x3). La même expérience est réalisée en présence de 2mM de Fétuine (F2379, Sigma, USA) en tant que compétiteur. Le nanocontainer contenant la doxorubicine (0.8 μ M) et le nanocontainer vide marqué alexa647 (32nM) sont pré-incubés dans du milieu de culture avec 2mM de Fétuine pendant 3h. Le mix de pré-incubation est ensuite ajouté sur les cellules pendant 15h avant de le retirer et faire des lavages PBS ($-Ca^{2+}/-Mg^{2+}$, x3). Les images de fluorescence ont été acquises en microscope confocale.

Pour les expériences de dose/réponse, 1.10^5 OVCAR-3, 5.10^4 SKOV-3 and 5.10^4 IGROV-1 sont cultivées sur des plaques 12 puits (150628, Nunc, Danemark). Une fois platées, 2mM d'hydroxyurée sont ajoutés au milieu de culture pour synchroniser les cellules en phase G1. Après 24h de culture, plusieurs concentrations de nanocontainer chargé en doxorubicine (0,4 ; 0,6 ; 0,8 ; 1,2 ; 1,6 et 3,2 μ M), ou en mithramycine A (1,6 ; 8 ; 24 ; 80 et 160 nM) ou 3,2 μ M de nanocontainer vide sont ajoutés au milieu de culture (volume final 1mL). Les cellules sont incubées 24h avant de retirer le milieu et faire des lavages PBS ($-Ca^{2+}/-Mg^{2+}$, x3). Un milieu de culture frais est ajouté sur les cellules qui sont cultivées 48h de plus. A la fin de l'expérience, les cellules sont lavées au PBS, passées à la trypsine EDTA (T4174, Sigma, USA). Pour évaluer la viabilité, les suspensions cellulaires sont comptées avec une cellule de comptage Neubauer après une dilution 1/2 dans du trypan bleu (15250061, Thermo Fisher Scientific, USA), et le pourcentage de survie (correspondant nombre de cellules non colorées) est exprimé en fonction de la viabilité des cellules témoins cultivées seules. Ensuite, pour regarder le cycle cellulaire, les cellules sont centrifugées (500g, 5 minutes) et resuspendues dans du PBS ($-Ca^{2+}/-Mg^{2+}$) complété avec 5 μ g.mL⁻¹ d'iodure de propidium (P4170, Sigma, USA), 0.1% Triton X100 (T9284, Sigma, USA) et 2,5% FCS. Les cellules sont incubées 20 minutes à température ambiante dans le noir avant les analyses de FACS.

Pour les 4 autres molécules confinées dans A38C, la bléomycine, le méthotrexate, la fludarabine sans phosphate et l'ifosfamide, 1.10^5 OVCAR-3, 5.10^4 SKOV-3 and 5.10^4 IGROV-1 sont cultivées sur des plaques 12 puits (pas de synchronisation). Après 24h de culture, plusieurs concentrations de nanocontainer chargé en bléomycine (0,8 ; 1,6 et 3,2 μ M), en méthotrexate (1,6 et 3,2 μ M), en fludarabine sans phosphate (3,2 μ M) et en Ifosfamide (5,5 μ M) sont ajoutés au milieu de culture (volume final 1mL). Les cellules sont incubées 72h en présence des confinements. A la fin de l'expérience, la viabilité et le cycle cellulaire sont évalués respectivement par comptage avec du bleu trypan et en FACS.

Immunofluorescence

Pour la détection de l'expression de la Mucine 16 et d'A38C-alexa647, 1.10^5 OVCAR-3, $7.5.10^4$ SKOV-3 et $7.5.10^4$ IGROV-1 ont été cultivées dans un dispositif de chambre de culture montées sur lame de microscopie (PEZGS0496, Merck Millipore, USA). Une fois les cellules platées, elles sont fixées avec 4% paraformaldéhyde (PFA) (102091-904, VWR, USA) pendant 20 minutes, puis la PFA est neutralisée avec du PBS ($-Ca^{2+}/-Mg^{2+}$) NH_4Cl 50mM pendant 2 minutes, enfin le blocage est effectué avec du PBS 10% FCS, 2% BSA (Bovine Serum Albumin) pendant 30 minutes à température ambiante. Les cellules sont marquées avec un anticorps monoclonal de souris anti CA-125/MUC16 (Ov185:1) (MA5-11579, Thermo Fisher Scientific, USA) dilué au 1:250 dans du PBS, 2% FCS et incubées 3 heures à température ambiante. Après 3 rinçages au PBS ($-Ca^{2+}/-Mg^{2+}$), les cellules sont marquées simultanément avec un anticorps secondaire Goat anti-Mouse IgG (H+L) alexa488 ou alexa405 (respectivement A11017 et A31553, Thermo Fisher Scientific, USA) dilué au 1:200, et 160nM d'A38C-alexa647, dans du PBS, 2% FBS et incubées 30 minutes à température ambiante. Après 3 rinçages au PBS ($-Ca^{2+}/-Mg^{2+}$), les noyaux sont marqués avec le milieu de montage Vectashield® antifade mounting qui contient du DAPI (H-1200, Clinisciences, USA) et les lames sont montées et conservées à $-20^{\circ}C$ jusqu'à l'imagerie confocale.

Cinétique d'entrée du nanocontainer dans les cellules par imagerie de fluorescence

Pour évaluer la cinétique d'entrée du nanocontainer, 10^5 OVCAR-3, 10^5 OVCAR-3 shMUC16, 5.10^4 SKOV-3, 5.10^4 IGROV-1 et 10^5 A-549 sont cultivées sur des dispositifs Lab Tek à 4 puits (155383, Thermo Fisher Scientific, USA). Une fois les cellules platées, A38C marquée est ajoutée à 160nM par puits, tout en gardant un puits sans protéine pour le contrôle négatif. Les acquisitions avec le microscope de fluorescence sont réalisées aux temps 30 minutes, 4h et 24h d'incubation de la protéine sur les cellules. Deux lavages au PBS ($-Ca^{2+}/-Mg^{2+}$) sont effectués pour retirer la protéine libre dans le milieu. Les cellules ont été imagées sur un vidéomicroscope inversé digitalisé (DMIRB, Leica Microsystems SA, Rueil-Malmaison, France) équipé d'une caméra Cool Snap HQ2 (Roper Scientific, Photometrics, Tucson, AZ, USA) et un objectif 63x 0.7 NA. Pour détecter la fluorescence sur les cellules les filtres appropriés ont été utilisés : Leica L4 block filter (excitation filter, BP: 480/40 nm, emission filter, BP: 527/30 nm) pour voir l'expression constitutive de la GFP par les cellules, et Leica Cy5 TET filtercube (excitation filter, BP 620/60 nm, emission filter, BP 700/75 nm) pour voir la protéine marquée dans le NIR (temps d'exposition = 1s).

Expériences d'endocytose et de dose/réponse

Pour la quantification, 1.10^5 OVCAR-3, 5.10^4 SKOV-3 et 5.10^4 IGROV-1 sont cultivées sur des plaques 12 puits. Une fois les cellules platées, A38C-alexa647 est ajouté à 160nM par puits, tout en conservant un puits sans protéine pour le contrôle négatif. Après une incubation de 24h, les cellules sont lavées au PBS ($-Ca^{2+}/-Mg^{2+}$), récupérées par passage à la trypsine et l'intensité de fluorescence est évaluée en FACS. Pour les expériences de dose/réponse, $7,5.10^4$ OVCAR-3, 5.10^4 SKOV-3 et 5.10^4 IGROV-1 sont cultivées sur des plaques 12 puits. Une fois les cellules platées, A38C-alexa647 est ajoutée à différentes concentrations (16, 32, 63, 126, 160, 253, 320 and 510nM). Les cellules sont ensuite incubées 6h à 37°C avec A38C-alexa647, lavées au PBS, récupérées par passage à la trypsine et l'intensité de fluorescence est évaluée en FACS.

Quantification de l'endocytose et évaluation des modifications du cycle cellulaire en cytométrie en flux (FACS)

Pour les expériences d'endocytose *in vitro*, la fluorescence d'alexa647 est mesurée avec un cytomètre BD (Becton, Dickinson & Company) FACSCalibur™ cell analyzer (FL4, 10^4 évènements comptés) et les résultats ont été analysés avec le logiciel Cell Quest Pro (BD Biosciences, USA) pour déterminer les intensités de fluorescence.

Pour le cycle cellulaire, la fluorescence de l'iodure de propidium est également mesurée avec le cytomètre BD FACSCalibur™ (FL2-A, 10^4 évènements comptés) et les résultats ont été analysés avec le logiciel FlowJo (LLC, BD company, USA).

Evaluation de la viabilité cellulaire en bioluminescence

1. Vérification de l'influence des composés à tester sur la réaction enzymatique conduisant à l'émission de bioluminescence

La réaction enzymatique brute est mise en présence des plus hautes concentrations de cisplatine, gemcitabine et doxorubicine qui seront testés sur les cellules AY-27 ou SKOV-3, pour déterminer l'interférence que pourraient avoir ces composés sur cette réaction conduisant à l'émission de photons. Quatre mélanges réactionnels sont préparés en triplicata dans des plaques 96 puits (Nunc™ F96 MicroWell™, white, Thermo Fisher Scientific, USA). Le premier mélange comprend 400nM d'ATP (A2383, Sigma, USA) et 64.5nM de luciférase (SRE0045, Sigma, USA) qui sont préparés sur des volumes finaux de 200μL dans les milieux de culture des cellules. Dans les trois autres mélanges, 100μM de cisplatine, 100μM de gemcitabine et 2μM de doxorubicine sont ajoutés. Ces quatre mélanges sont

répartis dans les puits en triplicata et incubés 30 minutes à 37°C. Deux minutes avant la lecture de la plaque, 468µM (150µg/mL) de D-luciferin sodium salt (cat n°LN10000, OZ Biosciences, France), préchauffé 30 minutes à 37°C, sont ajoutés dans chaque puits. Une lecture de la plaque est effectuée toutes les 2 minutes pendant 12 minutes pour obtenir les intensités de bioluminescence. La lecture est réalisée sur un Clariostar (microplate reader, BMG Labtech, Allemagne) avec les paramètres suivant : Measurement interval = 3s / No emission filter / Top optic reading / Focal height = 11mm / Reading type = average / Gain = 3600. Ces paramètres seront ceux appliqués aux expériences avec les cellules.

2. AY-27 Luc

Les cellules AY-27 Luc (carcinomes vésicaux) ont été transduites par la société Flash Therapeutics (Toulouse). Les cellules sont cultivées dans du milieu RPMI 1640 medium, supplémenté par 2mM L-Glutamine, 1% penicillin/streptomycin et 10% fetal calf serum, en monocouche à 37°C dans une atmosphère humide à 5% CO₂. L'absence de mycoplasmes dans les cultures est vérifiée toutes les deux semaines. A J-1, les cellules sontensemencées à une densité de 8000 cellules/cm² dans des plaques 96 puits, soit 12 000 cellules/mL dans un volume final de 200µL par puits. A J0, une fois les cellules platées, les composés (cisplatine, gemcitabine ou les deux) ou leurs solvants (eau ou DMSO) sont ajoutés au milieu de culture aux concentrations indiquées dans le Tableau 4.

Groupe n°	Noms	n
1	Cellules contrôles	6
2	Cellules contrôles + H ₂ O (solvant cisplatine)	6
3	Cellules contrôles + DMSO (solvant gemcitabine)	6
4	Cisplatine 0,1µM	6
5	Cisplatine 1µM	6
6	Cisplatine 10µM	6
7	Cisplatine 100µM	6
8	Gemcitabine 0,01µM	6
9	Gemcitabine 0,1µM	6
10	Gemcitabine 1µM	6
11	Gemcitabine 10µM	6
12	Cisplatine 1µM/Gemcitabine 0,1µM	6

Tableau 4 : Groupes pour les expériences de validation d'un test de viabilité basé sur la bioluminescence (1). Les cellules contrôles sont cultivées en présence ou non des solvants respectifs du cisplatine et de la gemcitabine. Quatre concentrations de cisplatine et gemcitabine, ou une combinaison des deux composés, sont ajoutés aux cellules à J0.

Tous les groupes sont faits en triplicata. Pour le suivi non longitudinal, à chaque temps d'analyse (4h, 24h, 48h et 72h) après l'ajout des composés ou des solvants, les cellules sont rincées (100µL PBS /puits x 2). Du milieu de culture complémenté par 150µg/mL de D-luciferin est préchauffé 30 minutes à 37°C avant d'être ajouté aux cellules (100µL/puits). Dix minutes après l'ajout du substrat, les intensités de bioluminescence sont lues avec le lecteur Clariostar, en mesurant aussi un puits vide pour soustraire

le bruit de fonds aux données mesurées sur les cellules. Les paramètres de lecture sont indiqués ci-dessus. Dans un premier temps pour ce suivi non longitudinal, des puits différents sont lus en triplicata pour chaque groupe et à chaque temps d'analyse (plan de plaques, Figure 67A).

Par la suite, un suivi longitudinal a été mis en place permettant de suivre les mêmes cellules pendant toute la durée de l'expérience sans rinçage intermédiaire (plan de plaques, Figure 67B). Pour cela, à chaque temps d'analyse, 1µL de luciférine (30mg/mL), préchauffé 30 minutes à 37°C, est ajouté dans les puits contenant 200µL de culture pour avoir la même concentration finale que précédemment (150µg/mL). La plaque est lue au Clariostar 10 minutes après l'ajout du substrat, avec les mêmes paramètres que précédemment.

Un autre test de viabilité est réalisé en parallèle avec du bleu trypan (plan de plaques, Figure 67A). A chaque temps d'analyse (4h, 24h, 48h et 72h) après l'ajout des composés ou des solvants, les cellules sont rincées au PBS (100µL/puits x 2). 50µL d'une solution d'Accutase® (Cell Detachment Solution, BLE423201, Ozyme, France) est ajoutée dans chaque puits. La plaque est incubée 15 minutes à 37°C avant de récupérer les suspensions cellulaires. Une solution de bleu trypan 0.4% (50µL) est ajoutée à chaque suspension et la concentration cellulaire est évaluée par comptage avec une cellule de Neubauer. Ces résultats sont comparés à ceux obtenus en bioluminescence pour valider la méthode.

A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	4h	4h	4h	4h	4h	4h	4h	4h	4h	4h	4h	4h
B	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h
C	48h	48h	48h	48h	48h	48h	48h	48h	48h	48h	48h	48h
D	72h	72h	72h	72h	72h	72h	72h	72h	72h	72h	72h	72h
E	4h	4h	4h	4h	4h	4h	4h	4h	4h	4h	4h	4h
F	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h
G	48h	48h	48h	48h	48h	48h	48h	48h	48h	48h	48h	48h
H	72h	72h	72h	72h	72h	72h	72h	72h	72h	72h	72h	72h

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	4h	4h	4h	4h	4h	4h	4h	4h	4h	4h	4h	4h
B	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h
C	48h	48h	48h	48h	48h	48h	48h	48h	48h	48h	48h	48h
D	72h	72h	72h	72h	72h	72h	72h	72h	72h	72h	72h	72h
E												
F												
G												
H												

B

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Figure 67: (A) Plan de plaques pour le test de viabilité en bioluminescence en utilisant des puits différents à chaque temps d'analyse, (B) Plan de plaque lorsque les mêmes cellules sont suivies sur toute la durée de l'expérience sans rinçage intermédiaire. Les couleurs correspondent aux différents groupes décrits dans le tableau 5.

3. SKOV-3 Luc

Les cellules SKOV-3 (ATCC® HTB-77™) ont été obtenus de l'ATCC et sont cultivées dans du milieu RPMI 1640 medium supplémenté par 2mM L-Glutamine, 1% penicillin/streptomycin, 10% fetal calf serum, 10µg/mL human Insulin et 20ng/mL human recombinant epidermal growth factor. Les cellules sont cultivées en monocouche à 37°C dans une atmosphère humide à 5% CO₂. L'absence de mycoplasmes dans les cultures est vérifiée toutes les deux semaines. A J-1, les cellules sontensemencées à une densité de 7 000 cellules/cm² dans des plaques 96 puits, soit 10 500 cellules/mL dans un volume final de 200µL par puits. A J0, une fois les cellules platées, la doxorubicine ou son solvant (eau) est ajouté au milieu de culture aux concentrations indiquées dans le Tableau 5.

Groupe n°	Noms	n
1	Cellules contrôles	6
2	Cellules contrôles + H2O (solvant doxorubicine)	6
3	Doxorubicine 0,005µM	6
4	Doxorubicine 0,01µM	6
5	Doxorubicine 0,05µM	6
6	Doxorubicine 0,1µM	6
7	Doxorubicine 0,5µM	6
8	Doxorubicine 1µM	6
9	Doxorubicine 2µM	6

Tableau 5 : Groupes pour les expériences de validation d'un test de viabilité basé sur la bioluminescence (2). Les cellules contrôles sont cultivées en présence ou non du solvant utilisé pour resuspendre la poudre de doxorubicine. Sept concentrations de doxorubicine sont ajoutées aux cellules à J0.

Pour ce suivi longitudinal, tous les groupes seront faits en triplicata (plan de plaques, Figure 68A).

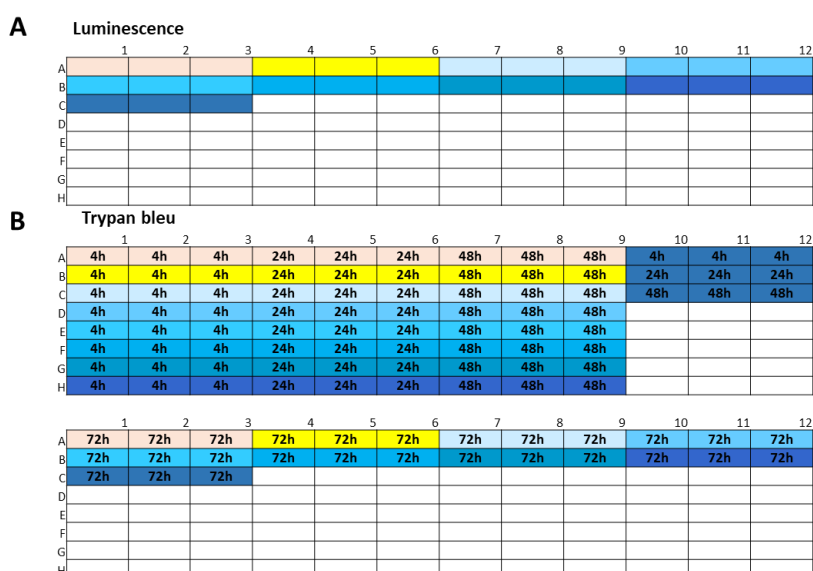


Figure 68 : (A) Plan de plaques pour le test de viabilité en bioluminescence où les mêmes cellules sont suivies sur toute la durée de l'expérience sans rinçage intermédiaire. (B) Plan de plaque pour le test de viabilité au bleu trypan. Les couleurs correspondent aux différents groupes décrits dans le tableau 6.

A chaque temps d'analyse (4h, 24h, 48h et 72h après l'ajout de la doxorubicine ou son solvant), 1µL du stock de luciférine (30 mg/mL), préchauffé à 37°C pendant 30 minutes, est ajouté dans les puits contenant 200 µL de culture pour avoir une concentration finale de 150 µg/mL. La plaque est ensuite lue par le lecteur Clariostar, 10 minutes après l'ajout du substrat, selon les mêmes paramètres que ci-dessus. Un autre test de viabilité est réalisé en parallèle avec du bleu trypan selon le même protocole que celui décrit pour les cellules AY-27 (plan de plaques, Figure 68B).

Xénogreffes murines, administration de la protéine marquée et suivi de croissance tumorale en imagerie non invasive

Des souris nude femelle (BALB/c de chez Janvier Labs, France) âgées de 8 semaines et pesant entre 18 et 23g ont été utilisées dans ce projet. Toutes les expérimentations animales ont été conduites en accord avec les recommandations ARRIVE, la directive européenne 2010/63/EU et les procédures françaises pour la manipulation des animaux de laboratoire, avec l'accord du comité d'éthique (C2EA-01) du Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (MESRI) auprès duquel le projet est référencé sous le numéro APAFIS #2017080816182218.

1. Modèle IGROV-1 Luc GFP

a) Xénogreffes des cellules tumorales

L'expansion des cellules IGROV-1 Luc GFP est réalisée en ensemencant 5000 cellules/cm² dans des flasques T175, 3 jours avant l'injection des animaux (les cellules doivent avoir été passées au moins 3 fois entre la décongélation et l'expansion). Le jour de l'injection, les cellules sont remises en suspension avec de l'Accutase® 20mL/T175 15 minutes à 37°C. La suspension cellulaire est récupérée et les cellules vivantes sont ensuite comptées avec une cellule de comptage Neubauer après une dilution 1/2 dans du bleu trypan. Enfin, les cellules sont centrifugées 500g, 5 minutes à température ambiante, puis le culot est repris dans 200µL de PBS (-Ca²⁺/-Mg²⁺) pour 2.10⁶ cellules.

b) Procédures de détection des nodules péritonéaux et imagerie non invasive de bioluminescence

Dans la procédure séquentielle, les souris nude sont injectées en i.p avec 2.10⁶ IGROV-1 Luc GFP dans du PBS -Ca²⁺/-Mg²⁺ (cellules en phase exponentielle de croissance, > 90% de viabilité) à jour 0 (J0). Trois semaines après, la protéine marquée dans le NIR est administrée en i.p (0,8 µM soit 50µg) un jour avant l'euthanasie des animaux. Pour la procédure de co-injection, les cellules IGROV-1 Luc/GFP (2.10⁶

cells dans du PBS -Ca²⁺/-Mg²⁺) sont injectées en i.p aux souris en même temps que la protéine marquée (0,8 µM) à J0.

Dans les deux procédures, une semaine après l'injection des cellules, une imagerie non invasive de bioluminescence est effectuée pour vérifier la xénogreffe chez les animaux. Dans ce modèle l'imagerie de bioluminescence est simplement qualitative. De la D-luciférine sodium salt (cat n°LN10000, OZ Biosciences, France) est injectée en i.p à 5 mL/kg pour une concentration finale de 150 mg/kg \pm 2 g (ou \pm 10 µL), donc pour 1 souris de 18-20 g l'injection de luciférine est de 100µL (stock 30 mg/mL, le substrat doit être à température ambiante avant injection, bien mélanger avant utilisation). Attendre 5 minutes avant de déclencher la série d'imagerie. La bioluminescence est évaluée sur un dispositif équipé d'une boîte noire (Photek, UK), un objectif Schneider VIS-NIR Cinegon 1.4/12-0515 et un tapis chauffant réglé à 37°C (Harvard Apparatus, USA). Les animaux sont anesthésiés par inhalation d'isoflurane (Vetflurane, Virbac, France) tout au long de l'expérimentation (3,5-4 en induction, 1,5-2 en maintien). Les souris sont imagées avec une caméra Ikon M et les données sont obtenues avec le logiciel d'acquisition Solis (ANDOR Technology). Six acquisitions de 5 minutes à un binning de 2 sont réalisées par série de 4 animaux (voir une illustration du dispositif Figure 69).



Figure 69: Dispositif pour l'imagerie non invasive de bioluminescence. (A) Caméra. (B1 et B2) Alimentation et lumière pour le positionnement des animaux à l'intérieur de la boîte noire. (C1 et C2) Alimentation et tapis chauffant. (D) Masques d'anesthésie gazeuse. (E) Boîte noire.

Le même jour pour les souris ayant eu la procédure de co-injection, une imagerie non invasive de fluorescence est effectuée pour détecter la protéine marquée avec un dispositif Fluobeam® 700

(Fluoptics, Grenoble, France), capable de faire de l'imagerie en temps réel dans le proche infrarouge. Les animaux sont anesthésiés par inhalation d'isoflurane tout au long de l'expérimentation (3,5-4 en induction, 2-3 en maintien). Dans les deux procédures, les animaux sont euthanasiés 3 semaines après la xénogreffe.

c) Procédure pour évaluer la propriété anti-adhésive de la protéine A38C

Pour déterminer à partir de quelle quantité la protéine A38C exerce un effet anti-adhésif sur les cellules IGROV-1, les animaux sont co-injectés avec 2.10^6 cellules IGROV-1 Luc GFP et différentes doses d'A38C (5, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250 et 500µg soit 0,08 ; 0,16 ; 0,4 ; 0,8 ; 1,6 ; 2,4 ; 3,2 ; 4 et 8µM) à J0.

Comme pour les procédures de détection, de l'imagerie non invasive de bioluminescence est effectuée toutes les semaines ou tous les 3 jours (voir protocole ci-dessus) sur ces animaux. L'analyse des images de bioluminescence pour obtenir des intensités de bioluminescence moyennes et des densités intégrées est faite avec le logiciel ImageJ. Pour cela, il faut placer les ROI « BG (background) » sur la tête de chaque animal et les ROI « RI (région d'intérêt) » sur le ventre de chaque animal en faisant attention de bien prendre tout l'abdomen. Les deux ROI ont la même aire (Figure 70).

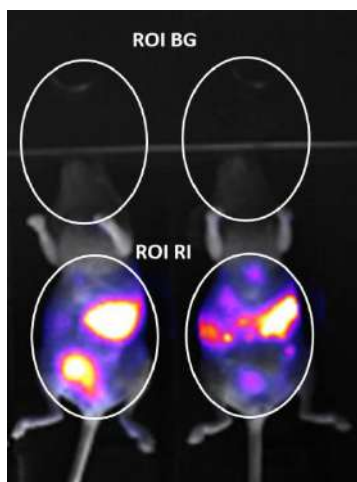


Figure 70 : *Analyse d'images : Représentation schématisée du placement des ROI « BG (background) » sur la tête de chaque animal et les ROI « RI (région d'intérêt) » sur le ventre de chaque animal pour faire l'analyse quantitative des images de bioluminescence.*

Pour chaque série d'imagerie, l'intensité de bioluminescence moyenne (Mean) et la densité intégrée (Integrated Density = surface de la ROI x moyenne des intensités de bioluminescence) sont mesurées pour les deux ROI de chaque animal et sur chacune des 6 images de la série. Les valeurs de la ROI BG seront soustraites à celles de la ROI RI. L'image présentant les valeurs les plus hautes en Mean et Integrated Density (correspondantes au pic d'émission de photons) parmi les 6 images pour chaque série d'animaux sera retenue et ces valeurs seront reportées sur les courbes de suivi croissance tumorale réalisées avec le logiciel GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) ou le logiciel GOSA [437]. Les intensités de bioluminescence moyennes et la densité intégrée seront exprimées en unité arbitraire (UA) et représentés en moyennes \pm SEM (standard error of the mean = écart type).

2. Modèle SKOV-3 Luc GFP

a) Xénogreffe et suivi de la croissance tumorale en bioluminescence

L'expansion des cellules SKOV-3 Luc GFP est réalisée en ensemençant 5000 cellules/cm² dans des flasques T175, 3 jours avant l'injection des animaux (les cellules doivent avoir été passées au moins 3 fois entre la décongélation et l'expansion). Le jour de l'injection, les cellules sont remises en suspension avec de la trypsine 2mL/T175 3 minutes à 37°C. La réaction est arrêtée par l'ajout de 20mL/T175 de milieu de culture 10% FCS. Les cellules vivantes sont comptées avec une cellule de comptage Neubauer après une dilution 1/2 dans du trypan bleu. Elles sont ensuite centrifugées 500g, 5 minutes à température ambiante, puis le culot est repris dans 200µL de PBS (-Ca²⁺/-Mg²⁺) pour 1.10⁶ cellules. Les souris nude sont injectées en i.p avec 1.10⁶ SKOV-3 Luc GFP (cellules en phase exponentielle de croissance, > 90% de viabilité) à jour 0 (J0).

Une semaine après l'injection des cellules, une première imagerie non invasive de bioluminescence est effectuée pour vérifier la xénogreffe des animaux et pour débiter le suivi de la croissance tumorale. Dans ce modèle, l'imagerie de bioluminescence est à la fois qualitative et quantitative. Elle est effectuée une fois par semaine et par animal tout au long de l'expérimentation (7 semaines). Le reste de la procédure pour l'imagerie (injection du substrat luciférine, paramètres d'acquisition et analyse des images) est décrite ci-dessus pour le modèle IGROV-1.

b) Traitement doxorubicine

A partir de la 4^{ème} semaine post-xénogreffe des cellules SKOV-3 (J28), un premier traitement i.p à 5mg/kg de doxorubicine est administré à un groupe d'animaux (n=10) et comparé au groupe d'animaux témoins (n=10). Pour cela, les souris sont pesées au préalable et les volumes nécessaires de solution stock de Doxorubicine (2,5mg/mL, stérile) sont calculés. Ils sont complétés avec de l'eau milliQ (qsp 100µL, meilleure répartition de la molécule dans la cavité péritonéale des animaux). Ces solutions diluées sont à utiliser dans l'heure (gardées à T°C ambiante). En parallèle, 100µL d'eau milliQ stérile (solvant doxorubicine) est administré en i.p au groupe d'animaux témoins. Deux semaines après ce premier traitement, si une reprise de la croissance est évaluée en suivi de bioluminescence, une 2^{ème} injection de doxorubicine à 2,5mg/kg est réalisée (J42) en suivant le même protocole que pour la 1^{ère} injection, voir ci-dessus. Les animaux sont ensuite euthanasiés à J49, et l'efficacité du traitement à la doxorubicine, en comparaison du groupe d'animaux témoins, est évaluée avec un index péritonéal en plus de l'évaluation faite en bioluminescence.

3. Essai avec les cellules A-549 Luc GFP

L'expansion des cellules A-549 Luc GFP est réalisée en ensemencant 4000 cellules/cm² dans des flasques T175, 4 jours avant l'injection des animaux. Le jour de l'injection, les cellules sont passées à la trypsine 2mL/T175 3 minutes à 37°C. La réaction est arrêtée par l'ajout de 20mL/T175 de milieu de culture 10% FCS. Les cellules vivantes sont comptées avec une cellule de comptage Neubauer après une dilution 1/2 dans du trypan bleu. Elles sont ensuite centrifugées 500g, 5 minutes à température ambiante, puis le culot est repris dans 200µL de PBS (-Ca²⁺/-Mg²⁺) pour 10.10⁶ cellules (cellules en phase exponentielle de croissance, > 90% de viabilité). La souris nude a été injectée en i.p à jour 0 (J0). Deux jours après l'injection des cellules, une imagerie non invasive de bioluminescence est effectuée pour vérifier la xénogreffe chez la souris (procédure décrite pour le modèle IGROV-1). Au bout d'une semaine (J8) l'animal est sacrifié et observé en macroscopie de fluorescence (voir-ci-dessous), puis des prélèvements de nodules sont effectués pour faire des cryocoupes histologiques et l'imagerie confocale associée.

Imagerie macroscopique de fluorescence sur les tissus tumoraux *ex vivo*

Après l'euthanasie des animaux, des autopsies sont effectuées sous contrôle de la fluorescence pour identifier les tissus tumoraux grâce à l'expression constitutive de la GFP par les cellules humaines implantées et pour évaluer la biodistribution d'A38C-alex647 administré aux animaux. La macroscopie est réalisée sur un microscope de fluorescence droit « Macrofluor » (Leica Microsystems SA, Rueil-Malmaison, France), équipé d'une caméra Cool Snap HQ2 (Roper Scientific, Photometrics, Tucson, AZ, USA) et d'un objectif PlanApo 0.5x, WD 187mm. Les images sont obtenues sur un logiciel d'acquisition (Metavue, Metamorph, Molecular devices, Sunnyvale, CA, USA). L'expression constitutive de la GFP est détectée avec le filtre L5 (excitation filter, BP: 480/40; emission filter, BP: 527/30). Pour le modèle IGROV-1, les tissus sont aussi imagés avec un filtre Cy5 (excitation filter, BP: 620/60, emission filter, BP: 700/75) pour observer le signal d'A38C-alex647.

Evaluation de l'index péritonéal

1. Détermination de la surface des nodules implantés

Les images de fluorescence (GFP) acquises pour chaque site de la carcinose dans le péritoine sont analysées avec le logiciel Fiji. Les images sont d'abord mises à l'échelle pour convertir les pixels en millimètres en fonction de la calibration de la caméra du microscope et de l'objectif (mm/pixel dépendant du grossissement utilisé au moment de l'acquisition, voir Tableau 6).

<i>Objectif + Zoom</i>	<i>Calibration (mm/pixel)</i>
0,5x0,57G	0.0349616
0,5x0,8G	0.0225216
0,5x1G	0.0174212
0,5x1,25G	0.0138888
0,5x1,6G	0.0107526
0,5x2G	0.00850296
0,5x2,5G	0.00677417
0,5x3,2G	0.00512652
0,5x4G	0.00408163
0,5x5G	0.00327693
0,5x6,3G	0.00263158
0,5x8G	0.00208333
0,5x9,2G	0.001788571

Tableau 6 : Calibration de la caméra du microscope de fluorescence. Elle permet de redimensionner les images du pixel en millimètre.

Ensuite, un seuil est appliqué aux images et la fonction « analyze particles » du logiciel est appliquée pour obtenir le nombre et la surface des nodules détectés en mm² (Paramètres : Size = 0-Infinity / Circularity = 0.00-1.00 / Show = Outlines / Display results). Les données sont analysées avec le logiciel Prism, et représentées en médiane et « range », soit la répartition de toutes les données autour de la médiane, pour chaque groupe d'organes.

2. Calcul de l'index péritonéal

Une fois les évaluations de surface et le comptage des nodules imagés terminés, des scores sont attribués et vont permettre de calculer l'index péritonéal. Celui appliqué en clinique dans les chirurgies de cytoréduction pour évaluer l'étendue des carcinoses (« Peritoneal index ») n'est pas adapté au modèle IGROV-1 Luc GFP qui a été développé pour obtenir une grande variabilité de taille de nodules et une majorité de nodules submillimétriques. Nous avons donc créé un nouveau calcul plus adapté à ce modèle nommé « Adapted peritoneal index ». Le Tableau 7 donne le mode de calcul avec les scores attribués aux surfaces des nodules et à leur nombre.

Surface des nodules	< 0,05mm ²	>0,05mm ² <0,3mm ²	>0,3mm ²		
score	1	5	10		
Nombre de nodules	1_5	6_10	11_20	20_30	>30
score	1	2	3	5	10

Calcul de scores	Peritoneal index = (Score de surface max) x (Score du nombre total de nodules)
	"Adapted peritoneal index" = (Score petits nodules x score nombre de petits nodules) + (Score nodules moyens x score nombre de nodules moyens) + (Score gros nodules x score nombre de gros nodules)

Tableau 7 : Attribution et calcul de scores pour obtenir l'index péritonéal permettant d'évaluer l'étendue d'une carcinose dans les modèles vivo.

Evaluation des ratios signal sur bruit de fond (SNR)

Pour évaluer les ratios signal sur bruit de fond sur les images de macroscopie de fluorescence, les intensités de fluorescence moyennes de 3 régions d'intérêt (ROI) par image ont été calculées. Une ROI est placée sur le signal alexa647 le plus intense de l'image (ROI 1), la seconde sur l'endroit le moins fluorescent du tissu (ROI 2) et la troisième sur une zone autour du tissu (ROI 3). Les intensités de fluorescence moyennes de chaque ROI sont calculées avec le logiciel ImageJ.

Le SNR est donc calculé selon l'équation suivante: $SNR = (ROI\ 1 - ROI\ 3) / (ROI\ 2 - ROI\ 3)$

Cette évaluation a été réalisée sur 3 souris pour chaque procédure et toutes les images ont été acquises au même grossissement.

Microscopie confocale et traitements des images de coupes histologiques

Une fois imagés, les tissus tumoraux sont incubés sur la nuit avec un tampon de fixation (tampon phosphate 50mM pH7.4, lysine 0.1M, sodium periodate 2mg/mL, PFA 1%). Pour s'assurer de l'absence d'eau au sein des tissus avant cryogénisation, chaque échantillon est incubé à 4°C pendant 3h dans trois bains consécutifs de sucre (en commençant par le bain à 10% puis 20 et 30% sucre dans 0.1M de tampon phosphate). Ensuite les tumeurs ou nodules sont inclus dans du milieu O.C.T (optimal

cutting temperature gel medium, Cell Path, UK) puis congelés rapidement avec de l'azote liquide avant d'être conservés à -80°C. Des cryosections de 20µm sont obtenues avec un dispositif Cryostat (Cryostat CM1950, Leica, Germany), puis montées sur lames. Après des bains de PBS (-Ca²⁺/-Mg²⁺) pour éliminer les restes d'O.C.T, un milieu de montage contenant du DAPI (NeoMount fluorescence mounting medium with DAPI, NB-23-00159-2, Clinisciences, USA) est appliqué sur les sections de tissus. Des lamelles sont scellées de manière permanente avec du vernis à ongle et les lames montées sont stockées à -20°C, protégées de la lumière, jusqu'à l'imagerie confocale.

Coloration Hématoxyline et Eosine (H&E) et imagerie

Les cryosections (épaisseur : 10µm) sont marquées à l'hématoxyline et à l'éosine selon un protocole standard [447]. Les images couleurs de ces marquages sont réalisées sur un microscope Zeiss Axioimager M2 (Carl Zeiss S.A.S., Jena, Germany) et avec un objectif 20x (NA 0.8). Le microscope est équipé d'une caméra couleur AxioCam 503 (14 bits) et avec une caméra ORCA-Flash4 LT digital sCMOS camera (Hamamatsu, 4.2 Megapx) pour faire en parallèle des images en lumière blanche et fluorescence avec les filtres appropriés pour l'alexa647 (excitation BP 640/30 et émission BP 690/50).

Microscopie multiphotonique

Le microscope multiphotonique est utilisé pour visualiser la capsule de collagène entourant les nodules péritonéaux sur les cryosections (épaisseur : 80µm) grâce à la génération d'un signal de seconde harmonique (SHG) par le collagène (molécule non centro-symétrique). Les acquisitions ont été effectuées sur un microscope multiphotonique droit 7MP (Carl Zeiss S.A.S., Jena, Germany), équipé d'un objectif 20x (NA 0.95) et couplé à un laser Ti-Sapphire femtoseconde, Chameleon Ultra 2 (Coherent Inc). Le laser est réglé à 800nm pour détecter le signal alexa647 (BP 640/710) et le signal SHG (BP 390/410), et à 920nm pour détecter le signal GFP (BP 500/550).

Immunohistofluorescence sur tissus tumoraux

Des cryosections de 20µm sont séchées à l'air ambiant pendant une heure, puis l'excès d'O.C.T est retiré avec un bain PBS (-Ca²⁺/-Mg²⁺) pendant 30 minutes. Les sections de tissus sont ensuite perméabilisées dans un bain de PBS 0.1% Triton-X-100 durant 10 minutes. Après des lavages de 10 minutes au PBS (x2) les sections sont entourées avec un stylo hydrophobe pour l'immunomarquage (PAP pen, Z6725481EA, Sigma, USA). Un blocage est effectué pendant 30 minutes avec du Maxblock (15252, Active motif, USA). Les sections de tissus ont ensuite été incubées, sur la nuit à 4°C et protégées de la lumière, avec un anticorps monoclonal anti-CD45 (30-F11 clone) efluor405 (48-0451-80, Thermo Fisher Scientific, USA) ou son isotype contrôle rat IgG2b Kappa (eB149/10H5) efluor405 (48-4031-82,

Thermo Fisher Scientific, USA) dilué au 1:200 dans du PBS 20% Maxblock. Après 2 lavages de 10 minutes au PBS ($-Ca^{2+}/-Mg^{2+}$), un milieu de montage contenant du DAPI (NeoMount fluorescence mounting medium with DAPI, NB-23-00159-2, Clinisciences, USA) est appliqué sur les sections de tissus. Des lamelles sont scellées de manière permanente avec du vernis à ongle et les lames montées sont stockées à $-20^{\circ}C$ protégées de la lumière jusqu'à l'imagerie confocale.

Imagerie confocale : acquisitions et traitement des images

Les images de fluorescence ont été acquises sur un microscope confocal Olympus FV-1000. Plusieurs objectifs ont été utilisés : UPLSAPO40X2 pour l'immunofluorescence sur cellules ; PLAPON OSC 60X oil pour les images de délivrance cellulaire et UPLSAPO10X2, UPLSAPO20X et UPLSAPO40X2 pour les coupes histologiques et immunohistofluorescences. Les lasers à diode (LD) ou à gaz utilisés dépendent du fluorophore à détecter : alexa405 avec LD 405nm ; GFP avec laser argon 488nm ; alexa647 avec LD635nm. Les images ont été analysées pour retirer le bruit de fond avec le logiciel Fiji (PureDenoise plugin). Le filtrage du bruit de fond est appliqué de la même manière à toutes les images d'un groupe expérimental.

Marquage de coupes histologiques d'exérèse de chirurgie avec A38C-alexa647

La coupe histologique de l'IUCT utilisée pour les mises au point du protocole de marquage par A38C-alexa647 provient d'une patiente atteinte d'une carcinose péritonéale ovarienne. Les coupes sériées réalisées après inclusion en paraffine de l'exérèse de chirurgie ont été montées sur des lames IHC microscope slides FLEX (K802021-2, Agilent, USA). Cinq protocoles de prétraitements ont été effectués avant d'incuber la nanosonde sur les lames à différentes concentrations. Dans un premier temps, la dilution 1/1000° d'A38C-alexa647 dans du EnVision FLEX Antibody diluent (K800621-2, Agilent, USA) a été testée avec les cinq protocoles de prétraitements réalisés sur un automate de marquage (Autostainer link 48, Dako) :

- 1) Protocole H : prétraitement « Hight » / incubation A38C-alexa647 60 minutes / montage DAPI
- 2) Protocole H_S : prétraitement « Hight » / démasquage d'épitopes avec du β -mercaptoéthanol et du SDS $56^{\circ}C$ 30 minutes / Lavages 45 minutes H_2O deutérée avec changement toutes les 15 minutes / incubation A38C-alexa647 60 minutes / montage DAPI
- 3) Protocole L_S : prétraitement « Low » / démasquage d'épitopes avec du β -mercaptoéthanol et du SDS $56^{\circ}C$ 30 minutes / Lavages 45 minutes H_2O deutérée avec changement toutes les 15 minutes / incubation A38C-alexa647 60 minutes / montage DAPI

- 4) Protocole D : déparaffinage xylène 2min, éthanol 100% 2 minutes, éthanol 95% 2 minutes, éthanol 70% 2 minutes, H₂O deutérée 2 minutes / incubation A38C-alexa647 60 minutes / montage DAPI
- 5) Protocole D_S : déparaffinage xylène 2min, éthanol 100% 2 minutes, éthanol 95% 2 minutes, éthanol 70% 2 minutes, H₂O deutérée 2 minutes / démasquage d'épitopes avec du β -mercaptoéthanol et du SDS 56°C 30 minutes / Lavages 45 minutes H₂O deutérée avec changement toutes les 15 minutes / incubation A38C-alexa647 60 minutes / montage DAPI

L'inclusion en paraffine, les coupes, les prétraitements et marquages A38C-alexa647 ont été réalisés par Diana Heaugwane (Ingénieur d'études SBEC, IUCT).

Une fois que les lames sont prêtes, les acquisitions en microscopie de fluorescence champs large ont été effectuées à l'IPBS sur un microscope Zeiss Axioimager M2 (Carl Zeiss S.A.S., Jena, Germany) avec un objectif 20x (NA 0.8) pour les zooms et 10x (NA 0.3) pour une acquisition en mosaïque de la coupe entière. Le microscope est équipé d'une camera ORCA-Flash4 LT digital sCMOS camera (Hamamatsu, 4.2 Megapx) pour faire des images en fluorescence avec les filtres appropriés. Pour l'alexa647 : excitation BP 640/30 et émission BP 690/50 ; pour l'autofluorescence des tissus : excitation BP 470/40 et émission BP 525/50 ; pour le DAPI : excitation BP 390/40 et émission BP 450/40.

Dissociation de nodules tumoraux et cytométrie en flux

Les nodules sont prélevés sur des souris ayant subi la procédure séquentielle (n=10), et sont dissociés mécaniquement avec le piston d'une seringue sur un filtre (Corning® cell strainer 70µm, CLS431751-50EA, Sigma, USA) pour casser les capsules de collagène. Ensuite, une dissociation enzymatique est effectuée dans du HBSS + Ca²⁺/Mg²⁺ (14025092, Thermo Fisher Scientific, USA) supplémenté avec 100µg/mL DNase I (11284932001, Sigma, USA) and 50µg/mL LiberaseTM TL (5401020001, Sigma, USA) pendant 30 minutes à 37°C sur un agitateur rotatif. Les suspensions de nodules obtenues sont passées sur filtre 70µm, centrifugées 500g, 5 minutes à température ambiante. Les érythrocytes sont lysés dans du ACK lysis buffer (A1049201, Thermo Fisher Scientific, USA) pendant 5 minutes avant de centrifuger à nouveau à 4°C (500g, 5 minutes). Les échantillons sont resuspendus dans du PBS 2% FCS 2mM EDTA et maintenu sur la glace jusqu'au marquage avec le panel d'anticorps. Toutes les analyses ont été réalisées sur les cellules vivantes qui étaient négatives au marquage Live/Dead (Molecular Probes® LIVE/DEAD Fixable Violet Dead Cell Stain Kit, Life technologiesTM, USA).

Les anticorps utilisés pour chaque panel immunitaire sont listés ci-après :

Panel Macrophages:

CD45-Viogreen (clone 30F11, Miltenyi, USA), F4/80-PE (clone REA126, Miltenyi, USA), CD206 BV605 (clone C068C2, Biolegend, USA), MHC class II-PerCP-Vio700 (clone M5/114.15.2, Miltenyi, USA) and CD279 (PD1)-PeCy7 (clone 29F.1A12, Biolegend, USA).

Panel MDSCs:

Gr1-PE (clone REA810, Miltenyi, USA), F4/80-PerCP-Vio700 (clone REA126, Miltenyi, USA), CD11b-BV605 (clone M1/70, Biolegend, USA).

Pour chaque canal, des témoins « fluorescence minus one » (FMOs) ont été utilisés pour gater les cellules positives (voir stratégie de gating Figure 71).

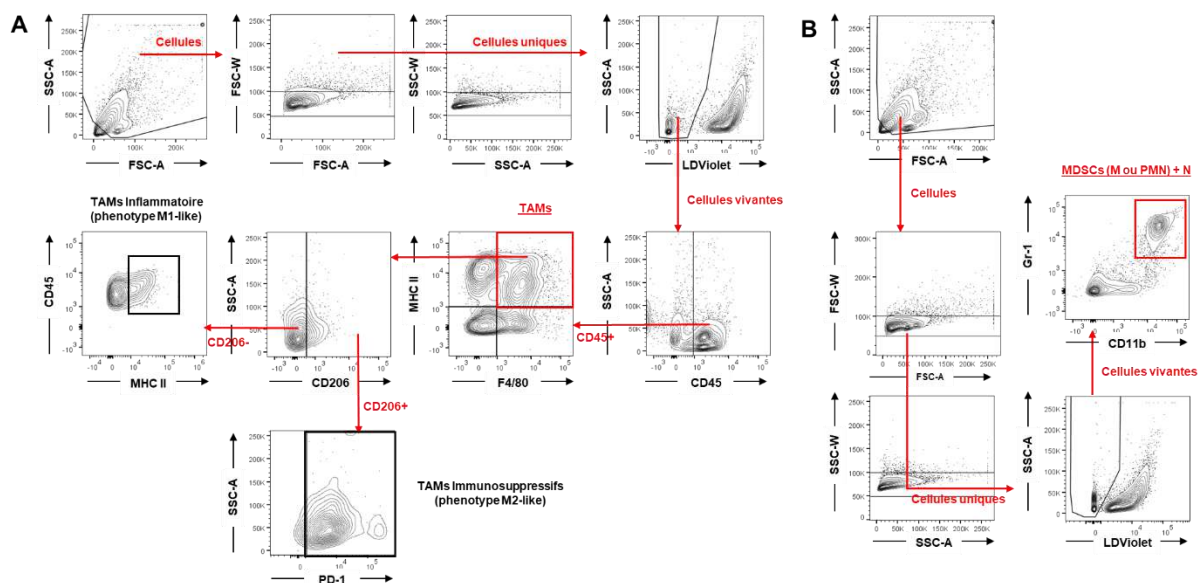


Figure 71 : Stratégies de « gating » FACS pour (A) Tumor-associated macrophages (TAMs) (B) Myeloid Derived Suppressor cells (MDSCs) et neutrophiles (N) monocytiques (M) ou polymorphonucleaires (PMN). Après avoir retiré les débris et les doublets cellulaires, les cellules vivantes sont isolées par non marquage LD (Live/dead) Violet. Les TAMs sont considérés comme CD45+ F4/80+ MHCII+ et les MDSCs et N comme CD11b+ Gr1+. Toutes les gates sont déterminées et positionnées en utilisant des contrôles fluorescence « minus one » (FMOs).

La population de macrophages est analysée avec la détection de l'expression membranaire de MHCII et F4/80, et les MDSCs avec la détection de Gr-1 et CD11b. Tous les marquages sont réalisés dans 100µL de PBS (-Ca²⁺/-Mg²⁺) 1% FCS. Une population d'au moins 30 000 cellules vivantes a été analysée pour chaque point. Toutes les analyses de FACS ont été effectuées sur un cytomètre BD Fortessa avec le logiciel Diva pour l'acquisition de données et le logiciel FlowJo pour l'analyse.

Analyses statistiques

Les analyses de données sont effectuées avec les programmes GOSA [429] et GraphPad Prism 6.0 et les données sont exprimées en mean ± SD ou SEM pour le nombre d'expérimentations renseigné dans les légendes des figures. La comparaison de deux jeux de données est réalisée avec un unpaired t-test, lorsque la répartition des données est gaussienne, et avec un test de Mann-Whitney (t-test non

paramétrique) lorsque la répartition des données n'est pas gaussienne (médiane différente de la moyenne) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ et **** $p < 0.0001$). Les comparaisons multiples sont effectuées avec des one-way analysis of variance (ANOVA) suivies d'un post-test Bonferroni pour comparer les jeux de données deux à deux (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ et **** $p < 0.0001$).

Bibliographie

1. S. W. Mitchell (1860) Venom of the Rattlesnake. *Smithson Contrib Knowl Misc Collect* **XII**: 89–90.
2. Gabius HJ, Siebert HC, Andre S, Jimenez-Barbero J, Rudiger H (2004) Chemical biology of the sugar code. *Chembiochem* **5**: 740–764.
3. Rudiger H, Siebert HC, Solis D, Jimenez-Barbero J, Romero A, von der Lieth CW, Diaz-Marino T, Gabius HJ (2000) Medicinal chemistry based on the sugar code: fundamentals of lectinology and experimental strategies with lectins as targets. *Curr Med Chem* **7**: 389–416.
4. Hermann Stillmark (1888) Über Ricin, ein giftiges Ferment aus den Samen von Ricinus comm. L. und einigen anderen Euphorbiaceen.
5. Landsteiner K, and Raubitschek H (1907) Beobachtungen über Hämolyse und Hämagglutination. *Zbl Bakt Abt Orig* **45**: 600–607.
6. James B. Sumner (1919) The Globulins of the Jack bean, *Canavalia ensiformis*. *J Biol Chem* **137**: 142.
7. Sumner JB, Howell SF (1936) Identification of Hemagglutinin of Jack Bean with Concanavalin A. *J Bacteriol* **32**: 227–237.
8. Boyd WC, Reguera RM (1949) Hemagglutinating substances for human cells in various plants. *J Immunol* **62**: 333–339.
9. Renkonen K. O (1948) Studies on hemagglutinins present in seeds of some representatives of the family of Leguminosae. *Ann Med Exp Fenn* **66**: 66–72.
10. Watkins WM, Morgan WT (1952) Neutralization of the anti-H agglutinin in eel serum by simple sugars. *Nature* **169**: 825–826.
11. Boyd WC, Shapleigh E (1954) Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins). *Science* **119**: 419.
12. Aub JC, Sanford BH, Cote MN (1965) Studies on reactivity of tumor and normal cells to a wheat germ agglutinin. *Proc Natl Acad Sci U A* **54**: 396–399.
13. Burger MM, Goldberg AR (1967) Identification of a tumor-specific determinant on neoplastic cell surfaces. *Proc Natl Acad Sci U A* **57**: 359–366.
14. Inbar M, Sachs L (1969) Structural difference in sites on the surface membrane of normal and transformed cells. *Nature* **223**: 710–712.
15. Lis H, Sela BA, Sachs L, Sharon N (1970) Specific inhibition by N-acetyl-D-galactosamine of the interaction between soybean agglutinin and animal cell surfaces. *Biochim Biophys Acta* **211**: 582–585.
16. Agrawal BB, Goldstein IJ (1965) Specific binding of concanavalin A to cross-linked dextran gels. *Biochem J* **96**: 23contd–5c.
17. Oliveira C, Teixeira JA, Domingues L (2013) Recombinant lectins: an array of tailor-made glycan-interaction biosynthetic tools. *Crit Rev Biotechnol* **33**: 66–80.
18. Sharon N, Lis H (2004) History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* **14**: 53R–62R.
19. Sharon N (2007) Lectins: carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. *J Biol Chem* **282**: 2753–2764.
20. Ambrosi M, Cameron NR, Davis BG (2005) Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode. *Org Biomol Chem* **3**: 1593–1608.
21. Wu AM, Lisowska E, Duk M, Yang Z (2009) Lectins as tools in glycoconjugate research. *Glycoconj J* **26**: 899–913.
22. Hassan MA, Rouf R, Tiralongo E, May TW, Tiralongo J (2015) Mushroom lectins: specificity, structure and bioactivity relevant to human disease. *Int J Mol Sci* **16**: 7802–7838.
23. Lam SK, Ng TB (2011) Lectins: production and practical applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **89**: 45–55.

24. Coelho LC, Silva PM, Lima VL, Pontual EV, Paiva PM, Napoleao TH, Correia MT (2017) Lectins, Interconnecting Proteins with Biotechnological/Pharmacological and Therapeutic Applications. *Evid Based Complement Altern Med* **2017**: 1594074.
25. Lehr CM (2000) Lectin-mediated drug delivery: the second generation of bioadhesives. *J Control Release* **65**: 19–29.
26. Song X, Airan RD, Arifin DR, Bar-Shir A, Kadayakkara DK, Liu G, Gilad AA, van Zijl PC, McMahon MT, Bulte JW (2015) Label-free in vivo molecular imaging of underglycosylated mucin-1 expression in tumour cells. *Nat Commun* **6**: 6719.
27. Bies C, Lehr CM, Woodley JF (2004) Lectin-mediated drug targeting: history and applications. *Adv Drug Deliv Rev* **56**: 425–435.
28. Kok Hoong Leonga;, Lip Yong Chunga;, Mohamed Ibrahim Noordina;, Yoshinori Onuki;, Mariko Morishita;, Kozo Takayama (2011) Lectin-functionalized carboxymethylated kappa-carrageenan microparticles for oral insulin delivery. *Carbohydr Polym* **86**: 555–565.
29. Ikemoto K, Shimizu K, Ohashi K, Takeuchi Y, Shimizu M, Oku N (2016) Bauhinia purpurea agglutinin-modified liposomes for human prostate cancer treatment. *Cancer Sci* **107**: 53–59.
30. Varki A, Kannagi R, Toole BP (2009) Glycosylation Changes in Cancer. In nd, Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME (eds.), *Essentials of Glycobiology*. , Cold Spring Harbor (NY).
31. Dan X, Ng TB, Wong JH, Chan YS, Cheung RC, Chan WY (2016) A hemagglutinin isolated from Northeast China black beans induced mitochondrial dysfunction and apoptosis in colorectal cancer cells. *Biochim Biophys Acta* **1863**: 2201–2211.
32. Araujo RMS, Vaz AFM, Aguiar JS, Coelho LCBB, Paiva PMG, Melo AMM, Silva TG, Correia MTS (2011) Lectin from *Crataeva tapia* bark exerts antitumor, antiinflammatory and analgesic activities. *Nat Prod Bioprospecting* **1**: 97–100.
33. Zwierzina H, Bergmann L, Fiebig H, Aamdal S, Schoffski P, Witthohn K, Lentzen H (2011) The preclinical and clinical activity of aviscumine: a potential anticancer drug. *Eur J Cancer* **47**: 1450–1457.
34. Schumacher U, Feldhaus S, Mengs U (2000) Recombinant mistletoe lectin (rML) is successful in treating human ovarian cancer cells transplanted into severe combined immunodeficient (SCID) mice. *Cancer Lett* **150**: 171–175.
35. Schaffrath B, Mengs U, Schwarz T, Hilgers RD, Beuth J, Mockel B, Lentzen H, Gerstmayer B (2001) Anticancer activity of rViscumin (recombinant mistletoe lectin) in tumor colonization models with immunocompetent mice. *Anticancer Res* **21**: 3981–3987.
36. Elsasser-Beile U, Ruhnau T, Freudenberg N, Wetterauer U, Mengs U (2001) Antitumoral effect of recombinant mistletoe lectin on chemically induced urinary bladder carcinogenesis in a rat model. *Cancer* **91**: 998–1004.
37. Schoffski P, Riggert S, Fumoleau P, Campone M, Bolte O, Marreaud S, Lacombe D, Baron B, Herold M, Zwierzina H, et al. (2004) Phase I trial of intravenous aviscumine (rViscumin) in patients with solid tumors: a study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer New Drug Development Group. *Ann Oncol* **15**: 1816–1824.
38. Bergmann L, Aamdal S, Marreaud S, Lacombe D, Herold M, Yamaguchi T, Wilhelm-Ogunbiyi K, Lentzen H, Zwierzina H (2008) Phase I trial of r viscumin (INN: aviscumine) given subcutaneously in patients with advanced cancer: a study of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC protocol number 13001). *Eur J Cancer* **44**: 1657–1662.
39. Trefzer U, Gutzmer R, Wilhelm T, Schenck F, Kahler KC, Jacobi V, Witthohn K, Lentzen H, Mohr P (2014) Treatment of unresectable stage IV metastatic melanoma with aviscumine after anti-neoplastic treatment failure: a phase II, multi-centre study. *J Immunother Cancer* **2**: 27.
40. Gamerith G, Amann A, Schenk B, Auer T, Lentzen H, Mugge DO, Cima KM, Loffler-Ragg J, Hilbe W, Zwierzina H (2017) Aviscumine, a recombinant ribosomal inhibitor, increases the antitumor activity of natural killer cells. *Oncol Lett* **14**: 5563–5568.

41. Wang HX, Liu WK, Ng TB, Ooi VE, Chang ST (1996) The immunomodulatory and antitumor activities of lectins from the mushroom *Tricholoma mongolicum*. *Immunopharmacology* **31**: 205–211.
42. Luís C. N. da Silva;, Clovis M. B. Filho;, Raiana A. de Paula;, Luana C. B.B. Coelho;, Márcia V. da Silva;, Maria T. dos Santos Correia (2014) *Cratylia mollis* Lectin: A Versatile Tool for Biomedical Studies. *Curr Bioact Compd* **10**: 44–54.
43. Roberto A. Sa;, Francis S. Gomes;, Thiago H. Napolea;, Nataly D. L. Santos;, Carla M. L. Melo;, Norma B. Gusma;, Luana C. B. B. Coelho;, Patricia M. G. Paiva;, Lothar W. Bieber (2009) Antibacterial and antifungal activities of *Myracrodruon urundeuva* heartwood. *Wood Sci Technol* **43**: 85–95.
44. Jayra D. Souza;, Maria B. R. Silva;, Adriana C. C. Argolo;, Thiago H. Napoleão;, Roberto A. Sa;, Maria T. S. Correia;, Patrícia M. G. Paiva;, Michele D. C. Silva;, Luana C. B.B. Coelho (2011) A new *Bauhinia monandra* galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities. *Int Biodeterior Biodegrad* **65**: 696–702.
45. Redondo MJ, Alvarez-Pellitero P (2010) The effect of lectins on the attachment and invasion of *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa) in turbot (*Psetta maxima* L.) intestinal epithelium in vitro. *Exp Parasitol* **126**: 577–581.
46. Sa RA, Santos ND, da Silva CS, Napoleao TH, Gomes FS, Cavada BS, Coelho LC, Navarro DM, Bieber LW, Paiva PM (2009) Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **149**: 300–306.
47. Sergei A. Svarovsky, Lokesh Joshi (2014) Cancer glycan biomarkers and their detection – past, present and future. *Anal Methods* **6**: 3918–3936.
48. Roth J (2011) Lectins for histochemical demonstration of glycans. *Histochem Cell Biol* **136**: 117–130.
49. Schnegelsberg B, Schumacher U, Valentiner U (2011) Lectin histochemistry of metastasizing and non-metastasizing breast and colon cancer cells. *Anticancer Res* **31**: 1589–1597.
50. Blonski K, Milde-Langosch K, Bamberger AM, Osterholz T, Utler C, Berger J, Loning T, Schumacher U (2007) *Ulex europeus* agglutinin-I binding as a potential prognostic marker in ovarian cancer. *Anticancer Res* **27**: 2785–2790.
51. Oliveira C, Teixeira JA, Schmitt F, Domingues L (2009) A comparative study of recombinant and native frutalin binding to human prostate tissues. *BMC Biotechnol* **9**: 78.
52. Andrade CG, Cabral Filho PE, Tenorio DP, Santos BS, Beltrao EI, Fontes A, Carvalho LB (2013) Evaluation of glycophenotype in breast cancer by quantum dot-lectin histochemistry. *Int J Nanomedicine* **8**: 4623–4629.
53. Bahadir EB, Sezginturk MK (2015) Applications of commercial biosensors in clinical, food, environmental, and biothreat/biowarfare analyses. *Anal Biochem* **478**: 107–120.
54. Liu X, Duckworth PA, Wong DK (2010) Square wave voltammetry versus electrochemical impedance spectroscopy as a rapid detection technique at electrochemical immunosensors. *Biosens Bioelectron* **25**: 1467–1473.
55. Maria D. L. Oliveira ;, Maria T. S. Correia ;, Flamarion B. Diniz (2009) A novel approach to classify serum glycoproteins from patients infected by dengue using electrochemical impedance spectroscopy analysis. *Synth Met* **159**: 2162–2164.
56. Bertok T, Gemeiner P, Mikula M, Tkac J (2013) Ultrasensitive impedimetric lectin based biosensor for glycoproteins containing sialic acid. *Mikrochim Acta* **180**: 151–159.
57. Silva ML, Gutierrez E, Rodriguez JA, Gomes C, David L (2014) Construction and validation of a *Sambucus nigra* biosensor for cancer-associated STn antigen. *Biosens Bioelectron* **57**: 254–261.
58. Zhang X, Teng Y, Fu Y, Xu L, Zhang S, He B, Wang C, Zhang W (2010) Lectin-based biosensor strategy for electrochemical assay of glycan expression on living cancer cells. *Anal Chem* **82**: 9455–9460.
59. Janzen DH, Juster HB, Liener IE (1976) Insecticidal action of the phytohemagglutinin in black beans on a bruchid beetle. *Science* **192**: 795–796.

60. Levi G, Teichberg VI (1981) Isolation and physicochemical characterization of electrolectin, a beta-D-galactoside binding lectin from the electric organ of *Electrophorus electricus*. *J Biol Chem* **256**: 5735–5740.
61. Wang M, Trigueros V, Paquereau L, Chavant L, Fournier D (2002) Proteins as active compounds involved in insecticidal activity of mushroom fruitbodies. *J Econ Entomol* **95**: 603–607.
62. Quélet Lucien (1888) Flore mycologique de la France et des pays limitrophes.
63. Josef Sutara (2008) Xerocomus s.l. in the light of the present state of knowledge. *Czech Mycol* **60**: 29–92.
64. Trigueros V, Lougarre A, Ali-Ahmed D, Rahbe Y, Guillot J, Chavant L, Fournier D, Paquereau L (2003) Xerocomus chrysenteron lectin: identification of a new pesticidal protein. *Biochim Biophys Acta* **1621**: 292–298.
65. Parks TD, Leuther KK, Howard ED, Johnston SA, Dougherty WG (1994) Release of proteins and peptides from fusion proteins using a recombinant plant virus proteinase. *Anal Biochem* **216**: 413–417.
66. Chatterjee BP, Ahmed H, Uhlenbruck G, Janssen E, Kolar C, Seiler FR (1985) Jackfruit (*Artocarpus integrifolia*) and the *Agaricus* mushroom lectin fit also to the so-called peanut receptor. *Behring Inst Mitt* 148–158.
67. Francis F, Marty-Detraves C, Poincloux R, Baricault L, Fournier D, Paquereau L (2003) Fungal lectin, XCL, is internalized via clathrin-dependent endocytosis and facilitates uptake of other molecules. *Eur J Cell Biol* **82**: 515–522.
68. Marty-Detraves C, Francis F, Baricault L, Fournier D, Paquereau L (2004) Inhibitory action of a new lectin from *Xerocomus chrysenteron* on cell-substrate adhesion. *Mol Cell Biochem* **258**: 49–55.
69. Yu LG, Fernig DG, White MR, Spiller DG, Appleton P, Evans RC, Grierson I, Smith JA, Davies H, Gerasimenko OV, et al. (1999) Edible mushroom (*Agaricus bisporus*) lectin, which reversibly inhibits epithelial cell proliferation, blocks nuclear localization sequence-dependent nuclear protein import. *J Biol Chem* **274**: 4890–4899.
70. Yu LG, Andrews N, Weldon M, Gerasimenko OV, Campbell BJ, Singh R, Grierson I, Petersen OH, Rhodes JM (2002) An N-terminal truncated form of Orp150 is a cytoplasmic ligand for the anti-proliferative mushroom *Agaricus bisporus* lectin and is required for nuclear localization sequence-dependent nuclear protein import. *J Biol Chem* **277**: 24538–24545.
71. Presant CA, Kornfeld S (1972) Characterization of the cell surface receptor for the *Agaricus bisporus* hemagglutinin. *J Biol Chem* **247**: 6937–6945.
72. Crenshaw RW, Harper SN, Moyer M, Privalle LS (1995) Isolation and characterization of a cDNA clone encoding a lectin gene from *Agaricus bisporus*. *Plant Physiol* **107**: 1465–1466.
73. Damian L, Fournier D, Winterhalter M, Paquereau L (2005) Determination of thermodynamic parameters of *Xerocomus chrysenteron* lectin interactions with N-acetylgalactosamine and Thomsen-Friedenreich antigen by isothermal titration calorimetry. *BMC Biochem* **6**: 11.
74. Birck C, Damian L, Marty-Detraves C, Lougarre A, Schulze-Briese C, Koehl P, Fournier D, Paquereau L, Samama JP (2004) A new lectin family with structure similarity to actinoporins revealed by the crystal structure of *Xerocomus chrysenteron* lectin XCL. *J Mol Biol* **344**: 1409–1420.
75. Xu Y, Sette A, Sidney J, Gendler SJ, Franco A (2005) Tumor-associated carbohydrate antigens: a possible avenue for cancer prevention. *Immunol Cell Biol* **83**: 440–448.
76. Springer GF, Desai PR, Banatwala I (1975) Blood group MN antigens and precursors in normal and malignant human breast glandular tissue. *J Natl Cancer Inst* **54**: 335–339.
77. Springer GF, Desai PR, Murthy MS, Tegtmeyer H, Scanlon EF (1979) Human carcinoma-associated precursor antigens of the blood group MN system and the host's immune responses to them. *Prog Allergy* **26**: 42–96.
78. Springer GF (1997) Immunoreactive T and Tn epitopes in cancer diagnosis, prognosis, and immunotherapy. *J Mol Med Berl* **75**: 594–602.

79. Yuan M, Itzkowitz SH, Boland CR, Kim YD, Tomita JT, Palekar A, Bennington JL, Trump BF, Kim YS (1986) Comparison of T-antigen expression in normal, premalignant, and malignant human colonic tissue using lectin and antibody immunohistochemistry. *Cancer Res* **46**: 4841–4847.
80. Cao Y, Stosiek P, Springer GF, Karsten U (1996) Thomsen-Friedenreich-related carbohydrate antigens in normal adult human tissues: a systematic and comparative study. *Histochem Cell Biol* **106**: 197–207.
81. Langkilde NC, Wolf H, Clausen H, Kjeldsen T, Orntoft TF (1992) Nuclear volume and expression of T-antigen, sialosyl-Tn-antigen, and Tn-antigen in carcinoma of the human bladder. Relation to tumor recurrence and progression. *Cancer* **69**: 219–227.
82. Itzkowitz SH, Yuan M, Montgomery CK, Kjeldsen T, Takahashi HK, Bigbee WL, Kim YS (1989) Expression of Tn, sialosyl-Tn, and T antigens in human colon cancer. *Cancer Res* **49**: 197–204.
83. MacLean GD, Bowen-Yacyshyn MB, Samuel J, Meikle A, Stuart G, Nation J, Poppema S, Jerry M, Koganty R, Wong T, et al. (1992) Active immunization of human ovarian cancer patients against a common carcinoma (Thomsen-Friedenreich) determinant using a synthetic carbohydrate antigen. *J Immunother* **1991** **11**: 292–305.
84. Wolf MF, Ludwig A, Fritz P, Schumacher K (1988) Increased expression of Thomsen-Friedenreich antigens during tumor progression in breast cancer patients. *Tumour Biol* **9**: 190–194.
85. Carraway KL, Ramsauer VP, Carraway CA (2005) Glycoprotein contributions to mammary gland and mammary tumor structure and function: roles of adherens junctions, ErbBs and membrane MUCs. *J Cell Biochem* **96**: 914–926.
86. Stein R, Chen S, Grossman W, Goldenberg DM (1989) Human lung carcinoma monoclonal antibody specific for the Thomsen-Friedenreich antigen. *Cancer Res* **49**: 32–37.
87. Kabir S, Daar AS (1994) The composition and properties of jacalin, a lectin of diverse applications obtained from the jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seeds. *Immunol Invest* **23**: 167–188.
88. Boland CR, Chen YF, Rinderle SJ, Resau JH, Luk GD, Lynch HT, Goldstein IJ (1991) Use of the lectin from *Amaranthus caudatus* as a histochemical probe of proliferating colonic epithelial cells. *Cancer Res* **51**: 657–665.
89. Campbell BJ, Finnie IA, Hounsell EF, Rhodes JM (1995) Direct demonstration of increased expression of Thomsen-Friedenreich (TF) antigen in colonic adenocarcinoma and ulcerative colitis mucin and its concealment in normal mucin. *J Clin Invest* **95**: 571–576.
90. Carrizo ME, Irazoqui FJ, Lardone RD, Nores GA, Curtino JA, Capaldi S, Perduca M, Monaco HL (2004) Crystallization and preliminary X-ray study of the common edible mushroom (*Agaricus bisporus*) lectin. *Acta Crystallogr Biol Crystallogr* **60**: 718–720.
91. Carrizo ME, Capaldi S, Perduca M, Irazoqui FJ, Nores GA, Monaco HL (2005) The antineoplastic lectin of the common edible mushroom (*Agaricus bisporus*) has two binding sites, each specific for a different configuration at a single epimeric hydroxyl. *J Biol Chem* **280**: 10614–10623.
92. Ladurantie C, Coustets M, Czaplicki G, Demange P, Mazeres S, Dauvillier S, Teissie J, Rols MP, Milon A, Ecochard V, et al. (2019) A protein nanocontainer targeting epithelial cancers: rational engineering, biochemical characterization, drug loading and cell delivery. *Nanoscale* **11**: 3248–3260.
93. Coccolini F, Gheza F, Lotti M, Virzi S, Iusco D, Ghermandi C, Melotti R, Baiocchi G, Giulini SM, Ansaloni L, et al. (2013) Peritoneal carcinomatosis. *World J Gastroenterol* **19**: 6979–6994.
94. Los G, Mutsaers PH, van der Vijgh WJ, Baldew GS, de Graaf PW, McVie JG (1989) Direct diffusion of cis-diamminedichloroplatinum(II) in intraperitoneal rat tumors after intraperitoneal chemotherapy: a comparison with systemic chemotherapy. *Cancer Res* **49**: 3380–3384.
95. Huo YR, Richards A, Liauw W, Morris DL (2015) Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) and cytoreductive surgery (CRS) in ovarian cancer: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Surg Oncol* **41**: 1578–1589.
96. Shen P, Thai K, Stewart JH, Howerton R, Loggie BW, Russell GB, Levine EA (2008) Peritoneal surface disease from colorectal cancer: comparison with the hepatic metastases surgical paradigm in optimally resected patients. *Ann Surg Oncol* **15**: 3422–3432.

97. Solass W, Kerb R, Mürdter T, Giger-Pabst U, Strumberg D, Tempfer C, Zieren J, Schwab M, Reymond MA (2014) Intraperitoneal chemotherapy of peritoneal carcinomatosis using pressurized aerosol as an alternative to liquid solution: first evidence for efficacy. *Ann Surg Oncol* **21**: 553–559.
98. Pannu HK, Oliphant M (2015) The subperitoneal space and peritoneal cavity: basic concepts. *Abdom Imaging* **40**: 2710–2722.
99. Pocard M, Debruyne P, Bras-Goncalves R, Mareel M, Dutrillaux B, Poupon MF (2001) Single alteration of p53 or E-cadherin genes can alter the surgical resection benefit in an experimental model of colon cancer. *Colon Rectum* **44**: 1106–1112.
100. Matsuura K, Kawanishi J, Fujii S, Imamura M, Hirano S, Takeichi M, Niitsu Y (1992) Altered expression of E-cadherin in gastric cancer tissues and carcinomatous fluid. *Br J Cancer* **66**: 1122–1130.
101. Elloul S, Elstrand MB, Nesland JM, Trope CG, Kvalheim G, Goldberg I, Reich R, Davidson B (2005) Snail, Slug, and Smad-interacting protein 1 as novel parameters of disease aggressiveness in metastatic ovarian and breast carcinoma. *Cancer* **103**: 1631–1643.
102. Murphy EM, Sexton R, Moran BJ (2007) Early results of surgery in 123 patients with pseudomyxoma peritonei from a perforated appendiceal neoplasm. *Colon Rectum* **50**: 37–42.
103. Ahmed N, Stenvers KL (2013) Getting to know ovarian cancer ascites: opportunities for targeted therapy-based translational research. *Front Oncol* **3**: 256.
104. Kusamura S, Baratti D, Zaffaroni N, Villa R, Laterza B, Balestra MR, Deraco M (2010) Pathophysiology and biology of peritoneal carcinomatosis. *World J Gastrointest Oncol* **2**: 12–18.
105. Jayne DG (2003) The molecular biology of peritoneal carcinomatosis from gastrointestinal cancer. *Ann Acad Med Singap* **32**: 219–225.
106. Davies DE, Farmer S, White J, Senior PV, Warnes SL, Alexander P (1994) Contribution of host-derived growth factors to in vivo growth of a transplantable murine mammary carcinoma. *Br J Cancer* **70**: 263–269.
107. Hall JC, Heel KA, Papadimitriou JM, Platell C (1998) The pathobiology of peritonitis. *Gastroenterology* **114**: 185–196.
108. Meza-Perez S, Randall TD (2017) Immunological Functions of the Omentum. *Trends Immunol* **38**: 526–536.
109. Shimotsuma M, Shields JW, Simpson-Morgan MW, Sakuyama A, Shirasu M, Hagiwara A, Takahashi T (1993) Morpho-physiological function and role of omental milky spots as omentum-associated lymphoid tissue (OALT) in the peritoneal cavity. *Lymphology* **26**: 90–101.
110. Chu CS, Menzin AW, Leonard DG, Rubin SC, Wheeler JE (1999) Primary peritoneal carcinoma: a review of the literature. *Obstet Gynecol Surv* **54**: 323–335.
111. Gilani S, Tashjian R, Fathallah L (2012) High-grade primary peritoneal serous papillary carcinoma with a wide differential diagnosis: a diagnostic challenge. *Pathologica* **104**: 442–445.
112. Spirtas R, Heineman EF, Bernstein L, Beebe GW, Keehn RJ, Stark A, Harlow BL, Benichou J (1994) Malignant mesothelioma: attributable risk of asbestos exposure. *Occup Env Med* **51**: 804–811.
113. Attanoos RL, Churg A, Galateau-Salle F, Gibbs AR, Roggli VL (2018) Malignant Mesothelioma and Its Non-Asbestos Causes. *Arch Pathol Lab Med* **142**: 753–760.
114. Cao S, Jin S, Cao J, Shen J, Hu J, Che D, Pan B, Zhang J, He X, Ding D, et al. (2015) Advances in malignant peritoneal mesothelioma. *Int J Colorectal Dis* **30**: 1–10.
115. Sharma H, Bell I, Schofield J, Bird G (2011) Primary peritoneal mesothelioma: case series and literature review. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* **35**: 55–59.
116. Nakamura K, Ueyama T, Yao T, Xuan ZX, Ambe K, Adachi Y, Yakeishi Y, Matsukuma A, Enjoji M (1992) Pathology and prognosis of gastric carcinoma. Findings in 10,000 patients who underwent primary gastrectomy. *Cancer* **70**: 1030–1037.
117. Yu CC, Levison DA, Dunn JA, Ward LC, Demonakou M, Allum WH, Hallisey MT (1995) Pathological prognostic factors in the second British Stomach Cancer Group trial of adjuvant therapy in resectable gastric cancer. *Br J Cancer* **71**: 1106–1110.

118. Ikeguchi M, Oka A, Tsujitani S, Maeta M, Kaibara N (1994) Relationship between area of serosal invasion and intraperitoneal free cancer cells in patients with gastric cancer. *Anticancer Res* **14**: 2131–2134.
119. Sadeghi B, Arvieux C, Glehen O, Beaujard AC, Rivoire M, Baulieux J, Fontaumard E, Brachet A, Caillot JL, Faure JL, et al. (2000) Peritoneal carcinomatosis from non-gynecologic malignancies: results of the EVOCAPE 1 multicentric prospective study. *Cancer* **88**: 358–363.
120. Jayne DG, Fook S, Loi C, Seow-Choen F (2002) Peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer. *Br J Surg* **89**: 1545–1550.
121. Chu DZ, Lang NP, Thompson C, Osteen PK, Westbrook KC (1989) Peritoneal carcinomatosis in nongynecologic malignancy. A prospective study of prognostic factors. *Cancer* **63**: 364–367.
122. Tziris N, Dokmetzioglou J, Giannoulis K, Kesisoglou I, Sapalidis K, Kotidis E, Gambros O (2008) Synchronous and metachronous adenocarcinomas of the large intestine. *Hippokratia* **12**: 150–152.
123. Cunliffe WJ, Hasleton PS, Tweedle DE, Schofield PF (1984) Incidence of synchronous and metachronous colorectal carcinoma. *Br J Surg* **71**: 941–943.
124. Jacquet P, Stephens AD, Averbach AM, Chang D, Ettinghausen SE, Dalton RR, Steves MA, Sugarbaker PH (1996) Analysis of morbidity and mortality in 60 patients with peritoneal carcinomatosis treated by cytoreductive surgery and heated intraoperative intraperitoneal chemotherapy. *Cancer* **77**: 2622–2629.
125. Sugarbaker PH, Jablonski KA (1995) Prognostic features of 51 colorectal and 130 appendiceal cancer patients with peritoneal carcinomatosis treated by cytoreductive surgery and intraperitoneal chemotherapy. *Ann Surg* **221**: 124–132.
126. Sugarbaker PH, Schellinx ME, Chang D, Koslowe P, von Meyerfeldt M (1996) Peritoneal carcinomatosis from adenocarcinoma of the colon. *World J Surg* **20**: 585–591; discussion 592.
127. Verwaal VJ, van Ruth S, de Bree E, van Sloothen GW, van Tinteren H, Boot H, Zoetmulder FA (2003) Randomized trial of cytoreduction and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy versus systemic chemotherapy and palliative surgery in patients with peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer. *J Clin Oncol* **21**: 3737–3743.
128. Quenet F, Elias D, Roca L, Goere D, Ghouti L, Pocard M, Facy O, Arvieux C, Lorimier G, Pezet D, et al. (2018) A UNICANCER phase III trial of hyperthermic intra-peritoneal chemotherapy (HIPEC) for colorectal peritoneal carcinomatosis (PC): PRODIGE 7. *J Clin Oncol* **36**: LBA3503–LBA3503.
129. Tani M, Kawai M, Terasawa H, Ina S, Hirano S, Shimamoto T, Miyazawa M, Uchiyama K, Yamaue H (2007) Prognostic factors for long-term survival in patients with locally invasive pancreatic cancer. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* **14**: 545–550.
130. Warshaw AL, Fernandez-del Castillo C (1992) Pancreatic carcinoma. *N Engl J Med* **326**: 455–465.
131. Sugarbaker PH (1996) Observations concerning cancer spread within the peritoneal cavity and concepts supporting an ordered pathophysiology. *Cancer Treat Res* **82**: 79–100.
132. Tentes AA, Stamou K, Pallas N, Karamveri C, Kyziridis D, Hristakis C (2016) The effect of hyperthermic intraoperative intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) as an adjuvant in patients with resectable pancreatic cancer. *Int J Hyperth* **32**: 895–899.
133. Tentes AA, Pallas N, Karamveri C, Kyziridis D, Hristakis C (2018) Cytoreduction and HIPEC for peritoneal carcinomatosis of pancreatic cancer. *J BUON* **23**: 482–487.
134. Siegel RL, Miller KD, Jemal A (2016) Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* **66**: 7–30.
135. Doherty JA, Peres LC, Wang C, Way GP, Greene CS, Schildkraut JM (2017) Challenges and Opportunities in Studying the Epidemiology of Ovarian Cancer Subtypes. *Curr Epidemiol Rep* **4**: 211–220.
136. Oza AM, Cook AD, Pfisterer J, Embleton A, Ledermann JA, Pujade-Lauraine E, Kristensen G, Carey MS, Beale P, Cervantes A, et al. (2015) Standard chemotherapy with or without bevacizumab for women with newly diagnosed ovarian cancer (ICON7): overall survival results of a phase 3 randomised trial. *Lancet Oncol* **16**: 928–936.

137. Moore K, Colombo N, Scambia G, Kim BG, Oaknin A, Friedlander M, Lisianskaya A, Floquet A, Leary A, Sonke GS, et al. (2018) Maintenance Olaparib in Patients with Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer. *N Engl J Med* **379**: 2495–2505.
138. Ray-Coquard I, Pautier P, Pignata S, Pérol D, González-Martín A, Berger R, Fujiwara K, Vergote I, Colombo N, Mäenpää J, et al. (2019) Olaparib plus Bevacizumab as First-Line Maintenance in Ovarian Cancer. *N Engl J Med* **381**: 2416–2428.
139. Baldwin LA, Huang B, Miller RW, Tucker T, Goodrich ST, Podzielinski I, DeSimone CP, Ueland FR, van Nagell JR, Seamon LG (2012) Ten-year relative survival for epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol* **120**: 612–618.
140. Reid BM, Permuth JB, Sellers TA (2017) Epidemiology of ovarian cancer: a review. *Cancer Biol Med* **14**: 9–32.
141. Lheureux S, Braunstein M, Oza AM (2019) Epithelial ovarian cancer: Evolution of management in the era of precision medicine. *CA Cancer J Clin* **69**: 280–304.
142. Lheureux S, Gourley C, Vergote I, Oza AM (2019) Epithelial ovarian cancer. *Lancet* **393**: 1240–1253.
143. Halabi NM, Martinez A, Al-Farsi H, Mery E, Puydenus L, Pujol P, Khalak HG, McLurcan C, Ferron G, Querleu D, et al. (2016) Correction: Preferential Allele Expression Analysis Identifies Shared Germline and Somatic Driver Genes in Advanced Ovarian Cancer. *PLoS Genet* **12**: e1005892.
144. Prat J (2015) FIGO's staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum: abridged republication. *J Gynecol Oncol* **26**: 87–89.
145. Katopodis P, Chudasama D, Wander G, Sales L, Kumar J, Pandhal M, Anikin V, Chatterjee J, Hall M, Karteris E (2019) Kinase Inhibitors and Ovarian Cancer. *Cancers* **11**.
146. Bewtra C, Watson P, Conway T, Read-Hippee C, Lynch HT (1992) Hereditary ovarian cancer: a clinicopathological study. *Int J Gynecol Pathol* **11**: 180–187.
147. Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT (1999) New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* **116**: 1453–1456.
148. Goff BA, Mandel LS, Melancon CH, Muntz HG (2004) Frequency of symptoms of ovarian cancer in women presenting to primary care clinics. *JAMA* **291**: 2705–2712.
149. Jacobs I, Bast RC (1989) The CA 125 tumour-associated antigen: a review of the literature. *Hum Reprod* **4**: 1–12.
150. Tuxen MK, Soletormos G, Dombernowsky P (1995) Tumor markers in the management of patients with ovarian cancer. *Cancer Treat Rev* **21**: 215–245.
151. You B, Colombari O, Heywood M, Lee C, Davy M, Reed N, Pignata S, Varsellona N, Emons G, Rehman K, et al. (2013) The strong prognostic value of KELIM, a model-based parameter from CA 125 kinetics in ovarian cancer: data from CALYPSO trial (a GINECO-GCIG study). *Gynecol Oncol* **130**: 289–294.
152. Menon U, Karpinskyj C, Gentry-Maharaj A (2018) Ovarian Cancer Prevention and Screening. *Obstet Gynecol* **131**: 909–927.
153. Rosenthal AN, Fraser LSM, Philpott S, Manchanda R, Burnell M, Badman P, Hadwin R, Rizzuto I, Benjamin E, Singh N, et al. (2017) Evidence of Stage Shift in Women Diagnosed With Ovarian Cancer During Phase II of the United Kingdom Familial Ovarian Cancer Screening Study. *J Clin Oncol* **35**: 1411–1420.
154. Skates SJ, Greene MH, Buys SS, Mai PL, Brown P, Piedmonte M, Rodriguez G, Schorge JO, Sherman M, Daly MB, et al. (2017) Early Detection of Ovarian Cancer using the Risk of Ovarian Cancer Algorithm with Frequent CA125 Testing in Women at Increased Familial Risk - Combined Results from Two Screening Trials. *Clin Cancer Res* **23**: 3628–3637.
155. Alsop K, Fereday S, Meldrum C, deFazio A, Emmanuel C, George J, Dobrovic A, Birrer MJ, Webb PM, Stewart C, et al. (2012) BRCA mutation frequency and patterns of treatment response in BRCA mutation-positive women with ovarian cancer: a report from the Australian Ovarian Cancer Study Group. *J Clin Oncol* **30**: 2654–2663.

156. Tsao SW, Mok CH, Knapp RC, Oike K, Muto MG, Welch WR, Goodman HM, Sheets EE, Berkowitz RS, Lau CC (1993) Molecular genetic evidence of a unifocal origin for human serous ovarian carcinomas. *Gynecol Oncol* **48**: 5–10.
157. Duggan BD, Dubeau L (1998) Genetics and biology of gynecologic cancer. *Curr Opin Oncol* **10**: 439–446.
158. Donninger H, Bonome T, Radonovich M, Pise-Masison CA, Brady J, Shih JH, Barrett JC, Birrer MJ (2004) Whole genome expression profiling of advance stage papillary serous ovarian cancer reveals activated pathways. *Oncogene* **23**: 8065–8077.
159. Bild AH, Yao G, Chang JT, Wang Q, Potti A, Chasse D, Joshi MB, Harpole D, Lancaster JM, Berchuck A, et al. (2006) Oncogenic pathway signatures in human cancers as a guide to targeted therapies. *Nature* **439**: 353–357.
160. Shridhar V, Lee J, Pandita A, Iturria S, Avula R, Staub J, Morrissey M, Calhoun E, Sen A, Kalli K, et al. (2001) Genetic analysis of early- versus late-stage ovarian tumors. *Cancer Res* **61**: 5895–5904.
161. Venkitaraman AR (2002) Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* **108**: 171–182.
162. Boulton SJ (2006) Cellular functions of the BRCA tumour-suppressor proteins. *Biochem Soc Trans* **34**: 633–645.
163. Jazaeri AA, Yee CJ, Sotiriou C, Brantley KR, Boyd J, Liu ET (2002) Gene expression profiles of BRCA1-linked, BRCA2-linked, and sporadic ovarian cancers. *J Natl Cancer Inst* **94**: 990–1000.
164. Shih Ie M, Kurman RJ (2004) Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol* **164**: 1511–1518.
165. Singer G, Oldt R, Cohen Y, Wang BG, Sidransky D, Kurman RJ, Shih Ie M (2003) Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **95**: 484–486.
166. Kohler MF, Marks JR, Wiseman RW, Jacobs IJ, Davidoff AM, Clarke-Pearson DL, Soper JT, Bast RC, Berchuck A (1993) Spectrum of mutation and frequency of allelic deletion of the p53 gene in ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* **85**: 1513–1519.
167. Kupryjanczyk J, Thor AD, Beauchamp R, Merritt V, Edgerton SM, Bell DA, Yandell DW (1993) p53 gene mutations and protein accumulation in human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 4961–4965.
168. Bonome T, Lee JY, Park DC, Radonovich M, Pise-Masison C, Brady J, Gardner GJ, Hao K, Wong WH, Barrett JC, et al. (2005) Expression profiling of serous low malignant potential, low-grade, and high-grade tumors of the ovary. *Cancer Res* **65**: 10602–10612.
169. Landen CN, Birrer MJ, Sood AK (2008) Early events in the pathogenesis of epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol* **26**: 995–1005.
170. Han LY, Landen CN, Trevino JG, Halder J, Lin YG, Kamat AA, Kim TJ, Merritt WM, Coleman RL, Gershenson DM, et al. (2006) Antiangiogenic and antitumor effects of SRC inhibition in ovarian carcinoma. *Cancer Res* **66**: 8633–8639.
171. Wiener JR, Windham TC, Estrella VC, Parikh NU, Thall PF, Deavers MT, Bast RC, Mills GB, Gallick GE (2003) Activated SRC protein tyrosine kinase is overexpressed in late-stage human ovarian cancers. *Gynecol Oncol* **88**: 73–79.
172. Pengetnze Y, Steed M, Roby KF, Terranova PF, Taylor CC (2003) Src tyrosine kinase promotes survival and resistance to chemotherapeutics in a mouse ovarian cancer cell line. *Biochem Biophys Res Commun* **309**: 377–383.
173. Bartlett JM, Langdon SP, Simpson BJ, Stewart M, Katsaros D, Sismondi P, Love S, Scott WN, Williams AR, Lessells AM, et al. (1996) The prognostic value of epidermal growth factor receptor mRNA expression in primary ovarian cancer. *Br J Cancer* **73**: 301–306.
174. Wang E, Ngaleme Y, Panelli MC, Nguyen-Jackson H, Deavers M, Mueller P, Hu W, Savary CA, Kobayashi R, Freedman RS, et al. (2005) Peritoneal and subperitoneal stroma may facilitate regional spread of ovarian cancer. *Clin Cancer Res* **11**: 113–122.
175. Xu L, Fidler IJ (2000) Interleukin 8: an autocrine growth factor for human ovarian cancer. *Oncol Res* **12**: 97–106.

176. Lokshin AE, Winans M, Landsittel D, Marrangoni AM, Velikokhatnaya L, Modugno F, Nolen BM, Gorelik E (2006) Circulating IL-8 and anti-IL-8 autoantibody in patients with ovarian cancer. *Gynecol Oncol* **102**: 244–251.
177. Bukovsky A (2006) Immune system involvement in the regulation of ovarian function and augmentation of cancer. *Microsc Res Tech* **69**: 482–500.
178. Nash MA, Ferrandina G, Gordinier M, Loercher A, Freedman RS (1999) The role of cytokines in both the normal and malignant ovary. *Endocr Relat Cancer* **6**: 93–107.
179. Belotti D, Paganoni P, Manenti L, Garofalo A, Marchini S, Taraboletti G, Giavazzi R (2003) Matrix metalloproteinases (MMP9 and MMP2) induce the release of vascular endothelial growth factor (VEGF) by ovarian carcinoma cells: implications for ascites formation. *Cancer Res* **63**: 5224–5229.
180. Naylor MS, Stamp GW, Davies BD, Balkwill FR (1994) Expression and activity of MMPS and their regulators in ovarian cancer. *Int J Cancer* **58**: 50–56.
181. Kamat AA, Fletcher M, Gruman LM, Mueller P, Lopez A, Landen CN, Han L, Gershenson DM, Sood AK (2006) The clinical relevance of stromal matrix metalloproteinase expression in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* **12**: 1707–1714.
182. Emerich J, Konefka T, Dudziak M, Sobol A (1997) [The value of peritoneal cytology in the staging of ovarian cancer]. *Ginekol Pol* **68**: 74–77.
183. Sundfeldt K, Piontkewitz Y, Ivarsson K, Nilsson O, Hellberg P, Brannstrom M, Janson PO, Enerback S, Hedin L (1997) E-cadherin expression in human epithelial ovarian cancer and normal ovary. *Int J Cancer* **74**: 275–280.
184. Griffiths CT, Fuller AF (1978) Intensive surgical and chemotherapeutic management of advanced ovarian cancer. *Surg Clin North Am* **58**: 131–142.
185. du Bois A, Reuss A, Pujade-Lauraine E, Harter P, Ray-Coquard I, Pfisterer J (2009) Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: a combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials: by the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Studiengruppe Ovarialkarzinom (AGO-OVAR) and the Groupe d'Investigateurs Nationaux Pour les Etudes des Cancers de l'Ovaire (GINECO). *Cancer* **115**: 1234–1244.
186. Wright AA, Bohlke K, Armstrong DK, Bookman MA, Cliby WA, Coleman RL, Dizon DS, Kash JJ, Meyer LA, Moore KN, et al. (2016) Neoadjuvant Chemotherapy for Newly Diagnosed, Advanced Ovarian Cancer: Society of Gynecologic Oncology and American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *J Clin Oncol* **34**: 3460–3473.
187. Vergote I, Trope CG, Amant F, Kristensen GB, Ehlen T, Johnson N, Verheijen RH, van der Burg ME, Lacave AJ, Panici PB, et al. (2010) Neoadjuvant chemotherapy or primary surgery in stage IIIC or IV ovarian cancer. *N Engl J Med* **363**: 943–953.
188. Karam A, Ledermann JA, Kim JW, Sehouli J, Lu K, Gourley C, Katsumata N, Burger RA, Nam BH, Bacon M, et al. (2017) Fifth Ovarian Cancer Consensus Conference of the Gynecologic Cancer InterGroup: first-line interventions. *Ann Oncol* **28**: 711–717.
189. Bookman MA, McGuire WP, Kilpatrick D, Keenan E, Hogan WM, Johnson SW, O'Dwyer P, Rowinsky E, Gallion HH, Ozols RF (1996) Carboplatin and paclitaxel in ovarian carcinoma: a phase I study of the Gynecologic Oncology Group. *J Clin Oncol* **14**: 1895–1902.
190. Burger RA, Brady MF, Bookman MA, Fleming GF, Monk BJ, Huang H, Mannel RS, Homesley HD, Fowler J, Greer BE, et al. (2011) Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. *N Engl J Med* **365**: 2473–2483.
191. Perren TJ, Swart AM, Pfisterer J, Ledermann JA, Pujade-Lauraine E, Kristensen G, Carey MS, Beale P, Cervantes A, Kurzeder C, et al. (2011) A phase 3 trial of bevacizumab in ovarian cancer. *N Engl J Med* **365**: 2484–2496.
192. Markman M, Bundy BN, Alberts DS, Fowler JM, Clark-Pearson DL, Carson LF, Wadler S, Sickel J (2001) Phase III trial of standard-dose intravenous cisplatin plus paclitaxel versus moderately high-dose carboplatin followed by intravenous paclitaxel and intraperitoneal cisplatin in small-volume stage III ovarian carcinoma: an intergroup study of the Gynecologic Oncology Group,

- Southwestern Oncology Group, and Eastern Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol* **19**: 1001–1007.
193. Tewari D, Java JJ, Salani R, Armstrong DK, Markman M, Herzog T, Monk BJ, Chan JK (2015) Long-term survival advantage and prognostic factors associated with intraperitoneal chemotherapy treatment in advanced ovarian cancer: a gynecologic oncology group study. *J Clin Oncol* **33**: 1460–1466.
 194. Walker JL, Brady MF, Wenzel L, Fleming GF, Huang HQ, DiSilvestro PA, Fujiwara K, Alberts DS, Zheng W, Tewari KS, et al. (2019) Randomized Trial of Intravenous Versus Intraperitoneal Chemotherapy Plus Bevacizumab in Advanced Ovarian Carcinoma: An NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* **37**: 1380–1390.
 195. Gore M, du Bois A, Vergote I (2006) Intraperitoneal chemotherapy in ovarian cancer remains experimental. *J Clin Oncol* **24**: 4528–4530.
 196. van Driel WJ, Koole SN, Sikorska K, Schagen van Leeuwen JH, Schreuder HWR, Hermans RHM, de Hingh IHJT, van der Velden J, Arts HJ, Massuger LFAG, et al. (2018) Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy in Ovarian Cancer. *N Engl J Med* **378**: 230–240.
 197. Myong Cheol Lim S-JC (2017) Randomized trial of hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) in women with primary advanced peritoneal, ovarian, and tubal cancer. *J Clin Oncol* **35**: 5520.
 198. Gelmon KA, Tischkowitz M, Mackay H, Swenerton K, Robidoux A, Tonkin K, Hirte H, Huntsman D, Clemons M, Gilks B, et al. (2011) Olaparib in patients with recurrent high-grade serous or poorly differentiated ovarian carcinoma or triple-negative breast cancer: a phase 2, multicentre, open-label, non-randomised study. *Lancet Oncol* **12**: 852–861.
 199. Kaufman B, Shapira-Frommer R, Schmutzler RK, Audeh MW, Friedlander M, Balmana J, Mitchell G, Fried G, Stemmer SM, Hubert A, et al. (2015) Olaparib monotherapy in patients with advanced cancer and a germline BRCA1/2 mutation. *J Clin Oncol* **33**: 244–250.
 200. Swisher EM, Lin KK, Oza AM, Scott CL, Giordano H, Sun J, Konecny GE, Coleman RL, Tinker AV, O'Malley DM, et al. (2017) Rucaparib in relapsed, platinum-sensitive high-grade ovarian carcinoma (ARIEL2 Part 1): an international, multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* **18**: 75–87.
 201. Oza AM, Tinker AV, Oaknin A, Shapira-Frommer R, McNeish IA, Swisher EM, Ray-Coquard I, Bell-McGuinn K, Coleman RL, O'Malley DM, et al. (2017) Antitumor activity and safety of the PARP inhibitor rucaparib in patients with high-grade ovarian carcinoma and a germline or somatic BRCA1 or BRCA2 mutation: Integrated analysis of data from Study 10 and ARIEL2. *Gynecol Oncol* **147**: 267–275.
 202. Rustin GJ, van der Burg ME, Griffin CL, Guthrie D, Lamont A, Jayson GC, Kristensen G, Mediola C, Coens C, Qian W, et al. (2010) Early versus delayed treatment of relapsed ovarian cancer (MRC OV05/EORTC 55955): a randomised trial. *Lancet* **376**: 1155–1163.
 203. Wilson MK, Pujade-Lauraine E, Aoki D, Mirza MR, Lorusso D, Oza AM, du Bois A, Vergote I, Reuss A, Bacon M, et al. (2017) Fifth Ovarian Cancer Consensus Conference of the Gynecologic Cancer InterGroup: recurrent disease. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* **28**: 727–732.
 204. Bristow RE, Puri I, Chi DS (2009) Cytoreductive surgery for recurrent ovarian cancer: a meta-analysis. *Gynecol Oncol* **112**: 265–274.
 205. Harter P, Sehouli J, Reuss A, Hasenburger A, Scambia G, Cibula D, Mahner S, Vergote I, Reinthaller A, Burges A, et al. (2011) Prospective validation study of a predictive score for operability of recurrent ovarian cancer: the Multicenter Intergroup Study DESKTOP II. A project of the AGO Kommission OVAR, AGO Study Group, NOGGO, AGO-Austria, and MITO. *Int J Gynecol Cancer* **21**: 289–295.
 206. Du Bois A, Vergote I, Ferron G, Reuss A, Meier W, Gregg S, Jensen PT, Selle F, Guyon F, Pomel C, et al. (2017) Randomized controlled phase III study evaluating the impact of secondary cytoreductive surgery in recurrent ovarian cancer: AGO DESKTOP III/ENGOT ov20. *J Clin Oncol* **35**: 5501–5501.

207. Parmar MK, Ledermann JA, Colombo N, du Bois A, Delaloye JF, Kristensen GB, Wheeler S, Swart AM, Qian W, Torri V, et al. (2003) Paclitaxel plus platinum-based chemotherapy versus conventional platinum-based chemotherapy in women with relapsed ovarian cancer: the ICON4/AGO-OVAR-2.2 trial. *Lancet* **361**: 2099–2106.
208. Pfisterer J, Plante M, Vergote I, du Bois A, Hirte H, Lacave AJ, Wagner U, Stahle A, Stuart G, Kimmig R, et al. (2006) Gemcitabine plus carboplatin compared with carboplatin in patients with platinum-sensitive recurrent ovarian cancer: an intergroup trial of the AGO-OVAR, the NCIC CTG, and the EORTC GCG. *J Clin Oncol* **24**: 4699–4707.
209. Aghajanian C, Blank SV, Goff BA, Judson PL, Teneriello MG, Husain A, Sovak MA, Yi J, Nycum LR (2012) OCEANS: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab in patients with platinum-sensitive recurrent epithelial ovarian, primary peritoneal, or fallopian tube cancer. *J Clin Oncol* **30**: 2039–2045.
210. Coleman RL, Brady MF, Herzog TJ, Sabbatini P, Armstrong DK, Walker JL, Kim BG, Fujiwara K, Tewari KS, O'Malley DM, et al. (2017) Bevacizumab and paclitaxel-carboplatin chemotherapy and secondary cytoreduction in recurrent, platinum-sensitive ovarian cancer (NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group study GOG-0213): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* **18**: 779–791.
211. Ledermann J, Harter P, Gourley C, Friedlander M, Vergote I, Rustin G, Scott C, Meier W, Shapira-Frommer R, Safra T, et al. (2012) Olaparib maintenance therapy in platinum-sensitive relapsed ovarian cancer. *N Engl J Med* **366**: 1382–1392.
212. Mirza MR, Monk BJ, Herrstedt J, Oza AM, Mahner S, Redondo A, Fabbro M, Ledermann JA, Lorusso D, Vergote I, et al. (2016) Niraparib Maintenance Therapy in Platinum-Sensitive, Recurrent Ovarian Cancer. *N Engl J Med* **375**: 2154–2164.
213. Coleman RL, Oza AM, Lorusso D, Aghajanian C, Oaknin A, Dean A, Colombo N, Weberpals JL, Clamp A, Scambia G, et al. (2017) Rucaparib maintenance treatment for recurrent ovarian carcinoma after response to platinum therapy (ARIEL3): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* **390**: 1949–1961.
214. Pujade-Lauraine E, Ledermann JA, Selle F, Gebski V, Penson RT, Oza AM, Korach J, Huzarski T, Poveda A, Pignata S, et al. (2017) Olaparib tablets as maintenance therapy in patients with platinum-sensitive, relapsed ovarian cancer and a BRCA1/2 mutation (SOLO2/ENGOT-Ov21): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* **18**: 1274–1284.
215. Marchetti C, Ledermann JA, Benedetti Panici P (2015) An overview of early investigational therapies for chemoresistant ovarian cancer. *Expert Opin Investig Drugs* **24**: 1163–1183.
216. Pujade-Lauraine E, Hilpert F, Weber B, Reuss A, Poveda A, Kristensen G, Sorio R, Vergote I, Witteveen P, Bamias A, et al. (2014) Bevacizumab combined with chemotherapy for platinum-resistant recurrent ovarian cancer: The AURELIA open-label randomized phase III trial. *J Clin Oncol* **32**: 1302–1308.
217. Thibodeaux SR, Curiel TJ (2011) Immune therapy for ovarian cancer: promise and pitfalls. *Int Rev Immunol* **30**: 102–119.
218. Owens GL, Sheard VE, Kalaitzidou M, Blount D, Lad Y, Cheadle EJ, Edmondson RJ, Kooner G, Gilham DE, Harrop R (2018) Preclinical Assessment of CAR T-Cell Therapy Targeting the Tumor Antigen 5T4 in Ovarian Cancer. *J Immunother* **41**: 130–140.
219. Moek KL, de Groot DJA, de Vries EGE, Fehrmann RSN (2017) The antibody-drug conjugate target landscape across a broad range of tumour types. *Ann Oncol* **28**: 3083–3091.
220. Moore KN, Vergote I, Oaknin A, Colombo N, Banerjee S, Oza A, Pautier P, Malek K, Birrer MJ (2018) FORWARD I: a Phase III study of mirvetuximab soravtansine versus chemotherapy in platinum-resistant ovarian cancer. *Future Oncol* **14**: 1669–1678.
221. Colombo I, Overchuk M, Chen J, Reilly RM, Zheng G, Lheureux S (2017) Molecular imaging in drug development: Update and challenges for radiolabeled antibodies and nanotechnology. *Methods* **130**: 23–35.

222. Le Saux O, Dubois B, Stern M-H, Terme M, Tartour E, Classe J-M, Chopin N, Trédan O, Caux C, Ray-Coquard I (2020) [Current advances in immunotherapy in ovarian cancer]. *Bull Cancer (Paris)*.
223. Hui L, Chen Y (2015) Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil. *Cancer Lett* **368**: 7–13.
224. Thibault B, Castells M, Delord JP, Couderc B (2014) Ovarian cancer microenvironment: implications for cancer dissemination and chemoresistance acquisition. *Cancer Metastasis Rev* **33**: 17–39.
225. Roskelley CD, Bissell MJ (2002) The dominance of the microenvironment in breast and ovarian cancer. *Semin Cancer Biol* **12**: 97–104.
226. Cairns R, Papandreou I, Denko N (2006) Overcoming physiologic barriers to cancer treatment by molecularly targeting the tumor microenvironment. *Mol Cancer Res* **4**: 61–70.
227. Gordon S (2003) Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* **3**: 23–35.
228. Murdoch C, Muthana M, Coffelt SB, Lewis CE (2008) The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* **8**: 618–631.
229. Lewis CE, Pollard JW (2006) Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res* **66**: 605–612.
230. Bingle L, Brown NJ, Lewis CE (2002) The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol* **196**: 254–265.
231. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* **25**: 677–686.
232. Biswas SK, Sica A, Lewis CE (2008) Plasticity of macrophage function during tumor progression: regulation by distinct molecular mechanisms. *J Immunol* **180**: 2011–2017.
233. Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A (2006) Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol* **177**: 7303–7311.
234. Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, Galon J (2012) The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* **12**: 298–306.
235. von Boehmer H, Daniel C (2013) Therapeutic opportunities for manipulating T(Reg) cells in autoimmunity and cancer. *Nat Rev Drug Discov* **12**: 51–63.
236. Frey DM, Droezer RA, Viehl CT, Zlobec I, Lugli A, Zingg U, Oertli D, Kettelhack C, Terracciano L, Tornillo L (2010) High frequency of tumor-infiltrating FOXP3(+) regulatory T cells predicts improved survival in mismatch repair-proficient colorectal cancer patients. *Int J Cancer* **126**: 2635–2643.
237. Coffelt SB, Lewis CE, Naldini L, Brown JM, Ferrara N, De Palma M (2010) Elusive identities and overlapping phenotypes of proangiogenic myeloid cells in tumors. *Am J Pathol* **176**: 1564–1576.
238. Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V (2012) Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol* **12**: 253–268.
239. Bronte V, Brandau S, Chen SH, Colombo MP, Frey AB, Greten TF, Mandruzzato S, Murray PJ, Ochoa A, Ostrand-Rosenberg S, et al. (2016) Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat Commun* **7**: 12150.
240. Nwani NG, Sima LE, Nieves-Neira W, Matei D (2018) Targeting the Microenvironment in High Grade Serous Ovarian Cancer. *Cancers Basel* **10**.
241. McAnulty RJ (2007) Fibroblasts and myofibroblasts: their source, function and role in disease. *Int J Biochem Cell Biol* **39**: 666–671.
242. Givel AM, Kieffer Y, Scholer-Dahirel A, Sirven P, Cardon M, Pelon F, Magagna I, Gentric G, Costa A, Bonneau C, et al. (2018) miR200-regulated CXCL12beta promotes fibroblast heterogeneity and immunosuppression in ovarian cancers. *Nat Commun* **9**: 1056.
243. Su Y, Zheng L, Wang Q, Li W, Cai Z, Xiong S, Bao J (2010) Quantity and clinical relevance of circulating endothelial progenitor cells in human ovarian cancer. *J Exp Clin Cancer Res* **29**: 27.
244. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* **9**: 669–676.

245. Kassim SK, El-Salahy EM, Fayed ST, Helal SA, Helal T, Azzam Eel D, Khalifa A (2004) Vascular endothelial growth factor and interleukin-8 are associated with poor prognosis in epithelial ovarian cancer patients. *Clin Biochem* **37**: 363–369.
246. Nieman KM, Kenny HA, Penicka CV, Ladanyi A, Buell-Gutbrod R, Zillhardt MR, Romero IL, Carey MS, Mills GB, Hotamisligil GS, et al. (2011) Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nat Med* **17**: 1498–1503.
247. Cannistra SA (2004) Cancer of the ovary. *N Engl J Med* **351**: 2519–2529.
248. Lessan K, Aguiar DJ, Oegema T, Siebenson L, Skubitz AP (1999) CD44 and beta1 integrin mediate ovarian carcinoma cell adhesion to peritoneal mesothelial cells. *Am J Pathol* **154**: 1525–1537.
249. Strobel T, Swanson L, Cannistra SA (1997) In vivo inhibition of CD44 limits intra-abdominal spread of a human ovarian cancer xenograft in nude mice: a novel role for CD44 in the process of peritoneal implantation. *Cancer Res* **57**: 1228–1232.
250. Yeo TK, Nagy JA, Yeo KT, Dvorak HF, Toole BP (1996) Increased hyaluronan at sites of attachment to mesentery by CD44-positive mouse ovarian and breast tumor cells. *Am J Pathol* **148**: 1733–1740.
251. Anttila MA, Tammi RH, Tammi MI, Syrjanen KJ, Saarikoski SV, Kosma VM (2000) High levels of stromal hyaluronan predict poor disease outcome in epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* **60**: 150–155.
252. Rieppi M, Vergani V, Gatto C, Zanetta G, Allavena P, Taraboletti G, Giavazzi R (1999) Mesothelial cells induce the motility of human ovarian carcinoma cells. *Int J Cancer* **80**: 303–307.
253. Offner FA, Obrist P, Stadlmann S, Feichtinger H, Klingler P, Herold M, Zwierzina H, Hittmair A, Mikuz G, Abendstein B, et al. (1995) IL-6 secretion by human peritoneal mesothelial and ovarian cancer cells. *Cytokine* **7**: 542–547.
254. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V (2008) Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* **8**: 726–736.
255. Lis R, Touboul C, Mirshahi P, Ali F, Mathew S, Nolan DJ, Maleki M, Abdalla SA, Raynaud CM, Querleu D, et al. (2011) Tumor associated mesenchymal stem cells protects ovarian cancer cells from hyperthermia through CXCL12. *Int J Cancer* **128**: 715–725.
256. Pasquet M, Golzio M, Mery E, Rafii A, Benabbou N, Mirshahi P, Hennebelle I, Bourin P, Allal B, Teissie J, et al. (2010) Hospicells (ascites-derived stromal cells) promote tumorigenicity and angiogenesis. *Int J Cancer* **126**: 2090–2101.
257. Elmasri WM, Casagrande G, Hoskins E, Kimm D, Kohn EC (2009) Cell adhesion in ovarian cancer. *Cancer Treat Res* **149**: 297–318.
258. Podhajcer OL, Benedetti L, Girotti MR, Prada F, Salvatierra E, Llera AS (2008) The role of the matricellular protein SPARC in the dynamic interaction between the tumor and the host. *Cancer Metastasis Rev* **27**: 523–537.
259. Yiu GK, Chan WY, Ng SW, Chan PS, Cheung KK, Berkowitz RS, Mok SC (2001) SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine) induces apoptosis in ovarian cancer cells. *Am J Pathol* **159**: 609–622.
260. Said N, Socha MJ, Olearczyk JJ, Elmarakby AA, Imig JD, Motamed K (2007) Normalization of the ovarian cancer microenvironment by SPARC. *Mol Cancer Res* **5**: 1015–1030.
261. Said NA, Najwer I, Socha MJ, Fulton DJ, Mok SC, Motamed K (2007) SPARC inhibits LPA-mediated mesothelial-ovarian cancer cell crosstalk. *Neoplasia* **9**: 23–35.
262. Said NA, Elmarakby AA, Imig JD, Fulton DJ, Motamed K (2008) SPARC ameliorates ovarian cancer-associated inflammation. *Neoplasia* **10**: 1092–1104.
263. Davidson B, Goldberg I, Gotlieb WH, Kopolovic J, Risberg B, Ben-Baruch G, Reich R (2003) Coordinated expression of integrin subunits, matrix metalloproteinases (MMP), angiogenic genes and Ets transcription factors in advanced-stage ovarian carcinoma: a possible activation pathway? *Cancer Metastasis Rev* **22**: 103–115.
264. Yang WL, Lu Z, Bast RC (2017) The role of biomarkers in the management of epithelial ovarian cancer. *Expert Rev Mol Diagn* **17**: 577–591.
265. Gendler SJ, Spicer AP (1995) Epithelial mucin genes. *Annu Rev Physiol* **57**: 607–634.

266. Singh AP, Senapati S, Ponnusamy MP, Jain M, Lele SM, Davis JS, Remmenga S, Batra SK (2008) Clinical potential of mucins in diagnosis, prognosis, and therapy of ovarian cancer. *Lancet Oncol* **9**: 1076–1085.
267. Hollingsworth MA, Swanson BJ (2004) Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nat Rev Cancer* **4**: 45–60.
268. Chauhan SC, Singh AP, Ruiz F, Johansson SL, Jain M, Smith LM, Moniaux N, Batra SK (2006) Aberrant expression of MUC4 in ovarian carcinoma: diagnostic significance alone and in combination with MUC1 and MUC16 (CA125). *Mod Pathol* **19**: 1386–1394.
269. Giuntoli RL, Rodriguez GC, Whitaker RS, Dodge R, Voynow JA (1998) Mucin gene expression in ovarian cancers. *Cancer Res* **58**: 5546–5550.
270. Hattstrup CL, Gendler SJ (2008) Structure and function of the cell surface (tethered) mucins. *Annu Rev Physiol* **70**: 431–457.
271. Gubbels JA, Belisle J, Onda M, Rancourt C, Migneault M, Ho M, Bera TK, Connor J, Sathyanarayana BK, Lee B, et al. (2006) Mesothelin-MUC16 binding is a high affinity, N-glycan dependent interaction that facilitates peritoneal metastasis of ovarian tumors. *Mol Cancer* **5**: 50.
272. Yin BW, Lloyd KO (2001) Molecular cloning of the CA125 ovarian cancer antigen: identification as a new mucin, MUC16. *J Biol Chem* **276**: 27371–27375.
273. Bast RC, Feeney M, Lazarus H, Nadler LM, Colvin RB, Knapp RC (1981) Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. *J Clin Invest* **68**: 1331–1337.
274. Bast RC, Klug TL, St John E, Jenison E, Niloff JM, Lazarus H, Berkowitz RS, Leavitt T, Griffiths CT, Parker L, et al. (1983) A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* **309**: 883–887.
275. Goonewardene TI, Hall MR, Rustin GJ (2007) Management of asymptomatic patients on follow-up for ovarian cancer with rising CA-125 concentrations. *Lancet Oncol* **8**: 813–821.
276. Hellstrom I, Raycraft J, Hayden-Ledbetter M, Ledbetter JA, Schummer M, McIntosh M, Drescher C, Urban N, Hellstrom KE (2003) The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma. *Cancer Res* **63**: 3695–3700.
277. Dochez V, Caillon H, Vaucel E, Dimet J, Winer N, Ducarme G (2019) Biomarkers and algorithms for diagnosis of ovarian cancer: CA125, HE4, RMI and ROMA, a review. *J Ovarian Res* **12**: 28.
278. Drapkin R, von Horsten HH, Lin Y, Mok SC, Crum CP, Welch WR, Hecht JL (2005) Human epididymis protein 4 (HE4) is a secreted glycoprotein that is overexpressed by serous and endometrioid ovarian carcinomas. *Cancer Res* **65**: 2162–2169.
279. Roy R, Shiao TC, Rittenhouse-Olson K (2013) Glycodendrimers: versatile tools for nanotechnology. *Braz J Pharm Sci* **49**: 85–108.
280. Hakomori S, Kannagi R (1983) Glycosphingolipids as tumor-associated and differentiation markers. *J Natl Cancer Inst* **71**: 231–251.
281. Hakomori S (1984) Tumor-associated carbohydrate antigens. *Annu Rev Immunol* **2**: 103–126.
282. Kannagi R, Yin J, Miyazaki K, Izawa M (2008) Current relevance of incomplete synthesis and neo-synthesis for cancer-associated alteration of carbohydrate determinants--Hakomori's concepts revisited. *Biochim Biophys Acta* **1780**: 525–531.
283. Pinho SS, Reis CA (2015) Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Cancer* **15**: 540–555.
284. Fuster MM, Esko JD (2005) The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. *Nat Rev Cancer* **5**: 526–542.
285. Springer GF (1984) T and Tn, general carcinoma autoantigens. *Science* **224**: 1198–1206.
286. Ghazizadeh M, Oguro T, Sasaki Y, Aihara K, Araki T, Springer GF (1990) Immunohistochemical and ultrastructural localization of T antigen in ovarian tumors. *Am J Clin Pathol* **93**: 315–321.
287. Jacobs I, Oram D, Fairbanks J, Turner J, Frost C, Grudzinskas JG (1990) A risk of malignancy index incorporating CA 125, ultrasound and menopausal status for the accurate preoperative diagnosis of ovarian cancer. *Br J Obstet Gynaecol* **97**: 922–929.

288. Baldus SE, Monig SP, Hanisch FG, Zirbes TK, Flucke U, Oelert S, Zilkens G, Madejczik B, Thiele J, Schneider PM, et al. (2002) Comparative evaluation of the prognostic value of MUC1, MUC2, sialyl-Lewis(a) and sialyl-Lewis(x) antigens in colorectal adenocarcinoma. *Histopathology* **40**: 440–449.
289. Kumar SR, Sauter ER, Quinn TP, Deutscher SL (2005) Thomsen-Friedenreich and Tn antigens in nipple fluid: carbohydrate biomarkers for breast cancer detection. *Clin Cancer Res* **11**: 6868–6871.
290. Friedenreich V (1930) The Thomsen Hemagglutination Phenomenon: Production of a Specific Receptor Quality in Red Corpuscles by Bacterial Activity.
291. Springer GF, Desai PR (1977) Cross-reacting carcinoma-associated antigens with blood group and precursor specificities. *Transpl Proc* **9**: 1105–1111.
292. Cao Y, Karsten UR, Liebrich W, Haensch W, Springer GF, Schlag PM (1995) Expression of Thomsen-Friedenreich-related antigens in primary and metastatic colorectal carcinomas. A reevaluation. *Cancer* **76**: 1700–1708.
293. Baldus SE, Hanisch FG, Monaca E, Karsten UR, Zirbes TK, Thiele J, Dienes HP (1999) Immunoreactivity of Thomsen-Friedenreich (TF) antigen in human neoplasms: the importance of carrier-specific glycotope expression on MUC1. *Histol Histopathol* **14**: 1153–1158.
294. Cao Y, Karsten U, Otto G, Bannasch P (1999) Expression of MUC1, Thomsen-Friedenreich antigen, Tn, sialosyl-Tn, and alpha2,6-linked sialic acid in hepatocellular carcinomas and preneoplastic hepatocellular lesions. *Virchows Arch* **434**: 503–509.
295. Karsten U, Goletz S (2015) What controls the expression of the core-1 (Thomsen-Friedenreich) glycotope on tumor cells? *Biochem Mosc* **80**: 801–807.
296. Hanisch FG, Stadie TR, Deutzmann F, Peter-Katalinic J (1996) MUC1 glycoforms in breast cancer-cell line T47D as a model for carcinoma-associated alterations of O-glycosylation. *Eur J Biochem* **236**: 318–327.
297. Ju T, Cummings RD (2005) Protein glycosylation: chaperone mutation in Tn syndrome. *Nature* **437**: 1252.
298. Ju T, Otto VI, Cummings RD (2011) The Tn antigen-structural simplicity and biological complexity. *Angew Chem Int Ed Engl* **50**: 1770–1791.
299. Cazet A, Julien S, Bobowski M, Burchell J, Delannoy P (2010) Tumour-associated carbohydrate antigens in breast cancer. *Breast Cancer Res* **12**: 204.
300. Yang JM, Byrd JC, Siddiki BB, Chung YS, Okuno M, Sowa M, Kim YS, Matta KL, Brockhausen I (1994) Alterations of O-glycan biosynthesis in human colon cancer tissues. *Glycobiology* **4**: 873–884.
301. Yoo NJ, Kim MS, Lee SH (2008) Absence of COSMC gene mutations in breast and colorectal carcinomas. *APMIS* **116**: 154–155.
302. de Graffenried CL, Bertozzi CR (2004) The roles of enzyme localisation and complex formation in glycan assembly within the Golgi apparatus. *Curr Opin Cell Biol* **16**: 356–363.
303. Egea G, Franci C, Gambus G, Lesuffleur T, Zweibaum A, Real FX (1993) cis-Golgi resident proteins and O-glycans are abnormally compartmentalized in the RER of colon cancer cells. *J Cell Sci* **105 (Pt 3)**: 819–830.
304. Rottger S, White J, Wandall HH, Olivo JC, Stark A, Bennett EP, Whitehouse C, Berger EG, Clausen H, Nilsson T (1998) Localization of three human polypeptide GalNAc-transferases in HeLa cells suggests initiation of O-linked glycosylation throughout the Golgi apparatus. *J Cell Sci* **111 (Pt 1)**: 45–60.
305. Axelsson MA, Karlsson NG, Steel DM, Ouwendijk J, Nilsson T, Hansson GC (2001) Neutralization of pH in the Golgi apparatus causes redistribution of glycosyltransferases and changes in the O-glycosylation of mucins. *Glycobiology* **11**: 633–644.
306. Campbell BJ, Rowe GE, Leiper K, Rhodes JM (2001) Increasing the intra-Golgi pH of cultured LS174T goblet-differentiated cells mimics the decreased mucin sulfation and increased Thomsen-Friedenreich antigen (Gal beta1-3GalNAc alpha-) expression seen in colon cancer. *Glycobiology* **11**: 385–393.

307. Rivinoja A, Kokkonen N, Kellokumpu I, Kellokumpu S (2006) Elevated Golgi pH in breast and colorectal cancer cells correlates with the expression of oncofetal carbohydrate T-antigen. *J Cell Physiol* **208**: 167–174.
308. Hassinen A, Pujol FM, Kokkonen N, Pieters C, Kihlstrom M, Korhonen K, Kellokumpu S (2011) Functional organization of Golgi N- and O-glycosylation pathways involves pH-dependent complex formation that is impaired in cancer cells. *J Biol Chem* **286**: 38329–38340.
309. Rivinoja A, Hassinen A, Kokkonen N, Kauppila A, Kellokumpu S (2009) Elevated Golgi pH impairs terminal N-glycosylation by inducing mislocalization of Golgi glycosyltransferases. *J Cell Physiol* **220**: 144–154.
310. Rivinoja A, Pujol FM, Hassinen A, Kellokumpu S (2012) Golgi pH, its regulation and roles in human disease. *Ann Med* **44**: 542–554.
311. Karsten U, Goletz S (2013) What makes cancer stem cell markers different? *Springerplus* **2**: 301.
312. Lin WM, Karsten U, Goletz S, Cheng RC, Cao Y (2011) Expression of CD176 (Thomsen-Friedenreich antigen) on lung, breast and liver cancer-initiating cells. *Int J Exp Pathol* **92**: 97–105.
313. Ricardo S, Marcos-Silva L, Pereira D, Pinto R, Almeida R, Soderberg O, Mandel U, Clausen H, Felix A, Lunet N, et al. (2015) Detection of glyco-mucin profiles improves specificity of MUC16 and MUC1 biomarkers in ovarian serous tumours. *Mol Oncol* **9**: 503–512.
314. Reisner Y, Itzicovitch L, Meshorer A, Sharon N (1978) Hemopoietic stem cell transplantation using mouse bone marrow and spleen cells fractionated by lectins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**: 2933–2936.
315. Reisner Y, Biniaminov M, Rosenthal E, Sharon N, Ramot B (1979) Interaction of peanut agglutinin with normal human lymphocytes and with leukemic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 447–451.
316. Newman RA, Boss MA (1980) Expression of binding sites for peanut agglutinin during murine B lymphocyte differentiation. *Immunology* **40**: 193–200.
317. Cao Y, Merling A, Karsten U, Goletz S, Punzel M, Kraft R, Butschak G, Schwartz-Albiez R (2008) Expression of CD175 (Tn), CD175s (sialosyl-Tn) and CD176 (Thomsen-Friedenreich antigen) on malignant human hematopoietic cells. *Int J Cancer* **123**: 89–99.
318. Yi B, Zhang M, Schwartz-Albiez R, Cao Y (2011) Mechanisms of the apoptosis induced by CD176 antibody in human leukemic cells. *Int J Oncol* **38**: 1565–1573.
319. Romero I, Bast RC (2012) Minireview: human ovarian cancer: biology, current management, and paths to personalizing therapy. *Endocrinology* **153**: 1593–1602.
320. Moore RG, Brown AK, Miller MC, Skates S, Allard WJ, Verch T, Steinhoff M, Messerlian G, DiSilvestro P, Granai CO, et al. (2008) The use of multiple novel tumor biomarkers for the detection of ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass. *Gynecol Oncol* **108**: 402–408.
321. Schummer M, Drescher C, Forrest R, Gough S, Thorpe J, Hellstrom I, Hellstrom KE, Urban N (2012) Evaluation of ovarian cancer remission markers HE4, MMP7 and Mesothelin by comparison to the established marker CA125. *Gynecol Oncol* **125**: 65–69.
322. Moore RG, McMeekin DS, Brown AK, DiSilvestro P, Miller MC, Allard WJ, Gajewski W, Kurman R, Bast RC, Skates SJ (2009) A novel multiple marker bioassay utilizing HE4 and CA125 for the prediction of ovarian cancer in patients with a pelvic mass. *Gynecol Oncol* **112**: 40–46.
323. Moore RG, Miller MC, DiSilvestro P, Landrum LM, Gajewski W, Ball JJ, Skates SJ (2011) Evaluation of the diagnostic accuracy of the risk of ovarian malignancy algorithm in women with a pelvic mass. *Obstet Gynecol* **118**: 280–288.
324. Zhang Z, Chan DW (2010) The road from discovery to clinical diagnostics: lessons learned from the first FDA-cleared in vitro diagnostic multivariate index assay of proteomic biomarkers. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* **19**: 2995–2999.
325. Li Q, Li Z, Duan X, Yi W (2014) A tandem enzymatic approach for detecting and imaging tumor-associated Thomsen-Friedenreich antigen disaccharide. *J Am Chem Soc* **136**: 12536–12539.

326. Ferguson K, Yadav A, Morey S, Abdullah J, Hrysenko G, Eng JY, Sajjad M, Koury S, Rittenhouse-Olson K (2014) Preclinical studies with JAA-F11 anti-Thomsen-Friedenreich monoclonal antibody for human breast cancer. *Future Oncol Lond Engl* **10**: 385–399.
327. Tati S, Fisk JC, Abdullah J, Karacosta L, Chrisikos T, Philbin P, Morey S, Ghazal D, Zazala F, Jessee J, et al. (2017) Humanization of JAA-F11, a Highly Specific Anti-Thomsen-Friedenreich Pancarcinoma Antibody and InVitro Efficacy Analysis. *Neoplasia N Y N* **19**: 716–733.
328. Sakuma S, Yu JYH, Quang T, Hiwatari K-I, Kumagai H, Kao S, Holt A, Erskind J, McClure R, Siuta M, et al. (2015) Fluorescence-based endoscopic imaging of Thomsen-Friedenreich antigen to improve early detection of colorectal cancer. *Int J Cancer* **136**: 1095–1103.
329. Nakase H, Sakuma S, Fukuchi T, Yoshino T, Mohri K, Miyata K, Kumagai H, Hiwatari K-I, Tsubaki K, Ikejima T, et al. (2017) Evaluation of a novel fluorescent nanobeacon for targeted imaging of Thomsen-Friedenreich associated colorectal cancer. *Int J Nanomedicine* **12**: 1747–1755.
330. Carvajal DN, Rowe PC (2010) Sensitivity, specificity, predictive values, and likelihood ratios. *Pediatr Rev* **31**: 511–513.
331. Weidle UH, Tiefenthaler G, Weiss EH, Georges G, Brinkmann U (2013) The intriguing options of multispecific antibody formats for treatment of cancer. *Cancer Genomics Proteomics* **10**: 1–18.
332. Pal MK, Rashid M, Bisht M (2015) Multiplexed magnetic nanoparticle-antibody conjugates (MNPs-ABS) based prognostic detection of ovarian cancer biomarkers, CA-125, β -2M and ApoA1 using fluorescence spectroscopy with comparison of surface plasmon resonance (SPR) analysis. *Biosens Bioelectron* **73**: 146–152.
333. Wang K, Fan D, Liu Y, Wang E (2015) Highly sensitive and specific colorimetric detection of cancer cells via dual-aptamer target binding strategy. *Biosens Bioelectron* **73**: 1–6.
334. Wicki A, Witzigmann D, Balasubramanian V, Huwyler J (2015) Nanomedicine in cancer therapy: challenges, opportunities, and clinical applications. *J Control Release Off J Control Release Soc* **200**: 138–157.
335. Bangham AD, Standish MM, Watkins JC (1965) Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol* **13**: 238–252.
336. Gregoriadis G (1976) The carrier potential of liposomes in biology and medicine (second of two parts). *N Engl J Med* **295**: 765–770.
337. Torchilin VP (2005) Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov* **4**: 145–160.
338. Hofheinz RD, Gnad-Vogt SU, Beyer U, Hochhaus A (2005) Liposomal encapsulated anti-cancer drugs. *Anticancer Drugs* **16**: 691–707.
339. Duncan R (2006) Polymer conjugates as anticancer nanomedicines. *Nat Rev Cancer* **6**: 688–701.
340. Maude SL, Frey N, Shaw PA, Aplenc R, Barrett DM, Bunin NJ, Chew A, Gonzalez VE, Zheng Z, Lacey SF, et al. (2014) Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med* **371**: 1507–1517.
341. Turtle CJ, Hanafi L-A, Berger C, Gooley TA, Cherian S, Hudecek M, Sommermeyer D, Melville K, Pender B, Budiarto TM, et al. (2016) CD19 CAR-T cells of defined CD4+:CD8+ composition in adult B cell ALL patients. *J Clin Invest* **126**: 2123–2138.
342. Herrera Estrada LP, Champion JA (2015) Protein nanoparticles for therapeutic protein delivery. *Biomater Sci* **3**: 787–799.
343. Lee EJ, Lee NK, Kim IS (2016) Bioengineered protein-based nanocage for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* **106**: 157–171.
344. Gradishar WJ, Tjulandin S, Davidson N, Shaw H, Desai N, Bhar P, Hawkins M, O'Shaughnessy J (2005) Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer. *J Clin Oncol* **23**: 7794–7803.
345. Maham A, Tang Z, Wu H, Wang J, Lin Y (2009) Protein-based nanomedicine platforms for drug delivery. *Small* **5**: 1706–1721.
346. Yang Z, Wang X, Diao H, Zhang J, Li H, Sun H, Guo Z (2007) Encapsulation of platinum anticancer drugs by apoferritin. *Chem Commun Camb* 3453–3455.

347. Xiangyou Liu, Wei Wei, Shijiao Huang, Shrong-Shi Lin, Xin Zhang, Chuanmao Zhang, Yuguang Du, Guanghui Ma, Mei Li, Stephen Mann, et al. (2013) Bio-inspired protein–gold nanoconstruct with core–void–shell structure: beyond a chemo drug carrier. *J Mater Chem B* **1**: 3136–3143.
348. Blazkova I, Nguyen HV, Dostalova S, Kopel P, Stanisavljevic M, Vaculovicova M, Stiborova M, Eckschlager T, Kizek R, Adam V (2013) Apoferritin modified magnetic particles as doxorubicin carriers for anticancer drug delivery. *Int J Mol Sci* **14**: 13391–13402.
349. Liang M, Fan K, Zhou M, Duan D, Zheng J, Yang D, Feng J, Yan X (2014) H-ferritin-nanocaged doxorubicin nanoparticles specifically target and kill tumors with a single-dose injection. *Proc Natl Acad Sci U A* **111**: 14900–14905.
350. Lin X, Xie J, Niu G, Zhang F, Gao H, Yang M, Quan Q, Aronova MA, Zhang G, Lee S, et al. (2011) Chimeric ferritin nanocages for multiple function loading and multimodal imaging. *Nano Lett* **11**: 814–819.
351. Lin X, Xie J, Zhu L, Lee S, Niu G, Ma Y, Kim K, Chen X (2011) Hybrid ferritin nanoparticles as activatable probes for tumor imaging. *Angew Chem Int Ed Engl* **50**: 1569–1572.
352. Kang HJ, Kang YJ, Lee YM, Shin HH, Chung SJ, Kang S (2012) Developing an antibody-binding protein cage as a molecular recognition drug modular nanoplatform. *Biomaterials* **33**: 5423–5430.
353. Eun Jung Lee, So Jin Lee, Yoon-Sik Kang, Ju Hee Ryu, Koo Chul Kwon, Eunji Jo, Ji Young Yhee, Ick Chan Kwon, Kwangmeyung Kim, Jeewon Lee (2015) Engineered Proteinticles for Targeted Delivery of siRNA to Cancer Cells. *Adv Funct Nanomater* **25**: 1279–1286.
354. Sun Y, MacRae TH (2005) Small heat shock proteins: molecular structure and chaperone function. *Cell Mol Life Sci* **62**: 2460–2476.
355. Kim KK, Kim R, Kim SH (1998) Crystal structure of a small heat-shock protein. *Nature* **394**: 595–599.
356. Goldsmith LE, Yu M, Rome LH, Monbouquette HG (2007) Vault nanocapsule dissociation into halves triggered at low pH. *Biochemistry* **46**: 2865–2875.
357. Kar UK, Srivastava MK, Andersson A, Baratelli F, Huang M, Kickhoefer VA, Dubinett SM, Rome LH, Sharma S (2011) Novel CCL21-vault nanocapsule intratumoral delivery inhibits lung cancer growth. *PLoS One* **6**: e18758.
358. Kickhoefer VA, Garcia Y, Mikiyas Y, Johansson E, Zhou JC, Raval-Fernandes S, Minoofar P, Zink JJ, Dunn B, Stewart PL, et al. (2005) Engineering of vault nanocapsules with enzymatic and fluorescent properties. *Proc Natl Acad Sci U A* **102**: 4348–4352.
359. Douglas T, Young M (2006) Viruses: making friends with old foes. *Science* **312**: 873–875.
360. Manchester M, Singh P (2006) Virus-based nanoparticles (VNPs): platform technologies for diagnostic imaging. *Adv Drug Deliv Rev* **58**: 1505–1522.
361. Singh P, Prasuhn D, Yeh RM, Destito G, Rae CS, Osborn K, Finn MG, Manchester M (2007) Bio-distribution, toxicity and pathology of cowpea mosaic virus nanoparticles in vivo. *J Control Release* **120**: 41–50.
362. Trevor Douglas, Mark Young (1998) Host–guest encapsulation of materials by assembled virus protein cages. *Nature* **393**: 152–155.
363. Hooker JM, Kovacs EW, Francis MB (2004) Interior surface modification of bacteriophage MS2. *J Am Chem Soc* **126**: 3718–3719.
364. Ren Y, Wong SM, Lim LY (2007) Folic acid-conjugated protein cages of a plant virus: a novel delivery platform for doxorubicin. *Bioconjug Chem* **18**: 836–843.
365. Loo L, Guenther RH, Lommel SA, Franzen S (2008) Infusion of dye molecules into Red clover necrotic mosaic virus. *Chem Commun Camb* **88**–90.
366. Wang Q, Raja KS, Janda KD, Lin T, Finn MG (2003) Blue fluorescent antibodies as reporters of steric accessibility in virus conjugates. *Bioconjug Chem* **14**: 38–43.
367. Storni T, Ruedl C, Schwarz K, Schwendener RA, Renner WA, Bachmann MF (2004) Nonmethylated CG motifs packaged into virus-like particles induce protective cytotoxic T cell responses in the absence of systemic side effects. *J Immunol* **172**: 1777–1785.

368. Choi KM, Choi SH, Jeon H, Kim IS, Ahn HJ (2011) Chimeric capsid protein as a nanocarrier for siRNA delivery: stability and cellular uptake of encapsulated siRNA. *ACS Nano* **5**: 8690–8699.
369. Kim M, Rho Y, Jin KS, Ahn B, Jung S, Kim H, Ree M (2011) pH-dependent structures of ferritin and apoferritin in solution: disassembly and reassembly. *Biomacromolecules* **12**: 1629–1640.
370. Speir JA, Munshi S, Wang G, Baker TS, Johnson JE (1995) Structures of the native and swollen forms of cowpea chlorotic mottle virus determined by X-ray crystallography and cryo-electron microscopy. *Structure* **3**: 63–78.
371. Deshayes S, Gref R (2014) Synthetic and bioinspired cage nanoparticles for drug delivery. *Nanomedicine Lond* **9**: 1545–1564.
372. Aljabali AA, Shukla S, Lomonosoff GP, Steinmetz NF, Evans DJ (2013) CPMV-DOX delivers. *Mol Pharm* **10**: 3–10.
373. Pokorski JK, Steinmetz NF (2011) The art of engineering viral nanoparticles. *Mol Pharm* **8**: 29–43.
374. Strable E, Prasuhn DE, Udit AK, Brown S, Link AJ, Ngo JT, Lander G, Quispe J, Potter CS, Carragher B, et al. (2008) Unnatural amino acid incorporation into virus-like particles. *Bioconjug Chem* **19**: 866–875.
375. Kang S, Uchida M, O'Neil A, Li R, Prevelige PE, Douglas T (2010) Implementation of p22 viral capsids as nanoplatfoms. *Biomacromolecules* **11**: 2804–2809.
376. Lammers T, Hennink WE, Storm G (2008) Tumour-targeted nanomedicines: principles and practice. *Br J Cancer* **99**: 392–397.
377. Poiroux G, Pitie M, Culerrier R, Lafont E, Segui B, Van Damme EJ, Peumans WJ, Bernadou J, Levade T, Rouge P, et al. (2011) Targeting of T/Tn antigens with a plant lectin to kill human leukemia cells by photochemotherapy. *PLoS One* **6**: e23315.
378. Poiroux G, Pitie M, Culerrier R, Segui B, Van Damme EJ, Peumans WJ, Bernadou J, Levade T, Rouge P, Barre A, et al. (2011) Morniga G: a plant lectin as an endocytic ligand for photosensitizer molecule targeting toward tumor-associated T/Tn antigens. *Photochem Photobiol* **87**: 370–377.
379. Choi KM, Kim K, Kwon IC, Kim IS, Ahn HJ (2013) Systemic delivery of siRNA by chimeric capsid protein: tumor targeting and RNAi activity in vivo. *Mol Pharm* **10**: 18–25.
380. Zeng Q, Wen H, Wen Q, Chen X, Wang Y, Xuan W, Liang J, Wan S (2013) Cucumber mosaic virus as drug delivery vehicle for doxorubicin. *Biomaterials* **34**: 4632–4642.
381. Chandrashekhara SH, Triveni GS, Kumar R (2016) Imaging of peritoneal deposits in ovarian cancer: A pictorial review. *World J Radiol* **8**: 513–517.
382. Mangeolle T, Yakavets I, Marchal S, Debayle M, Pons T, Bezdetnaya L, Marchal F (2018) Fluorescent Nanoparticles for the Guided Surgery of Ovarian Peritoneal Carcinomatosis. *Nanomater Basel* **8**.
383. Raspagliesi F, Kusamura S, Campos Torres JC, de Souza GA, Ditto A, Zanaboni F, Younan R, Baratti D, Mariani L, Laterza B, et al. (2006) Cyto reduction combined with intraperitoneal hyperthermic perfusion chemotherapy in advanced/recurrent ovarian cancer patients: The experience of National Cancer Institute of Milan. *Eur J Surg Oncol* **32**: 671–675.
384. Winter WE, Maxwell GL, Tian C, Sundborg MJ, Rose GS, Rose PG, Rubin SC, Muggia F, McGuire WP (2008) Tumor residual after surgical cyto reduction in prediction of clinical outcome in stage IV epithelial ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol* **26**: 83–89.
385. Azais H, Estevez JP, Foucher P, Kerbage Y, Mordon S, Collinet P (2017) Dealing with microscopic peritoneal metastases of epithelial ovarian cancer. A surgical challenge. *Surg Oncol* **26**: 46–52.
386. Louis Herly (1944) Studies in Selective Differentiation of Tissues by Means of Filtered Ultraviolet Light. *Am Assoc Cancer Res* **4**: 227–231.
387. Moore GE (1947) Fluorescein as an Agent in the Differentiation of Normal and Malignant Tissues. *Science* **106**: 130–131.
388. Parker N, Turk MJ, Westrick E, Lewis JD, Low PS, Leamon CP (2005) Folate receptor expression in carcinomas and normal tissues determined by a quantitative radioligand binding assay. *Anal Biochem* **338**: 284–293.

389. van Dam GM, Themelis G, Crane LM, Harlaar NJ, Pleijhuis RG, Kelder W, Sarantopoulos A, de Jong JS, Arts HJ, van der Zee AG, et al. (2011) Intraoperative tumor-specific fluorescence imaging in ovarian cancer by folate receptor-alpha targeting: first in-human results. *Nat Med* **17**: 1315–1319.
390. Paganin-Gioanni A, Bellard E, Paquereau L, Ecochard V, Golzio M, Teissié J (2010) Fluorescence imaging agents in cancerology. *Radiol Oncol* **44**: 142–148.
391. Vahrmeijer AL, Hutteman M, van der Vorst JR, van de Velde CJ, Frangioni JV (2013) Image-guided cancer surgery using near-infrared fluorescence. *Nat Rev Clin Oncol* **10**: 507–518.
392. Weissleder R (2001) A clearer vision for in vivo imaging. *Nat Biotechnol* **19**: 316–317.
393. Hoogstins CE, Tummers QR, Gaarenstroom KN, de Kroon CD, Trimbos JB, Bosse T, Smit VT, Vuyk J, van de Velde CJ, Cohen AF, et al. (2016) A Novel Tumor-Specific Agent for Intraoperative Near-Infrared Fluorescence Imaging: A Translational Study in Healthy Volunteers and Patients with Ovarian Cancer. *Clin Cancer Res* **22**: 2929–2938.
394. Mery E, Jouve E, Guillermet S, Bourgognon M, Castells M, Golzio M, Rizo P, Delord JP, Querleu D, Couderc B (2011) Intraoperative fluorescence imaging of peritoneal dissemination of ovarian carcinomas. A preclinical study. *Gynecol Oncol* **122**: 155–162.
395. Mery E, Golzio M, Guillermet S, Lanore D, Le Naour A, Thibault B, Tilkin-Mariamé AF, Bellard E, Delord JP, Querleu D, et al. (2017) Fluorescence-guided surgery for cancer patients: a proof of concept study on human xenografts in mice and spontaneous tumors in pets. *Oncotarget* **8**: 109559–109574.
396. Josserand V, Kéramidas M, Lavaud J, Righini C, Vollaie J, Bellard E, Rols MP, Teissié J, Coll JL, Golzio M (2016) Electrochemotherapy guided by intraoperative fluorescence imaging for the treatment of inoperable peritoneal micro-metastases. *J Control Release Off J Control Release Soc* **233**: 81–87.
397. Reinhart MB, Huntington CR, Blair LJ, Heniford BT, Augenstein VA (2016) Indocyanine Green: Historical Context, Current Applications, and Future Considerations. *Surg Innov* **23**: 166–175.
398. Tummers QR, Hoogstins CE, Peters AA, de Kroon CD, Trimbos JB, van de Velde CJ, Frangioni JV, Vahrmeijer AL, Gaarenstroom KN (2015) The Value of Intraoperative Near-Infrared Fluorescence Imaging Based on Enhanced Permeability and Retention of Indocyanine Green: Feasibility and False-Positives in Ovarian Cancer. *PLoS One* **10**: e0129766.
399. Tanaka E, Choi HS, Humblet V, Ohnishi S, Laurence RG, Frangioni JV (2008) Real-time intraoperative assessment of the extrahepatic bile ducts in rats and pigs using invisible near-infrared fluorescent light. *Surgery* **144**: 39–48.
400. Yonemura Y, Canbay E, Ishibashi H, Nishino E, Endou Y, Sako S, Ogura S (2016) 5-Aminolevulinic Acid Fluorescence in Detection of Peritoneal Metastases. *Asian Pac J Cancer Prev* **17**: 2271–2275.
401. Loning M, Diddens H, Kupker W, Diedrich K, Huttmann G (2004) Laparoscopic fluorescence detection of ovarian carcinoma metastases using 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX. *Cancer* **100**: 1650–1656.
402. Choi HS, Frangioni JV (2010) Nanoparticles for biomedical imaging: fundamentals of clinical translation. *Mol Imaging* **9**: 291–310.
403. Lacroix LM, Delpech F, Nayral C, Lachaize S, Chaudret B (2013) New generation of magnetic and luminescent nanoparticles for in vivo real-time imaging. *Interface Focus* **3**: 20120103.
404. Damalakiene L, Karabanovas V, Bagdonas S, Rotomskis R (2016) Fluorescence-Lifetime Imaging Microscopy for Visualization of Quantum Dots' Endocytic Pathway. *Int J Mol Sci* **17**:.
405. Sitbon G, Bouccara S, Tasso M, Francois A, Bezdetnaya L, Marchal F, Beaumont M, Pons T (2014) Multimodal Mn-doped I-III-VI quantum dots for near infrared fluorescence and magnetic resonance imaging: from synthesis to in vivo application. *Nanoscale* **6**: 9264–9272.
406. Liu X, Braun GB, Qin M, Ruoslahti E, Sugahara KN (2017) In vivo cation exchange in quantum dots for tumor-specific imaging. *Nat Commun* **8**: 343.
407. Chen G, Qiu H, Prasad PN, Chen X (2014) Upconversion nanoparticles: design, nanochemistry, and applications in theranostics. *Chem Rev* **114**: 5161–5214.

408. Yilin Gao, Lang Liu, Bin Shen, Xiaofeng Chen, Li Wang, Liya Wang, Wei Feng, Chunhui Huang, Fuyou Li (2017) Amphiphilic PEGylated Lanthanide-Doped Upconversion Nanoparticles for Significantly Passive Accumulation in the Peritoneal Metastatic Carcinomatosis Models Following Intraperitoneal Administration. *ACS Biomater Sci Eng* **3**: 2176–2184.
409. Zhu S, Meng Q, Wang L, Zhang J, Song Y, Jin H, Zhang K, Sun H, Wang H, Yang B (2013) Highly photoluminescent carbon dots for multicolor patterning, sensors, and bioimaging. *Angew Chem Int Ed Engl* **52**: 3953–3957.
410. Ko HY, Chang YW, Paramasivam G, Jeong MS, Cho S, Kim S (2013) In vivo imaging of tumour bearing near-infrared fluorescence-emitting carbon nanodots derived from tire soot. *Chem Commun Camb Engl* **49**: 10290–10292.
411. Hong Y, Lam JW, Tang BZ (2009) Aggregation-induced emission: phenomenon, mechanism and applications. *Chem Commun Camb* 4332–4353.
412. Liu J, Chen C, Ji S, Liu Q, Ding D, Zhao D, Liu B (2017) Long wavelength excitable near-infrared fluorescent nanoparticles with aggregation-induced emission characteristics for image-guided tumor resection. *Chem Sci* **8**: 2782–2789.
413. Burns A, Ow H, Wiesner U (2006) Fluorescent core-shell silica nanoparticles: towards ‘Lab on a Particle’ architectures for nanobiotechnology. *Chem Soc Rev* **35**: 1028–1042.
414. Kim SE, Zhang L, Ma K, Riegman M, Chen F, Ingold I, Conrad M, Turker MZ, Gao M, Jiang X, et al. (2016) Ultrasmall nanoparticles induce ferroptosis in nutrient-deprived cancer cells and suppress tumour growth. *Nat Nanotechnol* **11**: 977–985.
415. Colby AH, Berry SM, Moran AM, Pasion KA, Liu R, Colson YL, Ruiz-Opazo N, Grinstaff MW, Herrera VL (2017) Highly Specific and Sensitive Fluorescent Nanoprobes for Image-Guided Resection of Sub-Millimeter Peritoneal Tumors. *ACS Nano* **11**: 1466–1477.
416. Han MS, Tung CH (2014) Lessons learned from imaging mouse ovarian tumors: the route of probe injection makes a difference. *Quant Imaging Med Surg* **4**: 156–162.
417. Nagai K, Nogami S, Egusa H, Konishi H (2014) Pharmacokinetic evaluation of intraperitoneal doxorubicin in rats. *Pharmazie* **69**: 125–127.
418. Wright AA, Cronin A, Milne DE, Bookman MA, Burger RA, Cohn DE, Cristea MC, Griggs JJ, Keating NL, Levenback CF, et al. (2015) Use and Effectiveness of Intraperitoneal Chemotherapy for Treatment of Ovarian Cancer. *J Clin Oncol* **33**: 2841–2847.
419. Choi HS, Liu W, Misra P, Tanaka E, Zimmer JP, Itty Ipe B, Bawendi MG, Frangioni JV (2007) Renal clearance of quantum dots. *Nat Biotechnol* **25**: 1165–1170.
420. Du B, Jiang X, Das A, Zhou Q, Yu M, Jin R, Zheng J (2017) Glomerular barrier behaves as an atomically precise bandpass filter in a sub-nanometre regime. *Nat Nanotechnol* **12**: 1096–1102.
421. Ma N, Marshall AF, Gambhir SS, Rao J (2010) Facile synthesis, silanization, and biodistribution of biocompatible quantum dots. *Small Weinhe Bergstr Ger* **6**: 1520–1528.
422. Chen H, Zhang W, Zhu G, Xie J, Chen X (2017) Rethinking cancer nanotheranostics. *Nat Rev Mater* **2**.
423. Gao N, Bozeman EN, Qian W, Wang L, Chen H, Lipowska M, Staley CA, Wang YA, Mao H, Yang L (2017) Tumor Penetrating Theranostic Nanoparticles for Enhancement of Targeted and Image-guided Drug Delivery into Peritoneal Tumors following Intraperitoneal Delivery. *Theranostics* **7**: 1689–1704.
424. Aslantürk ÖS (2017) In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. *Genotoxicity - Predict Risk Our Actual World*.
425. Hernandez L, Kim MK, Lyle LT, Bunch KP, House CD, Ning F, Noonan AM, Annunziata CM (2016) Characterization of ovarian cancer cell lines as in vivo models for preclinical studies. *Gynecol Oncol* **142**: 332–340.
426. Shaw TJ, Senterman MK, Dawson K, Crane CA, Vanderhyden BC (2004) Characterization of intraperitoneal, orthotopic, and metastatic xenograft models of human ovarian cancer. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther* **10**: 1032–1042.
427. Colombo P-E, Boustta M, Poujol S, Jarlier M, Bressolle F, Teulon I, Ladjemi M-Z, Pinguet F, Rouanet P, Vert M (2011) Intraperitoneal administration of novel doxorubicin loaded polymeric

- delivery systems against peritoneal carcinomatosis: experimental study in a murine model of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* **122**: 632–640.
428. Cho H, Lai TC, Kwon GS (2013) Poly(ethylene glycol)-block-poly(ϵ -caprolactone) micelles for combination drug delivery: evaluation of paclitaxel, cyclopamine and gossypol in intraperitoneal xenograft models of ovarian cancer. *J Control Release Off J Control Release Soc* **166**: 1–9.
 429. Hill AP, Young RJ (2010) Getting physical in drug discovery: a contemporary perspective on solubility and hydrophobicity. *Drug Discov Today* **15**: 648–655.
 430. Teranishi R, Matsuki R, Yuba E, Harada A, Kono K (2016) Doxorubicin Delivery Using pH and Redox Dual-Responsive Hollow Nanocapsules with a Cationic Electrostatic Barrier. *Pharmaceutics* **9**.
 431. Hamilton TC, Young RC, McKoy WM, Grotzinger KR, Green JA, Chu EW, Whang-Peng J, Rogan AM, Green WR, Ozols RF (1983) Characterization of a human ovarian carcinoma cell line (NIH:OVCAR-3) with androgen and estrogen receptors. *Cancer Res* **43**: 5379–5389.
 432. Fogh J, Fogh JM, Orfeo T (1977) One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* **59**: 221–226.
 433. Lengyel E, Burdette JE, Kenny HA, Matei D, Pilrose J, Haluska P, Nephew KP, Hales DB, Stack MS (2014) Epithelial ovarian cancer experimental models. *Oncogene* **33**: 3619–3633.
 434. Matte I, Lane D, Boivin M, Rancourt C, Piche A (2014) MUC16 mucin (CA125) attenuates TRAIL-induced apoptosis by decreasing TRAIL receptor R2 expression and increasing c-FLIP expression. *BMC Cancer* **14**: 234.
 435. Benard J, Da Silva J, De Blois MC, Boyer P, Duvillard P, Chiric E, Riou G (1985) Characterization of a human ovarian adenocarcinoma line, IGROV1, in tissue culture and in nude mice. *Cancer Res* **45**: 4970–4979.
 436. Beaufort CM, Helmijr JC, Piskorz AM, Hoogstraat M, Ruigrok-Ritstier K, Besselink N, Murtaza M, van IjWF, Heine AA, Smid M, et al. (2014) Ovarian cancer cell line panel (OCCP): clinical importance of in vitro morphological subtypes. *PLoS One* **9**: e103988.
 437. Czaplicki J, Cornélissen G, Halberg F (2006) GOSA, a simulated annealing-based program for global optimization of nonlinear problems, also reveals transyears. *J Appl Biomed* **4**: 87–94.
 438. Lombo F, Menendez N, Salas JA, Mendez C (2006) The aureolic acid family of antitumor compounds: structure, mode of action, biosynthesis, and novel derivatives. *Appl Microbiol Biotechnol* **73**: 1–14.
 439. Previdi S, Malek A, Albertini V, Riva C, Capella C, Broggin M, Carbone GM, Rohr J, Catapano CV (2010) Inhibition of Sp1-dependent transcription and antitumor activity of the new aureolic acid analogues mithramycin SDK and SK in human ovarian cancer xenografts. *Gynecol Oncol* **118**: 182–188.
 440. Claussen CA, Long EC (1999) Nucleic Acid recognition by metal complexes of bleomycin. *Chem Rev* **99**: 2797–2816.
 441. Twentyman PR (1983) Bleomycin--mode of action with particular reference to the cell cycle. *Pharmacol Ther* **23**: 417–441.
 442. Inoue K, Yuasa H (2014) Molecular basis for pharmacokinetics and pharmacodynamics of methotrexate in rheumatoid arthritis therapy. *Drug Metab Pharmacokinet* **29**: 12–19.
 443. Ricci F, Tedeschi A, Morra E, Montillo M (2009) Fludarabine in the treatment of chronic lymphocytic leukemia: a review. *Ther Clin Risk Manag* **5**: 187–207.
 444. Munford RS (2010) Murine responses to endotoxin: another dirty little secret? *J Infect Dis* **201**: 175–177.
 445. Van Dyke MW, Sirito M, Sawadogo M (1992) Single-step purification of bacterially expressed polypeptides containing an oligo-histidine domain. *Gene* **111**: 99–104.
 446. Schrödinger LCC (2015) *The PyMOL Molecular Graphics System*.
 447. Simone NL, Remaley AT, Charboneau L, Petricoin EF, Glickman JW, Emmert-Buck MR, Fleisher TA, Liotta LA (2000) Sensitive Immunoassay of Tissue Cell Proteins Procured by Laser Capture Microdissection. *Am J Pathol* **156**: 445–452.

La lectine de *Xerocomellus Chrysenteron*, un nano-objet théranostique pour l'imagerie et le traitement des cancers épithéliaux :

Preuve de concept appliquée aux carcinoses péritonéales d'origine ovarienne

Mathilde Coustets

Le développement de thérapies ciblées et des techniques d'imagerie est un défi majeur en santé, particulièrement dans les pathologies cancéreuses. Les carcinoses péritonéales sont habituellement causées par une dissémination de cellules tumorales au sein de la cavité abdominale, ce qui est le cas de 85% des patientes atteintes d'un cancer ovarien et plus de 10% des patients atteints d'un cancer colorectal. Dans les deux cas, les traitements consistent en une chirurgie (cytoréduction), aussi complète que possible, accompagnée de chimiothérapies. L'amélioration de la survie globale des patients passe par le développement de technologies parallèles comme de nouveaux outils diagnostiques pour détecter des implantations précoces dans le péritoine, le blocage de la dissémination de cellules cancéreuses pendant et après la chirurgie, ou encore la combinaison de chimiothérapies et de traitements ciblés intrapéritonéaux.

Ce projet de thèse consiste à aborder ces différents aspects par l'utilisation d'un nanocontainer protéique multifonctionnel. L'objectif est d'optimiser cette protéine, appartenant à la famille des lectines, pour envisager son développement en tant qu'outil théranostique dans le cadre du diagnostic et des traitements de cancers épithéliaux. La lectine de *Xerocomellus chrysenteron*, à l'origine extraite d'un champignon supérieur comestible, présente une forte affinité pour un biomarqueur glycosidique des carcinomes, l'antigène de Thomsen-Friedenreich (antigène TF ou CD176). De plus, la présence d'une large cavité hydratée au centre de cet assemblage protéique (homotétramère) permet d'envisager le confinement et l'adressage spécifique de molécules thérapeutiques à des cellules épithéliales cancéreuses.

Nous avons commencé par établir la preuve de concept de la délivrance ciblée de molécules thérapeutiques dans plusieurs lignées d'adénocarcinomes ovariens humains (OVCAR-3, SKOV-3, IGROV-1). Le marquage de la lectine dans le proche infrarouge a permis de confirmer le mécanisme de délivrance et prouver que la molécule thérapeutique avait bien été endocytée grâce à son confinement dans le nanocontainer. La protéine marquée a également été utilisée pour valider son utilisation comme nanosonde pour la détection de nodules tumoraux submillimétriques dans le péritoine. Cette détection est faite par imagerie de fluorescence *in vivo* dans des modèles précliniques de carcinose péritonéale ovarienne préalablement développés à partir de lignées cellulaires. La combinaison des deux propriétés de la protéine (sonde et container) permet d'envisager son utilisation en nanothéranostique intrapéritonéale. Afin de confirmer ce développement prometteur, il sera nécessaire d'établir la preuve de concept sur des modèles murins plus pertinents de la situation clinique développés à partir de tumeurs issues de patientes (Patient Derived Xenografts, PDX).