HAL
open science

Optimisation de la thérapie photodynamique par la nanovectorisation du photosensibilisateur mTHPC à l'aide de vésicules extracellulaires

Marie Millard

To cite this version:

Marie Millard. Optimisation de la thérapie photodynamique par la nanovectorisation du photosensibilisateur mTHPC à l'aide de vésicules extracellulaires. Cancer. Université de Lorraine, 2018. Français. NNT : 2018LORR0246 . tel-02131239

HAL Id: tel-02131239

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-02131239

Submitted on 15 Dec 2020

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

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

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE l'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par **Marie MILLARD**

Optimisation de la thérapie photodynamique par la nanovectorisation du photosensibilisateur mTHPC à l'aide de vésicules extracellulaires

Le 14 décembre 2018

Membres du jury :

Rapporteurs :	Pr Olivier FERON	SSS/IREC/FATH 5349 – Université Catholique de Louvain Brussels, Belgique, *rapporteur*
	Pr Marc POCARD	CART - Hôpital Lariboisière - INSERM-Paris 7 UMR 965, Université Paris-Diderot, Paris, *rapporteur*
Examinateurs :	Dr Florence GAZEAU	LMSC – CNRS UMR 7057 – Université Paris-Diderot - Sorbonne Paris-Cité, Paris
	Dr Lina BEZDETNAYA	CRAN – CNRS UMR 7039 – Université de Lorraine - Institut de Cancérologie de Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy, *directrice de thèse*
Membre invité :		
	Pr Frédéric MARCHAL	CRAN – CNRS UMR 7039 – Université de Lorraine - Département de Chirurgie - Institut de Cancérologie de Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy

---

Centre de Recherche en Cancérologie de Nancy (CRAN) – CNRS UMR 7039 – Université de Lorraine, Institut de Cancérologie de Lorraine, 6 avenue de Bourgogne, 54519 Vandœuvre-lès-Nancy.

Table des matières

Liste des abréviations v
Liste des figures vii
Liste des tableaux ix
Chapitre 1. Introduction générale 1
Chapitre 2. Synthèse bibliographique 3
1. LA THÉRAPIE PHOTODYNAMIQUE 3
1.1. Généralités 3
1.1.1. Historique et principe 3
1.1.2. Les réactions photochimiques de type I et II 4
1.1.3. Mécanismes d'éradication de la tumeur 6
1.2. Les photosensibilisateurs 8
1.2.1. Les propriétés des photosensibilisateurs 8
1.2.2. Les photosensibilisateurs de 2ème et 3ème génération 9
1.2.3. Importance de la localisation du photosensibilisateur 11
1.3. La méta-tétra-hydroxyphénylchlorine (mTHPC) 12
1.3.1. Caractéristiques 12
1.3.2. Interactions cellulaires *in vitro* 14
1.3.3. Pharmacocinétique et biodistribution 15
2. LA VECTORISATION 17
2.1. Généralités 17
2.1.1. Intérêt de la vectorisation 17
2.1.2. Ciblage passif et actif 19
2.1.3. Internalisation des vecteurs par endocytose 22
2.2. Impact des propriétés physicochimiques des nanovecteurs sur l'accumulation et la pénétration dans les tissus tumoraux 24
2.2.1. Influence de la taille 24
2.2.2. Influence de la forme 25
2.2.3. Influence des propriétés de surface 26
2.3. Vectorisation de la mTHPC 27
2.3.1. Différents types de vectorisation de la mTHPC 27
2.3.2. Stabilité des formulations liposomales de mTHPC en circulation 30

2.3.3. Etude *in vivo* des formulations liposomales de mTHPC 32
3. LES VÉSICULES EXTRACELLULAIRES 35
3.1. Généralités 35
3.1.1. Les différentes catégories de vésicules extracellulaires 35
3.1.2. Les différentes origines, focus sur les cellules endothéliales 37
3.1.3. Composition des vésicules extracellulaires 38
3.2. Fonctions et applications des vésicules extracellulaires 40
3.2.1. Mécanismes de communication 40
3.2.2. Applications des vésicules extracellulaires en cancérologie 43
3.3. Les vésicules extracellulaires comme nanovecteurs 45
3.3.1. Méthodes d'incorporation des agents thérapeutiques 45
3.3.2. Vectorisation d'agents anticancéreux 47
3.3.3. Vectorisation de photosensibilisateur 49
4. LE SPHÉROÏDE MULTICELLULAIRE 51
4.1. Résumé 51
4.2. Revue scientifique 53
Chapitre 3. Objectif de l'étude 69
Chapitre 4. Résultats et Discussion 71
1. CARACTÉRISATION DES VÉSICULES EXTRACELLULAIRES CHARGÉES DE mTHPC 71
1.1. Matériels et Méthodes 71
1.1.1. Photosensibilisateur 71
1.1.2. Production des mTHPC-VE 71
1.1.3. Détermination de la taille, concentration en particules et stabilité 72
1.1.4. Caractérisation biologique des mTHPC-VE par cytométrie en flux 73
1.1.5. Spectres d'absorbance et de fluorescence 73
1.2. Résultats & Discussion 74
1.3. Conclusion 79
2. ÉTUDE DES VÉSICULES EXTRACELLULAIRES CHARGÉES DE mTHPC SUR CELLULES EN MONOCOUCHE 81
2.1. Matériels et Méthodes 81
2.1.1. Lignées et culture cellulaire 81
2.1.2. Incorporation cellulaire de la mTHPC 81
2.1.3. Mécanismes d'incorporation des nanovecteurs 82
2.1.4. Localisation subcellulaire 82
2.1.5. Cytotoxicité et photocytotoxicité 83
2.2. Résultats & Discussion 83

2.3. Conclusion 88
3. ÉTUDE DES NANOVECTEURS DE mTHPC SUR SPHÉROÏDES MULTICELLULAIRES 89
3.1. Modèle 3D et techniques d'analyse de la mTHPC nanovectorisée 89
3.2. Publication n°1 99
3.3. Etude des vésicules extracellulaires chargées de mTHPC 98
3.4. Publication n°2 99
4. ÉTUDE *IN VIVO* DES VÉSICULES EXTRACELLULAIRES CHARGÉES DE mTHPC SUR SOURIS NUDE 111
4.1. Matériels et Méthodes 111
4.1.1. Photosensibilisateur 111
4.1.2. Animaux et culture cellulaire 111
4.1.3. Biodistribution par imagerie de fluorescence 111
4.1.4. Pharmacocinétique 112
4.1.5. Traitement photodynamique et efficacité PDT 112
4.2. Résultats & Discussion 113
4.3. Conclusion 119
Chapitre 5. Discussion générale 121
Chapitre 6. Conclusions et perspectives 127
Conclusions 119
Perspectives 119
Bibliographie 129
Production scientifique 147

Liste des abréviations

ξ	Potentiel zêta
λ	Longueur d'onde
Ω	Rayon de courbure
υ	Largueur de la bande spectrale à mi-hauteur
Φ_{FL}	Rendement quantique de fluorescence
$^1O_2$	Oxygène singulet
3D	Tridimensionnel
ADN	Acide désoxyribonucléique
ALA	Acide 5-aminolevulinique
Alix	*« ALG-2 Interacting protein X »*
ARN	Acide ribonucléique
CAM	*« Cell adhesion molecules »*
CI	Conversion interne
CIS	Conversion interSystème
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
DMLA	Dégénérescence maculaire lié à l'âge
DPPC	Dipalmitoylphosphatidyl-choline
DPPG	Dipalmitoylphosphatidyl-glycérol
DOX	Doxorubicine
EMR	Endocytose médiée par récepteur
EMV	Endosome multivésiculaire
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
ESCRT	*« Endosomal sorting-complex required for transport »*
GTP	Guanosine triphosphate
H_2O_2	Peroxyde d'hydrogène
HDL	*« High density lipoprotein »*
HpD	Hématoporphyrine dérivée
HPLC	*« High Performance Liquid Chromatography »*
IC50	Concentration nécessaire pour obtenir 50% de mort cellulaire
IDL	Intervalle drogue-lumière
IL	Interleukine
i.v	Injection intraveineuse
LDL	*« Low density lipoprotein »*
MACE	Mono-(L)-aspartylchlorine-e6
MEC	Matrice extracellulaire
MPS	*« Mononuclear phagocyte system »*
mTHPC	Méta-tétra(hydroxyphényl)chlorine

NK	*« Natural killer»*
NP	Nanoparticule
NPe6	N-aspartylchlorine e6
NTA	*« NanoTracking Analysis »*
O_2	Oxygène
PDT	*« Photodynamic therapy »*
PEG	Poly-ethylene glycol
PgP	Glycoprotéine P
PLGA	Poly(lactic-co-glycolic acide)
PpIX	Protoporphyrine IX
PTX	Paclitaxel
PS	Photosensibilisateur
RE	Réticulum endoplasmique
SRE	Système Réticulo-endothélial
SVF	Sérum de veau fœtal
TEM	*« Transmission electronic microscopy »*
TNF	*« Tumor necrosis factor »*
Tsg-101	*« Tumor susceptibility gene 101 »*
VE	Vésicules extracellulaires

Liste des figures

Figure 1. Schéma du processus de traitement par thérapie photodynamique 4
Figure 2. Diagramme de Jablonski simplifié 4
Figure 3. Réactions photochimiques de type I et II 5
Figure 4. Effet indirect de la thérapie photodynamique sur la destruction tumorale 7
Figure 5. Distance de pénétration de la lumière dans les tissus biologiques 9
Figure 6. Structure moléculaire de la mTHPC 13
Figure 7. Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence de la mTHPC 13
Figure 8. Comparaison structurale entre tissu sain et tissu tumoral 20
Figure 9. Internalisation cellulaire d'une nanoparticule par ciblage actif 21
Figure 10. Voies d'entrée des nanoparticules dans les cellules par endocytose 23
Figure 11. Paramètres des nanoparticules influençant leur accumulation et pénétration dans la tumeur 24
Figure 12. Structure des formulations liposomales de mTHPC 30
Figure 13. Schéma représentant la biogénèse des vésicules extracellulaires 35
Figure 14. Stratégies d'encapsulation des agents thérapeutiques dans les vésicules extracellulaires 45

Figure 15. Caractérisation en cytométrie en flux des cellules HUVEC données par Paris 74
Figure 16. Optimisation de la fabrication des mTHPC-VE 75
Figure 17. Caractérisation des mTHPC-VE 76
Figure 18. Spectres d'absorbance des formulations de mTHPC 77
Figure 19. Comportement des nanovecteurs de mTHPC dans 20% de plasma murin 79

Figure 20. Incorporation cellulaire de la mTHPC dans des cellules cancéreuses 84
Figure 21. Incorporation cellulaire de la mTHPC dans des cellules saines 84
Figure 22. Localisation subcellulaire des formulations de mTHPC 85
Figure 23. Toxicité des inhibiteurs des voies d'endocytose 86
Figure 24. Cytotoxicité et photocytotoxicité des mTHPC-VE 87

Figure 25. Cytotoxicité des mTHPC-VE sur sphéroïdes HT29 98

Figure 26. Imagerie de fluorescence de souris « nude » xénogreffée 113
Figure 27. Imagerie de fluorescence réalisée sur organes *ex vivo* 115
Figure 28. Intensité de fluorescence de la mTHPC dans les organes en fonction du temps 116
Figure 29. Pharmacocinétiques 117
Figure 30. Retard de croissance tumorale après application de la thérapie photodynamique en incluant les cures tumorales 118

Liste des tableaux

Tableau 1. Principaux photosensibilisateurs approuvés en clinique 10
Tableau 2. Comparaison des différents paramètres entre quatre modèles 3D sphériques 51

Tableau 3. Propriétés photophysiques des formulations de mTHPC 77

Tableau 4. Nombre de jours après injection nécessaire pour atteindre 10 fois le volume tumoral initial en excluant les cures tumorales 118

Introduction générale

Le projet de thèse présenté dans ce manuscrit a été réalisé au sein du laboratoire CRAN dans le département Biologie, Signaux et Systèmes en Cancérologie et Neurosciences (BioSIS) en étroite relation avec l'Institut de Cancérologie de Lorraine. Ces deux centres mènent en commun depuis plusieurs années des travaux de recherche pluridisciplinaires visant à augmenter l'efficacité des stratégies thérapeutiques exploitant les interactions lumière-tissus biologiques. Ce projet s'inscrit dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe parisienne du Dr Claire Wilhelm du laboratoire Matières et Systèmes Complexes, Université Paris-Diderot, CNRS UMR 7057.

La thérapie photodynamique possède une efficacité reconnue en cancérologie, notamment dans le traitement des petites tumeurs superficielles. Modalité de traitement non-invasive, cette méthode repose sur l'activité d'une molécule photoactivable appelée photosensibilisateur, de la lumière visible et de l'oxygène moléculaire. Suite au processus d'irradiation, le photosensibilisateur génère des espèces réactives de l'oxygène conduisant à la destruction des cellules cancéreuses. Cependant, le manque de sélectivité tumorale de ces molécules photoactivables et la forte sensibilité cutanée après irradiation restreint son application clinique. Ainsi, dans le but de pallier ces limitations, les travaux concernant la vectorisation des photosensibilisateurs sont en constante augmentation et apportent une vision optimisée de la thérapie photodynamique.

La nanovectorisation offre une meilleure solubilité, de meilleurs propriétés pharmacocinétiques ainsi qu'une protection du photosensibilisateur pendant le transit vers la tumeur. Les vecteurs, de taille nanométrique aussi appelés nanoparticules, doivent augmenter la sélectivité tumorale ainsi que la concentration intratumorale du PS. L'augmentation de l'accumulation des nanoparticules dans la tumeur repose en partie sur l'effet EPR (*Enhanced Permability and Retention*) et sur les propriétés photophysiques intrinsèques aux vecteurs.

Un travail d'optimisation de la thérapie photodynamique utilisant la méta-tétra(hydroxyphényl)chlorine (mTHPC) a été entrepris au laboratoire depuis plusieurs années. La mTHPC a reçu l'autorisation de mise sur le marché pour le cancer des voies aérodigestives supérieures. Les travaux précédemment obtenus au laboratoire ont démontré les propriétés avantageuses de vectoriser la mTHPC dans des liposomes conventionnels (Foslip®) et PEGylés (Fospeg®) dans le traitement et la prévention des cancers. Cependant, leur stabilité et leur capacité à retenir la mTHPC en présence de protéines plasmatiques restent limitées. Ainsi, une alternative aux liposomes synthétiques est l'utilisation de vésicules extracellulaires. La libération

de vésicules extracellulaires représente un mécanisme non conventionnel d'exocytose impliqué dans le transport extracellulaire de matériel biologique. Des conditions physiologiques ou des stimuli spécifiques sont à l'origine de la production de ces vésicules dont la taille varie entre 30 nm et 1 µm. En tant que nanovecteurs, ces vésicules lipidiques présentent l'avantage de posséder une membrane structurée leur conférant stabilité en circulation et des fonctions spécialisées de ciblage cellulaire dans le but de délivrer leur contenu de manière spécifique. Dans ce contexte, leur utilisation en cancérologie peut constituer une opportunité pour véhiculer des agents anti-cancéreux à but diagnostic et/ou thérapeutique.

Dans le but d'évaluer l'intérêt des vésicules extracellulaires en tant que nanovecteurs de mTHPC en thérapie photodynamique, divers modèles précliniques ont été utilisés tel que le sphéroïde multicellulaire et les tumeurs xénogreffées. Ces travaux portent sur la caractérisation des vésicules extracellulaires chargées de mTHPC ainsi que leur efficacité *in vitro* et *in vivo* comparé à la mTHPC libre et à une formulation nanovectorisée de mTHPC. La membrane liposomale étant une bicouche phospholipide, tout comme celle des VE, la formulation liposomale de mTHPC (Foslip®) a alors été choisie pour la comparaison.

Synthèse bibliographique

LA THÉRAPIE PHOTODYNAMIQUE

Cette première partie s'intéresse au principe et au fonctionnement de la thérapie photodynamique (PDT) ainsi qu'aux propriétés des photosensibilisateurs (PS). De plus, les caractéristiques du PS utilisé dans cette étude y seront développées.

1.1. Généralités

1.1.1. Historique et principe

➢ Historique

Les effets thérapeutiques de la lumière ont été mis en évidence pendant l'antiquité où les égyptiens l'utilisait pour traiter les maladies de peau [1]. Il faut attendre le 20ème siècle pour voir apparaître le terme de PDT où a été réalisé, par Friedrich Meyer-Betz, le premier traitement sur l'homme utilisant un dérivé de l'hémoglobine comme PS : l'hématoporphyrine [2]. En 1960, l'équipe de Lipson découvre l'hématoporphyrine dérivée (HpD) et met en évidence ses propriétés de fluorescence [3].

Dans les années 1970, les premières applications cliniques de la PDT en cancérologie ont été réalisées, notamment grâce au professeur Thomas Dougherty (*Roswell Park Comprehensive Cancer Center, Buffalo, USA*). Elle devient dès lors un traitement alternatif à la chirurgie dans le cas des petites tumeurs superficielles accessibles à la lumière [4,5]. Après purification de l'HpD, le Photofrin® a été isolé et approuvé en clinique pour le cancer de la vessie au Canada en 1993. De nos jours, de nombreuses études sont conduites à l'aide de PS plus spécifiques et plus actifs. De plus, des formulations nanovectorisées de PS ont été développées afin de diminuer les effets secondaires et d'augmenter les propriétés photophysiques du PS [6].

➢ Principe

Le fonctionnement de la PDT requière l'intervention de 3 composants essentiels : un photosensibilisateur (PS) non actif à l'obscurité, la lumière visible et l'oxygène moléculaire (O_2) permettant la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO).

En clinique, le traitement par PDT est réalisé selon une succession d'étapes précises (Figure 1). Dans un premier temps, le patient reçoit une dose de PS, en application locale ou systémique (exemple : injection intraveineuse, i.v). Après administration, le PS se distribue dans l'organisme et se localise préférentiellement au niveau du site tumoral ce qui permet l'application de l'irradiation lumineuse. Le temps entre l'injection et l'irradiation est alors appelé intervalle drogue-lumière (IDL). Après irradiation, le PS va réagir avec l'O_2 présent dans son environnement et entrainer la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) conduisant à l'éradication tumorale.

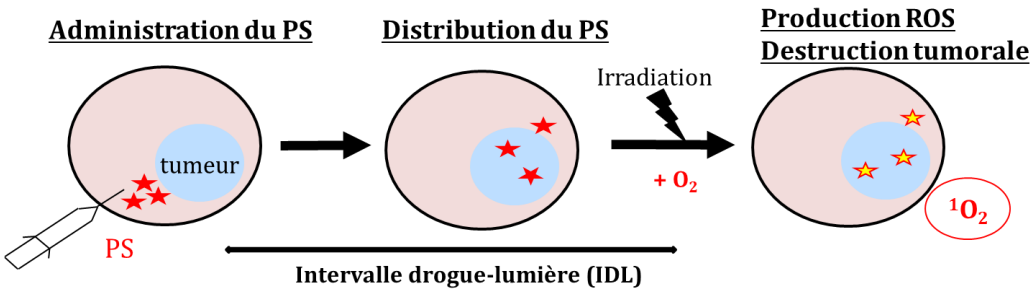


Figure 1. Schéma du processus de traitement par thérapie photodynamique

Quatre étapes majoritaires sont impliquées dans le traitement par PDT. Après administration (étape 1), le PS se distribue préférentiellement au niveau du site tumoral (étape 2). Après un certain laps de temps, une irradiation est réalisée (étape 3) conduit à la destruction tumorale (étape 4).

1.1.2. Les réactions photochimiques de type I et II

Les réactions photochimiques mises en jeu s'expliquent grâce au diagramme de Jablonski (Figure 2) [1].

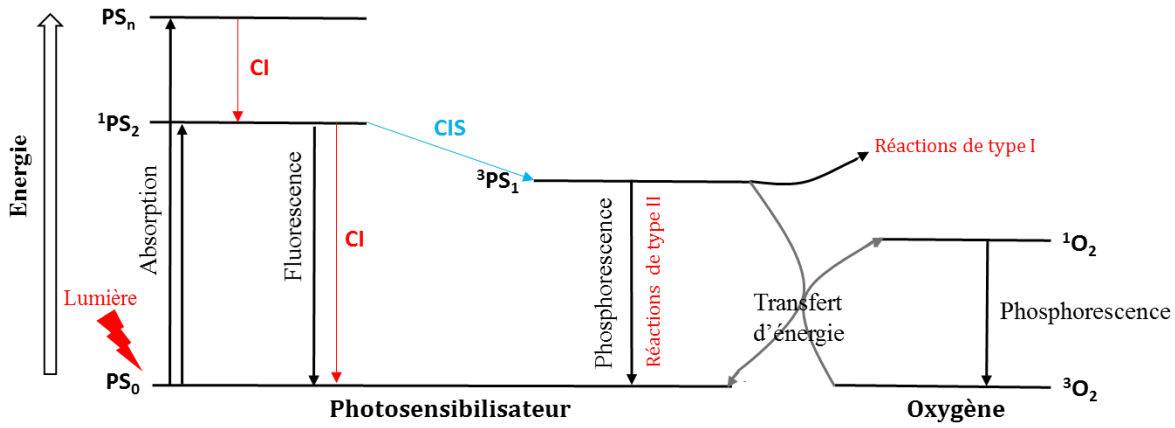


Figure 2. Diagramme de Jablonski simplifié (d'après [7])

Après irradiation, le PS passe sous forme excitée. Par conversion interne (CI), il se stabilise et retourne à son état fondamental en émettant de la fluorescence. Par conversion intersystème (CIS), son passage à l'état triplet conduit à des réactions photochimiques de type I ou type II.

Selon ce diagramme, après une irradiation lumineuse (absorption d'un photon), le PS passe de son état fondamental (PS_0) à différents états singulets non stable (PS_n) grâce à une absorption d'énergie. Le PS peut rapidement retourner à un état excité de plus basse énergie ($^1PS_2$) par deux processus différents : relaxation vibrationnelle ou conversion interne (CI). A partir de cet état (courte durée de vie : 10^{-10} à 10^{-7} sec), le PS à la capacité de se stabiliser en retournant à son état fondamental (PS_0) par CI en émettant de la fluorescence.

Par conversion intersystème (CIS), le PS peut également passer dans un état triplet ($^3PS_1$*) et transferer de l'énergie à l'O_2 ou au substrat biologique. Ce transfert d'énergie s'effectue par emission de phosphorescence. Le temps de vie de l'état triplet est plus long que celui de l'état singulet (10^{-6} à 1 sec) permettant au PS d'interagir avec son substrat biolgique ou l'O_2, conduisant à la formation d'ERO et notamment de l'oxygène singulet ($^1O_2$) grâce à deux types de réactions photochimiques (Figure 3).

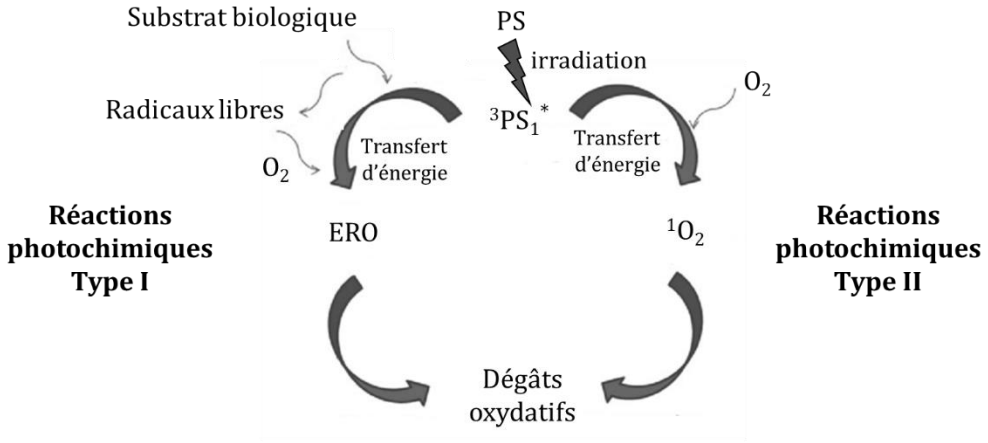


Figure 3. Réactions photochimiques de type I et II

Abréviations : $^1O_2$: Oxygène singulet ; O_2 : Oxygène ; ERO : Espèces réactives de l'oxygène ; PS : Photosensibilisateur ; $^3PS_1$: Photosensibilisateur dans son état triplet.*

- <u>Réaction photochimique de type I</u>

Lorsqu'un transfert d'électron a lieu entre le PS à l'état triplet et le substrat biologique, des radicaux libres sont produits entraînant la formation de dommages oxydatifs. Ce phénomène se produit dans le cas des réactions photochimiques de type I [2]. En présence d'O_2, les formes triplet du PS réagissent et transferent des électrons conduisant à la formation d'ERO tel que l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$). Cette ERO n'est pas particulièrement toxique pour la cellule mais contribue à la production du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) pouvant, quant à lui, générer le radical hydroxyle ($OH^{\cdot}$) [8].

➢ Réaction photochimique de type II

Lorsqu'un transfert d'énergie a lieu entre le PS à l'état triplet et l'O_2, une réaction photochimique de type II se produit. Le PS retourne dans son état fondamental et de l'oxygène singulet ($^1O_2$) est produit [1]. L'$^1O_2$ est l'espèce la plus réactive et toxique pour la cellule induisant par conséquent d'important dommages cellulaires. Cependant, son temps de demi-vie (environ 40 ns) ainsi que son rayon d'action (environ 20 nm) étant très courts [9], l'importance de la localisation du PS au moment de l'irradiation devient primordiale (cf §1.3.4).
L'une des principales caractéristiques des PS est de posséder un rendement quantique en $^1O_2$ élevé (entre 0,30 et 0,75). Par conséquent, on considère que l'action anti-tumorale des PS est principalement due à l'$^1O_2$ généré lors de la réaction photochimique de type II [1].

1.1.3. Mécanismes d'éradication de la tumeur

L'efficacité de la PDT est due à 3 mécanismes : un effet direct en raison des dommages cytotoxique sur les cellules tumorales et deux effets indirects : des dommages induits sur la vascularisation tumorale [10] et l'induction d'une réaction inflammatoire [11].

➢ Effet direct

Les dommages cellulaires produits à la suite de l'application de la PDT sont étroitement liés à la voie de mort cellulaire ainsi qu'à la localisation subcellulaire du PS au moment de l'irradiation. Trois voies majoritaires de mort cellulaire post–PDT sont connues : apoptose, nécrose et autophagie, décrites en détails dans la revue de Mroz et *al.* [12].

L'apoptose photo-induite est la voie de mort cellulaire prédominante après PDT. Après bourgeonnement de la membrane et condensation de la chromatine, la cellule se fragmente en corps apoptotiques qui seront éliminés par phagocytose. Ce mécanisme de mort cellulaire programmée non inflammatoire est impliqué dans le renouvellement cellulaire et peut être induit par deux voies majoritaires :

- **Voie intrinsèque** : Cette voie est étroitement liée avec une localisation mitochondriale du PS. En effet, la formation de pores dans la membrane mitochondriale entraine la libération du cytochrome C dans le milieu extérieur conduisant à l'activation de la caspase-9 puis de la caspase-3 conduisant à la mort cellulaire [13].
- **Voie extrinsèque** : Cette voie est dépendante des récepteurs de mort cellulaire appartenant à la famille des TNFR (*Tumor necrosis factor receptor*). Les PS se liant à ces récepteurs conduisent à l'activation de la caspase-8 qui, après clivage de la caspase-3, induit l'apoptose [14].

La nécrose est un mécanisme de mort cellulaire non programmée. Après une perte de l'intégrité membranaire, la cellule va subir un gonflement irréversible ainsi qu'une vacuolisation du cytoplasme. La perméabilité de la membrane augmente entrainant sa destruction et une libération du contenu cellulaire dans le milieu extérieur. Ce phénomène déclenche une réaction inflammatoire importante.

L'autophagie est un phénomène impliqué dans le recyclage des composants cellulaires souvent à la suite d'un stress cellulaire. Elle se caractérise par la formation, dans le cytoplasme de la cellule, de vésicules autophagiques composées d'une double membrane. Ces autophagosomes ont la capacité de fusionner avec les lysosomes où leur contenu sera dégradé [15]. Dans un contexte de PDT, l'autophagie peut présenter un rôle cytoprotecteur ou être un facteur de mort cellulaire[16].

- <u>Effet indirect</u>

La destruction de la vascularisation tumorale est notée quelques minutes après irradiation, induisant une privation de la tumeur en oxygène et une asphyxie des cellules tumorales [17]. Cette altération vasculaire induite par la PDT a été rapportée pour la première fois en 1963 par l'équipe de Star. Cette étude met en évidence une vasoconstriction des vaisseaux tumoraux suite à un traitement par HpD/PDT ainsi qu'un arrêt du flux sanguin et des hémorragies [18]. Après PDT, les cellules endothéliales sont endommagées entrainant un changement morphologique des cellules ainsi qu'une perte des jonctions intercellulaires [19]. Ces altérations conduisent à une augmentation de la perméabilité vasculaire et ainsi à des fuites d'éléments sanguins dans la matrice extracellulaire (MEC) provoquant l'activation du système immunitaire (Figure 4).

Parallèlement, une infiltration des neutrophiles au sein de la tumeur ainsi qu'une activation des plaquettes est observée. L'agrégation plaquettaire est amplifiée par la production d'un vasoconstricteur : le thromboxane. La migration des neutrophiles est facilitée par une augmentation des molécules d'adhésion [20]. Le recrutement massif de cellules immunitaires sur le site tumoral est responsable de la production d'un grand nombre de médiateurs de l'inflammation et notamment des cytokines pro-inflammatoires comme le TNFα ou l'interleukine 6 (IL-6) [19].

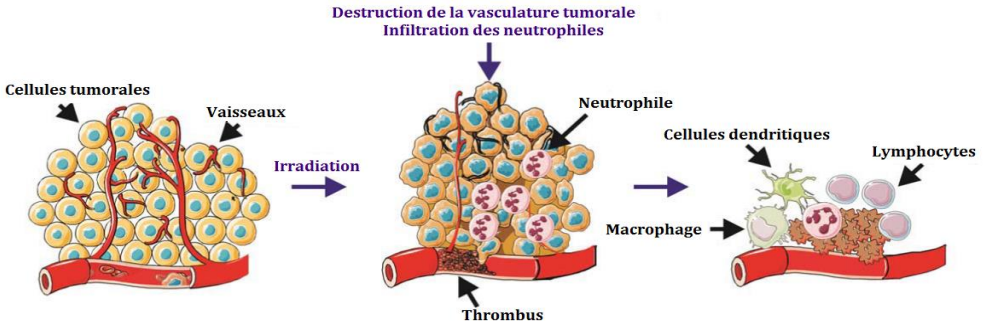


Figure 4. Effet indirect de la thérapie photodynamique sur la destruction tumorale [7]

Les dommages produits au niveau de la vascularisation tumorale potentialisent l'effet cytotoxique direct observé sur les cellules tumorales. Ces mécanismes sont accompagnés d'une activation du système immunitaire avec observation d'une inflammation accrue et d'une infiltration de cellules immunitaires au sein de la tumeur.

1.2. Les photosensibilisateurs

1.2.1. Les propriétés des photosensibilisateurs

Un photosensibilisateur (PS) est une molécule dont la toxicité à l'obscurité est faible voire nulle mais qui, sous l'effet d'une irradiation lumineuse, est capable d'induire des altérations physiques et/ou chimiques.

Le premier PS utilisé en PDT est l'hématoporphyrine (HpD) obtenue par Lipson à partir d'un traitement de l'hémoglobine sanguine avec un mélange d'acides sulfurique et acétique, suivi d'un traitement alcalin. L'HpD ainsi que ses dérivés sont alors considérés comme des PS de première génération [21]. Après purification, l'HpD donne naissance à des dérivés dont un mélange de ces composés a été commercialisé sous le nom Photofrin®. Ce PS fut le premier à être approuvé en clinique en 1993 pour le traitement du papillome de la vessie puis en 2003 pour traiter les cancers de l'œsophage [22]. De par sa nature de mélange complexe, le Photofrin® possède certaines limitations comme une faible sélectivité tumorale combinée à une longue durée de vie dans l'organisme ce qui entraine une longue photosensibilisation cutanée (6-10 semaines). De plus, sa faible absorption à 630 nm limite la pénétration au sein du tissu à 2-3 mm de profondeur et la production modérée d'$^1O_2$ par ce composé entraine un temps de traitement relativement long [23].

Ces inconvénients ont conduit à la réalisation d'une liste de critères caractérisant le PS idéal : Composé pur, synthèse simple et reproductible, faible toxicité à l'obscurité, photosensibilité cutanée limitée, bonne sélectivité tumorale, clairance rapide, stable et soluble en milieu aqueux, rendement quantique en fluorescence (Φ_{FL}) et en $^1O_2$ élevé (Φ_Δ) ainsi qu'une forte absorption dans la fenêtre thérapeutique (650 – 800 nm) [7,23,24].

Ce dernier point est le paramètre le plus déterminant dans l'efficacité de la PDT. En effet, afin d'éviter l'absorbance des chromophores endogènes et obtenir une meilleure pénétration de la lumière dans les tissus, il est nécessaire que les PS possèdent un pic d'absorption situé dans la fenêtre optique 650-800 nm. Ainsi, à ces longueurs d'onde, la lumière pénétrent dans les tissus jusqu'à 10 mm de profondeur contrairement à la lumière bleue qui ne dépasse pas les 0,15 mm de profondeur (Figure 5) [7].

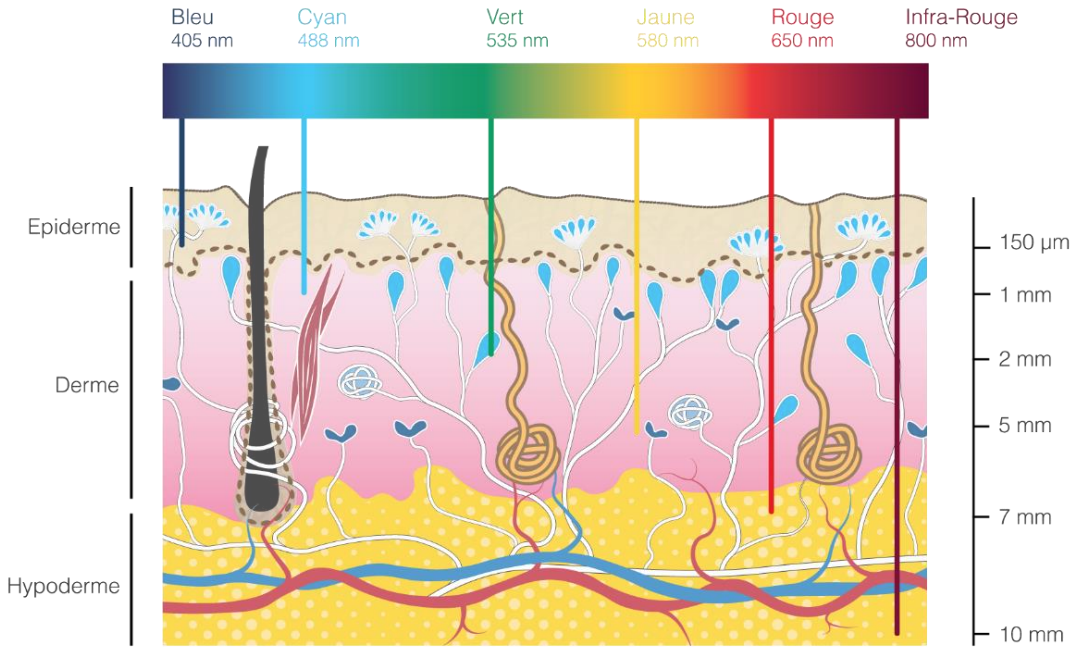


Figure 5. Distance de pénétration de la lumière dans les tissus biologiques

1.2.2. Les photosensibilisateurs de 2ème et 3ème génération

➢ <u>Les PS de 2ème génération</u>

Les PS de deuxième génération ont été élaborés pour répondre aux mieux aux critères du PS idéal. Ils possèdent une pureté et une stabilité élevée ainsi qu'une longueur d'onde d'absorption dans le rouge (> 650 nm). La production d'ERO est améliorée grâce à ces PS qui présentent un rendement quantique en $^1O_2$ élevé. Leur sélectivité tumorale et/ou leur pharmacocinétique permettent de réduire le risque de photosensibilisation cutanée [25].

Les PS de deuxième génération, hormis le Photofrin®, approuvés en clinique, sont répertoriés dans le Tableau 1 ci-dessous. Chaque PS necessite un protocole thérapeutique spécifique avec des doses de PS, des doses de lumière et des IDL variables. Ils possèdent des structures chimiques variées, majoritairement des dérivés de porphyrines et des chlorines comme l'acide 5-aminolévulinique (ALA) [21] ou encore la méta-tétra(hydroxyphenyl)chlorine (mTHPC) [26], qui sera le PS utilisé dans cette étude. D'autres structures de PS sont utilisées dans le cadre d'essais cliniques de phase II, notamment texafirines et pheophorbides [21,23].

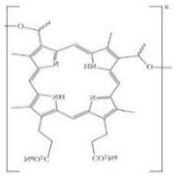
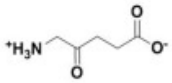
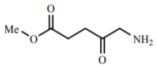
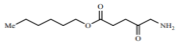
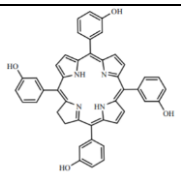
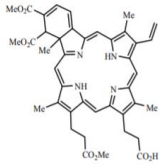
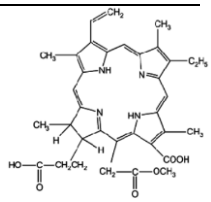
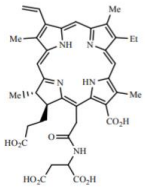
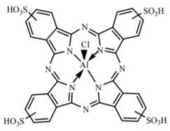
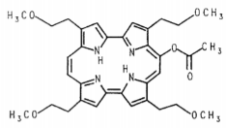
Nom commercial	Drogue	Structure	Approuvé	Applications	λexc (nm)	Structure chimique
Photofrin®	Dérivé de l'HpD	Porphyrine	1993, Canada 1994, Japon 1995, USA	Cancer de la vessie, poumon, œsophage, ovaire	630	
Levulan®	5-ALA	Précurseur de porphyrine	1999, USA	Kératose actinique, dysplasie	632	
Metvixia®	5-ALA-methylester	Précurseur de porphyrine	2001, UE 2002, Nouvelle-Zélande 2003, Australie 2004, USA	Kératose actinique, carcinome des cellules basales, cancer de la peau et tête et cou	632	
Hexvix®	5-ALA-hexylester	Précurseur de porphyrine	2010, USA	Diagnostic cancer de la vessie	635	
Foscan®	Temoporfine/ mTHPC	Chlorine	2001, UE	Cancer de la tête et du cou	652	
Visudyne®	Verteporfine/ Benzoporphyrine-mono acide	Chlorine	2000, USA Canada UE 2003, Japon	DMLA, myopathie pathologique	690	
Photolon™	Chlorine e6 - PVP	Chlorine	2001, Biélorussie Russie	Cancer de la peau, cerveau, pharynx	665	
Laserphyrin®	Talaporfine/ MACE/NPe6	Chlorine	2004, Japon	Cancer des poumons	664	
Photosens®	Phthalocyanine d'aluminium sulfonaté	Phtalocyanine	2001, Russie	DMLA, cancers divers	675	
ATMPn®	9-Acetoxy-2,7,12,17-tetrakis-(β-methoxyethyl)-porphycène	Porphycène	1997, Allemagne	Psoriasis et cancer de la peau	640	

Tableau 1. Principaux photosensibilisateurs approuvés en clinique [6,7,23]

Abréviations : 5-ALA : acide 5-aminolevulinique ; DMLA : Dégénérescence maculaire lié à l'âge ; HpD : hématoporphyrine ; MACE : mono-(L)-aspartylchlorine-e6 ; m-THPC : méta-tétra(hydroxyphényl)chlorine ; NPe6 : N-aspartyl chlorine e6 ; PVP : Polyvinylpyrrolidone.

- Les PS de 3ème génération

Depuis peu, des PS de 3ème génération font leur apparition pour améliorer la sélectivité tumorale tout en limitant leur accumulation au niveau des tissus sains et ainsi diminuer les effets secondaires. Cette génération de PS permet également d'accroitre leur incorporation cellulaire et leur biodisponibilité grâce à un ciblage dit passif (cf §2.1.2). Ces PS sont généralement des molécules de 2ème génération introduites dans un vecteur de taille nanométrique. Les nanovecteurs couramment utilisés en PDT sont des nanoparticules (NP) organiques comme les liposomes, micelles, NP polymériques de poly(lactic-co-glycolic acide)(PLGA) ou NP inorganiques comme les NP d'or ou de silice [27].

Ces vecteurs peuvent porter à leur surface des agents ciblant les cellules cancéreuses de manière spécifique [28]. Diverses modifications de surface sont, à ce jour, utilisés comme : des groupements chimiques (acides aminés, sucres, peptides, …), des anticorps ou des récepteurs spécifiques (acide folique, transferrines, …) visant à induire un ciblage actif [7].

1.2.3. Importance de la localisation du photosensibilisateur

Le temps de demi-vie de l'$^1O_2$ étant très court (40 ns dans la cellule) ainsi que son champ d'action (10-45 nm), la localisation du PS au niveau sub-cellulaire détermine les dommages moléculaires photoinduits responsables de l'effet cytotoxique de la PDT [1].

- Localisation intracellulaire du photosensibilisateur

La distribution intracellulaire des PS dépend de la charge ionique : de -4 (anionique) à +4 (cationique), du degré d'hydrophobicité ainsi que de l'asymétrie structurale de la molécule.

Les PS hydrophobes ayant une charge négative infèrieure à -2 diffusent au travers des membranes plasmiques. Par la suite, ces PS ont la capacité de se relocaliser au niveau des organites intracellulaires. Ces propriétés leur confèrent une plus grande facilité à s'accumuler, même à faible concentration (<1 µM), dans les cellules *in vitro* [29]. En terme d'exemple, l'hypéricine, un PS connu pour son importante hydrophobicité, se localise préférentiellement au niveau du réticulum endoplasmique (RE) [30]. Les PS moins hydrophobes, comme la talaporfine (Npe6), ont une charge ionique supérieure à -2 et sont trop polaires pour diffuser au travers des membranes et entrent dans les cellules par endocytose. Il a été démontré que l'ajout d'oligosaccharide à la

surface du PS permettait d'augmenter sa solubilité en le rendant plus hydrophile entrainant une augmentation de l'accumulation tumorale et une modification de la localisation subcellulaire [31]. Par conséquent, ces PS se localisent préférentiellement au niveau des lysosomes qui est l'organite cible de l'endocytose.

La plupart des PS ont une forte affinité pour la mitochondrie, organite central de l'apoptose. Celle-ci est rapidement induite après PDT et, de ce fait, l'apoptose photoinduite est une des caractéristiques de la PDT [32]. De plus, les PS ayant une structure voisine de la protoporphyrine IX (PpIX) sont des ligands des récepteurs périphériques des benzodiazépines présents dans la mitochondrie et s'y localise préférentiellement [33]. Une relocalisation mitochondriale du PS suite à une irradiation a également été démontrée. En effet, un derivé porphycène, initialement présent dans le RE, présente la capacité de se relocaliser dans la mitochondrie suite à une irradiation [34].

- Localisation intratissulaire du photosensibilisateur

L'hydrophobicite du PS joue également un rôle sur sa localisation intratissulaire. En effet, les PS hydrophobes ont la capacité de se lier aux lipoprotéines de faible densité (LDL) dont les récepteurs sont surexprimés dans les tissus tumoraux [35].

In vivo, la localisation du PS dans les différents compartiments de la tumeur (vasculaire *vs* cellulaire) est déterminante. La localisation tumorale dépend des propriétés pharmacocinétiques du PS et peut être manipulée par l'intervalle drogue-lumière (IDL) qui est l'intervalle de temps entre l'administration du PS et l'irradiation. Il a été montré qu'un IDL court favorise la localisation vasculaire du PS et que les dommages photoinduits à ce niveau jouent un rôle essentiel dans la cure tumorale [7]. Au contraire, un IDL long favorise une accumulation des PS au niveau des cellules tumorales conduisant à une forte cytotoxicité [36]. Les données de la littérature ont mis en évidence que le plus grand nombre de cure tumorale est obtenu en cas de dommages produits au niveau du parenchyme tumoral combiné à des dommages au niveau des néovaisseaux tumoraux [10].

1.3. La méta-tétra-(hydroxyphényl)chlorine (mTHPC)

1.3.1. Caractéristiques

La mTHPC (Temoporfin, Foscan®) est l'un des PS de 2ème génération les plus puissants connus à ce jour. Approuvé en clinique depuis 2001, ce PS est utilisé pour le traitement des petites tumeurs (~1 cm de diamètre) des cancers de la tête et du cou ne pouvant pas être traitées par d'autres modalités thérapeutiques. La photosensibilisation cutanée est diminuée comparé à celle produite par le Photofrin® (4-12 semaines), mais reste non négligeable (3-6 semaines) [26]. La PDT réalisée avec le Foscan® est appliquée 96 heures après l'injection dans la circulation sanguine à une dose de 0,15 mg/kg avec une intensité lumineuse de 10 J/cm^2, 10 fois plus faible que celle

utilisée avec le Photofrin®. Une étude clinique réalisée sur 128 patients dans ces conditions expérimentales a permis de mettre en évidence une augmentation de la qualité de vie des patients ainsi qu'une importante réduction tumorale [37].

La mTHPC est un composé tétrapyrrolique (Figure 6) issu de la réduction d'une double liaison de la méta-tétra(hydroxyphenyl)porphyrine [38]. Cette molécule répond en partie aux caractéristiques idéales d'un PS comme une faible toxicité à l'obscurité, une composition pure à plus de 99% et un fort rendement quantique en état triplet (0,89 dans le méthanol) ce qui lui confère la capacité de produire une quantité importante d'$^1O_2$ (rendement quantique 0,43-0,46 dans le méthanol) [39].

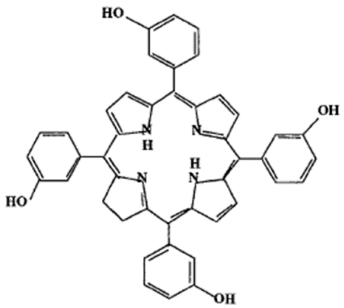


Figure 6. Structure moléculaire de la mTHPC [38]

La mTHPC possède également des propriétés spectrales d'absorption et d'émission de fluorescence compatibles avec son utilisation *in vivo*. En effet, si son maximum d'absorption se trouve dans la bande de Soret à 420 nm (Figure 7), un pic d'absorption dans le rouge lointain à une longueur d'onde de 652 nm permet son utilisation en PDT. [38] De plus, cette molécule présente un coefficient d'absorption élevé à 652 nm : 22400 $M^{-1}cm^{-1}$ dans le méthanol comparé à 1170 M^{-1} cm^{-1} pour le Photofrin®.

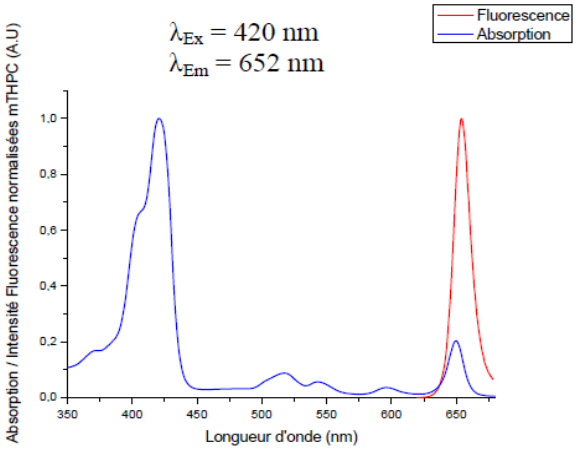


Figure 7. Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence de la mTHPC

Le maximum d'absorption de la mTHPC se trouve à 420 nm. Un pic d'absorption est également présent à 652 nm permettant l'utilisation de la mTHPC en PDT.

1.3.2. Interactions cellulaires *in vitro*

➢ Localisation subcellulaire de la mTHPC

La distribution intracellulaire de la mTHPC, en partie influencée par son degré d'hydrophobicité, lui confère une grande affinité pour les structures membranaires. Après avoir traversé les membranes plasmiques par diffusion passive, la mTHPC se localise au niveau des organites intracellulaires tels que l'appareil de Golgi, le RE et la mitochondrie [29]. Aucune localisation nucléaire n'a été reportée dans la littérature.

La localisation subcellulaire de la mTHPC est dépendante de deux paramètres principaux :

- **de la lignée cellulaire** avec laquelle est réalisée l'étude [40]. Dans une lignée de carcinome mammaire (MCF-7), aucune localisation dans les lysosomes n'a été mise en évidence [41]. En revanche, dans une lignée cancéreuse de colon (Colo-201), une importe localisation lysosomale a été mise en évidence après 20 heures d'incubation avec la mTHPC [40].
- **des conditions d'incubation** des cellules (temps et concentration) avec la mTHPC. En effet, dans les cellules MCF-7, après 3 heures d'incubation, la mTHPC se localise préférentiellement dans l'appareil de Golgi ainsi que dans le RE [41]. En revanche, après 24 heures d'incubation, la localisation subcellulaire de la mTHPC est modifiée en faveur de la mitochondrie et du RE, deux organites cibles de la mort cellulaire par apoptose [42,43].

➢ Relation entre localisation subcellulaire et mort cellulaire

Cette localisation multiple contribue à la complexité des voies apoptotiques initiées par la mTHPC/PDT à de faibles doses de lumière [13,43]. Un changement morphologique des mitochondries [44], une rapide dépolarisation de leur membrane ainsi qu'une libération du cytochrome C ont été constatées durant un traitement mTHPC/PDT. [45] Ces phénomènes pourraient s'expliquer par une translocation de la protéine pro-apoptotique Bax au moment de l'irradiation et ainsi activer la cascade des caspases responsable de l'apoptose [46].
Après une irradiation à de faibles doses de lumière (5 J/cm^2), un important clivage de la protéine PARP est observé conduisant à l'initiation de l'apoptose par la voie intrinséque (dépendante de la mitochondrie) [47]. Plus récemment, Meier et *al.* ont utilisé un inhibiteur (Z-VAD-FMK) du clivage de PARP mettant en évidence une induction de l'apoptose dépendante de la voie de la caspase-3 après mTHPC/PDT [48]. Parallèlement, un clivage massif de la caspase-7 est constaté suggerant une

implication du RE dans les mécanismes de mort cellulaire ainsi qu'une induction de l'apoptose par la voie extrinséque [43].

Une localisation mitochondriale du PS peut également entrainer de l'autophagie. Sasnauskiene et *al*. ont suivi ce mécanisme par immunofluorescence et ont mis en évidence une forte interaction entre apoptose et autophagie. L'autophagie représente probablement une voie de survie cellulaire qui se termine par l'apoptose lorsque les dommages cellulaires sont trop importants. En effet, pour 50% de dommages cellulaires, les cellules présentent une augmentation de l'autophagie mais une absence d'apoptose. En revanche, pour 80% de dommages cellulaires, un relargage du cytochrome C ainsi qu'une activation des caspases est observée combiné à l'autophagie [49]. Une autre étude a montré qu'en cas de stress oxidatif au niveau du RE, la protéine associée aux microtubules LC3-I est convertie en LC3-II, un des marqueurs de l'autophagie [15].

La quantité de nécrose augmente avec le temps post-mTHPC/PDT et avec les doses de lumière appliquée. En effet, à une dose de lumière de 0,26 J/cm^2, seulement 21,6% de nécrose est observée alors qu'avec une dose de lumière de 1,92 J/cm^2, 75% de nécrose est constatée [13]. Ainsi, après une irradiation à fortes doses de lumière, la PDT médiée par la mTHPC entraine une forte nécrose au niveau tumorale. *In vivo*, après une i.v de mTHPC à 0,15 mg/kg suivie de l'application de la PDT, une surface nécrotique de 10 mm^2 apparaît au niveau tumoral contrarement aux souris controles sans mTHPC où la surface n'est que de 0,3 mm^2 [50]. Cette forte induction de nécrose post mTHPC/PDT a également été observée après i.v avec des formulations liposomales de mTHPC (cf §2.3) [51].

1.3.3. Pharmacocinétique et biodistribution

Le comportement particulier du Foscan® dans le plasma est responsable de ses propriétés pharmacocinétiques et de sa biodistribution inhabituelles [38].

- <u>Comportement de la mTHPC dans le plasma</u>

Dans le plasma, la liaison de la mTHPC avec les différentes protéines plasmatiques est de 95% et son association avec les lipoprotéines de haute densité (HDL) est deux fois plus importante que celle obtenue avec les lipoprotéines de faible densité (LDL) [52]. En effet, l'estimation de la distribution de la mTHPC dans le sérum montre que 60% du Foscan® se lie aux HDL, immédiatement après injection [29,53]. Cette forte liaison est suivie d'une lente redistribution de la mTHPC vers les autres protéines plasmatiques.

La pharmacocinétique très longue de la mTHPC chez l'homme, avec une concentration maximum à 10-24 heures après l'injection et une demi-vie plasmatique de 30 à 45 heures, peut en partie entre expliquée par son importante affinité pour les protéines plasmatiques [38,54]. La présence d'agrégats est un second phénomène pouvant expliquer cette pharmacocinétique particulière. En effet, de par sa nature hautement hydrophobe, 20% de la mTHPC se retrouve sous forme agrégée en présence de lipoprotéines ce qui diminue son accumulation tumorale. Cette agrégation entraine une diminution de la fluorescence, une augmentation de la prise en charge par les macrophages et une distribution retardée vers les tissus tumoraux [55].

- Biodistribution de la mTHPC

Des études de distribution et d'excrétion de la mTHPC dans un modèle murin, réalisées par Whelpton et *al.,* mettent en évidence une absence de mTHPC dans les urines (moins de 0,2%). De plus, 40% de la mTHPC sont excrétés dans les selles après une seule journée et 75% après une semaine [56]. Au sein des différents tissus, la concentration maximale de mTHPC est dépendante de l'espèce animale. Cependant, le profil de distribution de la mTHPC dans les différents organes pour toutes les espèces testées est similaire. Les organes les plus perfusés contiennent la plus grande concentration en mTHPC (poumons, foie, reins et rate) et aucun passage de la barrière encéphalo-rachidienne n'est démontré [57]. Chez le rat, la concentration la plus importante de mTHPC dans la tumeur est observée 24 heures après injection, parallèlement au pic de mTHPC au niveau musculaire. Cependant, la concentration maximale dans la peau est obtenue 96 heures après injection [58].

La concentration intratumorale en mTHPC n'est pas le seul facteur déterminant pour l'efficacité de la PDT [59]. En effet, la localisation des dommages post-PDT et son efficacité sont dépendantes de l'IDL. L'application d'un IDL court (3 heures) entraine une localisation du PS exclusivement vasculaire en raison d'une forte séquestration de la mTHPC dans les cellules contrairement à un IDL long (> 24 heures) qui favorise l'accumulation de la mTHPC à distance des vaisseaux [53,60]. La présence de mTHPC à distance des vaisseaux s'expliquerait par la prolifération cellulaire dans les zones oxygénées, qui éloignerait les cellules contenant la mTHPC. Dans le même temps, la clairance plasmatique priverait les nouvelles cellules de mTHPC [60]. Un IDL court entraîne l'apoptose des cellules endothéliales après PDT alors qu'un IDL de 24 heures montre peu d'effets sur les cellules (vaisseaux intacts, peu d'apoptose). L'efficacité de la PDT est maximale lors de la destruction simultanée des vaisseaux et des cellules tumorales lorsqu'une apoptose massive est observée 24 heures après irradiation [10].

LA VECTORISATION

L'accumulation sélective des molécules au niveau tumoral est une nécessité cruciale en cancérologie. D'une part, leur diffusion au travers de la paroi vasculaire des tissus sains génère des évènements toxiques limitant leur accumulation tumorale. D'autre part, la mauvaise solubilité des principes actifs réduit considérablement leur biodisponibilité. Ainsi, une nouvelle approche thérapeutique consiste à associer la molécule à une structure de taille nanométrique appelée nanovecteur ou NP afin d'encapsuler et de véhiculer le principe actif vers le tissu tumoral.

2.1. Généralités

2.1.1. Intérêt de la vectorisation

La nanovectorisation contribue à améliorer la biodistribution par une accumulation plus sélective dans la tumeur. De plus, les nanovecteurs permettent de s'affranchir des problèmes de solubilité et de stabilité des composés hydrophobes mais également de protéger la molécule des interactions indésirables avec son environnement et limiter sa dégradation ou son excrétion [61,62].

- Améliorer la solubilité et stabilité de la molécule

Une mauvaise solubilité dans l'eau des molécules limite leur biodisponibilité et peut gêner le développement de nouvelles molécules thérapeutiques [61]. La vectorisation permet ainsi d'améliorer les propriétés de composés dont l'utilisation est limitée en raison d'une faible solubilité dans l'eau. La curcumine, qui possède une très faible solubilité dans l'eau (11 ng/mL) et une faible stabilité à pH alcalin, a une utilisation clinique limitée en raison de ces propriétés physicochimiques. Ainsi, son incorporation dans un nanovecteur de type micelle a permis d'augmenter sa solubilité de 25 000 fois et d'augmenter sa stabilité à 7 jours [63].

La faible solubilité de la plupart des PS en milieu biologique rend leur injection dans la circulation sanguine délicate. Ainsi, l'ajout de sucres à leur surface permet de cibler préférentiellement les cellules cancéreuses en raison d'une glycolyse augmentée par rapport aux cellules saines. Il a été montré que la présence de sucres combiné à de la phthalocyanine améliore l'incorporation cellulaire mais également la cytotoxicité [64]. De plus, cette stratégie permet de diminuer l'hydrophobicité des PS en créant des dimères amphiphiliques qui montrent une activité plus importante [28].

➢ Protéger la molécule

Une faible biodisponibilité, en raison d'une importante dégradation, peut affecter les performances de la molécule entrainant une forte variabilité. Une solution proposée est son intégration au sein d'une NP [65]. Par exemple, l'utilisation de NP lipidiques protège la cyclosporine A de l'hydrolyse grâce à une diminution de l'accessibilité des enzymes [66]. De plus, l'encapsulation d'insuline dans une NP composée de polyacrylates, connus pour supprimer l'action des trypsines, permet de la protéger à 45% de la dégradation par les enzymes digestives [67].

L'intégration de la molécule dans un nanovecteur empêche sa dégradation mais également la protège d'une agrégation et donc d'une éventuelle inactivation. Ainsi, l'encapsulation de la phtalocyanine d'aluminium (un PS de 2nde génération) dans des NP de polycaprolactone PEGylées permet d'améliorer les propriétés optiques du PS avec une augmentation de la fluorescence et surtout une absence d'agrégation de la molécule [68].

➢ Contourner la résistance aux médicaments

La résistance des cellules cancéreuses vis-à-vis des agents thérapeutiques limite leur incorporation tumorale pouvant affecter l'efficacité du traitement [69]. De nombreux mécanismes sont connus pour entrainer cette résistance et notamment une surexpression de la glycoprotéine P (Pgp) qui est un transporteur membranaire fonctionnant comme une pompe à efflux, expulsant les molécules hors des cellules. Intégrer une molécule dans une NP permet de prolonger son temps de circulation dans l'organisme et d'augmenter son accumulation tumorale afin de contrebalancer cet efflux excessif. Ainsi, des stratégies existent pour contourner cette résistance :

- **Intégrer un modulateur/inhibiteur de la Pgp** : L'ajout d'un anticorps anti-Pgp à la surface de NP de PLGA chargées de paclitaxel (PTX) et de curcumine permet de considérablement réduire le volume tumoral et d'augmenter de 3,5 fois le pourcentage de cellules apoptotiques [70]. Charger des NP de polyalkylcyanoacrylate avec de la doxorubicine (DOX) et de la cyclosporine A, un modulateur de la Pgp, permet diminuer de 2 fois la concentration nécessaire pour obtenir 50% de mort cellulaire (IC50) comparée aux NP de DOX [71].
- **Associer 2 principes actifs :** Lu et *al.* ont réalisé des micelles chargées de dendrimères de phthalocyanine combiné à de la DOX. Une activité synergique a ainsi été mis en évidence avec une augmentation du pourcentage d'inhibition tumorale après PDT *in vivo* de 3,5 fois et 2,5 fois en comparaison de la DOX libre et des micelles de phtalocyanine seules respectivement [72].

- Améliorer l'accumulation, le ciblage tumoral et la biodistribution

Une stratégie permettant d'augmenter l'accumulation et le ciblage tumoral est l'utilisation des nanovecteurs chargés à la fois de PS et de NP magnétiques. En effet, le guidage magnétique à l'aide d'un aimant permet d'amener les NP jusqu'au site tumoral. Ainsi, des NP d'oxyde de fer superparamagnétiques chargées d'hypericine ont montré une importante accumulation par endocytose au niveau des cellules tumorales ainsi qu'une forte efficacité thérapeutique en raison des propriétés de guidage des NP et une réduction des effets secondaires pour une future application clinique [73].

La biodistribution des agents anticancéreux, y compris des PS, est définie par les propriétés physico-chimiques des NP et conditionnent leur pénétration au sein du tissu tumoral (cf §2.2). Li et *al.* ont mis en évidence une amélioration du ciblage tumoral par le PS hypocrelline B après encapsulation dans une NP de poly butyl-cyanoacrylate (1,5 fois supérieure à l'hypocrelline B libre) 4 heures après i.v [74].

2.1.2. Ciblage passif et actif

Les nanovecteurs utilisent deux stratégies de ciblage : passif grâce aux propriétés des tissus tumoraux et l'effet EPR (*Enhanced permeability and retention*) et actif grâce à une fonctionnalisation des NP.

- Ciblage passif

Les NP dites de première génération utilisent le ciblage passif. Le transport de la molécule jusqu'à la tumeur *via* la circulation sanguine est dépendant des particularités physiologiques de la tumeur comme un réseau vasculaire hiérarchique, une augmentation de la pression interstitielle ou encore un mauvais drainage lymphatique.

La structure anormale des vaisseaux tumoraux engendre une fuite des molécules et NP de la circulation sanguine vers les tissus tumoraux grâce aux pores vasculaires (200 – 800 nm) [75]. De plus, le faible retour veineux dû à un mauvais drainage lymphatique des tissus permet aux molécules et NP d'être retenues spécifiquement dans le tissu tumoral (Figure 8). L'ensemble de ces phénomènes est appelé effet EPR. Cet effet a été décrit pour la première fois par Matsumura & Maeda en 1986 après l'observation d'une extravasation excessive et d'une accumulation durable du complexe « evans blue »/albumine dans les tumeurs solides [76].

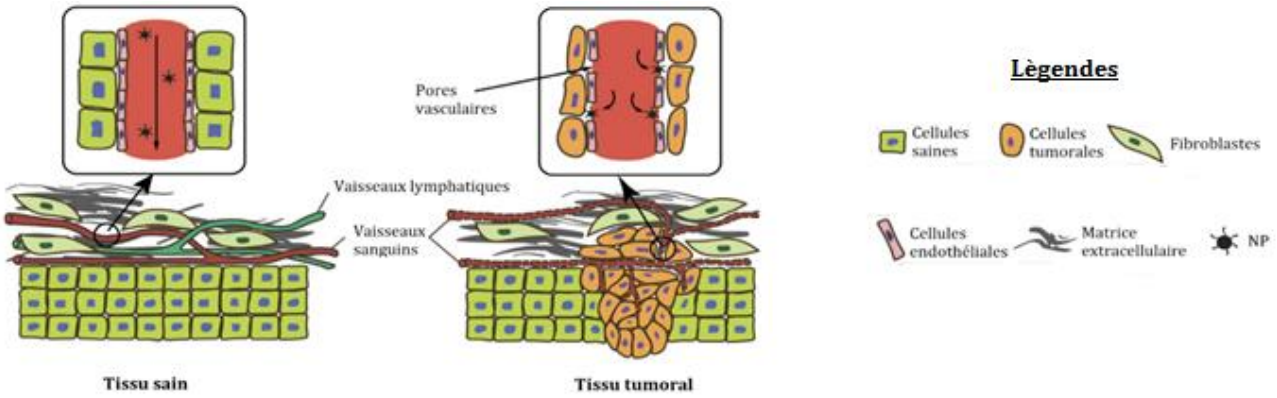


Figure 8. Comparaison structurale entre tissu sain et tissu tumoral [77]

Les tissus tumoraux montrent une désorganisation du réseau vasculaire avec la présence de pores permettant une extravasation des NP dans la tumeur. Comparés aux tissus sains, un manque de vaisseaux lympatiques est également observé.

L'effet EPR présente certaines limites largement discutées dans de nombreuses revues. Il s'agit notamment de la forte variabilité des types tumoraux (taille, localisation, zone nécrotique importante) ainsi que la nature du réseau vasculaire (faible ou richement vascularisé). Toutefois, la forte capture par le système des phagocytes mononucléés (MPS) représente la limitation la plus importante [78–80]. En effet, le MPS capture les NP et les conduit dans les organes riches en cellules phagocytaires (foie, rate et poumons), les empêchant d'atteindre la tumeur de manière sélective. Dès lors, seulement 5% de la dose injectée s'accumule réellement dans la tumeur [81].

Bien que l'effet EPR ait ses limites, ce processus reste à la base du ciblage tumoral passif et peut être mis à profit pour permettre la libération des NP au niveau tumoral afin d'y augmenter leur accumulation [79]. Cet effet est amélioré lors d'un traitement à la hyaluronidase dans le but d'augmenter la perfusion tumorale et ainsi l'accumulation de NP PEGylées chargées du PS chlorine e6 dans la tumeur. Ce résultat est corrélé avec une amélioration de l'efficacité PDT montrant une complète inhibition de la croissance tumorale après PDT [82]. Une seconde stratégie consiste à rendre les NP furtives en ajoutant à leur surface des polymères hydrophiles permettant ainsi d'échapper au MPS et d'augmenter leur temps de demi-vie dans la circulation sanguine [83]. Des auteurs se sont également servis de cette forte capture par le MPS pour cibler de manière sélective les cellules immunitaires dans le but de traiter les leucémies à l'aide de NP d'or [84].

Le ciblage passif peut être associé au ciblage actif avec la conception de NP de nouvelles générations portant à leur surface des stimulants. Le but est de déclencher localement la libération du principe actif dans la tumeur après accumulation des NP par effet EPR. Cette libération peut s'effectuer par l'activation de stimuli internes (pH, potentiel rédox, enzyme, …) ou externes (température, lumière, ultrasons, …) [85].

➢ Ciblage actif

Un ciblage actif peut être réalisé grâce à la synthèse de NP fonctionnalisées portant à leur surface un motif de ciblage accessible et spécifique de la zone tumorale permettant la reconnaissance des cellules cancéreuses [86]. Les cellules tumorales possèdent à leur surface des récepteurs membranaires surexprimés ou spécifiques. Ainsi, les NP de seconde génération portent à leur surface les ligands spécifiques de ces récepteurs membranaires permettant une reconnaissance des cellules cibles (Figure 9). Par exemple, l'utilisation de NP d'or PEGylées chargées de phthalocyanine ciblant les récepteurs au facteur de croissance épidermiques (*Human epidermal growth factor receptor-2)* améliorent l'efficacité anti-tumorale [87]. Cette observation peut s'expliquer par l'augmentation de l'internalisation cellulaire grâce à une incorporation de la NP par endocytose [88].
De nombreux anticorps sont utilisés comme agents de ciblage mais un large panel de ligands a été décrit dans la littérature comme des peptides, des protéines, des aptamères et des oligonucléotides [61]. Des NP de chitosan chargées de mTHPC conjuguées au peptide arginine-glycine-acide aspartique (RGD) ont montré une augmentation de l'accumulation intratumorale dans des tumeurs riches en intégrine corrélé à une forte inhibition de la croissance tumorale post PDT (61,3% vs 35% pour des NP non conjuguées) [89].

Il est également possible de cibler des récepteurs surexprimés à la surface des cellules endothéliales (Figure 9), particulièrement les molécules d'adhésion cellulaire (CAM), permettant de réduire l'apport sanguin au niveau tumoral, la privant d'oxygène et de nutriments. L'utilisation de liposomes PEGylés modifiés avec l'anticorps anti-VCAM a mis en évidence une augmentation de l'accumulation liposomale ainsi qu'une sélectivité tumorale accrue [90].

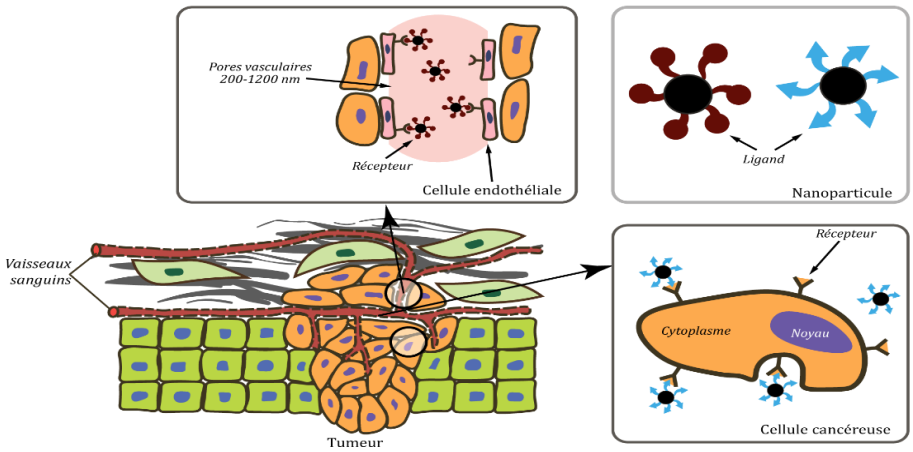


Figure 9. Internalisation cellulaire d'une nanoparticule par ciblage actif

Le ciblage actif consiste en la reconnaissance entre un ligand spécifique à la surface d'une NP et son récepteur membranaire présent à la surface de la cellule cancéreuse ou des cellules endothéliales.

2.1.3. Internalisation des vecteurs par endocytose

L'endocytose est un processus cellulaire utilisé par les cellules pour internaliser des éléments présents dans son environnement extracellulaire. Contrairement aux petites molécules qui sont incorporées par diffusion passive au travers des membranes plasmiques, les NP sont internalisées par ce mécanisme [91]. Deux grands types d'endocytose sont connus : l'endocytose des phases fluides (micropinocytose) et l'endocytose médiée par récepteur (EMR). L'endocytose des phases fluides étant essentiellement dépendante de l'état physiologique de la cellule [92], nous nous intéresserons à l'EMR.

Dans l'EMR, un ligand se fixe sur un récepteur membranaire présent à la surface des cellules entrainant une internalisation du complexe ligand/récepteur à l'intérieur d'une vésicule. Deux voies d'entrées dans les cellules ont été identifiées, variant selon la NP et le ligand sollicité.

- La phagocytose

La phagocytose est réservée aux cellules spécialisées appelées cellules phagocytaires tels que macrophages, cellules dendritiques, polynucléaires et cellules de Langerhans. Elle participe à l'élimination de particules, de cellules endommagées et coordonne le système immunitaire. Elle permet l'internalisation de particules de très grandes tailles (supérieure à 0,5 µm) exigeant une importante flexibilité du cytosquelette. Après opsonisation de la particule à phagocyter, elle est internalisée dans la cellule par l'intermédiaire d'une vésicule appelée phagosome. Après fusion de cette dernière avec les lysosomes, la particule est recyclée (Figure 10).

- La pinocytose

C'est un processus utilisé par la plupart des cellules qui se subdivise en 4 mécanismes (Figure 10):

- **Macropinocytose** : C'est un mécanisme dépendant de l'actine et des protéines stimulant le cytosquelette (protéines kinases) permettant l'internalisation de grandes quantités de NP présent dans le milieu extracellulaire. La cellule forme des prolongements cytoplasmiques permettant la capture de NP d'une taille supérieure à 200 nm. Elles sont ensuite internalisées dans des vésicules renfermant une grande quantité de fluides extracellulaires appelées macropinosomes fusionnant avec les endosomes précoces [93].
- **Voie dépendante des clathrines** : Cette voie se caractérise par la formation de puits recouverts de clathrines qui se lient sur les récepteurs spécifiques. Les NP d'environ 120 nm piégées dans les puits sont internalisées dans la cellule à la suite de la formation d'une vésicule ayant la capacité de se détacher de la membrane plasmique grâce à l'action d'une GTPase : la dynamine. La vésicule perd son manteau de clathrine lui permettant de fusionner avec les endosomes précoces dans lesquelles les NP sont triées et dirigées vers les lysosomes où elles

sont dégradées. L'utilisation d'inhibiteur spécifique (phenylarsine oxide) a mis en évidence une incorporation cellulaire de la phtalocyanine conjuguée à l'acide poly-L-glutamique préférentiellement par cette voie d'endocytose corrélée à une forte localisation lysosomale [94].

- **Voie des cavéoles** : Après internalisation de la NP, une vésicule se forme et se détache de la membrane plasmique par l'action de la dynamine. Elle peut directement fusionner avec les endosomes précoces ou des endosomes particuliers appelés cavéosomes formés de phospholipides, sphingolipides, cavéolines et de cholestérol, indispensable à leur stabilité [95]. L'inhibition des cavéolines empêche l'internalisation cellulaire des exosomes mettant en évidence une utilisation préférentielle de cette voie pour des nanovecteurs naturels [96]. Il a également été montré que des dendrimères PEGylés de chlorine e6 chargés négativement utilisent préférentiellement cette voie d'endocytose [97]. Dans certains cas, la NP contourne les endosomes précoces et se retrouve dans les lysosomes. Sahay et *al.* ont mis en évidence ce phénomène grâce à des micelles polymériques suggérant une dérégulation de l'endocytose dans les cellules cancéreuses [91].
- **Voies indépendantes des clathrines et des cavéoles** : Dans ces mécanismes, une absorption non spécifique des NP à la surface des cellules est observée grâce à des forces intermoléculaires (interactions de nature hydrophobiques et liaisons hydrogènes) [98]. La **voie RhoA** *(Homologue du gène Ras, member A)* est dépendante de l'action de cette GTPase et de la dynamine. Elle est impliquée dans l'internalisation de récepteurs comme les récepteurs à l'interleukine-2 [99]. Les **voies de la flottine** et **CDC-42** (Homologue de la protéine de contrôle 42 de la division cellulaire) sont indépendantes de la dynamine mais encore mal caractérisées.

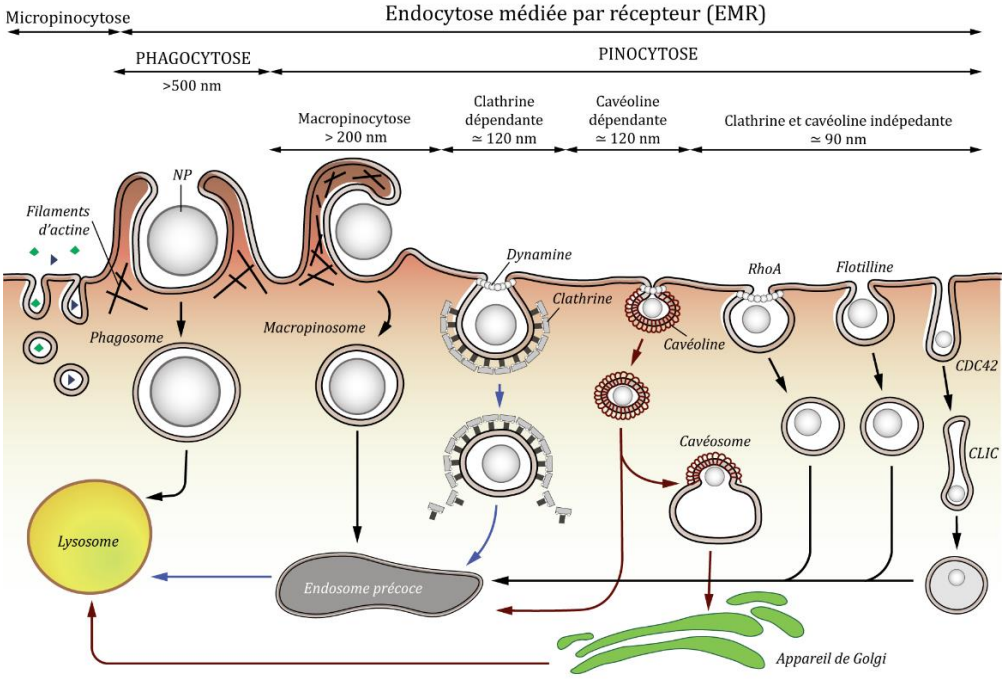


Figure 10. Voies d'entrée des nanoparticules dans les cellules par endocytose (d'après [98])

L'EMR est divisée en deux grands mécanismes : la phagocytose pour les plus grosses NP et la pinocytose également subdivisée en quatre mécanismes dépendant une reconnaissance récepteur/ligand.

2.2. Impact des propriétés physicochimiques des nanovecteurs sur l'accumulation et la pénétration dans les tissus tumoraux

Les propriétés structurales des NP telles que la taille, la forme, la charge ou le poids moléculaire jouent un rôle essentiel dans la pénétration des agents anticancéreux dans les tumeurs solides (Figure 11). Tous les paramètres physicochimiques assignés à une molécule sont cruciaux pour son transport et sa distribution dans les milieux biologiques. Cependant, le poids de chacun de ces paramètres reste difficile à évaluer. C'est pourquoi, de nombreuses revues scientifiques donnent des informations judicieuses pour répondre à cette question complexe [79,100,101].

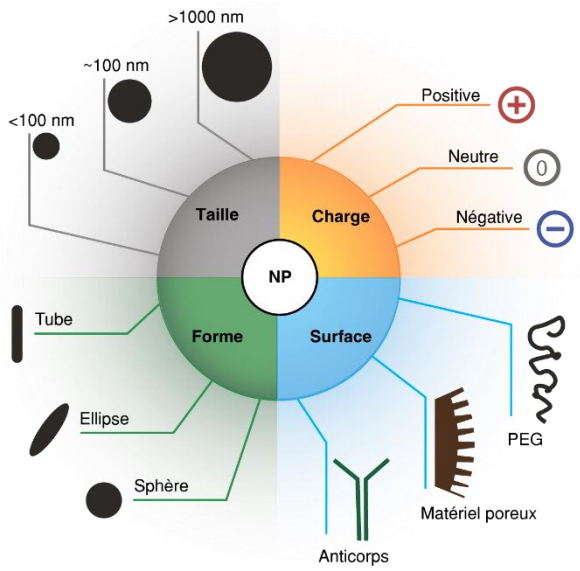


Figure 11. Paramètres des nanoparticules influençant leur accumulation et pénétration dans la tumeur [77]

2.2.1. Influence de la taille

Une circulation prolongée des molécules dans le système sanguin implique une taille de molécules supérieures à 5,5 nm pour éviter l'élimination rénale. Dans le cas de tumeurs peu vascularisées, les NP de petites tailles sont les seules à avoir la capacité de pénétration au sein du tissu. Par exemple, des tumeurs pancréatiques soumises à diverses micelles polymériques de platinium (30, 50, 70 et 100 nm) ont montré un effet thérapeutique important uniquement avec les NP de 30 nm de diamètre, suggérant qu'un réseau vasculaire restreint empêche la pénétration des grosses NP [102]. Une seconde étude a mis en évidence une meilleure capacité à diffuser à distance des vaisseaux avec des micelles de 25 nm contrairement aux mêmes micelles de 60 nm

(42 µm et 23 µm de profondeur respectivement) [103]. Cependant, la diffusion de petites NP dans le compartiment vasculaire, où elles sont facilement éliminées de la circulation sanguine, constitue un inconvénient majeur pour l'accumulation tumorale [104]. En effet, les très petites micelles (15 nm) pénètrent rapidement et profondément dans le tissu tumoral mais ne sont pas retenues contrairement aux micelles de 55 nm qui possèdent la capacité de s'accumuler dans la couche externe de la tumeur [105].

Ainsi, l'augmentation de taille, bien que réduisant la diffusion intratumorale, augmente le temps de demi-vie plasmatique, le temps d'extravasation vasculaire ainsi que l'accumulation tumorale [79]. Globalement, un diamètre compris entre 70 et 100 nm pour les NP est considéré comme optimal pour échapper à une clairance importante et atteindre l'extravasation vasculaire dans le cas de tumeur richement vascularisée [100,107]. Il a été montré que des liposomes composés de phosphatidylcholine et cholestérol d'un diamètre de 100 nm sont 4 fois plus concentrés dans la tumeur que ceux de 300 nm fortement captés par la rate [106]. Un second exemple peut être donné par des NP d'or conjuguées à de la PpIX d'un diamètre de 66 nm présentant l'accumulation cellulaire la plus importante comparée aux mêmes NP de 19 et 106 nm de diamètre. Ce résultat, combiné à une amélioration de la production d'ERO, est en corrélation avec l'augmentation de la destruction tumorale [108]. Afin d'optimiser la pénétration et la distribution intratumorale des NP, un nouveau système a été proposé. Des NP de gélatine d'environ 100 nm composées de quantum dots (QD) de 10 nm ont été développées permettant ainsi une augmentation du temps de demi-vie plasmatique. A la suite de leur extravasation, la NP de gélatine est dégradée permettant ainsi la libération des petites NP qui diffuseront en profondeur dans la tumeur [109].

2.2.2. Influence de la forme

Un autre point jouant un rôle critique dans le temps de demi-vie plasmatique et l'accumulation tumorale est la forme de la NP. Beaucoup de NP utilisées en cancérologie pour la délivrance de médicaments sont de formes sphériques mais d'autres formes sont également développées comme les nanos-aiguilles, nanotubes, nanodisques, filaments micellaires ou encore les formes ellipsoïdales [110]. Une étude montre que les NP sphériques d'or de 74 et 14 nm de diamètre s'accumulent d'une manière plus importante dans les cellules cancéreuses que les NP tubulaires d'or de 74x14 nm [111]. Plus récemment, Champion et Mitragotri ont démontré que les NP sphériques sont plus sujettes à la phagocytose par des macrophages que les NP en forme de bâtonnets. Les auteurs suggèrent que la forme de la NP influence leur capacité à adhérer à la cellule en fonction de son rayon de courbure (Ω) et influence donc leur internalisation cellulaire

[112]. En effet, les NP sont plus internalisées quand le Ω est inférieur à 45° (forme sphérique) alors que les NP avec un Ω supérieur à 45° (forme d'ellipse) ne sont pas internalisées.

Le ratio d'aspect (largeur/hauteur) de la NP impact les performances photodynamiques. En effet, comparés à des nanosphères d'or de même composition, des nanotubes d'or chargés de phtalocyanine provoquent une augmentation de l'activité photodynamique, attribuée à une hausse de l'absorption lumineuse [113]. *In vivo*, ce ratio influence l'élimination de la NP de l'organisme ainsi que son transport au travers des pores vasculaires [110]. Il a été montré que les nanotubes de carbones avec un haut ratio sont efficacement éliminés par les reins malgré des dimensions 10 à 20 fois supérieures au seuil de filtration glomérulaire. Les auteurs suggèrent que les NP de forme allongée présentent un avantage considérable dans le processus de filtration [114]. Enfin, des nanotubes avec une longueur de 44 nm (ratio d'aspect : 10 nm), comparés à des nanospheres de 35 nm de diamètre, possèdent une extravasation 4 fois plus rapide et diffusent en profondeur dans le tissu tumoral. Ainsi, les formes allongées apparaissent en faveur d'une plus importante extravasation des pores vasculaires [115].

Il apparait également que le plus long temps de demi-vie plasmatique est obtenu pour des NP en forme de filaments. En effet, des filaments micellaires de 8 µm de long composés d'une couronne de polyéthylène glycol (PEG) possèdent une circulation persistante dans le sang jusqu'à une semaine après injection. Contrairement à ces NP, des vésicules PEGylées sphériques avec les mêmes propriétés de surface montrent une clairance totale au bout de 2 jours après injection [116]. Cette équipe a également constaté que des filaments micellaires d'une longueur supérieure à 8 µm sont rapidement fragmentés après injection chez la souris mettant en évidence une complexe relation entre forme, taille et comportement des NP *in vivo*.

2.2.3. Influence des propriétés de surface

La stabilité des NP dans la circulation sanguine est fortement dépendante de sa charge de surface, positive ou négative. [117] De manière similaire aux bactéries négatives, les NP anioniques ont plus de facilité à interagir avec les cellules phagocytaires, particulièrement les macrophages, et ainsi à être internalisées dans les cellules cancéreuses. Les NP avec un potentiel zêta (ξ) inférieur à -20 mV sont retenues par la MEC probablement à cause des chaînes d'héparane sulfate, attachées au réseau de collagène [118], et d'une forte capture par le système réticulo-endothélial (SRE).

Cependant, les NP cationiques avec un (ξ) supérieur à +10 mV sont fortement agrégées avec les protéines plasmatiques. [119] En effet, la liaison de liposomes cationiques avec les protéines sériques est 5-9 fois plus importantes que celle obtenues avec des liposomes neutres. [120] Les NP

cationiques sont également plus efficacement opsonisées et éliminées de la circulation sanguine par les macrophages du foie [121]. Levchencko et *al.* montrent que des liposomes avec un (ξ) de +40 mV sont éliminées de la circulation sanguine à 90% en 10 min alors que les liposomes neutres (± 10 mV) ne montrent que 10% d'élimination [122]. Globalement, les NP neutres sont moins exposées aux interactions avec le SRE et présentent un plus long temps de circulation dans le sang. De plus, elles diffusent de manière plus homogène et plus profondément dans le tissu tumoral que leurs homologues chargées [100]. En effet, les liposomes neutres (-2 à -5 mV) possèdent une capacité de pénétration dans le tissu tumoral 14 fois supérieure à celle obtenue avec des liposomes chargés positivement (+48 mV) [123].

Pour minimiser la clairance par le SRE et réduire l'opsonisation par les protéines sanguines, la stratégie la plus couramment utilisée depuis de nombreuses années consiste à ajouter du PEG à la surface de la NP. La présence de PEG réduit ainsi les interactions de la NP avec la surface des cellules mais également leur pénétration au sein de la tumeur lorsque le pourcentage de PEG dépasse les 10%. Il semble que réduire la quantité de PEG à 5% permet alors de contrebalancer cet effet négatif tout en maintenant les interactions cellulaires [124]. La densité du PEG utilisée pour recouvrir la NP est également importante [100]. En effet, le groupe de protéines se liant au PEG de faible densité (<0,16 PEG/nm^2) facilite la capture par les macrophages tandis que le groupe de protéines se liant au PEG de haute densité (>0,64 PEG/nm^2) ne déclenche pas de phagocytose, diminuant ainsi l'internalisation cellulaire des NP d'or [125].

2.3. Vectorisation de la mTHPC

2.3.1. Différents types de vectorisation de la mTHPC

Malgré des propriétés proches du PS idéal, la mTHPC est hautement hydrophobe et a tendance à s'agréger avec les protéines plasmatiques. De plus, sa biodistribution imparfaite et son manque de sélectivité tumorale entrainent d'importants effets secondaires et notamment une longue photosensibilité cutanée. Ces inconvénients ont donc conduit au développement de formulation nanovectorisée de mTHPC.

- Nanoparticules inorganiques

Les NP d'or présentent des propriétés physiques et optiques unique permettant les mesures par résonance plasmonique de surface ou tomodensitométrie. Leurs propriétés chimiques permettent de greffer des groupes amines ou thiols à leur surface pour des applications biomédicales. Elles présentent un temps de circulation long et sont non toxiques et biocompatibles. Des NP d'or chargées de mTHPC (Au-mTHPC) de 180 nm de diamètre se sont

révélées être un complexe soluble et stable. De plus, le taux de mort cellulaire après PDT s'est révélé plus important après une incubation avec les NP Au-mTHPC comparé à la mTHPC libre [126].

Des NP de silices chargées de mTHPC de 33 nm de diamètre permettent de conserver la mTHPC sous forme monomérique non agrégée au cœur des NP. En milieu aqueux, ces NP précipitent et s'agrègent mais leur stabilité est préservée en présence de sérum de veau fœtal. Cette nanoformulation réduit l'accumulation cellulaire de mTHPC de 50% mais n'affecte pas sa photocytotoxicité ni sa localisation intracellulaire [127].

- Nanoparticules polymériques

Les NP polymériques sont synthétisées à partir de PLGA ou de polymères naturels comme le chitosan et permettent l'encapsulation de PS.

Des NP de PLGA de 283 nm de diamètre chargées de mTHPC montrent une absence de cytotoxicité à l'obscurité à de fortes concentrations contrairement à la mTHPC libre. Cependant, l'accumulation cellulaire dans des cellules en monocouche ainsi que dans une structure tridimensionnelle (3D) de sphéroïde multicellulaire est similaire entre mTHPC-NP PLGA et mTHPC libre tout comme la photocytotoxicité [128]. Par la suite, du PEG a été ajouté sur des NP de même composition mais d'un diamètre inférieure (145 nm). Comparé aux mTHPC-NP PLGA non PEGylées, la mTHPC est plus rapidement libérée de la NP lorsqu'elles sont PEGylées. De plus, *in vitro*, aucune différence de résultats n'a été mis en évidence entre ces deux types de NP [129]. Plus récemment, des NP PEGylées de PLGA chargées de mTHPC de 97 nm ont été injectées chez la souris. Malheureusement, la sensibilité des mesures de fluorescence n'a pas été suffisante pour détecter la mTHPC dans les différents organes. Une faible fluorescence de la mTHPC a été retrouvée au point d'injection avec les NP de PLGA PEGylées contrairement à la mTHPC libre suggérant une biodistribution améliorée [130].

Des NP composées de chitosan et d'un dérivé de vitamine E chargées de mTHPC montrent une diminution de la concentration nécessaire pour atteindre 50% de mort cellulaire (IC50) de 2,5 fois comparé à la mTHPC libre sur cellules en monocouche. Dans le modèle 3D de sphéroïde multicellulaire, 7 jours après PDT, une réduction de 60% du volume du sphéroïde est constatée contre seulement 40% pour la mTHPC libre. De plus, *in vivo*, l'inhibition de croissance tumorale s'est révélée significativement plus importante avec les NP (35%) [89].

- Micelles

Les micelles polymériques sont constituées de polymères amphiphiliques dont la taille varie entre 10 et 100 nm. En solution aqueuse, les parties hydrophobes s'assemblent et forment le cœur de la micelle tandis que les parties hydrophiles s'organisent autour et forment une coque

protectrice [131]. Des micelles de mTHPC composées d'ε-caprolactone montrent une capacité de chargement de la mTHPC supérieure à 30%. Cependant, ces micelles n'entrainent pas de photocytotoxicité après PDT ni de meilleure incorporation cellulaire en comparaison de la mTHPC libre. [132] *In vivo*, des micelles de β-poly(D,L-lactide) chargées de mTHPC ne se révèlent pas plus photocytotoxique que la mTHPC libre, en raison d'effets antitumoraux similaires, mais présentent l'avantage de réduire la photosensibilité cutanée [133]. Plus récemment, l'équipe de Syu a confirmé ces résultats avec des micelles de même composition mais ont mis en évidence une augmentation significative de l'inhibition tumorale après PDT grâce à l'ajout de folate à la surface des micelles de mTHPC. Cette différence peut s'expliquer par une accumulation préférentielle dans la tumeur (900 ng de mTHPC/g d'organes pour les micelles-folate de mTHPC *vs* 500 ng de mTHPC/g d'organes pour les micelles de mTHPC et la mTHPC libre) [134].

- <u>Nanoparticules lipidiques</u>

Des NP lipidiques solides de mTHPC, composées d'un cœur hydrophobe entouré d'une couronne hydrophile, se sont montrées être des nanovecteurs prometteurs et stables en milieu biologique. Leur forte concentration de lipides permettent l'encapsulation d'un grand nombre de molécule de mTHPC. Une importante photocytotoxicité a ainsi été montré après une irradiation à 10 J/cm^2 [135]. Des NP similaires thermosensibles ont été synthétisées et testées par Brezaniova et *al*. Cette étude démontrent une forte accumulation cellulaire de ces NP de mTHPC ainsi qu'une efficacité antitumorale *in vivo* supérieure à celle obtenue avec de la mTHPC libre [136].

Récemment, des nanoémulsions lipidiques de mTHPC appelées Lipidots ont été synthétisés. Ils sont non toxiques et composés d'huile de soja au cœur et de lécithine comme couche externe avec un revêtement à base de PEG. Contenant uniquement des composés naturels, ils sont susceptibles d'être dégradés et recyclés par l'organisme. Les Lipidots montrent une diminution de la pénétration dans le modèle 3D de sphéroïde multicellulaire comparé à la mTHPC libre mais une efficacité PDT équivalente [137]. *In vivo*, les Lipidots n'ont pas révélé de meilleure destruction tumorale mais une diminution de l'inflammation et des effets secondaires [138].

Les liposomes sont des vésicules sphériques composées d'une double couche phospholipidique permettant l'encapsulation de molécules hydrophobes dans la couche externe et de molécules hydrophiles dans le cœur. Non immunogènes et biodégradables, les liposomes se montrent être les nanovecteurs de mTHPC les plus étudiés à ce jour [139]. Deux formulations liposomales à base de mTHPC (Foslip® et Fospeg®) ont été développées par Biolitec GmbH (Iena, Allemagne). Le Foslip® est un liposome conventionnel de 111 ± 8 nm de diamètre, constitué de 18 mg/mL de dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), de 2 mg/mL de

dipalmitoylphosphatidylglycérol (DPPG) et de 1,5 mg/mL de mTHPC. L'addition de DPPG leur confère une charge de surface négative. Le Fospeg® est un liposome de 114 ± 7 nm de diamètre de même composition que le Foslip® mais recouvert de PEG [140,141].

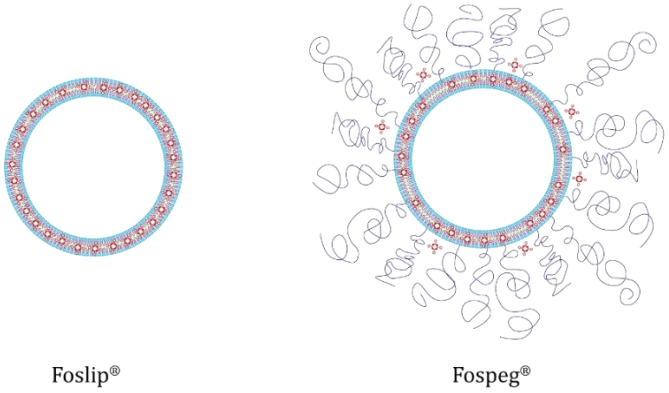


Figure 12. Structure des formulations liposomales de mTHPC

2.3.2. Stabilité des formulations liposomales de mTHPC en circulation

La stabilité des formulations liposomales de mTHPC dépend de la quantité de mTHPC relarguée ainsi que de la conservation de l'intégrité membranaire.

- Relargage de la mTHPC

Le relargage de la mTHPC à partir des liposomes est légèrement dépendant de la concentration en sérum. En effet, la fuite de mTHPC à partir des liposomes conventionnels ou PEGylés est plus faible avec une incubation dans 20% de sérum humain comparé à 50% de sérum humain [52].

La libération de mTHPC à partir des liposomes est étroitement liée au temps d'incubation. Pour le Foslip®, une libération progressive de la mTHPC est observée au cours du temps jusqu'à atteindre 91% de relargage après 24 heures d'incubation dans le sérum [52]. Il apparait que la mTHPC se redistribue préférentiellement sur les HDL dès 30 min d'incubation (27%) jusqu'à atteindre un transfert de 50% après 8 heures d'incubation. Elle se redistribue également, dans des proportions plus faibles, sur les LDL et sur l'albumine (environ 15% après 8 heures) [142]. De plus, le relargage de la mTHPC est également lié à la composition de la bicouche phospholipidique. En effet, les liposomes de palmitoyl-oleoyl-phosphocholine/glycérol présentent le taux de libération de mTHPC le plus faible contrairement aux liposomes conventionnels DPPC/DPPG qui retiennent une faible portion de mTHPC dans leur bicouche 48 heures après incubation avec des protéines plasmatiques (39% *vs* 20% de mTHPC retenue dans le liposome). Les liposomes composés de dioleoylphosphocholine/glycérol se sont montrés être un intermédiaire avec 30% de relargage de mTHPC après 48 heures [143].

Pour le Fospeg®, une forte fuite de mTHPC est observée pour les temps d'incubation courts (42% à 30 min *vs* 24% à 30 min pour le Foslip®) suivie d'une lente redistribution atteignant les 72% après 24 heures d'incubation dans le sérum [52]. Cette différence de profil peut s'expliquer par la présence du PEG. En effet, l'importante disponibilité de la mTHPC piégée dans les chaînes de PEG présentes à la surface des liposomes permet un relargage rapide d'environ 30% dès les premières minutes d'incubation. Par la suite, la lente redistribution de la mTHPC sur les HDL et LDL s'explique par une augmentation de la rigidité membranaire due à la présence du PEG [143].

Le processus de redistribution de la mTHPC dans le sérum est liée à deux mécanismes majoritaires : le transfert de la mTHPC des liposomes intacts sur les lipoprotéines et la destruction des liposomes permettant une redistribution de la mTHPC sur les protéines plasmatiques [142].

- <u>Destruction des liposomes</u>

L'étude de la stabilité du Foslip® dans du sérum montre une rapide destruction des liposomes. En effet, après incubation avec 20% de sérum humain, la concentration en liposomes diminue au cours du temps mais leur taille reste inchangée. Les liposomes sont détruits à 30% durant la première heure suivi d'une diminution graduelle pour atteindre 60% de destruction après 24 h d'incubation avec le sérum humain [52]. *In vivo*, 20% des liposomes sont détruits dès les 5 premières minutes après i.v et 60% après 24 heures [144]. Cette rapide destruction peut s'expliquer par la composition du Foslip®. En effet, des liposomes composés uniquement de phosphatidylcholine montrent une diminution progressive de la taille des liposomes après incubation dans du plasma avec une destruction préférentielle des petites vésicules formées [145].
L'ajout de cholestérol dans la membrane de liposomes DPPC/DPPG permet d'augmenter la conservation de l'intégrité membranaire. Decker et *al.* ont mis en évidence que 82% des liposomes DPPC/DPPG-30% de cholestérol restent intacts 8 heures après incubation dans du plasma humain [142]. Une étude plus récente souligne que le pourcentage de cholestérol de la membrane liposomale est un facteur important pour leur stabilité. Les formulations DPPC/DPPG-mTHPC composées de 22,5 et 30% de cholestérol doublent leur stabilité après 12 heures d'incubation dans du plasma humain comparées aux formulations composées de 7,5 et 15% [143].
Une autre possibilité est l'ajout de PEG dans la membrane permettant d'augmenter la stabilité des liposomes DPPG/DPPC à 78% 8 h après incubation dans du plasma humain [142].

Qualitativement, le profil de destruction des liposomes PEGylés est identique à celui des liposomes conventionnels avec une diminution du nombre de particules au cours du temps et une taille inchangée. En revanche, quantitativement, le Fospeg® s'est révélé beaucoup plus stable avec

uniquement 10% de destruction après 1 heure d'incubation avec le sérum humain et 28% après 24 heures. [52] *In vivo*, aucune destruction des liposomes PEGylés n'est constaté avant 6 heures après i.v. Après 24 heures, seulement 20% des liposomes sont détruits permettant ainsi une circulation prolongée dans l'organisme et une libération de la mTHPC sous forme monomère [144]. Il a également été montré que la longueur des chaines de PEG est importante dans la stabilité des liposomes. Plus les chaines de PEG sont courtes, plus la stabilité est augmentée et la quantité de mTHPC libérée faible [143].

2.3.3. Etude *in vivo* des formulations liposomales de mTHPC

- Biodistribution

La première étude *in vivo* conduite après une i.v de Foslip® chez la souris xénogreffée a été réalisée par Svensson et *al*. Les auteurs ont mis en évidence une rapide accumulation de la mTHPC dans la tumeur, 4 heures après i.v, corrélée avec les meilleurs ratio tumeur/peau et tumeur/muscle [146]. Des résultats similaires sont obtenus sur un second modèle tumoral (cellules cancéreuses mammaires EMT6). En effet, une rapide distribution du plasma vers la tumeur est observée suivi d'un plateau entre 6 et 15 heures après i.v avec une concentration maximale en mTHPC de 0,18 ng/mg comparé au Foscan® où le plateau est enregistré plus tardivement (entre 24 et 48 heures après i.v). [147] Une forte accumulation de la mTHPC est également relevée au niveau de la rate et du foie, 1 et 3 heures respectivement après i.v de Foslip® [144]. De plus, la photosensibilisation cutanée est diminuée comparé au Foscan® en raison d'une meilleure biodisponibilité vasculaire [55] ainsi qu'une accumulation de mTHPC plus faible au niveau de la peau [138].

Le Fospeg® présente une biodisponibilité tumorale 4 fois supérieure à celle obtenue avec le Foscan® [148]. Cette formulation présente également une intensité de fluorescence au sein de la tumeur plus importante (2 fois supérieure) avec une accumulation maximale atteinte 8 heures après i.v contre 15 et 24 heures pour Foslip® et Foscan®. Le Fospeg® est également plus confiné au niveau vasculaire que le Foslip® avec une biodisponibilité de la mTHPC 2 fois plus importante [55]. De plus, la photosensibilisation cutanée est diminuée avec une accumulation de mTHPC plus faible au niveau de la peau comparée au Foscan® [148] et au Foslip® [144]. Une forte concentration de mTHPC est retrouvée dans le foie après une analyse par chromatographie liquide de haute performance (HPLC), 2 heures après i.v [149].
Le pourcentage de PEGylation influence la biodistribution de la mTHPC. En effet, l'ajout de 8% de PEG entraine une forte concentration de mTHPC dans les poumons mais une réduction dans les

reins comparés à des liposomes de mTHPC avec 2% de PEG. De plus, le meilleur ratio tumeur/peau est observé pour la formulation composée de 2% de PEG 6 heures après i.v [150].

- Pharmacocinétique

Une étude a étudié les propriétés pharmacocinétiques du Foslip® en relation avec son efficacité après PDT dans un modèle murin de xénogreffe. Il a ainsi été montré que le Foslip® est rapidement éliminé de la circulation sanguine en raison d'une forte reconnaissance par les cellules du RES et d'une forte clairance. La quantité de mTHPC libérée à partir du Foslip® dans la circulation sanguine est 25 à 30% plus faible que le Foscan® [147].

En situation clinique chez des chats porteurs de carcinomes cutanés, le Fospeg® présente des propriétés pharmacocinétiques supérieures à celles observées avec le Foscan® [148]. Une augmentation du temps de demi-vie plasmatique est mis en évidence comparé au Foscan® [150] et au Foslip® [144]. Cette augmentation est d'autant plus importante lorsque le pourcentage de PEG augmente alors que le plus petit volume de distribution est constaté pour les liposomes possédant le pourcentage de PEG le plus élevé (290 mL/kg avec 8% de PEG *vs* 465 mL/kg avec 2% de PEG)[150].

- Efficacité de la thérapie photodynamique

La meilleure efficacité PDT chez la souris xénogreffée avec le Foslip® s'opère avec un IDL de 6 heures [147] ce qui est significativement plus court que l'IDL optimal de 24 heures observé avec le Foscan® [58]. Cette efficacité peut être liée à la présence de mTHPC dans les cellules endothéliales et le parenchyme tumoral, comme montré grâce à la distribution intratumorale de la mTHPC [55]. Cette étude a mis en évidence une absence de corrélation entre biodistribution et efficacité PDT avec une concentration maximale en mTHPC intratumorale observée 15 heures après i.v et une DLI optimale de 6 heures [147]. L'application de la PDT avec une DLI de 3 heures est quant à elle inefficace [144]. La dose de lumière appliquée ne semble pas impacter l'efficacité PDT avec le Foslip® (10 ou 20 J/cm^2). Dans les deux conditions, 14 jours après irradiation, une complète réduction tumorale est mesurable [138]. En revanche, l'origine tumorale semble influencer la régression puisqu'aucune cure tumorale n'est observée sur un modèle colique [144] contrairement au modèle ORL [138].

Chez les chats présentant des carcinomes spontanés du nez, une injection de Fospeg® permet l'obtention de 75% de cure tumorale la première année sans aucun effet secondaire contrairement au Foscan® où 75% de récidive est observée [151]. De plus, pour obtenir un effet thérapeutique équivalent à celui du Foscan® (0,3 mg/kg, 10 J/cm^2), la dose de Fospeg® injectée peut être diminuée à 0,05 mg/kg (10 J/cm^2). Les auteurs montrent également que cet effet

équivalent peut être atteint en diminuant la dose de lumière à 2 J/cm^2 avec une concentration en mTHPC identique (0,3 mg/kg) [150].

Chez les souris xénogreffées, comparé au Foslip®, l'efficacité PDT est comparable mais obtenue avec un IDL plus court [144]. Dans le modèle de membrane chorio-allantoïdienne, le Fospeg® entraine 2 fois plus de dommages vasculaires que le Foslip® pour des doses de lumière comprise entre 12,5 et 75 J/cm^2 en raison d'une activité photothrombique augmentée [152]. Ces résultats ont été confirmés en 2013 avec une augmentation significative du pourcentage de nécrose tumorale [51]. Ces résultats peuvent s'expliquer par la forte concentration en mTHPC dans les vaisseaux tumoraux due à l'augmentation du temps de circulation des liposomes PEGylés.

LES VÉSICULES EXTRACELLULAIRES

Des vésicules provenant de cellules normales et néoplasiques, présentant une activité 5'-nucléotidase, ont été mise en évidence dans les années 80. Les images de microscopie électronique à transmission (TEM) ont montré deux populations distinctes : une première constituée de vésicules de 500 à 1000 nm de diamètre et une seconde composée de vésicules de 40 nm environ. Ainsi, le nom exosome est apparu caractérisant toutes les vésicules membranaires ayant une fonction physiologique. [153] En 1987, le terme exosome fut choisi pour désigner les vésicules extracellulaires (VE) ayant une origine endosomale et non membranaire. [154] C'est en 1996 que les VE commencèrent à susciter l'intérêt grâce à leur implication dans l'activation lymphocytaire ou dans les pathologies cancéreuses [155].

3.1. Généralités

3.1.1. Les différentes catégories de vésicules extracellulaires

Les VE se décomposent en trois principales populations et se distinguent par leur taille, origine cellulaire et marqueurs de surface. Ainsi, les principales VE étudiées sont les exosomes de la taille d'un virus, les microvésicules de la taille des bactéries et enfin les corps apoptotiques de la taille des plaquettes (Figure 13).

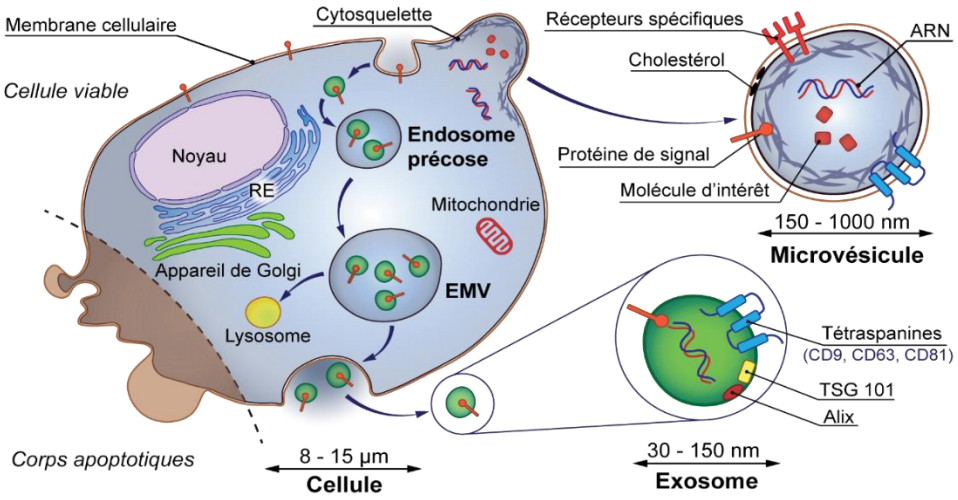


Figure 13. Schéma représentant la biogénèse des vésicules extracellulaires

Abréviations : Alix : ALG-2 Interacting protein X ; ARN : Acide ribonucléique ; EMV : Endosome multi vésiculaire ; RE : Réticulum endoplasmique ; TSG-101 : Tumor susceptibility gene 101.

- Les exosomes

Les exosomes sont des petites vésicules de 30 à 150 nm de diamètre issues d'un bourgeonnement de la membrane endosomale avec une densité de 1,13 à 1,19 g/mL dans le sucrose [156]. Une

première invagination de la membrane plasmique conduit à la formation de petites vésicules d'endocytose possédant la capacité de fusionner avec les endosomes précoces. Au cours du processus de maturation, ces endosomes accumulent de petites vésicules appelées vésicules intraluminales et se transforment en endosomes multi vésiculaires (EMV) [157].

La machinerie ESCRT (complexe de tri endosomal requis pour le transport) est la voie de formation des EMV la plus décrite à ce jour. Brièvement, le processus est initié par ESCRT-0 qui reconnait et retient les protéines transmembranaires ubiquitinylées de la membrane endosomale. Le complexe ESCRT-I/II contenant Tsg-101 ainsi que la protéine accessoire Alix est recruté et déclenche l'invagination de la membrane vers l'intérieur de l'endosome. ESCRT-III permet la désubiquitinylation des protéines. Par la suite, Vps4 entre dans l'invagination et permet la scission de la membrane formant ainsi une vésicule intraluminale [158]. Ainsi, la machine ESCRT permet la biogenèse des exosomes ainsi que la séquestration de protéines ubiquitinylées au cœur des exosomes. C'est pour cette raison que les protéines Tsg-101 et Alix sont des marqueurs exosomals très étudiés [159]. De plus, l'activité héparanase sulfate semble être impliquée dans la formation des exosomes en stimulant l'incorporation de la flotilline-1 et des tétraspanines CD9 et CD63 [160].

Après formation des EMV, deux destinées sont possibles. La première est une fusion avec les lysosomes entrainant la dégradation de leur contenu. La seconde est une fusion avec la membrane plasmique conduisant à la libération de vésicules intraluminales, qui portent désormais le nom d'exosome, dans le milieu extracellulaire [161]. Ce processus de fusion nécessite l'intervention de protéines du cytosquelette (actine, microtubules, myosine, …) ainsi que les GTPases de la famille Rab. Une étude montre qu'en absence des protéines Rab 27b, les EMV sont localisés dans la région périnucléaire, empêchant toute fusion avec la membrane plasmique [162]. De plus, une autre étude met en évidence qu'en absence des protéines Rab 27a les cellules produisent moins d'exosomes [163].

- <u>Les microvésicules</u>

Les microvésicules sont des vésicules possédant une taille hétérogène comprise entre 100 et 1000 nm de diamètre avec une densité de 1,17 à 1,20 g/mL dans le sucrose. [156] Elles dérivent de la membrane plasmique à la suite d'un bourgeonnement de celle-ci. C'est pourquoi, leur composition est proche de celle de la membrane plasmique et varie en fonction de la cellule d'origine.

En raison de leur hétérogénéité de taille, divers mécanismes sont à l'origine de la formation des microvésicules. Les plus petites microvésicules, proches de la taille des exosomes, sont également produites par la machinerie ESCRT mais enrichies en protéines de surface reflétant leur origine membranaire comme par exemple les récepteurs aux protéines transmembranaires Notch [164].

Un second mécanisme impliqué dans la biogenèse des microvésicules est l'activation de la sphingomyélinase. A la suite d'une stimulation ATP, cette enzyme est rapidement activée et se déplace vers le feuillet externe de la membrane plasmique entrainant un bourgeonnement membranaire et un relargage de microvésicules [165,166].
Le dernier mécanisme est lié au réarrangement du cytosquelette à la base du bourgeonnement entrainant une scission membranaire. Ce phénomène est généralement rencontré dans le cas de cancers agressifs avec un fort pouvoir invasif et métastatique [167]. Après formation du bourgeonnement, une contraction des filaments d'actine et de myosine permet le pincement de la base du bourgeon. L'activation des chaines légères de la myosine, nécessaire pour permettre la libération de la vésicule dans l'espace extracellulaire, est permise grâce à l'activité de la protéine RhoA. Cette GTPase régule la réorganisation de cytosquelette et la contractilité corticale [168].

Différents stress sont à l'origine de la formation de microvésicules. Une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire augmente le processus de vésiculation. En effet, cette augmentation entraine une désorganisation de la membrane avec une redistribution des phospholipides conduisant à des mécanismes de fusion et de scission membranaire [169]. L'hypoxie se révèle également être un stimulant dans la production de microvésicules. En effet, Lichtenauer et *al*. ont mis en évidence une augmentation significative de la production de microvésicules endothéliales 8 heures après le début d'une hypoxie avec une saturation en oxygène de 78% [170].
Le stress oxydatif contribue également à la biogenèse des microvésicules. Cette production de VE est dépendante du temps et de la quantité d'H_2O_2 ajoutée, responsable du stress oxydatif. Ainsi, le relargage des microvésicules atteint 60% au bout de 16 heures avec une concentration de 200 µM d'H_2O_2 alors qu'elle n'est que de 30% à 50 µM [171].

- <u>Les corps apoptotiques</u>

Les corps apoptotiques sont des vésicules de 1 à 5 µm de diamètre libérées à partir de cellules apoptotiques avec une densité de 1,24 à 1,28 g/mL dans le sucrose [172]. Durant le phénomène d'apoptose, les cellules rétrécissent et se fragmentent en corps apoptotiques. Elles se caractérisent par la présence de phosphatidylsérine à leur surface et contiennent de l'ADN fragmentée. Ce type de VE peut être isolé après une centrifugation à 2000 g, tout comme les débris cellulaires, et ainsi éliminé de la population d'intérêt [173].

3.1.2. Les différentes origines, focus sur les cellules endothéliales

De nombreux types cellulaires sont capables de produire des VE. De nombreux groupes se sont intéressés aux VE dérivées de cellules immunitaires comme les monocytes, neutrophiles ou lymphocytes T. Cependant, les VE issues de plaquettes, cellules endothéliales et cellules

cancéreuses sont également largement étudiées. Les VE utilisées dans cette étude étant dérivées de cellules endothéliales, un focus sera effectué sur cette lignée.

Les cellules endothéliales sont capables de produire tous les types de VE. *In vitro*, divers stimuli déclenchent la libération des VE comme une stimulation par les lipopolysaccharides, ERO ou différentes cytokines. De plus, après induction d'un stress comme une privation de sérum, les cellules endothéliales sont celles qui produisent la quantité la plus importante de VE [174]. Les microvésicules endothéliales sont détectables dans le sang à l'aide de la cytométrie en flux et présentent à leur surface des marqueurs spécifiques des cellules endothéliales comme le CD31, CD54, CD144. En situation physiologique, ces VE sont produites dans le cas de maladies cardiovasculaires, hypertension, problèmes vasculaires, etc. De plus, les VE possèdent un tropisme naturel influençant leur biodistribution *in vivo*. Ainsi, les VE dérivées de cellules endothéliales se localisent préférentiellement dans les zones riches en néovaisseaux comme les zones tumorales [175]. De plus, les exosomes issus de cellules endothéliales possèdent un micro-ARN spécifique, le miR-503, inhibant naturellement la croissance tumorale. L'incubation des exosomes avec des cellules cancéreuses permet d'augmenter de 5 fois le niveau de miR-503 et par conséquence de significativement réduire l'invasion des cellules ainsi que leur prolifération cellulaire [176].

3.1.3. Composition des vésicules extracellulaires

- <u>Lipidique</u>

La membrane des VE est constituée d'une bicouche lipidique similaire à la membrane plasmique dans le cas des microvésicules en raison de leur biogenèse. Ainsi, l'asymétrie structurale présente dans la membrane plasmique n'est pas conservée dans celle des VE en raison de l'absence de flippase entrainant une exposition des phosphatidylsérines à la surface des microvésicules [177]. De plus, une étude lipidomique a permis de mettre en évidence la présence de phosphatidylcholine et de phosphatidylinositol en quantité importante dans les membranes des microvésicules. En revanche, quelques traces de phosphatidyléthanolamines sont retrouvées [178]. De même que les microvésicules, une analyse des six grandes classes de lipides a mis en évidence que la membrane des exosomes est composée de phosphatidylcholine et de phosphatidylinositol. En revanche, en raison de leur origine cellulaire, les exosomes ne présentent pas de phosphatidyléthanolamines et phosphatidylglycérol dans leur membrane et une absence d'exposition des phosphatidylsérines à la surface des membranes [179,180].

La membrane des VE, composée de SM, cardiolipidines et céramides, présente des micro-domaines riches en cholestérol appelés radeaux lipidiques. [178,179,181] Del Conde et *al*. ont montré une réduction de la sécrétion de VE après une déplétion membranaire en cholestérol [182]. Cette

composition rend leur membrane plus rigide que celle des cellules ce qui leur permet de résister à la dégradation et d'augmenter leur stabilité [183]. Cette forte rigidité semble également être dépendante du pH du microenvironnement. En effet, la fusion entre la membrane des VE et la membrane plasmique nécessite une fluidité membranaire similaire entre les deux entités, rencontrée pour un pH acide d'environ 5. Il a été montré que le traitement d'exosomes dérivés de basophiles leucémiques par une solution acide diminue leur rigidité [184]. L'augmentation de l'acidité simule le microenvironnement tumoral et permet d'augmenter la fluidité membranaire des VE ayant pour conséquence une accumulation cellulaire plus importante [185].

- <u>Protéique</u>

Toutes VE sont composées de protéines du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), de tétraspanines, flotillines, annexines et de protéines chaperonnes HSP70 et HSP90 indépendamment de leur cellule d'origine. Leur expression varie en fonction de la catégorie de VE ainsi que le type de tétraspanines. De plus, certaines protéines sont spécifiques de la cellule d'origine. Par exemple, la sélectine P (CD62) est présente à la surface des VE dérivées de plaquettes activées alors que celles issues de macrophages sont riches en acide sialique α2,3 [186].

L'ensemble des résultats obtenus au cours des différentes études sur les exosomes de mammifères sont regroupés dans la base de données « exocarta » [187]. Les protéines retrouvées dans les exosomes sont généralement les protéines impliquées dans leur biogenèse c'est-à-dire Tsg-101, Alix, la flottiline-1 ou encore les tétraspanines CD9, CD63 et CD81. Colombo et *al*. ont mis en évidence une forte expression de CD63 dans les exosomes de petite taille (<50 nm) alors que les molécules du CMH de classe II sont abondantes dans les exosomes de grande taille (>100 nm) [177]. Hormis les tétraspanines, d'autres molécules d'adhésions sont présentes dans la membrane des exosomes comme l'intégrine β-1. [179] Théry et *al.* ont également montré la présence de protéines impliquées dans la transduction de signaux comme la protéine 14-3-3, la synténine ou la protéine G [156]. De plus, les protéines du noyau, mitochondrie, RE et appareil de Golgi ne sont pas retrouvées dans les exosomes ce qui confirme leur origine endosomale et les distingue des autres VE [188]. En revanche, un grand nombre de protéines cytosoliques sont exprimées comme la gelsoline, histones et protéines du cytosquelette (actine, tubuline, moésine et cofiline) [156,177,179].

La composition protéique des microvésicules est dépendante de la cellule d'origine, c'est pourquoi une base de données regroupant les résultats de diverses vésicules a été créée du nom de « Vesiclepedia » [189]. Contrairement aux exosomes, des protéines nucléaires, mitochondriales et du RE sont retrouvées dans les microvésicules (environ 6% au total). Majoritairement, leur membrane contient des protéines issues de la membrane plasmique (23%) et du cytoplasme

(14%) dont un grand nombre sont impliquées dans la transduction de signaux et le trafic intracellulaire [172]. A titre d'exemple, Sun et *al.* ont identifié plus de 900 protéines dans des microvésicules issues de cancers pulmonaires dont 284 protéines sont des marqueurs spécifiques de ce cancer [190]. Les microvésicules issues de cellules cancéreuses hépatiques expriment fortement la flottine-1 et la tétraspanine 4 contrairement aux microvésicules issues de cellules souches mésenchymateuses qui sous-expriment ces protéines et surexpriment une protéine du RE, la protéolipide 2 [191].

- Génomique

Des études révélent que les VE transportent une grande variété de matériel génétique (micro-ARN, ARN messager, ARN interférents, ARN de transfert et ARN non codants). La teneur en ARN des VE est fonction du type cellulaire. En effet, il a été montré que les VE issues de medulloblastomes (55 ng) sont beaucoup plus riches en ARN que les VE dérivées de mélanomes ou fibroblastes (0,3 ng) [192]. La quantité d'ARN messager est le reflet du contenu de la cellule d'origine mais certains sont systématiquement enrichis dans les VE, de même que certains micro-ARN (miR-1 ; 15 ; 16 ; 181 et 375) impliqués dans l'angiogenèse l'exocytose et la tumorogenèse [193]. De plus, l'abondance d'ARN messager dans la cellule influence la quantité de micro-ARN présent dans les exosomes qui en dérivent. En effet, en présence d'un fort niveau d'expression du transcrit dans la cellule d'origine, l'interaction ARN messager-micro ARN empêche l'incorporation de micro-ARN dans les exosomes. [194] Une autre équipe a également mis en évidence que les modifications post-transcriptionelles des micro-ARN sont associées à un enrichissement en micro-ARN dans les VE dans le cas d'ajout d'uracile ou à un déficit dans le cas d'ajout d'adénine [195]. Après une analyse par puce à ARN, Valadi et *al*. ont constaté la présence d'environ 1300 gènes dans les exosomes ainsi qu'un transfert horizontal d'ARN messager entre les exosomes murin et des mastocytes humains. En effet, des protéines murines se sont retrouvées exprimées dans les cellules réceptrices humaines mettant en évidence ce processus [193].

Les VE sont aussi capables de transporter de l'ADN. Tout comme pour l'ARN messager, le contenu en ADN est le reflet de la cellule d'origine. En effet, les mutations KRAS et p53 présentent dans les cellules cancéreuses sont également retrouvées dans les exosomes dérivés de ces cellules [196]. Le rôle de l'ADN vésiculaire reste à élucider et de nombreuses études sont en cours [197].

3.2. Fonctions et applications des vésicules extracellulaires

3.2.1. Mécanismes de communication

Les VE relarguées par les cellules ont la capacité d'initier des communications intercellulaires par le transfert de récepteurs ainsi que par leur capacité de signalisation et ainsi induire la

prolifération cellulaire, l'angiogenèse, la migration et intervenir dans les phénomènes pathologiques.

- Présentation antigénique et régulation du système immunitaire

Les VE ont naturellement un rôle dans la régulation du système immunitaire en raison de leur enrichissement en molécules du CMH. Raposo et *al*. ont mis en évidence que les exosomes sécrétés par des lymphocytes B, enrichis en molécules du CMH de classe II, sont capables de stimuler spécifiquement les lymphocytes T en leur présentant des antigènes [155]. Les exosomes sont également capables de transférer l'antigène aux cellules dendritiques voisines qui vont à leur tour activer les lymphocytes [198]. Lors d'une réponse antivirale, les VE déclenchent la production de cytokines. En cas d'infection, les VE sécrétées possèdent des antigènes reconnus par le système immunitaire induisant la sécrétion du TNF-α et de diverses cytokines (IL-1β, IL-8 et IL-10) [199]. Dans ces conditions, les VE modulent la réaction immunitaire et peuvent également avoir des capacités immunosuppressives. Il a été montré que des exosomes dérivées de lymphocytes T possèdent des protéines pro-apoptotiques ce qui inhibe l'activation des cellules « natural-killer » (NK) ainsi que la stimulation des lymphocytes T conduisant à l'apoptose cellulaire [200].

En cancérologie, les VE agissent naturellement sur les macrophages associés aux tumeurs qui contribuent à la progression tumorale. En effet, des exosomes issus de cellules cancéreuses mammaires empêchent l'infiltration de ces macrophages par une inhibition de la production de l'IL-6 et du TGF-β ce qui diminue le développement tumoral [201]. Une étude de phase II réalisée chez des patients atteints de cancer pulmonaire a montré la capacité des exosomes dérivées de cellules dendritiques des patients à induire une réponse anti-tumorale par l'intermédiaire de l'activation des cellules NK [202].

- Angiogenèse

Les VE peuvent être des régulateurs de la vascularisation tumorale grâce à leur capacité de transférer des molécules pro-angiogéniques des tumeurs jusqu'aux cellules endothéliales. En effet, au cours d'une réaction inflammatoire, les VE régulent la formation de néovaisseaux en modulant la sécrétion d'IL-8 et la migration des cellules endothéliales [203]. Il a également été montré que les VE augmentent la capacité des cellules endothéliales à former des tubes dans du matrigel *in vitro* [204] ainsi que l'adhésion cellulaire, la migration et la prolifération *in vivo*. De plus, les VE stimulent la sécrétion de facteur pro-angiogénique et facilitent la prolifération des cellules endothéliales ce qui augmente l'angiogenèse tumorale. Certaines VE contiennent des facteurs de croissance qui vont être transférés dans les monocytes induisant la signalisation VEGFR des cellules endothéliales [205]. Certaines molécules et ARN présents dans les VE sont connus pour

promouvoir l'angiogenèse comme miR-9, miR-105 ou miR-23a par exemple qui ont été retrouvés dans des VE en condition hypoxique [206]. Les VE positives pour la molécule CD105 possèdent la capacité d'augmenter la formation de vaisseaux des cellules endothéliales.

- Différenciation et prolifération cellulaire

Dans le cas d'une blessure, les cellules présentent la capacité de produire des VE capables d'entrainer la différenciation des cellules souches conduisant à la réparation et la régénération tissulaire. A l'inverse, elles sont également capables d'entrainer la dédifférenciation de cellules afin de renouveler le stock de cellules souches [207]. A la suite d'une infection, des exosomes contenant des protéines virales sont libérés dans la circulation sanguine et sont capables d'induire la différenciation des cellules B en lymphocytes B mémoires et leur prolifération [208]. En situation cancéreuse, les VE sont capables d'induire la dédifférenciation de cellules cancéreuses en cellules souches cancéreuses, représentant une petite population de cellules résistantes inhibant les tumeurs. Ainsi, il a récemment été démontré que les exosomes issues de cellules de carcinome pulmonaire entraine leur dédifférenciation grâce à une implication des cytokines (IL-6 et activine-A) et forment des cellules souches cancéreuses [209].

La prolifération des fibroblastes peut être augmentée par des VE issues de cellules souches mésenchymateuses activant les voies de signalisation intracellulaires et induisant l'expression de facteur de croissance [210]. La prolifération des cellules hématopoïétiques peut être modulée par des VE issues de plaquettes possédant la capacité de phosphoryler AKT, un régulateur de la survie et de la prolifération cellulaire. Cette phosphorylation augmente considérablement la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques ainsi que leur différenciation [211]. Dans le cas de VE issues de cellules cancéreuses, ces dernières peuvent transférer des protéines aux cellules tumorales accélérant leur prolifération. Cette observation a été montré par Xiao et *al.* qui ont mis en évidence une augmentation de l'expression de la cycline D1 et donc du cycle cellulaire dans des cellules cancéreuses pulmonaires [212].

- Invasion cellulaire et métastases

Les VE possèdent des métalloprotéinases ce qui leur confère la capacité de dégrader la MEC contribuant à l'invasion des cellules et à la croissance tumorale. Dans un modèle de cancer prostatique, il a été montré que les exosomes dérivant de ces cellules contiennent des métalloprotéinases, ARN, cavéoline-1 ainsi que des facteurs activant les cellules tumorales et endothéliales présentent dans la circulation sanguine des souris. Les VE dévirées de cellules tumorales contribuent donc à la propagation de métastases [213]. Le marquage des exosomes à l'aide de traceur fluorescent met en évidence l'interaction entre exosomes et cellules endothéliales ainsi

que l'induction de leur changement morphologique conduisant à la production de bourgeon tumoraux. Ces modifications, observées dans les cellules du mélanome, constituent la première étape des métastases [214]. *In vivo*, la présence de VE dérivées des plaquettes dans la circulation au moment de la greffe de cellules cancéreuses augmente la quantité de métastases [215].

3.2.2. Applications des vésicules extracellulaires en cancérologie

En raison de leur activité thérapeutique intrinsèque, les VE sont utilisées pour améliorer la réparation d'une blessure et pour la régénération tissulaire. Les VE issues de cellules souches réduisent les infarctus du myocarde et de diminuent l'hypertension et l'inflammation [216]. Elles peuvent également être chargées de molécules comme l'IL-1 pour la vaccination. De plus, leurs applications en cancérologie sont variées, aussi bien pour le diagnostic que pour la thérapie.

- <u>Utilisation comme biomarqueur</u>

Actuellement en cancérologie, le diagnostic cancéreux peut être établi grâce à la recherche de cellules tumorales circulantes. Cependant, leur quantité étant faible, les VE représentent une alternative intéressante en tant que biomarqueur [217]. Les cellules cancéreuses sécrètent des VE qui se retrouvent dans tous les fluides biologiques (plasma, urines, salive, lymphe, fluide cérébrospinal, etc) et sont donc facilement accessibles.

Les VE présentes dans le sang des patients contiennent une partie du génome tumoral. L'analyse génomique des VE circulantes a permis la découverte de nouveaux biomarqueurs. Une étude conduite par Cazzoli et *al*. a démontré la possibilité d'utiliser les VE comme test de dépistage dans les cancers du poumon. Les auteurs ont identifié 4 micro ARN permettant de distinguer les patients atteints d'un cancer et les individus sains avec un séquençage sensible à 97%. Dans cette population, 6 autres micro ARN ont permis de discriminer les adénocarcinomes et les granulomes [218]. Une seconde étude a montré que les mutations génomiques présentent dans les cancers pancréatiques comme KRAS et p53 sont également détectées dans l'ADN des exosomes circulants. Les VE sont donc utilisées pour prédire le statut cancéreux et adapter le traitement [196].

Les VE présentent également à leur surface des protéines permettant de mettre en évidence un cancer. En effet, 8 protéines spécifiques ont été retrouvées dans les VE présentes dans l'urine de patient atteints de cancer de la vessie comparée à des individus sains [219]. L'analyse transcriptomique des exosomes présents dans l'urine de patients atteints d'un cancer de la prostate possèdent un niveau très élevé des protéines PCA-3 contrairement aux individus sains [220]. Plus récemment, une analyse de la composition protéique d'exosomes circulants provenant de

chien atteints d'ostéosarcomes, d'une fracture et sains a été réalisée. Dix protéines exosomales spécifiques aux ostéosarcomes ont été révélées avec une certitude de 85% [221].

- Utilisation pour déterminer l'agressivité d'un cancer

L'identification de l'agressivité d'un cancer est déterminant pour l'efficacité du traitement. Dans les cancers des ovaires, le niveau d'expression de la molécule d'adhésion des cellules épithéliales dans les exosomes circulants est corrélé avec l'agressivité du cancer. Le niveau d'expression basal de cette CAM est inférieur à 0,1 mg/mL chez les patients sains et d'environ 0,4 mg/mL chez les patients de stade I. En revanche, chez les patients de stade IV, le niveau est 15 fois plus élevé [222]. De plus, un fort niveau d'expression de la protéine CD24 est un indicateur de mauvais pronostic et réduit considérablement la survie des patients [223].

Dans les cancers de la vessie, les exosomes retrouvés dans l'urine des patients atteints d'un cancer de haut grade présentent un fort niveau de la molécule EDIL-3. Cette molécule est responsable de la progression tumorale ainsi qu'une augmentation des propriétés migratrices [224]. Plus récemment, cette même équipe a mis en évidence une corrélation entre un fort niveau d'expression de certains ARN messager dans les exosomes et le déclenchement de la transition épithélio-mésenchymateuse. Les auteurs ont montré une forte expression de l'ARN HOTAIR dans le cas de cancer de la vessie métastatique. En absence d'HOTAIR, les gènes de la transition épithélio-mésenchymateuse ne sont pas exprimés. En revanche, en présence de cet ARN, 7 gènes de la transition sont exprimés et le cancer devient invasif et métastatique [225].

- Utilisation pour la vaccination dans le cas d'immunothérapie

Les VE présentent un grand intérêt dans le développement de « vaccin anticancéreux » en raison de leur capacité à stimuler le système immunitaire. L'étude de Zitvogel et *al*. explique que les exosomes dérivés de cellules dendritiques expriment naturellement une grande quantité de molécules du CMH ainsi que des molécules stimulant les lymphocytes T [226]. La vaccination de souris avec des exosomes contenant de l'ovalbumine entraine une activation des lymphocytes T conduisant à l'acquisition d'une immunité anti-tumorale ainsi qu'une diminution du volume tumorale [227]. L'injection de VE dérivées de cellules dendritiques contenant le ligand des récepteurs toll-like comme inhibiteur de signaux entraine une diminution de la croissance tumorale, limite le développement de métastases et prolonge la survie des souris présentant un mélanome. [228] Une combinaison entre vaccination avec des exosomes tumoraux et injection de gemcitabine a permis d'augmenter le nombre de cellules T activées dans la tumeur et de prolonger la survie des souris en comparaison de la drogue ou de la vaccination seule [190].
La vaccination à base de VE pour traiter le cancer a montré des résultats intéressants qui ont conduit à un essai clinique. Dans les cancers du poumon, une immunothérapie suivie de

vaccinations répétées avec des exosomes contenant un antigène tumoral a permis d'activer le système immunitaire et le développement d'une immunité adaptative (NCT01159288).

- Utilisation comme nanovecteur

Cette application nous concernant particulièrement pour notre recherche, elle sera décrite en détails dans le paragraphe suivant (cf § 3.3)

3.3. Les vésicules extracellulaires comme nanovecteurs

3.3.1. Méthodes d'incorporation des agents thérapeutiques

Deux grandes stratégies sont utilisées pour incorporer les agents thérapeutiques dans les VE : incorporer le principe actif dans les cellules à l'aide d'une aide incubation afin de produire des VE chargées ou incorporer le principe actif dans les VE *ex vivo* après leur production.

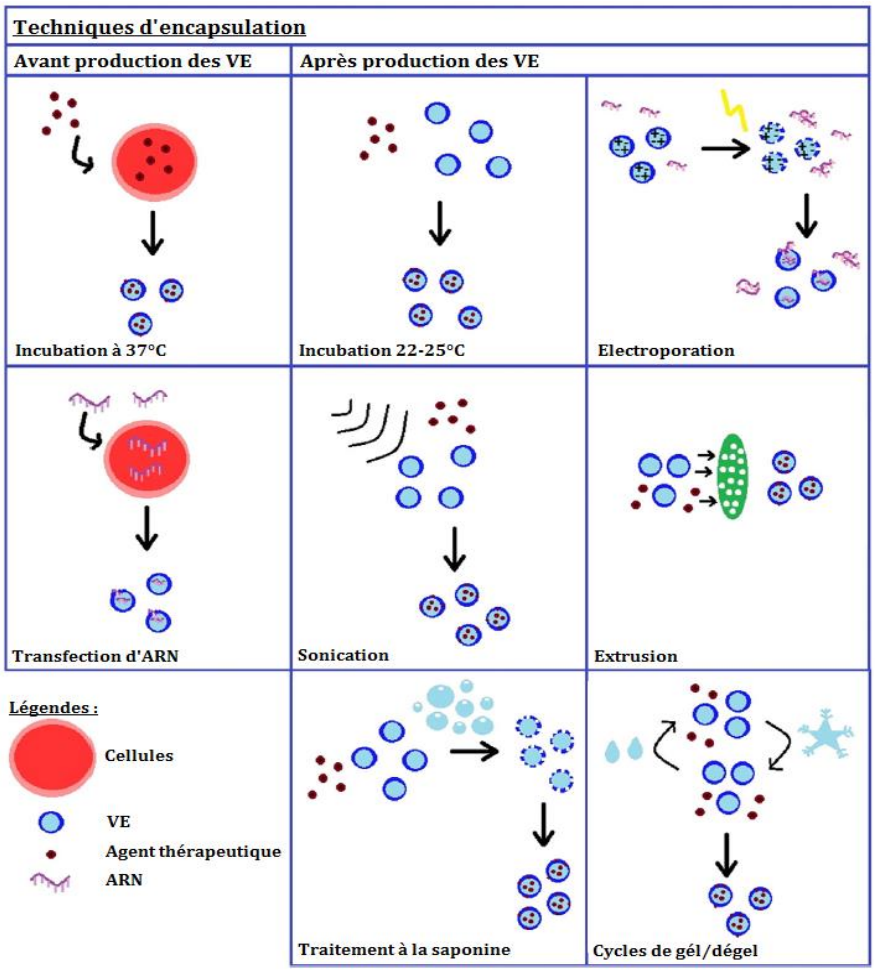


Figure 14. Stratégies d'encapsulation des agents thérapeutiques dans les vésicules extracellulaires [229]

A gauche sont représentées les techniques d'encapsulation avant production des VE. Les cellules productrices des VE sont chargées avec l'agent thérapeutiques ou les ARN puis les VE sont produites

à la suite d'un stimulus. A droite sont représentées les techniques d'encapsulation après production des VE, par incubation à température ambiante ou par différentes méthodes plus sophistiquées.

- Incorporation des agents thérapeutiques avant production des VE

La première méthode est une incubation des cellules productrices de VE à 37 °C avec l'agent thérapeutique. Différentes études ont mis en évidence la possibilité d'incorporer des agents thérapeutiques avec différents niveaux d'hydrophobicité, notamment des composés hydrophobes comme la plupart des PS [230,231]. Pascussi et *al*. ont utilisé cette méthode pour charger des cellules mésenchymateuses de PTX afin de produire des VE à activité thérapeutique. Ces VE ont montré une forte activité antiproliférative contre les cellules cancéreuses *in vitro* [232]. Bien que cette technique permette de créer en très grande quantité des VE chargées d'agents thérapeutiques efficaces *in vitro* et *in vivo*, la faille de cette approche est l'incapacité de contrôler l'efficacité d'encapsulation de la molécule. Ainsi, Jang et *al*. ont proposé une stratégie pour pallier à ce problème. Après chargement des macrophages avec divers agents de chimiothérapie, les cellules sont dégradées puis extrudées au travers de pores jusqu'à 1 µm. Il en résulte ainsi des nanovésicules ayant des propriétés similaires aux exosomes issus de ces mêmes cellules avec un rendement 100 fois plus important ainsi qu'une encapsulation significativement supérieure [233].

La seconde méthode utilisée est la transfection de petits ARN dans les cellules produisant les VE. Les VE peuvent transporter et délivrer efficacement des ARN messager ainsi que des protéines pour traiter le cancer. Il a ainsi été possible de transfecter des cellules avec un vecteur de la cytosine désaminase combinée à l'uracile phosphoribosyltransférase puis de générer des VE enrichies avec cet ARN afin d'inhiber la croissance tumorale [234].

- Incorporation des agents thérapeutiques après production des VE

Cette approche consiste à encapsuler la molécule dans les VE après leur production. Il est possible de procéder comme précédemment avec une simple incubation de l'agent thérapeutique avec les VE à température ambiante. Sun et *al.* ont ainsi encapsulé de la curcumine dans des exosomes après 5 min d'incubation à 22 °C [235]. Cette même approche a également été employée par Saari et *al*. avec du PTX mettant en évidence une amélioration des propriétés anti-tumorale de cet agent thérapeutique [229,236].

L'obstacle majoritaire étant la double couche phospholipidique, différentes approches ont été proposées :

- **Electroporation** : Aucune amélioration significative de la capacité d'encapsulation de petites molécules dans les VE n'a été montré avec cette méthode comparée à un chargement passif [230,237]. Par exemple, l'efficacité d'encapsulation du PTX dans des VE est inférieure aux résultats

attendus (7,2% uniquement) [238]. Cette technique s'est révélée intéressante en ce qui concerne l'encapsulation d'ARN [237,239]. Cependant, l'électroporation induit une agrégation des VE entre elles et altèrent l'intégrité structurale de la membrane exosomale [240].

- **Sonication** : Cette méthode s'est révélée plus favorable que l'électroporation. La reformation des exosomes au moment de la sonication a mis en évidence une forte capacité d'encapsulation de la catalase (26% *vs* 5% pour une incubation à 22 °C) [241]. La sonication étant généralement utilisée pour déstabiliser les membranes lipidiques, Lamichhane et *al*. ont montré une absence de dégradation des protéines exosomales et d'agrégation des VE durant la sonication. Cependant, une agrégation des ARN encapsulés est observée pour une sonication supérieure à 30 min [242]. De plus, la sonication augmente considérablement la taille des exosomes (179 nm *vs* 100 nm de diamètre) [241].
- **Extrusion** : L'avantage de cette méthode est l'augmentation de la quantité de VE produite. Jang et *al*. ont ainsi produit 100 fois plus d'exosomes en utilisant cette technique [233]. Cependant, comparé à un chargement passif ou l'électroporation, l'extrusion n'améliore pas la capacité d'encapsulation et entraine également un changement de taille des VE ainsi qu'un changement de potentiel zêta indiquant une altération de la population vésiculaire [230,241].
- **Traitement à la saponine** : La capacité d'encapsulation est fortement dépendant de la molécule. En effet, une augmentation de 12 fois a été observée dans le cas d'une porphyrine avec un faible degré d'hydrophobicité [230]. En revanche, dans le cas de l'encapsulation de la catalase, cette technique ne s'est pas révélée supérieure à la sonication [241]. Aucune modification de taille ou de charge des VE n'a été constatée mais ce traitement semble affecter leur immunogénicité [229].
- **Cycles de gel/dégel** : Cette technique augmente la capacité d'encapsulation des molécules comparée à une incubation à 22°C mais est deux fois plus faible qu'avec une sonication. De plus, elle déstabilise la membrane et entraine un relargage rapide de la molécule. Une observation des exosomes par TEM a mis en évidence cette altération ainsi qu'une agrégation [241]. De plus, une augmentation de taille des VE est observée après plus d'un cycle gel/dégel [243].

3.3.2. Vectorisation d'agents anticancéreux

Diverses études ont montré leur intérêt en tant que nanovecteur pour le traitement des maladies inflammatoires, cardiovasculaires et du cancer [235,236,244]. Après encapsulation de l'agent thérapeutique dans les VE, ces dernières sont utilisées comme nanovecteur possédant des propriétés remarquables en raison de leur composition permettant une stabilité accrue en circulation, une parfaite biocompatibilité ainsi qu'une capacité naturelle de ciblage tumoral [245].

En raison de leur taille nanométrique, les VE peuvent atteindre les tumeurs par ciblage passif *via* l'effet EPR. Une des premières études à avoir utilisé les VE comme nanovecteur pour le traitement du cancer a été réalisé par Mizrak et *al*. en 2013 après encapsulation de la pro-drogue 5-fluorocytosine. Deux semaines après une injection intratumorale des VE, une réduction significative de la croissance tumorale est observée chez les souris [234]. De nombreuses études se sont ensuite intéressées aux VE comme nanovecteur d'ARN. Ainsi des microvésicules chargées du siARN correspondant au TGFβ1 montrent une forte activité anti-tumorale après une injection i.v en raison de la suppression de l'expression de ce facteur et une régulation négative de la signalisation tumorale. Une inhibition de la croissance tumorale ainsi qu'une absence de métastase a été mis en évidence. De plus, les doses de siARN ont pu être considérablement diminuée grâce à leur incorporation dans les VE [246].

Les recherches ont mis en évidence la capacité des VE à délivrer efficacement les agents thérapeutiques afin de supprimer la croissance tumorale. Par exemple, *in vitro*, l'encapsulation du PTX dans des VE a permis d'augmenter la cytotoxicité de cet agent anti-cancéreux en comparaison de la drogue libre [232,236]. *In vivo*, des VE dérivées de cellules dendritiques chargées de DOX ont montré une inhibition de la croissance tumorale après i.v chez des souris nude. Son encapsulation a également permis de réduire la toxicité cardiaque qui est l'effet secondaire majeur de la DOX libre [247]. De plus, le succès de ces traitements est lié à une augmentation de l'induction apoptotique. Des exosomes de survivine induisent la cascade des caspases et par conséquent, une augmentation de la mort par apoptose des cellules d'adénocarcinome pancréatiques [248].
Les VE apparaissent comme un nanovecteur intéressant pour la médecine personnalisée. En effet, collectées à partir du sang d'un patient, les VE chargées *ex vivo* d'agent thérapeutique sont ensuite réinjectées à ce patient sans risque de réactions immunitaires [245].
Un autre avantage d'utiliser les VE comme nanovecteur dans les thérapies cancéreuses est leur capacité de traverser la barrière hémato-encéphalique. Yang et *al*. ont mis en évidence cette capacité sur des « zébraFish ». Après xénogreffes de cellules cancéreuses fluorescentes dans le cerveau des poissons, des exosomes de DOX sont injectés en intratumoral. Une forte diminution de la fluorescence des cellules cancéreuses et une suppression des marqueurs de croissance tumorale suit cette expérimentation [238].

- <u>Intérêt des VE en clinique</u>

Au total, 5 études cliniques se sont intéressées aux exosomes comme nanovecteur d'agents thérapeutiques dans les thérapies anticancéreuses et 6 autres se sont penchées sur les microvésicules (site web : clinicaltrials.gov).

Tang et *al*. ont utilisé deux modèles de tumeurs (hépatique et ovarienne) et diverses molécules de chimiothérapie afin de mettre en évidence les bénéfices de ce type de vectorisation. L'injection intrapéritonéale de cellules cancéreuses hépatiques forment des ascites après 10 jours. Ainsi, après traitement à l'aide de VE chargées de méthotrexate, le volume des ascites est considérablement réduit en comparaison du méthotrexate libre. De plus, ces souris ont présenté un allongement de leur temps de vie avec une inhibition de la croissance tumorale et une absence d'effets secondaires. Dans le second modèle tumoral, une i.v de VE chargées de cisplatine augmente le temps de vie des souris et permet d'obtenir 30% de cures tumorales contrairement au cisplatine libre où aucune cure n'est observée [249]. A la suite de ces travaux, une étude clinique de phase II a été menée sur 30 patients présentant des ascites malins avec un cancer avancé (NCT01854866).

3.3.3. Vectorisation de photosensibilisateur

Récemment les VE se sont révélées être des nanovecteurs intéressants pour véhiculer les molécules photosensibilisantes afin de pallier les inconvénients observés avec les liposomes. En effet, les recherches cliniques effectuées avec des liposomes chargés de PS ont montré une rapide destruction dans le plasma, une efficacité thérapeutique non supérieure à celle obtenue avec les PS libres et une possible toxicité en raison de l'ajout d'agents de furtivité à leur surface [250]. Une étude conduite par Fuhrmann et *al.* a permis de réaliser une comparaison entre des VE chargées de PS et des liposomes, possédant une taille similaire, composés de cholestérol et phosphatidylcholine. Il a ainsi été prouvé que l'utilisation de VE diminue significativement la viabilité cellulaire après PDT en comparaison des liposomes. Ce résultat pourrait être lié à l'augmentation de l'accumulation cellulaire du PS (> 60% avec les VE) [230].

La comparaison de l'incorporation des PS dans les VE en fonction de leur hydrophobicité a mis en évidence une corrélation entre augmentation de l'efficacité de chargement du PS et hydrophobicité. En effet, des PS très hydrophobes comme la mTHPC présentent une capacité de chargement de 30% alors que celle des PS très hydrophiles comme la porphyrine tétra(p-toluenesulfonate) n'est que de 1% [230].

En tant que nanovecteur de PS, de récentes études ont testé la capacité de diffusion, accumulation et cytotoxicité des VE dans un modèle 3D de sphéroïde multicellulaire. Lee et *al.* ont montré une pénétration jusqu'au cœur du sphéroïde après incorporation de la phtalocyanine liposomale dans des VE comparée aux liposomes seuls. Parallèlement, une augmentation de l'incorporation cellulaire ainsi qu'une efficacité PDT accrue a été mise en évidence après incubation avec ces VE [231]. L'acridine orange véhiculée par des exosomes dérivés de macrophages

augmente significativement son accumulation dans les cellules cancéreuses ainsi que son efficacité cytotoxique [251].

- Vectorisation de la mTHPC

Une preuve de concept réalisée en 2013 par Silva et *al*. a permis de mettre en évidence la capacité des VE à incorporer à la fois de la mTHPC comme agent thérapeutique et des NP magnétiques comme agent de contraste en IRM. Ces VE dotées d'une bi-potentialité ont montré leur capacité d'accumulation dans des cellules cancéreuses *in vitro* ainsi qu'une forte activité photocytotoxique comparable à la mTHPC libre dans le cas de cellules pulmonaires et supérieure dans le cas de cellules ovariennes. De plus, après une injection en intra-tumorale, ces mTHPC-VE ont montré une réduction du volume tumorale 7 jours après injection comparé à la mTHPC libre [252]. Ces mTHPC-VE présentent également une incorporation cellulaire par endocytose. Après marquage de leur membrane à l'aide d'un traceur fluorescent (PKH 67), une forte colocalisation avec les lysosomes a été mis en évidence [253].

Plus récemment, des VE chargées de mTHPC ont été modifiées par une fusion avec des liposomes dans le but de créer un système hybride. Cette fusion, permise grâce à l'ajout de PEG dans le milieu, est plus importante dans le cas d'une fusion entre des VE issues de cellules HUVEC et des liposomes non PEGylés comparée à une fusion entre des VE issues de cellules souches mésenchymateuses et des liposomes PEGylés. L'efficacité d'encapsulation de la mTHPC s'est révélée nettement supérieure pour les VE hybrides comparées aux mTHPC-VE (90% *vs* 3%). De plus, l'internalisation cellulaire de la mTHPC était 6 fois plus importante avec les VE hybrides comparées à la mTHPC libre et au Foslip®. Cependant, après une incubation avec de la mTHPC, la photocytotoxicité est proche de 100% quel que soit la formulation utilisée (VE hybrides, Foslip®, mTHPC libre). De plus, dans le sphéroïde multicellulaire, aucune différence entre les VE hybrides et les mTHPC-VE n'a été mise en évidence [254].

LE SPHÉROÏDE MULTICELLULAIRE

4.1. Résumé

Les modèles 3D *in vitro* sont utilisés dans la recherche contre le cancer comme intermédiaire entre les lignées cellulaires cancéreuses cultivées en monocouche et les tumeurs *in vivo*. La majorité des modèles de ce type, connu à ce jour, est d'une forme sphérique et sont issus de fragments tissulaires ou de cellules de diverses origines. Ils possèdent tous une architecture et des caractéristiques proches de celles observées *in vivo* mais leur utilisation répond à des nécessités différentes (Tableau 2) [255].

	Sphéroïdes multicellulaires	**Tumorosphères**	**Sphéroïdes organo-typiques**	**Sphères tumorales dérivées**
Composition				
Hétérogénéité tumorale	++	-	++	++
Interaction tumeur/stroma	+	-	++	-
Système immunitaire	+/-	-	+	-
Caractéristiques de la tumeur d'origine	+	-	++	++
Applications				
Croissance tumorale	++	+	+	+/-
Survie	++	-	+/-	+
Hypoxie	++	-	+	+
Migration/Invasion	+	-	+	+
Tumorogénicité *in vivo*	+/-	++	+	+
Médecine personnalisée	+	+	++	++
Radiosensibilité	++	+/-	+	ND

Tableau 2. Comparaison des différents paramètres entre quatre modèles 3D sphériques [255]

Paramètres jugés comme le meilleur (++), approprié (+), possible (+/-), inapproprié (-) et non déterminé (ND).

Le modèle 3D utilisé dans cette étude est le sphéroïde multicellulaire, initié par Sutherland et al pour l'étude de la survie tumorale après chimiothérapie. [256] Le sphéroïde multicellulaire modélise une microtumeur non vascularisée, comparable à une micrométastase telle qu'elle est observée chez certains patients [257]. Comparé aux cellules cultivées en monocouche, les sphéroïdes sont soumis à l'influence de gradients de concentration (pH, O_2 et nutriments). Le microenvironnement présente des similitudes avec celui observé dans les tumeurs solides, tout comme la croissance cellulaire. En effet, trois zones distinctes sont présentes : 3-5 couches de cellules prolifératives en périphérie du sphéroïdes, suivi d'une zone de cellules quiescentes et enfin, un cœur nécrotique, représentatif de la zone hypoxique d'une tumeur [258].

Le gradient d'oxygène présent dans le sphéroïde en fait un bon modèle d'étude pour la PDT. Pendant le traitement par PDT, l'oxygénation est primordiale. En effet, lorsque l'irradiance diminue, l'oxygénation pendant l'irradiation est conservée et ainsi, l'effet cytotoxique est plus important [259,260]. Il a également été montré que l'apoptose photo-induite est distribuée en périphérie du cœur nécrotique du sphéroïde [261]. Il a également permis d'étudier la diffusion et la distribution des PS. En effet, comparé au Photofrin®, la mTHPC demeure plus concentrée en périphérie du sphéroïde, dans les couches de cellules prolifératives. En effet, l'intensité de fluorescence de la mTHPC libre chute très rapidement en profondeur su sphéroïde [13,260,262].

La pénétration des principes actifs ou leur formulation nanovectorisée étant comparable à la situation observée *in vivo*, ce modèle a été utilisé pour évaluer des protocoles de chimiothérapie [257]. Il en est de même pour l'étude des liposomes classiques, PEGylés ou cationiques dont la pénétration dans le sphéroïde diffère selon leurs propriétés de charge, de surface, de taille et de fluidité [263,264].

Cette revue présente les récents développements dans les modèles de sphéroïdes multicellulaires afin de mieux comprendre les interactions entre les NP et les composants tumoraux pouvant ainsi affecter l'effet thérapeutique [77].

4.2. Revue scientifique

International Journal of Nanomedicine

Dovepress
open access to scientific and medical research

Open Access Full Text Article

REVIEW

Drug delivery to solid tumors: the predictive value of the multicellular tumor spheroid model for nanomedicine screening

Marie Millard[1,2]
Ilya Yakavets[1–3]
Vladimir Zorin[3,4]
Aigul Kulmukhamedova[1,2,5]
Sophie Marchal[1,2]
Lina Bezdetnaya[1,2]

[1]Centre de Recherche en Automatique de Nancy, Centre National de la Recherche Scientifique UMR 7039, Université de Lorraine, [2]Research Department, Institut de Cancérologie de Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy, France; [3]Laboratory of Biophysics and Biotechnology, [4]International Sakharov Environmental Institute, Belarusian State University, Minsk, Belarus; [5]Department of Radiology, Medical Company Sunkar, Almaty, Kazakhstan

Abstract: The increasing number of publications on the subject shows that nanomedicine is an attractive field for investigations aiming to considerably improve anticancer chemotherapy. Based on selective tumor targeting while sparing healthy tissue, carrier-mediated drug delivery has been expected to provide significant benefits to patients. However, despite reduced systemic toxicity, most nanodrugs approved for clinical use have been less effective than previously anticipated. The gap between experimental results and clinical outcomes demonstrates the necessity to perform comprehensive drug screening by using powerful preclinical models. In this context, in vitro three-dimensional models can provide key information on drug behavior inside the tumor tissue. The multicellular tumor spheroid (MCTS) model closely mimics a small avascular tumor with the presence of proliferative cells surrounding quiescent cells and a necrotic core. Oxygen, pH and nutrient gradients are similar to those of solid tumor. Furthermore, extracellular matrix (ECM) components and stromal cells can be embedded in the most sophisticated spheroid design. All these elements together with the physicochemical properties of nanoparticles (NPs) play a key role in drug transport, and therefore, the MCTS model is appropriate to assess the ability of NP to penetrate the tumor tissue. This review presents recent developments in MCTS models for a better comprehension of the interactions between NPs and tumor components that affect tumor drug delivery. MCTS is particularly suitable for the high-throughput screening of new nanodrugs.

Keywords: nanodrug, tridimensional model, distribution, accumulation, cytotoxicity

Introduction

The complex biology of cancer highlights the urgent need of specific and effective treatments. Low-weight molecules that have been developed as antineoplastic agents since several decades have enabled progress in cancer management, gradually placing chemotherapy at a crucial position in cancer care. However, poor water solubility, unfavorable pharmacokinetics and adverse side effects of many molecules with potential antineoplastic properties have hindered their clinical applications.[1] The lack of selective drug delivery to neoplastic tissues is the main reason for both systemic drug toxicity and poor efficiency. Therefore, tumor targeting is becoming a major issue in cancer therapy since it would allow to overcome side effects and to ensure full effectiveness of antineoplastic agents. In this context, nanomedicine, based on passive and/or active (or receptor-mediated) tumor targeting, yielding improved drug delivery has been considered promising.[2] Recent developments in the field have succeeded in placing a significant number of anticancer nanotherapeutics in the pipeline; some of them are now investigated in advanced clinical settings.[3] Despite this progress,

Correspondence: Lina Bezdetnaya
Institut de Cancerologie de Lorraine, 6 Avenue de Bourgogne – CS 30519, 54519 Vandoeuvre-les-Nancy, Cedex, France
Tel +33 3 83 59 83 53
Fax +33 3 83 44 76 31
Email l.bolotine@nancy.unicancer.fr

submit your manuscript | www.dovepress.com
Dovepress
http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S146927

© 2017 Millard et al. This work is published and licensed by Dove Medical Press Limited. The full terms of this license are available at https://www.dovepress.com/terms.php and incorporate the Creative Commons Attribution – Non Commercial (unported, v3.0) License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/). By accessing the work you hereby accept the Terms. Non-commercial uses of the work are permitted without any further permission from Dove Medical Press Limited, provided the work is properly attributed. For permission for commercial use of this work, please see paragraphs 4.2 and 5 of our Terms (https://www.dovepress.com/terms.php).

it must be conceded that until now, few nanodrugs have been included in the arsenal of chemotherapeutics used for clinical cancer care management. Nanotherapeutics issued from promising preclinical studies often failed to achieve the expected results in patients, and as such, nanomedicine is still considered challenging for cancer therapy.[4] To be efficiently delivered to the tumor, nanoparticles (NPs) must overcome different biological barriers that influence the extent of tissue penetration. Molecule diffusion through the interstitial space strongly depends on the structure and composition of the interstitial compartment. The dense extracellular matrix (ECM) mainly composed of loosely, poorly organized and interconnected collagen lattices together with polysaccharides like glycosaminoglycans (GAGs) to ensure the structural integrity of the network regulates the movement of NPs in the interstitium.[5] In addition, host stromal cells including fibroblasts contribute to the production of ECM or to the capture of extravasated compounds (mononuclear phagocytes).[6,7] Size of interstitial spaces along with the reduction in cell density is another feature that influences the movement of molecules in tumors.[8,9] Molecule transport through vascular space is closely related to vessel morphology and to vascular organization.[10,11] With the tumor growth, vessel compressions due to the development of proliferating cells or other stromal components contribute to the enhancement of blood flow and intravascular pressure irregularities.[12,13] These parameters strongly disrupt oxygen, nutrient and blood-borne molecule delivery to tumor tissues.[10]

Extravasation of NPs >40 kDa is facilitated by the high permeability of tumor vessels. In the presence of vascular pores, from 200 to 1,200 nm in size,[14] larger than those in normal blood vessels (range 50–150 nm), the fenestrated neovascular wall enhances vascular permeability with, however, important variability both spatially and temporally within a tumor or from one tumor to another.[15] This particularity of tumor vessels was first described by Matsumura and Maeda in 1986. Attributed to the enhanced permeability of blood vessels along with the low clearance rate of poor lymphatic system developed by tumor tissues, this phenomenon was called enhanced permeability and retention (EPR) effect (Figure 1).[16] Although the limitations of EPR effect have been extensively discussed,[17] it remains the main process of passive tumor targeting by NPs, resulting in an increased drug accumulation in tumor while sparing healthy tissues.[18] This selective accumulation and retention of NPs in solid tumor by EPR effect, contrary to small molecules

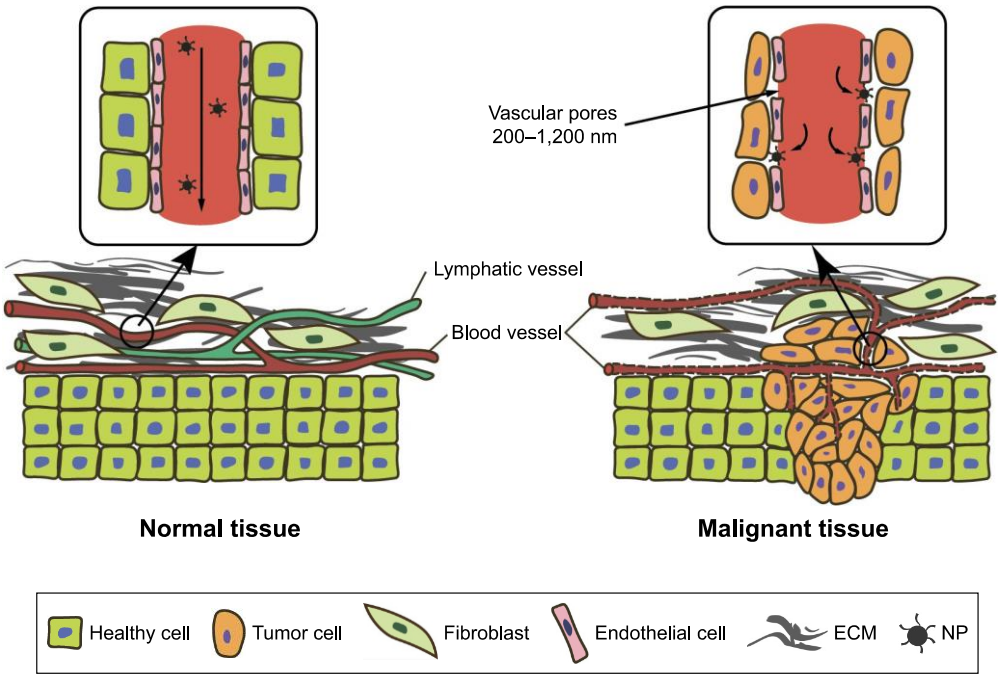


Figure 1 Schematic representation of NP EPR effect in tumor tissue.
Note: Tumor tissues show a disorganized vascular network with fenestrated blood vessels involving an improvement in NP extravasation and a lack of lymphatic vessels compared to normal tissues.
Abbreviations: ECM, extracellular matrix; EPR, enhanced permeability and retention; NP, nanoparticle.

that get out of the tumor vessels, makes the use of spherical tridimensional (3D) model highly appropriate.[19,20] In fact, 3D models have expanded in the recent years reproducing better the complexity of the tumor than 2D cell culture and therefore being more representative of clinical situation.[21] Among them, multicellular tumor spheroids (MCTSs) are of great interest in cancer research since some of their physiological features are close to those of avascular cancer metastases.[22,23] MCTS models have been recognized suitable for studies of cell survival, cell proliferation, resistance to drug therapy, cell migration and hypoxia phenomena.[24] MCTS models are also appropriate to estimate the ability of nanotherapeutics to penetrate and distribute inside tumor tissues.[19,25] This review provides a comprehensive overview of the MCTS model focusing on the evaluation of nanodrugs along with the possibility to better predict its in vivo translation.

MCTS model

Although 3D models cannot fully reflect the extent of tumor complexity and heterogeneity, they can be finely handled to meet specific tumor aspects. The recent review of Katt et al[23] on the subject gave a valuable insight into different in vitro tumor models, with their particularities and specific use. Among them, spheroid-based models are the most widely used. Most 3D models have spherical shape, and the word "sphere" is commonly used to name any cellular aggregate. Spherical models can be obtained from fragments of tumors (tissue-derived tumor spheres and organotypic multicellular spheroids), from cancer stem cell culture (tumorospheres) or from single cancer cell suspension culture (MCTSs). All models have strengths and weaknesses. For example, fragments of tumor are suitable to study both tumor heterogeneity and the interaction between tumor and stroma, whereas tumorospheres are more appropriate for studying cancer stemness and in vivo tumorigenicity. The MCTS model is probably the most convenient to evaluate posttreatment tumor growth and cell survival, and it is therefore well adapted for high-throughput drug screening.[19,25,26]

Characteristics of MCTS model

Described for the first time in the early 1970s, Sutherland applied MCTS with the aim to evaluate tumor cell survival after chemotherapy. The MCTS model is an intermediate between 2D cell culture and in vivo tumor models (Figure 2). Derived from cancer cell lines known to be easily maintained in culture conditions, the 3D structure of MCTS mimics nonvascularized microtumors, which are similar to micrometastases observed in patients.[27] Indeed, MCTS shares three fundamental characteristics with in vivo tumors: 1) a heterogeneous cellular growth with the presence of proliferating cells at the periphery surrounding a ring of quiescent cells and a necrosis core; 2) pH, nutriments and oxygen gradients from the periphery to the center and 3) more or less complex ECM that depends on the cell lines and the technique used for MCTS production.

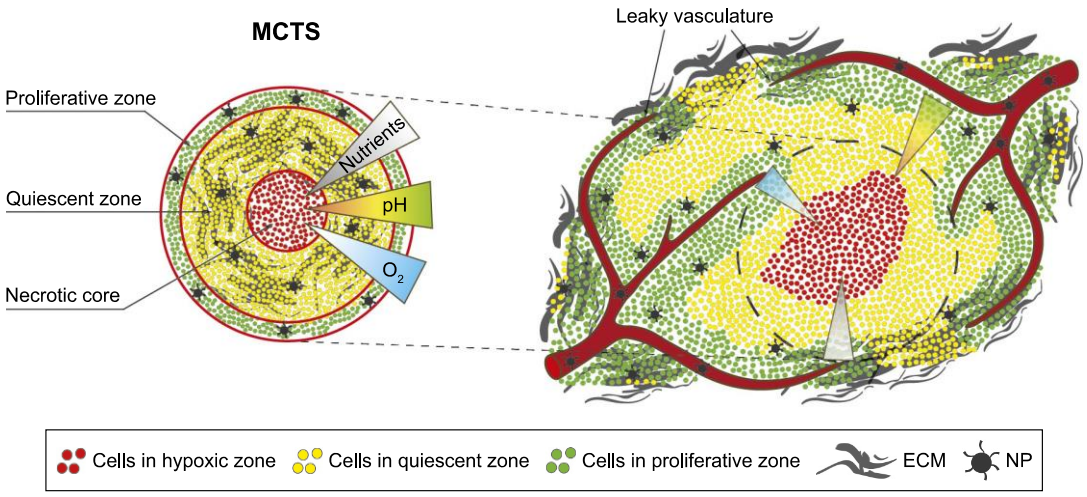


Figure 2 Schematic representation of similarity between tumor and MCTS.
Notes: MCTS (left panel) displays similarities with in vivo tumor (right panel). MCTS is composed of proliferative cells in periphery, quiescent cells in the intermediate zone and a necrotic core. Three concentration gradients (nutrients, pH and oxygen) are comparable to the situation in avascular tumor regions.
Abbreviations: ECM, extracellular matrix; MCTS, multicellular tumor spheroid; NP, nanoparticle.

1. MCTS growth is similar to the one observed in solid tumors since the latter grows in 3D from the center to the periphery. The organization of the MCTS in three distinct layers, the outer one composed of proliferating cells and the inner one composed of quiescent cells and necrotic core, depends strongly on MCTS volume and growth rate. Below 120 µm in diameter, MCTS is well oxygenated while oxygen concentration and cell viability decrease rapidly with the spheroid growth.[28,29]
2. The thickness of viable cell layer decreases in MCTS with low doubling time, and the fastest growing spheroids tend to have both higher oxygen consumption and pH decrease although anoxia is not necessary to obtain low pH values. These characteristics make MCTS model particularly well adapted for the evaluation of oxygen-dependent treatments such as ionizing radiation and photodynamic therapy (PDT).[30–32]
3. Together with hypoxia, the ECM represents a crucial determinant in the tumor progression via epithelial–mesenchymal transition (EMT), tumor migration, invasion and metastasis processes. Many ECM proteins (fibronectin, laminin, collagen and GAGs) can be found in MCTS in similar proportions to those expressed in tumor in vivo.[33] As a matter of fact, numerous studies reported the utility of MCTS taking into consideration the mechanisms of tumor cells' migration and invasiveness as well as the treatments applied to prevent them.[26,34]

MCTS production techniques

MCTS is the 3D in vitro model that is most widely used for different purposes, such as cell proliferation, tumor growth, immune interactions, drug screening and in the case of the ECM-embedded MCTS, for cell invasion and matrix remodeling.[23] The reason for this widespread use is the relative simplicity of MCTS production even though methods are becoming more and more complex with technological advances.[19,26] Methodology for two commonly used techniques (liquid-overlay technique and gyratory rotation system) is based on the promotion of cell aggregates obtained from single tumor cell placed in agarose (or other inert substance)-coated flasks to prevent cell adhesion to the substrate. After 3–4 days growth, the aggregates are transferred into appropriate containers (coated petri dishes, culture plates, spinner or gyratory rotation system) where MCTS development is maintained until reaching the suitable size.[35] The liquid-overlay technique offers the collection of few but more homogeneous in size MCTS, whereas spinner flask or gyratory rotation system is usually used for mass production (Table 1).[23,26] The third method named hanging drop technique consists of the formation of cell droplets hanging on the underside of the lid of tissue culture dish. Cell clusters induced by gravity at the bottom of the drop grow into spheroids with a more regular size.[19,23] Recently, innovative but sophisticated solutions have taken advantage of new technologies, such as microfluidics, to improve the control of size and composition of MCTS while maintaining high throughput (Table 1).[19,36]

To be more representative of tumor complexity, coculture of tumor cells with immune, endothelial cells or fibroblasts helps to better understand a crosstalk between cancer and stromal cells as well as the mechanisms of metastatic invasiveness.[19,33,37] For example, the migration of endothelial cells into MCTS or the formation of vascular networks within spheroids is often used to assess the potential of tumor vascularization. Thus, by means of this spheroid coculture technique, factors that induce or inhibit angiogenesis can be studied.[38] Scaffold-based techniques using natural (Matrigel®, hydrogels or alginate gels) or synthetic polymers as a semisolid matrix provide an excellent means to study the influence of external physical factors on the spheroid growth. Manipulating scaffolds to mimic particular physical properties of the tumor environment, such as stiffness and porosity, contributes to significant diversification of MCTS application for different and well-defined purposes.[39]

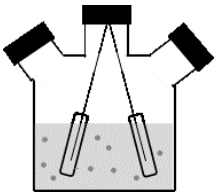
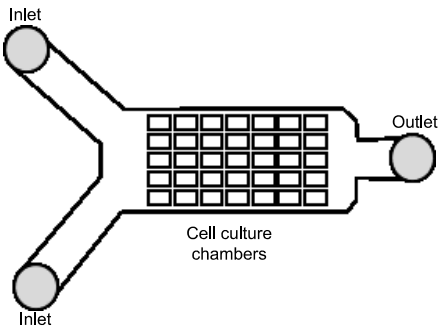
MCTS as a predictive model for nanodrug screening

Evaluation of drug sensitivity

Nowadays, MCTS rather than 2D cell culture-based assays are considered reliable enough for high-throughput drug screening. This model enables the selection of negative and/or positive new drug candidates, especially nanotherapeutics, thus reducing animal testing.[19,40,41] Moreover, the development of MCTS-based biosensor devices is becoming widespread.[36,42] Recently, Patra et al demonstrated the advantage to couple microfluidics with flow cytometry for the rapid production and viability analysis of a great number of MCTS with well-defined size, which were submitted to different drugs and their combination.[36]

Drug screening typically involves several steps. After spheroid formation (Table 1) and incubation with the drug for various periods of time, measurements of spheroid growth kinetics (ie, spheroid integrity, growth inhibition and regrowth after treatment) are performed.[43] They are followed

Table 1 Comparison of MCTS fabrication methods for drug screening purpose

Methods	Advantages	Disadvantages
Spinner flask 	Simple Mass production Long-term culture High throughput	Nonhomogeneous size and cell composition High shear force ± Expensive (special equipment required)
Liquid overlay technique	Simple ± Homogeneous spheroid size ± Coculture Inexpensive ± High throughput	No control of spheroid size Tedious medium replacement Long-term culture difficult
Hanging drop technique	Simple Control of spheroid size Homogeneous spheroid size Coculture with defined cell types Inexpensive	Tedious handling Time consuming Long-term culture difficult Low throughput
Microfluidic 	Control of cell microenvironment Homogeneous size and cell composition Faster spheroid production and handling Analysis may be integrated into the device High throughput	Spheroid recovery difficult Special devices required High complexity Expensive

Abbreviation: MCTS, multicellular tumor spheroid.

by the determination of cell viability (eg, acid phosphatase or lactate dehydrogenase release assays)[43,44] and/or cell survival by testing the ability of a single cell to grow into a colony by clonogenic assay.[40,45] Overall, MCTS is more resistant to the treatment than 2D cell culture and can recapitulate the drug resistance, observed in solid tumors.[41,42,46]

It must be noted that MCTS with both hypoxic and necrotic areas closely mimic specific gene expression profiles of tumors in vivo.[47] Hypoxia and necrosis play key roles in the complex mechanisms (stress response, gene expression, signal transduction) of anticancer drug resistance. Spheroids have contributed to better understanding of the altered responsiveness of hypoxic tumor cells and the importance of cell–cell and cell–matrix interactions in therapeutic resistance.[48] Desoize and Jardillier[49] in 2000 showed that A549 human lung cancer cells, which have established contact with their microenvironment, become much less sensitive to anticancer drugs (ie, 27-fold decrease for cisplatin and 6,625 times lower sensitivity for vinblastine). In another study, it has been shown that acquisition of drug resistance by ovarian carcinoma spheroids, after treatment with Taxol, was related to culture conditions of spheroids. The use of compact spheroids, with an important E-cadherin expression, involves a low incorporation and poor diffusion of chemotherapeutic drugs. This result revealed the impact of adhesion molecule in drug resistance.[48,50] Thus, MCTS is recognized to be a powerful model to assess tumor sensitivity to anticancer agents.[19,25,40,41]

The tumor-immune response assessed by MCTS coculturing between tumor and immune cells in order to observe the migration, interactions and cytotoxic effects of immune cells within spheroids is another contribution of MCTS to the development of new therapeutic strategies. It is important to note that immune response can be stimulated by promoting infiltration and cytotoxicity of leukocytes in MCTS.[51] For example, it was demonstrated that the blocking of lactic acid secreted by tumor cells increased the migration of monocytes into MCTS.[52]

Evaluation of drug content and distribution in MCTS

Considering the complex tumor environment, the heterogeneous and limited dissemination of conventional anticancer drugs in tumors has been regarded as a crucial issue in cancer treatment.[53–55] In comparison with their low-weight molecular payload, nanocarriers have increased size and other specific characteristics listed in the "Impact of physicochemical properties of NPs on their penetration" section below, which increase the risk of impaired distribution within the tumor. In this regard, 3D in vitro models and above all MCTS have been applied for evaluating the NP potential to accumulate and penetrate in depth the tumor tissue.[20,34,56–59]

Determination of free or drug-loaded NPs' distribution and concentration in spheroids can be performed by various techniques. The distribution of gold NPs in MCTS could be precisely assessed with transmission electronic microscopy (TEM),[60,61] while fluorescence microscopy was successfully applied for the detection of dye-labeled NPs. In this case, the NPs are either labeled with fluorescent probes,[34,57,62–64] specific dyes or loaded with fluorescent drugs such as doxorubicin (DOX),[58,65–68] Oregon Green 488 Taxol,[20] or porphyrin-based photosensitizers (PSs).[59,69] Estimation of drug concentration in MCTS could be done by high-performance liquid chromatography (HPLC),[20] flow cytometry or chemical extraction with successive fluorescence measurements.[43,44,57,64]

After incubation, MCTS is collected and embedded in special medium as tissue-Tek before being cut in thin sections (~5 µm).[32,57] The next step consists of examining spheroid sections by fluorescence microscopy to determine the extent of fluorescence intensity toward the spheroid center.[20,34,58,59,62,64,70] NP penetration can also be evaluated in intact fixed MCTS[64–66] or in intact living MCTS by using confocal laser scanning microscopy.[34,71] An important lesson to draw from these experiments has been the excellence of the MCTS model to determine the main factors hindering or favoring NP penetration. Two major factors can modulate accumulation and distribution of NPs in MCTS. The first one is specific characteristics of cell lines and/or methods used to form spheroids. MCTS with lower cell density and larger extracellular space enable NP migration, whereas stroma-embedded MCTS turns out to be an appropriate model to demonstrate the barrier effect of stromal components on NP penetration.[34,43]

The second main factor is a design of NPs that takes into account various parameters such as size,[20,60–62] composition,[72] surface charge and coating of the nanocarriers.[20,64] These properties are valuable indications for the optimal design of nanocarriers, allowing improved penetration in MCTS and treatment effectiveness. Surface of NPs plays a key role in its intra-spheroid repartition. Here, an attractive approach is the addition of collagenase on the NP surface to trigger ECM degradation, increasing the accessible space for NP transport and therefore improving its penetration.[73] Likewise, gold NPs present an added benefit in drug delivery, thanks to the ease of fabrication and controllable surface functionality.[60]

Recent studies have shown that functionalization of gold NPs with tiopronin on NP surface considerably increases accumulation of NPs in MCTS and in vivo in solid xenografted tumors.[61,74] Another interesting approach is to design an NP with regulated drug release to control the localization of NP inside MCTS or solid tumor. For example, Sims et al designed a PEGylated NP to target center areas, thus achieving deeper penetration into spheroids. In the same paper, the authors successfully designed the NPs coated with a cell-penetrating peptide (MPG) to target proliferative regions strongly confining NPs to periphery layers.[64] Gold NP surface functionalization using multilayer formulation was also tested in 3D cells.[72] Two-layer particles were synthesized with an inner layer of alkanethiol and an outer layer of phosphatidylcholine (a major component of biological membranes). Three-layer nanoshells were additionally coated with high-density lipoprotein. Both types of NPs demonstrated considerably enhanced penetration and diffusion into 3D cells compared to standard polyethylene glycol (PEG)-coated nanoshells.[72]

Impact of physicochemical properties of NPs on their penetration

Physicochemical parameters assigned to a specific compound are important for its transport and distribution in biological media, playing a critical role in NP penetration and accumulation in solid tumor. Albeit many reviews provided insightful information about this complex issue, the contribution of each parameter is not easy to evaluate.[3,17,26,75] Study of NPs' structural properties such as size, shape, charge or surface (Figure 3) in the MCTS model provides information for understanding and predicting drug delivery to solid tumors.

1. Many studies demonstrated improved penetration in MCTS for NPs with small size (<100 nm).[20] For example, 50 nm-sized lipid NPs showed a considerably deeper penetration and homogeneous distribution as compared to 120 nm-sized ones.[76] NPs >100 nm are too large to cross ECM interstitial spaces in spheroid[73,77] and are confined to the outer layers as demonstrated with gelatin NPs (210 nm) that only penetrated ~40 µm deep.[20] Micelles are generally smaller than liposomes and penetrate deeply and

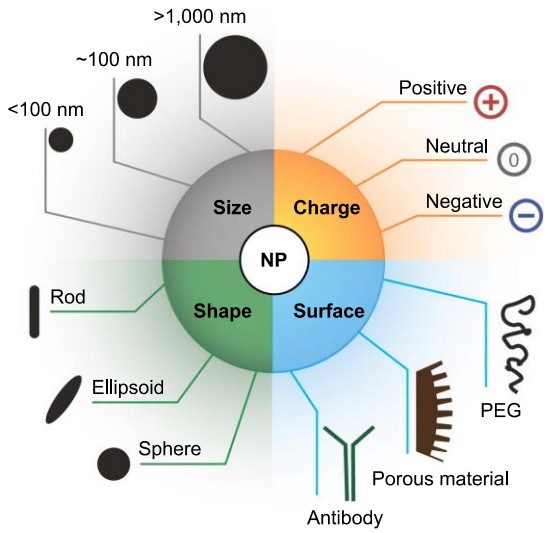


Figure 3 NP properties affecting drug penetration in MCTS.
Abbreviations: MCTS, multicellular tumor spheroid; NP, nanoparticle; PEG, polyethylene glycol.

homogeneously in MCTS.[20,62] For example, it was shown that very small-sized micelles (15 nm) penetrated faster and deeper in spheroids but over time failed to be retained and thus accumulated to the same extent than their larger counterparts (55 nm).[62] Huang et al evaluated how the size of ultrasmall gold NPs could influence localization and penetration in MCTS. The authors highlighted that ultrasmall gold NPs (2 and 6 nm in diameter) cannot be observed in MCTS due to their small size.[61] The penetration behavior of NPs in MCTS was revealed to be comparable to solid tumor.[60] Several reports in tumor-bearing rodents demonstrated that NPs with ~100 nm in diameter are considered optimal to escape extensive clearance and to achieve vascular extravasation by the EPR effect.[75,78] In fact, NPs <50 nm interact with liver cells and are poorly retained in tumor tissues.[75] The same holds for NPs >300 nm, which are massively captured by RES.[79]

2. An equally important factor is the surface charge of NPs.[80] The penetration of NPs into MCTS depends strongly on their charges as shown for negatively charged quantum dots that penetrated deeper into spheroids than their positive counterparts, the latter being confined to superficial layers of spheroids.[81] Other examples were given by liposomes similar in sizes but different in chemical composition that strongly influenced their surface charge. Neutral liposomes displayed important penetration capacity into spheroids, but they accumulated less than their cationic DOTAP (N-[1-(2,3(dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium methyl-sulfate) counterparts. Neutral DMPC (dimyristoyl-phosphatidylcholine):cholesterol liposomes (~−9 mV) exhibited at 100 µm from the spheroid rim 49.2% diffusion compared to 2.3% and 21.4% for cationic DMPC:DOPE (dioleoylphosphatidylcholine) liposomes (~50 mV) with respectively DC-chol (3b-[N-(N′,N′-dimethylaminoethane)-carbamoyl]cholesterol) and DOTAP components.[57] In another study, the limited penetration of cationic DOTAP liposomes into spheroids was attributed to electrostatic interactions of this type of liposomes with spheroid cells.[20,57] However, in the same study, DOTAP liposomes accumulated to a higher extent than neutral (DOPE) or anionic (DOPS) ones, suggesting that accumulation of NPs is not fully related to their ability to penetrate in depth into spheroid. A similar pattern of NPs' diffusion in tumor tissue was observed in vivo.[75] It must be noted that cationic liposomes targeted tumor vasculature by electrostatic binding and displayed lower ability to disseminate at distance from the vessel area in the tumor.[82] It was also shown that both anionic and cationic NPs (<−20 mV and >+10 mV) are retained by tumor ECM, probably because local patches of either negative or positive charge of heparan sulfate chains are attached to the laminin/collagen IV network.[83]
3. The shape of the nanomaterial chosen for drug delivery also plays a critical role in NP penetration and accumulation in MCTS. The aspect ratio height/diameter (*H/D*) of NPs impacts its transport through interstitial spaces of MCTS. For example, experimental findings showed that decreasing the aspect ratio from 0.45 to 0.30 improved NP accumulation and produced homogeneous penetration into spheroids.[77] Short nanorods (400 nm in length) accumulate more rapidly and are better internalized into spheroids as compared to long nanorods (<2,000 nm in length).[84] In addition, nanorods compared to nanospheres seem to diffuse more rapidly in spheroids.[85] This result is in agreement with in vivo observations, showing that elongated shapes, such as rods and filaments, favor extravasation and accumulation of NPs. Distribution kinetics given for both shapes (elongated vs spherical) indicate that flexible nanorods accumulated more rapidly and penetrated more deeply in tumors as compared to nanospheres with identical hydrodynamic radius.[86]
4. Modification of the surface coating is another factor affecting penetration of NPs. The inert PEG placed on the NP surface in order to minimize the interactions with the RES prevents cell interactions and therefore limits NP penetration into MCTS.[20,57,75] Conversely, enhancement of NP penetration by using ECM-degrading enzymes

was suggested. This approach was verified by using collagenase-coated NPs that produced a fourfold increase in the amount of 100 nm NPs delivered in MCTS.[73] NP diffusion in MCTS could also be improved by addition of cell-penetrating peptides on the NP surface such as RDG,[87,88] TAT or MPG.[64,65] It has been demonstrated that MPG-modified poly(D,L-lactic-*co*-glycolic acid) (PLGA) NPs exhibited a greater fluorescence intensity and a higher incorporation and diffusion in HeLa spheroids compared to unmodified PLGA NPs.[64]

Another modification affecting the carrier surface is the addition of a targeting moiety to address the cargo to specific tissue. The addition of a ligand at the NP surface, directed against receptors exposed at the outer cell surface, is indeed a mean to improve uptake and distribution of NPs in the tumor despite the NPs' complicated tumor microenvironment and complex surface chemistry.[67] In addition, drug delivery mediated by immunotargeting was reported to result from drug internalization into the targeted cells rather than the NPs' increased localization in the tumor.[89] Therefore, the risk of early internalization into the cells of the outer rim of the spheroid is not negligible.[90] Targeting approaches are particularly justified for brain cancer since >98% of drug molecules do not reach the tumor, mainly as a result of the blood–brain barrier (BBB). An attractive possibility to increase NPs' abilities to cross the BBB and to penetrate the glioma tissue consists of the development of dual-targeting delivery systems.[91] The first approach is to place at the surface of the carrier a unique ligand that targets the corresponding receptor overexpressed at the surface of both endothelial and/or cancer cells like angiopep-2, a specific ligand of low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP).[63] Another solution is to modify the carrier surface with two kinds of ligands, one could target the endothelium and the other could target tumor tissue. The third possibility is to use two kinds of ligands, the first one specific for both BBB and the cancer cells and another ligand could promote the NP penetration into the tumor parenchyma. This strategy was investigated by Zong et al with DOX liposome decorated with a transferrin (Tf) fragment to target the Tf receptor overexpressed at the surface of both endothelial and tumor cells and at the same time with cell-penetrating peptide to facilitate intracellular drug delivery in tumors. The authors demonstrated a deeper NP penetration into the cell spheroid and an improved therapeutic effect of glioma tumors in animals.[65]

Another possibility to achieve a higher NP penetration into MCTS was assessed by coadministration of the NP with the peptide iRGD, thus facilitating the NP extravasation and distribution.[88] The coadministration of a basic liposomal formulation of Taxol together with the iRGD peptide produced a threefold increase in drug accumulation and penetration into MCTS as compared with other liposomes or micelles especially designed to improve drug delivery in MCTS.[20]

Drug efficacy depends on NP behavior in MCTS

The relationship that exists between the ability of NPs to accumulate/to penetrate the spheroid and drug cytotoxicity is taken more into consideration when evaluating the potential of NPs to be efficient in vivo.[20,60] In this context, Table 2 resumes recent studies that used the MCTS model to evaluate drug accumulation, penetration and cytotoxicity with the aim to demonstrate the anticancer potential of new nanotherapeutics.

In general terms, the highest cytotoxic effect in MCTS was obtained with NPs exhibiting both high penetration and accumulation. Solomon et al[20] showed recently that drug accumulation is associated with greater cytotoxicity even if NPs are restricted to the spheroid periphery. Formulations that penetrate deeper are also cytotoxic, but better effects are obtained when both high accumulation and penetration can be achieved.[20] As was already mentioned, drug penetration into the tumor tissue is a major concern in brain cancer management, and many studies with the aim to evaluate the capacity of new nanoformulations to penetrate the tumor tissue used MCTS from brain cancer cell lines (Table 2).

DOX, one of the most commonly used drugs in oncology, has occupied a key place in nanomedicine with several nanoformulations, which were either approved for treatment of patients or subjected to clinical investigations.[92] In fact, the serious DOX-induced adverse effects in patients are a major argument to improve its selective delivery to tumors.[92] The fluorescent properties of DOX molecule rend the DOX tracing quite easy in organs and cells, and therefore, DOX is considered as an excellent tool for evaluation of NPs in vivo and in vitro.[93] PEGylated liposomal formulations of DOX (Doxil®/Caelyx®) were already applied in patients with satisfying results in terms of reduced cardiotoxicity, albeit no significant enhancement of therapeutic efficacy has been achieved.[4] The limited tumor distribution of DOX, which was shown to be restricted to the vascular region in vivo and to the outer rim in spheroids, is detrimental to its cytotoxic potential and fully justifies the investigations aiming to increase DOX efficiency, especially by the enhancement of both DOX accumulation and distribution in cancer tissues.[53,67] This issue is particularly crucial in the context of multidrug

Table 2 NPs evaluated with MCTS for drug penetration, accumulation and cytotoxicity

Drug	NPs	MCTS	Drug resistance	Target/ligand	In vivo study	Reference
DOX	Liposomes	Brain cancer C6	–	Tf receptors/Tf TAT	+	65
	Triblock polymeric micelles	Cervical cancer SiHa	–	–	+	58
	PLGA NPs	Lung cancer A549	–	Tf receptors/Tf	+	66
	Chitosan NPs	Brain cancer SH-SY5Y	–	Sialic acid groups/CPBA	+	67
DOX + CUR	Micelles	Brain cancer U87MG	+	GLUT1/GLUT1 scFv	–	98
DOX + DHA	Nanostructured lipid carrier	Breast cancer MCF7/Adr	+	–	–	71
DOX + α-tocopherol	Solid lipid NPs	Breast cancer MCF7/Adr	+	–	–	96
DOX + CQ	Polyphosphazene vesicles	Breast cancer MCF7/Adr	+	–	–	95
Oregon Green PTX	Liposomes/micelles	Lung cancer LLC	–	Integrin/iRGD peptide	–	20
PTX + coumarin-6	PLA NPs	Brain cancer C6	–	MT1 MMP/MT1-AF7p Integrin/iRDG peptide	+	88
PTX + rhodamine	PEG NPs	Brain cancer U87MG	–	LRP receptor/angiopep	+	63
PTX + rhodamine + CUR	PEG-phosphatidyl ethanolamine micelles	Ovarian cancer NCI-ADR-RES	+	Tf receptors/Tf	+	97
DTX + coumarin-6	PLGA NPs	Brain cancer C6	–	Integrin/RGD peptide	+	87
DTX + FITC	VES-g-ε-PLL NPs	Brain cancer C6	–	–	+	100
mTHPC	Liposomes	Epidermoid cancer HeLa	–	–	–	59
Liposomal phtalocyanine	Natural MVs	Epidermoid cancer HeLa	–	–	–	69
Proapoptotic drug NCL-240 + rhodamine	Liposomes/micelles	Ovarian cancer NCI-ADR-RES	+	Tf receptors/Tf	–	70

Abbreviations: CPBA, 4-carboxyphenylboronic acid; CQ, chloroquine phosphate; CUR, curcumin; DHA, docosahexaenoic acid; DOX, doxorubicin; DTX, docetaxel; FITC, fluorescein isothiocyanate; LLC, Lewis lung carcinoma; LRP, lipoprotein receptor-related protein; MCTS, multicellular tumor spheroid; MMP, matrix metalloproteinase; MT1, membrane type-1 metalloproteinase; mTHPC, meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorine; MV, membrane vesicle; NA, not applicable; NP, nanoparticle; PEG, polyethylene glycol; PLGA, poly(D,L-lactic-co-glycolic acid); PTX, paclitaxel; GLUT1, glucose transporter-1 antibody; GLUT1 scFv, glucose transporter-1 antibody single-chain fragment variable; SiHa, human cervical carcinoma cells; TAT, cell penetrating peptide; Tf, transferrin; VES-g-ε-PLL, RRR-α-tocopheryl succinate-grafted-ε-polylysine conjugate.

resistance (MDR) that counteracts DOX effects and implies the necessity to administrate DOX together with other chemotherapeutic drugs or MDR modulators.[94] In this regard, MCTS from MDR cell lines such as breast cancer MCF7/Adr or ovarian cancer NCI-ADR-RES are useful tools to evaluate innovative solutions to restore DOX cytotoxicity as was shown with intrinsic drug-resistant glioblastoma U87MG cells.[70,71,95–98] DOX-loaded nanoplatforms (targeted or nontargeted) that allow the simultaneous administration of several anticancer agents were evaluated in MCTS based on three criteria: accumulation, penetration and cytotoxic effects (Table 2).[70,71,95–98] An excellent example of what can be done was the coloading of DOX with the MDR modulator curcumin (CUR) that inhibits different resistance-related pathways.[94,98] Polymeric micelles loaded with DOX and/or CUR (zeta potential of –4.4 mV, 15 nm in size) were decorated with a single-chain fragment variable (scFv), smaller, more stable and less immunogenic than IgG antibody, and were addressed against the GLUT1 protein in overexpressed glioblastoma cells. The greater synergism of both drugs when coloaded in the GLUT1 scFv micelles was attributed to the increased drug delivery to cells. By using U87MG spheroids, deeper penetration of DOX into the spheroids was observed and significant cytotoxic effects were measured from 48 h to 5 days after treatment. Since much less DOX was required in monolayer cells to obtain similar cytotoxic effects, the authors pointed out the necessity to use such 3D in vitro model to evaluate the efficacy of nanoformulations.[98] A similar approach was previously reported by the same authors with Tf-targeted paclitaxel (PTX) and CUR-coloaded micelles assessed in monolayer and spheroids from MDR ovarian cancer cells and thereafter in xenografted tumors.[97] PTX, one of the most effective anticancer agents, is another anticancer drug for which nanovectorization has been considered of major importance. The poor water solubility of the drug significantly limited the development of intravenous PTX formulations and the use of Cremophor® EL (CrEL) as a vehicle generated serious side effects in patients. Therefore, PTX nanoformulations have been designed to improve PTX solubilization, to avoid the use of CrEL and to ensure the stability of the NPs in the blood flow. Abraxane, a PTX albumin-based natural polymer, has been approved for clinical use, and other nanoformulations continue to be developed, some of them being evaluated in ongoing clinical trials.[4,99] Docetaxel (DTX), another taxane used as an anticancer drug, is in theory fourfold more potent than PTX but

suffered from all disadvantages of chemotherapeutic drugs, such as low water solubility, poor ability to cross the BBB, rapid clearance from the blood and short retention time in tumor.[100] For all the reasons given earlier, PTX and DTX are good candidates for nanovectorization even if, unlike DOX, they are not fluorescent molecules. To estimate their distribution in spheroids, Oregon Green PTX was used.[20] More generally, fluorescent dyes such as rhodamine,[63,70,97] coumarin[87,88] or fluorescein isothiocyanate (FITC) are appropriate for this purpose.[95]

Table 2 indicates that a great variety of NPs were designed to improve the anticancer drug delivery to tumors. The production of biogenic membrane vesicles (MVs) as a drug carrier constituted a particular case. Exosomes and microvesicles, both named extracellular vesicles (EVs), are endogenous particles excreted by a great variety of cell types. EVs play an important role in intercellular communication and cancer development by delivering their biological materiel to target cells. Biocompatibility, low immunogenicity and high stability in circulation are attractive properties of EVs, and among the potential therapeutic applications of EVs, drug delivery received more and more attention.[101] By using EVs charged with fusogenic liposomes (MVs), Lee et al[69] showed a special way for the payload to disseminate into the spheroid due to the capacity of liposomes to fuse with the cell membrane.[66] It seems that successive rounds of MV uptake, liposome delivery and de novo MV production by the cells contributed to deeper distribution of the liposomes into spheroids.[66] MVs charged with the hydrophobic PS Zn phtalocyanine (ZnPc) embedded in such liposomes were tested for PDT applications. In spheroids, increased penetration and higher cell content of PS were found, suggesting that MVs delivered the fusogenic liposomes to adjacent cells from the outer rim toward the spheroid center. Taken together, these findings can explain the higher efficacy of the photodynamic treatment obtained in spheroids and in vivo as compared with those obtained with nonfusogenic liposomes.[69]

Because most effective PSs are lipophilic molecules with a high propensity to aggregate, encapsulation in nanocarriers can highly influence their performance in PDT. In addition, nanocarriers have the advantage to improve tumor selectivity, resulting in an increase in photochemical efficacy while sparing healthy tissues. The PS *meta*-tetra(hydroxyphenyl) chlorine (mTHPC; Foscan®) is a potent PS approved for the treatment of head and neck carcinoma, but its poor pharmacokinetics properties leading to skin photosensitivity considerably limited its clinical application.[4] Liposomal formulations of mTHPC (Foslip®, Fospeg®) provided some improvements with regard to pharmacokinetics in tumor-bearing mice, but the capacity of the mTHPC-loaded liposomes to penetrate the tumor tissue remained unknown until recently.[4,102] The high fluorescence quantum yield of mTHPC allows the accurate tracing of PS penetration into the MCTS.[32,103] It was shown that irrespective of formulation (free mTHPC, Foslip® or Fospeg®), the PS fluorescence was limited to the outer rim of the spheroid with a slightly higher drug content for liposomal mTHPC formulations. The photocytotoxicity was not significantly different between formulations. Despite the external localization of the PS, photodamage were observed in the internal region of spheroids, suggesting the diffusion of the singlet oxygen, a highly cytotoxic form of reactive oxygen species produced by the photodynamic reaction.[59]

Of big interest is the consistency of the results obtained in spheroids with tumors established from the same cell type. On the basis of in vivo imaging in tumor-bearing mice, a strong parallel exists in the capacity of NPs to accumulate and to penetrate in cell spheroids as compared with tumor tissue.[65,66,87,88] For example, England et al[72] have shown that smaller citrate gold NPs exhibit enhancement of diffusion and accumulation in metastatic pancreatic adenocarcinoma spheroids (S2-VP10) compared to larger silica gold NPs. These results were also obtained in S2-VP10 orthotopic xenograft tumor and showed the predictive value of MCTS.[104] The same statement holds for growth inhibition effects measured in MCTS and in vivo tumors subjected to NPs' treatment. The similarity between the evolution of spheroid volume and tumor growth after treatment constitutes a great advantage with respect to 2D cell models.[63,87,88,95]

Predictive response of MCTS by mathematical models

Nowadays, mathematical modeling is an invaluable tool for understanding the impact of cellular interactions on drug movement within MCTS. Indeed, the physical–chemical parameters of drug accumulation and distribution in tumor tissues can be determined by means of computational modeling. Along with experimental studies, mathematical models provide pertinent perspectives for understanding mechanisms controlling drug penetration in spheroids and their consequences on treatment efficacy. Owing to their spherical symmetry, spheroids can be easily defined mathematically in radial dimensions. Equations obtained are of first order that greatly facilitate the analytical resolution. Many of mathematical models consist of systems of ordinary differential equations that describe the diffusional drug transport coupled with the specific cell binding. The tumor growth velocity is usually implemented through a generalized

Darcy's law,[105] while Fick's laws and Michaelis–Menten equations provide the description of NP diffusion transport and drug-cell binding.

Modeling macromolecule delivery to tumors was based either on finite element models to predict cell culture response to mitotic cell targeting drugs or on numerical solutions to simulate antibody delivery to tumor spheroids,[106] thereby assuming their structural uniformity and the heterogeneous distribution of binding sites in MCTS.[107,108] All these models focused mainly on the penetration of macromolecules (ie, dextrans and antibodies) in MCTS and showed strong evidence of transport barriers that impair macromolecule diffusion in MCTS. Currently, there is an increasing interest in the use of large NPs such as liposomes and polymeric NPs for drug delivery. Several groups used mathematical models to estimate diffusional and binding characteristics of cationic liposomes with variable charges and sizes.[109,110] They separated parameters affecting drug transport in the MCTS into two groups: the parameters depending on liposome to cell interactions (binding constants, uptake and retention rates, termed NP–cell biointerface parameters) and the diffusivity parameters related to MCTS environment (cell and ECM density) and NP characteristics (size, shape, etc.). Gao et al[109] successfully simulated diffusion of negatively charged polystyrene beads, near-neutral liposomes and positively charged liposomes with respective diameters of 20, 110 and 130 nm in 3D pharynx FaDu tumor spheroids, while Wientjes et al[110] achieved excellent precision in the prediction of the diffusion of NPs with various sizes (20–135 nm) and surface charges (–49 to +44 mV) in MCTS. Finally, very recently, Curtis et al examined the cytotoxicity of novel two- and three-layer gold NPs in heterogeneously vascularized tumors for future in vivo evaluation. They established a complicated mathematical model involving mass equations describing tissue growth combined with diffusion of small molecules (drug, oxygen and cell nutrients) and parameters of drug release from NPs. Moreover, the authors summarized the experimentally estimated coefficients with known literature data to complete the precise simulation of tumor nanotherapy response.[111]

Two major advantages of the modeling of NPs' penetration into MCTS could be outlined. On one hand, it provides insight into the factors that affect the distribution of particles in avascular regions of tumors, and on the other hand, modeling helps to delineate the factors related to the improvement of the design of nanotherapeutic agents. By achieving these goals, mathematical models have the potential to provide valuable information to predict therapeutic efficacy of macromolecules or nanotherapeutics.[19]

Conclusion

Nanomedicine constitutes a rich area of investigations designated to revolutionize anticancer therapy. Progresses achieved in the last 10 years offer new perspectives on key issues for drug delivery optimization and control, selective targeting of cancer cells and early detection of cancer molecular pathways. However, despite attractive concepts already highlighted in many studies, a lot of work should be done to benefit fully from the great potential of nanomedicine. It is of utmost importance to integrate all relevant disciplines, including mathematics, physics, chemistry, biology, pharmacology and clinical oncology, to break through the limits of monodisciplinary knowledge and to connect the huge potential of nanotechnology to the practical needs of medical oncology. It is obvious that a gap remains between in vitro evaluation and clinical translation. Several weaknesses have been identified and require now increased investment by the international scientific community to facilitate nanomedicine translation. Notably, the toxicity of nanomaterials toward human cells and tissues needs further development. Although NPs are designed for specific tumor targeting while avoiding systemic toxicity, NP degradation inside the body, accumulation in internal organs and potential interactions with biological processes remain major concerns. Efforts must also be made to adjust clinical trials to nanomedicine specificities by the careful recruitment of patients with the adequate response to this type of treatment.

In this context, there is an urgent need to expand the available set of tools for screening high-potential nanodrugs before taking the ultimate step of clinical investigations. The key issue of relevant preclinical models to assess the progress obtained with new nanotherapeutic concepts and guide or stop the project before significant and costly investments is highly timely.[112] In vitro, ex vivo and in vivo preclinical models are fundamental requirements to achieve these goals. In addition to in vitro platforms like MCTS, ex vivo organoid models of cancer or microtumors and tissue slices can be integrated into the early phase of nanodrug development.[21] In vivo, non-murine models (invertebrates, nematodes or zebrafish) can also be useful for initial triage in drug screening.[113] For the respect of vascularity, the in vivo model developed from the chorioallantoic membrane (CAM) of the chicken egg can be considered as an alternative to mammalian models. Grafting a tumor on the CAM is a relatively simple, rapid and inexpensive procedure, which may be used to evaluate nanodrug transport from the vessel compartment to the tumor.[114] Finally, new technologies like the most recent innovation in genome engineering are promising for enriching the catalog of animal models with

tumor that fully mimics clinical cancer. The advantage of such technology is to obtain spontaneous or induced tumor growth with similar microenvironment, including vascular network, stromal cells and immune reactions.[21] In fact, none of the single model can provide rapid and specific information needed for clinical translation, and 2D or 3D in vitro models are still required to provide basic data on the behavior of nanodrugs in contact with the cell components. MCTS constitutes a classical in vitro 3D model, which raises nowadays a renewed interest in the field of nanodrug delivery. A bibliographic search on MEDLINE for the terms "nanoparticles" and "tumor cell spheroids" would reveal ~160 papers published over 10 years, most of them (138) over the last 5 years (Figure 4). Undoubtedly, the constant evolution of spheroid design should contribute to more and more widespread use of this in vitro model for drug screening purpose. In fact, development of scaffold-based techniques or coculture with fibroblast has allowed to closely mimic in vivo situation and microfluidic devices along with the high-yield production of homogeneous MCTS. Another crucial characteristic is the ability to produce MCTS from various cancer cell lines such as breast, colon, ovarian, brain or prostate cancers. Using MCTS to determine tumor penetration, accumulation and antitumor activity of newly designed nanotherapeutics is becoming an essential step to demonstrate their potential value for cancer treatment.

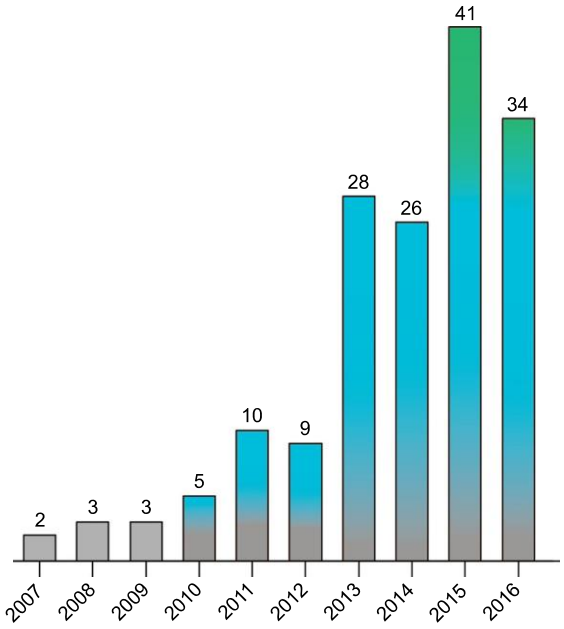


Figure 4 Number of publications by year.
Note: In all, 160 publications were found on the subject of NPs and MCTS.
Abbreviations: MCTS, multicellular tumor spheroid; NP, nanoparticle.

Acknowledgments

This work was supported by the French "Ligue Nationale contre le Cancer (CCIR-GE)" and the Institut de Cancérologie de Lorraine. Aigul Kulmukhamedova acknowledges the JCS "Center for International Programs", Kazakhstan, for financial support.

Disclosure

The authors report no conflicts of interest in this work.

References

1. Zamboni W, Torchilin V, Patri A, et al. Best practices in cancer nanotechnology: perspectives from NCI nanotechnology alliance. *Clin Cancer Res*. 2012;18(12):3229–3241.
2. Duncan R, Gaspar R. Nanomedicine(s) under the microscope. *Mol Pharm*. 2011;8(6):2101–2141.
3. Wicki A, Witzigmann D, Balasubramanian V, Huwyler J. Nanomedecine in cancer therapy: challenges, opportunities and clinical applications. *J Control Release*. 2015;200:138–157.
4. Marchal S, Hor AE, Millard M, Gillon V, Bezdetnaya L. Anticancer drug delivery: an update on clinically applied nanotherapeutics. *Drugs*. 2015;75(14):1601–1611.
5. Netti P, Berk D, Swartz M, Grodzinsky A, Jain R. Role of extracellular matrix assembly in interstitial transport in solid tumors. *Cancer Res*. 2000;60(9):2497–2503.
6. Davies CL, Berk D, Pluen A, Jain R. Comparison of IgG diffusion and extracellular matrix composition in rhabdomyosarcomas grown in mice versus in vitro as spheroids reveals the role of host stromal cells. *Br J Cancer*. 2002;86(10):1639–1644.
7. Prabhakar U, Maeda H, Jain R, et al. Challenges and key considerations of the enhanced permeability and retention effect for nanomedicine drug delivery in oncology. *Cancer Res*. 2013;73(8):2412–2417.
8. Au J, Jang S, Zheng J, et al. Determinants of drug delivery and transport to solid tumors. *J Control Release*. 2001;74(1–3):31–46.
9. Junttila M, de Sauvage F. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature*. 2013;501:346–354.
10. Jain R. Delivery of novel therapeutic agents in tumors: physiological barriers and strategies. *J Natl Cancer Inst*. 1989;81(8):570–576.
11. Nagy J, Dvorak H. Heterogeneity of the tumor vasculature: the need for new tumor blood vessel type-specific targets. *Clin Exp Metastasis*. 2012;29(7):657–662.
12. Stylianopoulos T, Martin J, Chauhan V, et al. Causes, consequences, and remedies for growth-induced solid stress in murine and human tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(38):15101–15108.
13. Padera T, Stoll B, Tooredman J, Capen D, di Tomaso E, Jain R. Pathology: cancer cells compress intratumour vessels. *Nature*. 2004; 427(6976):695.
14. Hobbs S, Monsky W, Yuan F, et al. Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(8):4607–4612.
15. Jain R. Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012;64(suppl):353–365.
16. Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res*. 1986; 46(12):6387–6392.
17. Bertrand N, Wu J, Xu X, Kamaly N, Farokhzad O. Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Adv Drug Deliv Rev*. 2014;66:2–25.
18. Maeda H, Tsukigawa K, Fang J. A retrospective 30 years after discovery of the enhanced permeability and retention effect of solid tumors: next-generation chemotherapeutics and photodynamic therapy-problems, solutions, and prospects. *Microcirculation*. 2016;23(3):173–182.

19. Mehta G, Hsiao A, Ingram M, Luker G, Takayama S. Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. *J Control Release*. 2012;164(2):192–204.
20. Solomon M, Lemera J, D'Souza G. Development of an in vitro tumor spheroid culture model amenable to high-throughput testing of potential anticancer nanotherapeutics. *J Liposome Res*. 2016;26(3):246–260.
21. Gould S, Junttila M, de Sauvage F. Translational value of mouse models in oncology drug development. *Nat Med*. 2015;21(5):431–439.
22. Hickman J, Graeser R, de Hoogt R, et al; IMI PREDECT Consortium. Three-dimensional models of cancer for pharmacology and cancer cell biology: capturing tumor complexity in vitro/ex vivo. *Biotechnol J*. 2014; 9(9):1115–1128.
23. Katt M, Placone A, Wong A, Xu Z, Searson P. In vitro tumor models: advantages, disadvantages, variables, and selecting the right platform. *Front Bioeng Biotechnol*. 2016;4(12):1–14.
24. Khaitan D, Dwarakanath B. Multicellular spheroids as an in vitro model in experimental oncology: applications in translational medicine. *Expert Opin Drug Discov*. 2006;1(7):663–675.
25. Patel N, Aryasomayajula B, Abouzeid A, Torchilin V. Cancer cell spheroids for screening of chemotherapeutics and drug-delivery systems. *Ther Deliv*. 2015;6(4):509–520.
26. Weiswald L, Bellet D, Dangles-Marie V. Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia*. 2015;17(1):1–15.
27. Sutherland R. Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science*. 1988;240(4849):177–184.
28. Glicklis R, Merchuk J, Cohen S. Modeling mass transfer in hepatocyte spheroids via cell viability, spheroid size, and hepatocellular functions. *Biotechnol Bioeng*. 2004;86(6):672–680.
29. Langan L, Dodd N, Owen S, Purcell W, Jackson S, Jha A. Direct measurements of oxygen gradients in spheroid culture system using electron parametric resonance oximetry. *PLoS One*. 2016;11(2):1–13.
30. Foster T, Hartley D, Nichols M, Hilf R. Fluence rate effects in photodynamic therapy of multicell tumor spheroids. *Cancer Res*. 1993;53(6): 1249–1254.
31. Buffa F, West C, Byrne K, Moore J, Nahum A. Radiation response and cure rate of human colon adenocarcinoma spheroids of different size: the significance of hypoxia on tumor control modelling. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2001;49(4):1109–1118.
32. Coutier S, Mitra S, Bezdetnaya L, et al. Effects of fluence rate on cell survival and photobleaching in metaTetra-(hydroxyphenyl) chlorin-photosensitized Colo 26 multicell tumor spheroids. *Photochem Photobiol*. 2001;73(3):297–303.
33. Kim S, Lee E, Kuh H. Co-culture of 3D tumor spheroids with fibroblasts as a model for epithelial-mesenchymal transition in vitro. *Exp Cell Res*. 2015;335(2):187–196.
34. Priwitaningrum D, Bondé J, Sridhar A, et al. Tumor stroma-containing 3D spheroid arrays: a tool to study nanoparticle penetration. *J Control Release*. 2016;244(pt B):257–268.
35. Santini M, Rainaldi G. Three-dimensional spheroid model in tumor biology. *Pathobiology*. 1999;67(3):148–157.
36. Patra B, Peng C, Liao W, Lee C, Tung Y. Drug testing and flow cytometry analysis on a large number of uniform sized tumor spheroids using a microfluidic device. *Sci Rep*. 2016;6:21061.
37. Schreiber-Brynzak E, Klapproth E, Unger C, et al. Three-dimensional and co-culture models for preclinical evaluation of metal-based anticancer drugs. *Invest New Drugs*. 2015;33(4):835–847.
38. Timmins N, Dietmair S, Nielsen L. Hanging-drop multicellular spheroids as a model of tumour angiogenesis. *Angiogenesis*. 2004;7(2):97–103.
39. Thoma C, Zimmermann M, Agarkova I, Kelm J, Krek W. 3D cell culture systems modeling tumor growth determinants in cancer target discovery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2014;69–70:29–41.
40. Hirschhaeuser F, Walenta S, Mueller-Klieser W. Efficacy of catumaxomab in tumor spheroid killing is mediated by its trifunctional mode of action. *Cancer Immunol Immunother*. 2010;59(11):1675–1684.
41. Friedrich J, Seidel C, Ebner R, Kunz-Schughart L. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nat Protoc*. 2009;4(3): 309–324.
42. Edmondson R, Broglie J, Adcock A, Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev Technol*. 2014;12(4):207–218.
43. Mikhail A, Eetezadi S, Allen C. Multicellular tumor spheroids for evaluation of cytotoxicity and tumor growth inhibitory effects of nanomedicines in vitro: a comparison of Docetaxel-loaded block copolymer micelles and Taxotere. *PLoS One*. 2013;8(4):e62630.
44. Perche F, Torchilin V. Cancer cell spheroids as a model to evaluate chemotherapy protocols. *Cancer Biol Ther*. 2012;13(12):1205–1213.
45. Franken N, Rodermond H, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc*. 2006;1(5):2315–2319.
46. Karlsson H, Fryknas M, Larsson R, Nygren P. Loss of cancer drug activity in colon cancer HCT-116 cells during spheroid formation in a new 3-D spheroid cell culture system. *Exp Cell Res*. 2012;318(13): 1577–1585.
47. Däster S, Amatruda N, Calabrese D, et al. Induction of hypoxia and necrosis in multicellular tumor spheroids is associated with resistance to chemotherapy treatment. *Oncotarget*. 2017;8(1):1725–1736.
48. Shield K, Ackland M, Ahmed N, Rice G. Multicellular spheroids in ovarian cancer metastases: biology and pathology. *Gynecol Oncol*. 2009; 113(1):143–148.
49. Desoize B, Jardillier J. Multicellular resistance: a paradigm for clinical resistance? *Crit Rev Oncol Hematol*. 2000;36(2–3):193–207.
50. Makhija S, Taylor D, Gibb R, Gerçel-Taylor C. Taxol-induced Bcl-2 phosphorylation in ovarian cancer cell monolayer and spheroids. *Int J Oncol*. 1999;14(3):515–521.
51. Hoffmann T, Schirlau K, Sonkoly E, et al. A novel mechanism for anti-EGFR antibody action involves chemokine-mediated leukocyte infiltration. *Int J Cancer*. 2009;124(11):2589–2596.
52. Gottfried E, Kunz-Schughart L, Andreesen R, Kreutz M. Brave little world: spheroids as an in vitro model to study tumor-immune-cell interactions. *Cell Cycle*. 2006;5(7):691–695.
53. Lankelma J, Dekker H, Luque F, et al. Doxorubicin gradients in human breast cancer. *Clin Cancer Res*. 1999;5(7):1703–1707.
54. Giordano S, Morosi L, Veglianese P, et al. A registry on distal popliteal and infrapopliteal revascularization with coronary drug-eluting stents. *Sci Rep*. 2016;6:37027.
55. Patel K, Trédan O, Tannock I. Distribution of the anticancer drugs doxorubicin, mitoxantrone and topotecan in tumors and normal tissues. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2013;72(1):127–138.
56. Goodman T, Chen J, Matveev K, Pun S. Spatio-temporal modeling of nanoparticle delivery to multicellular tumor spheroids. *Biotechnol Bioeng*. 2008;101(2):388–399.
57. Kostarelos K, Emfietzoglou D, Papakostas A, Yang W, Ballangrud Ä, Sgouros G. Binding and interstitial penetration of liposomes within avascular tumor spheroids. *Int J Cancer*. 2004;112(4):713–722.
58. Kim T, Mount C, Gombotz W, Pun S. The delivery of doxorubicin to 3-D multicellular spheroids and tumors in a murine xenograft model using tumor-penetrating triblock polymeric micelles. *Biomaterials*. 2010; 31(28):7386–7397.
59. Gaio E, Scheglmann D, Reddi E, Moret F. Uptake and photo-toxicity of Foscan®, Foslip® and Fospeg® in multicellular tumor spheroids. *J Photochem Photobiol B*. 2016;161:244–252.
60. Huo S, Ma H, Huang K, et al. Superior penetration and retention behavior of 50 nm gold nanoparticles in tumors. *Cancer Res*. 2013; 73(1):319–330.
61. Huang K, Ma H, Liu J, et al. Size-dependent localization and penetration of ultrasmall gold nanoparticles in cancer cells, multicellular spheroids, and tumors in vivo. *ACS Nano*. 2012;6(5):4483–4493.
62. Mikhail A, Eetezadi S, Ekdawi S, Stewart J, Allen C. Image-based analysis of the size- and time-dependent penetration of polymeric micelles in multicellular tumor spheroids and tumor xenografts. *Int J Pharm*. 2014;464(1–2):168–177.
63. Xin H, Sha X, Jiang X, Zhang W, Chen L, Fang X. Anti-glioblastoma efficacy and safety of paclitaxel-loading Angiopep-conjugated dual targeting PEG-PCL nanoparticles. *Biomaterials*. 2012;33(32): 8167–8176.

64. Sims LB, Curtis LT, Frieboes HB, Steinbach-Rankins JM. Enhanced uptake and transport of PLGA-modified nanoparticles in cervical cancer. *J Nanobiotechnology*. 2016;14:33.
65. Zong T, Mei L, Gao H, et al. Synergistic dual-ligand doxorubicin liposomes improve targeting and therapeutic efficacy of brain glioma in animals. *Mol Pharm*. 2014;11(7):2346–2357.
66. Guo Y, Wang L, Lv P, Zhang P. Transferrin-conjugated doxorubicin-loaded lipid-coated nanoparticles for the targeting and therapy of lung cancer. *Oncol Lett*. 2015;9(3):1065–1072.
67. Wang X, Tang H, Wang C, Zhang J, Wu W, Jiang X. Phenylboronic acid-mediated tumor targeting of chitosan nanoparticles. *Theranostics*. 2016;6(9):1378–1392.
68. Lee W, Guo W, Ho V, et al. Delivery of doxorubicin and paclitaxel from double-layered microparticles: the effects of layer thickness and dual-drug vs. single-drug loading. *Acta Biomater*. 2015;27:53–65.
69. Lee J, Kim J, Jeong M, et al. Liposome-based engineering of cells to package hydrophobic compounds in membrane vesicles for tumor penetration. *Nano Lett*. 2015;15(5):2938–2944.
70. Pattni B, Nagelli S, Aryasomayajula B, et al. Targeting of micelles and liposomes loaded with the pro-apoptotic drug, NCL-240, into NCI/ADR-RES cells in a 3D spheroid model. *Pharm Res*. 2016;33(10):2540–2551.
71. Mussi S, Sawant R, Perche F, et al. Novel nanostructured lipid carrier co-loaded with doxorubicin and docosahexaenoic acid demonstrates enhanced in vitro activity and overcomes drug resistance in MCF-7/Adr cells. *Pharm Res*. 2014;31(8):1882–1892.
72. England CG, Priest T, Zhang G, et al. Enhanced penetration into 3D cell culture using two and three layered gold nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:3603–3617.
73. Goodman T, Olive P, Pun S. Increased nanoparticle penetration in collagenase treated multicellular spheroids. *Int J Nanomedecine*. 2007;2(2):265–274.
74. Kumar A, Ma H, Zhang X, et al. Gold nanoparticles functionalized with therapeutic and targeted peptides for cancer treatment. *Biomaterials*. 2012;33(4):1180–1189.
75. Ernsting M, Murakami M, Roy A, Li S. Factors controlling the pharmacokinetics, biodistribution and intratumoral penetration of nanoparticles. *J Control Release*. 2013;172(3):782–794.
76. Hinger D, Navarro F, Käch A, et al. Photoinduced effects of m-tetrahydroxyphenylchlorin loaded lipid nanoemulsions on multicellular tumor spheroids. *J Nanobiotechnology*. 2016;14(1):68.
77. Agarwal R, Jurney P, Raythatha M, et al. Effect of shape, size, and aspect ratio on nanoparticle penetration and distribution inside solid tissues using 3D spheroid models. *Adv Healthc Mater*. 2015;4(15):2269–2280.
78. Li S, Huang L. Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles. *Mol Pharm*. 2008;5(4):496–504.
79. Hrkach J, Von Hoff D, Mukkaram Ali M, et al. Preclinical development and clinical translation of a PSMA-targeted docetaxel nanoparticle with a differentiated pharmacological profile. *Sci Transl Med*. 2012;4(128):128ra39.
80. Stylianopoulos T, Poh M, Insin N, et al. Diffusion of particles in the extracellular matrix: the effect of repulsive electrostatic interactions. *Biophys J*. 2010;99(5):1342–1349.
81. Ma H, Jiang Q, Han S, et al. Multicellular tumor spheroids as an in vivo-like tumor model for three-dimensional imaging of chemotherapeutic and nano material cellular penetration. *Mol Imaging*. 2012;11(6):487–498.
82. Campbell R, Fukumura D, Brown E, et al. Cationic charge determines the distribution of liposomes between the vascular and extravascular compartments of tumors. *Cancer Res*. 2002;62(23):6831–6836.
83. Lieleg O, Baumgärtel R, Bausch A. Selective filtering of particles by the extracellular matrix: an electrostatic bandpass. *Biophys J*. 2009;97(6):1569–1577.
84. Zhao J, Lu H, Xiao P, Stenzel M. Cellular uptake and movement in 2D and 3D multicellular breast cancer models of Fructose-based cylindrical micelles is dependent on the rod length. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2016;8(26):16622–16630.
85. Lee K, Hubbard L, Hern S, Yildiz I, Gratzl M, Steinmetz N. Shape matters: the diffusion rates of TMV rods and CPMV icosahedrons in a spheroid model of extracellular matrix are distinct. *Biomater Sci*. 2013;1(6):1–12.
86. Chauhan V, Popović Z, Chen O, et al. Fluorescent nanorods and nanospheres for real-time in vivo probing of nanoparticle shape-dependent tumor penetration. *Angew Chem Int Ed*. 2012;50(48):11417–11420.
87. Shi K, Zhou J, Zhang Q, et al. Arginine-Glycine-Aspartic acid-modified lipid-polymer hybrid nanoparticles for docetaxel delivery in glioblastoma multiforme. *J Biomed Nanotechnol*. 2015;11(3):382–391.
88. Gu G, Gao X, Hu Q, et al. The influence of the penetrating peptide iRGD on the effect of paclitaxel-loaded MT1-AF7p-conjugated nanoparticles on glioma cells. *Biomaterials*. 2013;34(21):5138–5148.
89. Kirpotin D, Drummond D, Shao Y, et al. Antibody targeting of long-circulating lipidic nanoparticles does not increase tumor localization but does increase internalization in animal models. *Cancer Res*. 2006;66(13):6732–6740.
90. Albanese A, Lam A, Sykes E, Rocheleau J, Chan W. Tumour-on-a-chip provides an optical window into nanoparticle tissue transport. *Nat Commun*. 2013;4:2718.
91. Gao H, Pang Z, Jiang X. Targeted delivery of nano-therapeutics for major disorders of the central nervous system. *Pharm Res*. 2013;30(10):2485–2498.
92. Cagel M, Grotz E, Bernabeu E, Moretton M, Chiappetta D. Doxorubicin: nanotechnological overviews from bench to bedside. *Drug Discov Today*. 2017;22(2):270–281.
93. Mohan P, Rapoport N. Doxorubicin as a molecular nanotheranostic agent: effect of doxorubicin encapsulation in micelles or nanoemulsions on the ultrasound-mediated intracellular delivery and nuclear trafficking. *Mol Pharm*. 2010;7(6):1959–1973.
94. Iyer A, Singh A, Ganta S, Amiji M. Role of integrated cancer nanomedicine in overcoming drug resistance. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013;65(13–14):1784–1802.
95. Xu J, Zhu X, Qiu L. Polyphosphazene vesicles for co-delivery of doxorubicin and chloroquine with enhanced anticancer efficacy by drug resistance reversal. *Int J Pharm*. 2016;498(1–2):70–81.
96. Oliveira M, Aryasomayajula B, Pattni B, Mussi S, Ferreira L, Torchilin V. Solid lipid nanoparticles co-loaded with doxorubicin and a-tocopherol succinate are effective against drug-resistant cancer cells in monolayer and 3-D spheroid cancer cell models. *Int J Pharm*. 2016;512(1):292–300.
97. Sarisozen C, Abouzeid A, Torchilin V. The effect of co-delivery of paclitaxel and curcumin by transferrin-targeted PEG-PE-based mixed micelles on resistant ovarian cancer in 3-D spheroids and in vivo tumors. *Eur J Pharm Biopharm*. 2014;88(2):539–550.
98. Sarisozen C, Dhokai S, Tsikudo E, Luther E, Rachman I, Torchilin V. Nanomedicine based curcumin and doxorubicin combination treatment of glioblastoma with scFv-targeted micelles: in vitro evaluation on 2D and 3D tumor models. *Eur J Pharm Biopharm*. 2016;108:54–67.
99. Bernabeu E, Cagel M, Lagomarsino E, Moretton M, Chiappetta D. Paclitaxel: what has been done and the challenges remain ahead. *Int J Pharm*. 2017;526(1–2):474–495.
100. Xu H, Mao K, Lu C, et al. An injectable acellular matrix scaffold with absorbable permeable nanoparticles improves the therapeutic effects of docetaxel on glioblastoma. *Biomaterials*. 2016;107:44–60.
101. Stremersch S, De Smedt S, Raemdonck K. Therapeutic and diagnostic applications of extracellular vesicles. *J Control Release*. 2016;244(pt B):167–183.
102. Reshetov V, Lassalle H, François A, et al. Photodynamic therapy with conventional and PEGylated liposomal formulations of mTHPC (temoporfin): comparison of treatment efficacy and distribution characteristics in vivo. *Int J Nanomedecine*. 2013;8:3817–3831.
103. Yakavets I, Yankovsky I, Millard M, et al. The alteration of temoporfin distribution in multicellular tumor spheroids by β-cyclodextrins. *Int J Pharm*. 2017;529(1–2):568–575.
104. England CG, Huang JS, James KT, Zhang G, Gobin AM, Frieboes HB. Detection of phosphatidylcholine-coated gold nanoparticles in orthotopic pancreatic adenocarcinoma using hyperspectral imaging. *PLoS One*. 2015;10(6):e0129172.

105. Macklin P, McDougall S, Anderson ARA, Chaplain MAJ, Cristini V, Lowengrub J. Multiscale modelling and nonlinear simulation of vascular tumour growth. *J Math Biol*. 2009;58(4–5):765–798.
106. Ward J, King J. Mathematical modelling of drug transport in tumour multicell spheroids and monolayer cultures. *Math Biosci*. 2003;181(2): 177–207.
107. Graff C, Wittrup K. Theoretical analysis of antibody targeting of tumor spheroids: importance of dosage for penetration, and affinity for retention. *Cancer Res*. 2003;63(6):1288–1296.
108. Wenning L, Murphy R. Coupled cellular trafficking and diffusional limitations in delivery of immunotoxins to multicell tumor spheroids. *Biotechnol Bioeng*. 1999;62(5):562–575.
109. Gao Y, Li M, Chen B, et al. Predictive models of diffusive nanoparticle transport in 3-dimensional tumor cell spheroids. *AAPS J*. 2013; 15(3):816–831.
110. Wientjes M, Yeung B, Lu Z, Wientjes M, Au J. Predicting diffusive transport of cationic liposomes in 3-dimensional tumor spheroids. *J Control Release*. 2014;192:10–18.
111. Curtis LT, England CG, Wu M, Lowengrub J, Frieboes HB. An interdisciplinary computational/experimental approach to evaluate drug-loaded gold nanoparticle tumor cytotoxicity. *Nanomedicine (Lond)*. 2016;11(3):197–216.
112. Hare JI, Lammers T, Ashford MB, Puri S, Storm G, Barry ST. Challenges and strategies in anti-cancer nanomedicine development: an industry perspective. *Adv Drug Deliv Rev*. 2017;108:25–38.
113. Day C, Merlino G, Van Dyke T. Preclinical mouse cancer models: a maze of opportunities and challenges. *Cell*. 2015;163(1):39–53.
114. Vargas A, Zeisser-Labouèbe M, Lange N, Gurny R, Delie F. The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007;59(11): 1162–1176.

International Journal of Nanomedicine
Dovepress

Publish your work in this journal

The International Journal of Nanomedicine is an international, peer-reviewed journal focusing on the application of nanotechnology in diagnostics, therapeutics, and drug delivery systems throughout the biomedical field. This journal is indexed on PubMed Central, MedLine, CAS, SciSearch®, Current Contents®/Clinical Medicine, Journal Citation Reports/Science Edition, EMBase, Scopus and the Elsevier Bibliographic databases. The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system, which is all easy to use. Visit http://www.dovepress.com/testimonials.php to read real quotes from published authors.

Submit your manuscript here: http://www.dovepress.com/international-journal-of-nanomedicine-journal

Objectif de l'étude

Comme présenté dans le chapitre précédent, la PDT, utilisant la mTHPC comme molécule photosensible, est une modalité de traitement des petites tumeurs superficielles accessibles à la lumière. Cependant, ce traitement anticancéreux présente de sévères effets secondaires ainsi qu'une efficacité tumorale limitée en raison d'un manque de sélectivité tumorale.

Dans le but d'améliorer les propriétés pharmacocinétiques de la mTHPC, des formulations nanovectorisées, notamment des formulations liposomales, ont été élaborées. Malgré les propriétés avantageuses des liposomes (durée de vie plasmatiques biodégradabilité, monomérisation du PS), cette stratégie de vectorisation ne s'est pas révélée pleinement satisfaisante en raison d'un manque de stabilité des liposomes en présence de protéines plasmatiques entrainant une absence d'amélioration de l'efficacité PDT *in vivo*.

Une alternative possible, proposée par l'équipe parisienne du Dr Claire Wilhelm (Laboratoire Matières et Systèmes Complexes, Université Paris-Diderot, France) avec qui nous avons travaillé en collaboration sur ce projet, est l'utilisation de vésicules extracellulaires. La composition complexe de leur membrane sous forme d'une bicouche phospholipides, classiquement retrouvée dans les vecteurs lipidiques, pourrait être avantageuse dans le but de pallier le manque de stabilité des liposomes. Dans ce contexte, des VE chargées à la fois de NP magnétiques comme agent de contraste et de mTHPC comme agent thérapeutique ont montré leur potentialité *in vitro* et *in vivo*. Dans ces travaux, les VE ont illustré leur capacité à incorporer de la mTHPC et la possibilité de les utiliser comme nanovecteur. L'efficacité PDT de ces mTHPC-VE s'est révélée au moins aussi performante que la mTHPC libre *in vitro*. De plus, *in vivo*, suite à une injection intratumorale, un léger retard de croissance tumorale comparé à la mTHPC libre a été constaté. La compréhension du potentiel des mTHPC-VE en PDT nécessite une meilleure connaissance des paramètres régissant l'efficacité PDT comme la diffusion intratumorale, la stabilité des VE ou encore les mécanismes d'incorporation cellulaire.

Ainsi, **l'objectif principal de cette thèse vise à évaluer l'intérêt des VE en tant que nanovecteur de mTHPC dans divers modèles précliniques comparé aux liposomes de mTHPC**. Dans ce but, le projet s'articule autour de 3 axes dont les résultats sont présentés dans le chapitre suivant :

- Etude des propriétés physicochimiques des mTHPC-VE *ex vivo*

La première partie des résultats est consacré à l'optimisation de la fabrication des VE ainsi qu'à leur caractérisation biologique et physico-chimiques. L'analyse des VE par cytométrie en flux a permis de caractériser la population de VE. De plus, la taille, charge, morphologie et propriétés physicochimiques des VE seront présentés dans cette partie.

- Etude de l'accumulation, distribution et efficacité PDT *in vitro*

La seconde partie présente les résultats obtenus dans un modèle de cellules cancéreuses HT29 cultivées en monocouche et la troisième partie présente les résultats obtenus dans un modèle de cellules cancéreuses HT29 cultivées en 3D sous forme de sphéroïdes multicellulaires. La capacité d'internalisation, la distribution et l'efficacité PDT des mTHPC-VE a été évaluée dans ces deux modèles en comparaison de la mTHPC libre et de la formulation liposomale : Foslip®. De plus, leur localisation intracellulaire ainsi que les mécanismes d'incorporation ont été évalués.

- Etude du comportement des mTHPC-VE *in vivo* dans un modèle de xénogreffe

La quatrième partie concerne les résultats obtenus *in vivo* suite à l'inoculation de cellules cancéreuses HT29 en sous-cutanée chez la souris. L'expérimentation animale a été réalisée dans le respect de l'éthique et de la législation européenne en vigueur décrite dans le décret n°2013-118 du 1er février 2013 au sein d'une animalerie agréée (N° A54-547-21). A la suite d'une injection i.v, la biodistribution, pharmacocinétique et efficacité PDT des mTHPC ont été analysées.

Résultats et Discussion

CARACTÉRISATION DES VÉSICULES EXTRACELLULAIRES CHARGÉES DE mTHPC

1.1. Matériels et Méthodes

1.1.1. Photosensibilisateur

La mTHPC libre (méta-tétra-hydroxyphénylchlorine ; Temoporfin ; Foscan®) ainsi que sa formulation liposomale (Foslip®) sont généreusement données par Biolitec GmbH (Jena, Allemagne), sous forme de poudre. La solution mère est préparée en solubilisant 2 mg de poudre dans 1 mL d'éthanol afin d'obtenir une concentration finale de 3.10^{-3} M (équivalent à 2 mg/mL). La solution mère de Foslip®, composé de dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) et de dipalmitoylphosphatidylglycérol (DPPG) avec un ratio mTHPC/lipides de 1:12 (mol/mol), est préparée en solubilisant 30 mg de poudre dans 500 µL d'eau stérile pour conserver l'intégrité de la membrane liposomale et obtenir une concentration finale de $2,2.10^{-3}$ M (1,5 mg/mL).

Les solutions sont conservées à 4 °C à l'obscurité. Du fait de l'instabilité de la mTHPC, la concentration des solutions est régulièrement vérifiée par spectrophotométrie (Lambda 35, PerkinElmer, Waltham, USA) et calculée grâce à la loi de Beer-Lambert : $A = \varepsilon \times L \times C$ avec le coefficient d'extinction molaire de la mTHPC à 652 nm $\varepsilon = 36000\ M^{-1}.cm^{-1}$ et L = 1 cm.

1.1.2. Production des mTHPC-VE

Les cellules endothéliales ont été fournies par l'équipe parisienne. Les cellules sont cultivées dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium-glutamax (DMEM) (GIBCO®, Royaume uni) supplémenté avec 9% de Sérum de Veau Fœtal (SVF) (Dominique Dutscher®, Afrique du Sud). Les cellules sont ensuite ensemencées à 3.10^4 cellules/mL dans des flasques de 175 cm^2 (Falcon®) avec 30 mL de milieu complet ainsi que dans des flasques de 5 étages de 875 cm^2 avec 150 mL de milieu complet et placées dans un incubateur sous atmosphère humide (37 °C – 5% de CO_2).

Après 5 jours, les cellules en flasques T175 sont trypsinées. Après élimination du milieu de culture, les cellules sont lavées avec 5 mL de D-PBS (GIBCO®, Royaume uni). La trypsination est réalisée avec 3 mL de trypsine-EDTA (Sigma® Aldrich, France) pendant 5 min. La réaction est stoppée avec 15 mL de milieu complet et une centrifugation (200 g - 5 min) est effectuée. Le culot

est repris dans 15 mL de milieu complet puis un comptage sur cellule de Thoma est réalisé et de nouvelles flasques sont ensemencées.

Lorsque les cellules ensemencées dans les flasques T875 sont proches de la confluence, le milieu de culture est remplacé par 50 mL d'une solution de mTHPC à 5 µM, préparée dans du milieu « Roswall Park Memorial Institute medium-1640 » (RPMI) (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) non supplémenté en SVF et en glutamine pendant 2 heures (37°C – 5% de CO_2). Après deux lavages successifs avec du milieu RPMI non supplémenté, les cellules sont placées à l'incubateur avec 75 mL de milieu RPMI non supplémenté pour induire la production des VE. Après trois jours, le surnageant est centrifugé (2 000 g - 10 min) pour éliminer les débris cellulaires et corps apoptotiques. Après une ultracentrifugation (100 000 g - 1h10 à 4°C), les VE présentes dans le culot sont caractérisées en taille, en concentration de particules et de mTHPC. Ainsi, une solution mère de mTHPC-VE dans du milieu de culture est obtenue.

1.1.3. Détermination de la taille, concentration en particules et stabilité

Une analyse du suivi de la trajectoire des particules est réalisée avec un instrument NanoSight® (LM10 system, Malvern instruments, Royaume-Uni). Les mTHPC-VE diluées au 1/5000ème dans du D-PBS stérile sont irradiées avec un laser à 532 nm à 50 mW. Un halo de diffusion est alors émis par chaque particule. La trajectoire de ce halo est filmée par un microscope puis analysée de manière à déterminer la concentration en particules de la solution ainsi que leur taille. Cinq mesures de 30 sec sont réalisées pour chaque échantillon avec une température régulée à 25 °C et le diamètre des particules est calculé selon l'équation de Stokes-Einstein.

La taille des mTHPC-VE est confirmée par cryo-TEM. Les échantillons sont dilués au 1/10ème dans du D-PBS stérile et 5 µL sont déposés sur une membrane de carbone Quantifoil® (Quantifoil MicroTools GmbH, Allemagne). Après élimination de l'excès de liquide avec du papier filtre, la membrane est rapidement plongée dans de l'éthane liquide refroidi à l'azote liquide. Les échantillons sont transférés dans un cryo-microscope (LaB6 ROL JEM2100, Jeol, Japon) et observés à -180°C à 200 kV.

La stabilité des mTHPC-VE ainsi que celle des liposomes de mTHPC est testée après une incubation des échantillons dans 20% de plasma murin dont le VE plasmatiques ont été préalablement éliminées par ultracentrifugation. Cette incubation est réalisée à 37 °C jusqu'à 24 h. Après différents temps d'incubation, 100 µL du mélange NP/plasma sont dilués 1/5000ème dans du D-PBS stérile et placés à 4 °C dans le noir jusqu'à réalisation des mesures au Nanosight. Pour les expériences de cryo-TEM, l'incubation des échantillons est réalisée de la même manière que

précédemment mais dilués à 1/10ème. Les contrôles de l'expérience sont réalisés à l'aide de Foslip® et mTHPC-VE incubés dans du D-PBS stérile à 37 °C et 4 °C.

La stabilité de la mTHPC à l'intérieur des NP est testée grâce à un gel de migration à 1% d'agarose. Après avoir chauffé 135 mL d'une solution d'agarose ultra-pure, 30 mL de tampon TBE 10X y sont ajoutés. Après 30 min à température ambiante sous agitation, la préparation est coulée dans un cadre en plexiglass et des peignes sont placés en haut du gel pour former les puits. Après polymérisation du gel, 20 µL des échantillons, utilisés pour la cryo-TEM, sont déposés dans chaque puit avec 2 µL de bleu de charge. La migration est réalisée durant 3 h à 100 V avec 900 mL de tampon de migration 0,5X de TBE. Les contrôles de l'expérience sont effectués avec : plasma seul, mTHPC libre désagrégée dans 0,3% de D-PBS/Triton, Foslip® seul et mTHPC-VE seules.

1.1.4. Caractérisation biologique des mTHPC-VE par cytométrie en flux

Le FITC, IsoThioCyanate de Fluorescéine, est un fluorochrome excitable à une longueur d'onde de 488 nm et émettant à 520 nm. La fluorescence est récupérée sur le canal 1 à 530 nm +/- 30 nm pour les anticorps IgG1-FITC, CD3-FITC et l'Annexine-V. Le PE, R-PhycoErythrine, est excitable à 488 nm et émet à une longueur d'onde de 578 nm. Les mesures sont réalisées avec une excitation à 488 nm et la fluorescence est récupérée sur le canal 2 à 585 nm +/- 42 nm pour les anticorps IgG1-PE, CD9-PE, CD63-PE, CD81-PE et CD144-PE.

Le marquage est réalisé sur les cellules endothéliales préalablement fixées et placées à 4 °C ou 10 µL de mTHPC-VE. Les cellules et mTHPC-VE sont marquées avec 20 µL d'anticorps (BD Pharmigen®, France) ou d'IgG1 (DakoCytomation®, Danemark) à 4 °C pendant 1 h. Après incubation, elles sont passées en cytométrie en flux (BD FACS Calibur™, BD Biosciences, Inde) pour déterminer le pourcentage de cellules marquées avec les anticorps couplés au fluorochrome.

1.1.5. Spectres d'absorbance et de fluorescence

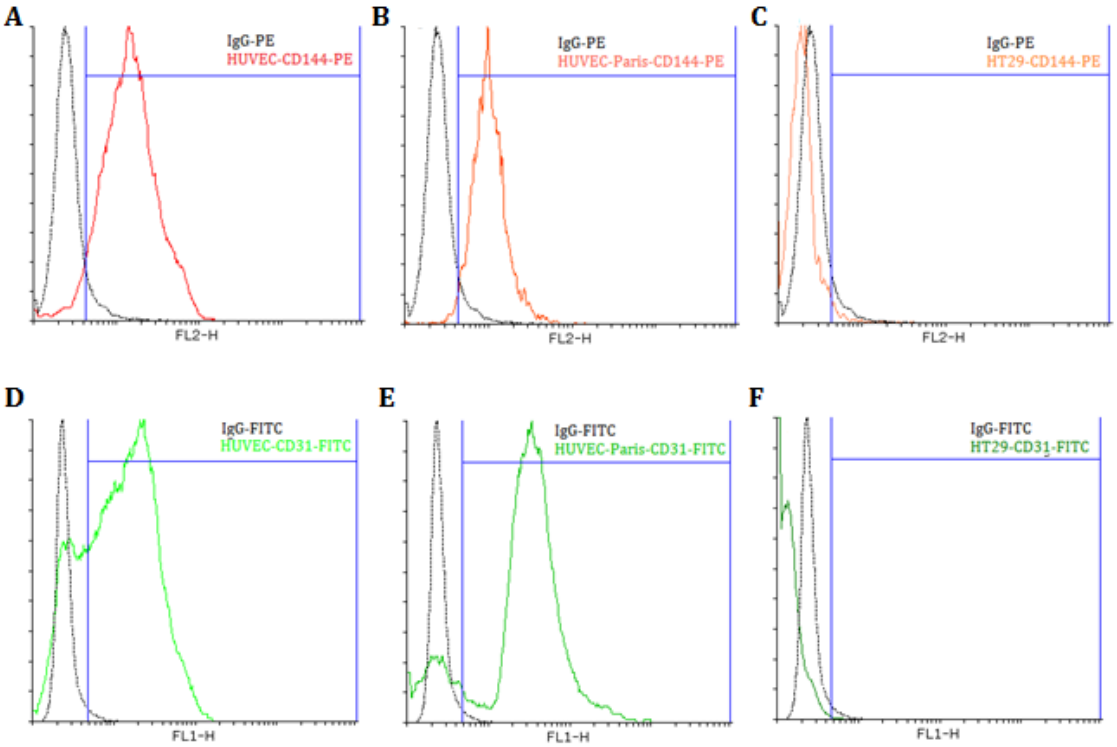
Les spectres d'absorption sont réalisés, à l'aide d'un spectromètre, après dilution des solutions mères dans de l'éthanol afin de dégrader la membrane des liposomes et des VE pour obtenir la concentration des échantillons. Pour visualiser l'état d'agrégation de la mTHPC, les solutions mères sont diluées dans du D-PBS à une concentration de 1,45 µM de mTHPC avant acquisition des spectres d'absorbance à l'aide d'une sphère d'intégration pour s'affranchir du bruit de fond obtenu par les membranes biologiques.

Les spectres de fluorescence sont obtenus après dilution des solutions mères dans du D-PBS à une concentration de mTHPC de 1,45 µM à l'aide d'un spectrofluorimètre LS55B (Perkin Elmer, Waltham, USA) (λexc: 416 nm; λem: 652 nm). Les mesures de polarisation de fluorescence

sont obtenues à l'aide des polarisateurs du spectrofluoromètre avec un temps d'intégration de 20 sec. Après irradiation des échantillons pendant 10 sec, la nouvelle valeur de fluorescence est notée puis du triton à 0,3% est ajouté sur les échantillons pour récupérer la valeur de fluorescence de la mTHPC et permettre ainsi le calcul du quenching de fluorescence.

1.2. Résultats & Discussion

Les cellules utilisées pour la production des mTHPC-VE sont des cellules HUVEC données par l'équipe parisienne du laboratoire MSC. La première partie des résultats a consisté à caractériser ces cellules en utilisant des marqueurs spécifiques des cellules endothéliales en comparaison avec des cellules HUVEC issues de cordon ombilical (témoin positif) et des cellules cancéreuses HT29 n'exprimant pas ces marqueurs (témoin négatif). Ainsi, le marquage similaire obtenu entre les deux lignées endothéliales avec 97% de cellules marquées avec le CD144 (VE-cadhérine) et 82% de cellules marquées avec le CD31 (molécule d'adhésion des cellules endothéliales) (Figure 15) a permis de confirmer l'origine endothéliale de nos cellules.



	Cellules HUVEC issues de cordon (Témoin positif)	Cellules HUVEC données par Paris (Cellules de l'étude)	Cellules HT29 (Témoin négatif)
CD144	93,9 ± 6,1 %	97,1 ± 8,2 %	1,4 ± 0,45 %
CD31	73,6 ± 4,5 %	81,7 ± 1,2 %	0,73 ± 0,16 %

Figure 15. Caractérisation en cytométrie en flux des cellules HUVEC données par Paris

Après fixation des cellules et incubation 1 h à 4 °C avec les anticorps, (A, D) les cellules HUVEC, (B, E) HUVEC données par Paris et (C, F) HT29 sont diluées dans du D-PBS et passées en cytométrie. (A-C) Canal 2 (585 nm +/- 42 nm) pour l'anticorps CD144 couplé au PE. (D-F) Canal 1 (530 nm +/- 30 nm) pour l'anticorps CD31 couplé au FITC.

Afin d'obtenir une importante quantité de VE et une concentration en mTHPC optimale, certains paramètres ont été préalablement optimisés. En effet, pour obtenir une grande quantité de VE, il est important de réaliser la procédure au moment où les cellules d'origine sont quasiment à confluence, avant un possible décollement, c'est-à-dire entre 4 et 5 jours après la mise en culture (Figure 16A).

Concernant l'optimisation de la concentration en mTHPC, l'équipe parisienne a montré précédemment qu'une incubation de 2 h avec la mTHPC permet d'obtenir une bonne accumulation du PS dans les cellules HUVEC tout en limitant les impacts dû à la privation de sérum. En effet, la privation de sérum étant l'élément déclencheur de la production de VE, une courte incubation limite la production de VE avant chargement des cellules avec la mTHPC. De plus, nous avons montré que l'ajout d'une solution de mTHPC à une concentration de 5 µM entraine une toxicité cellulaire négligeable (Figure 16B).

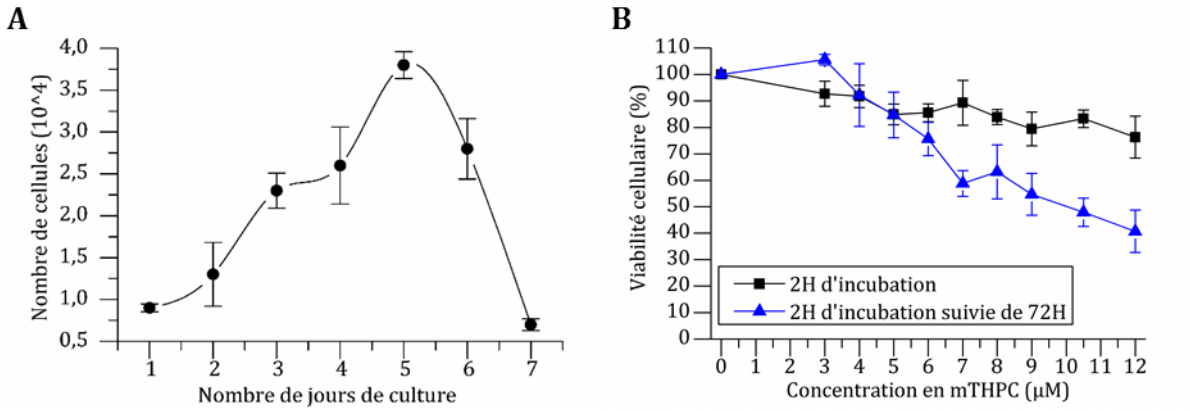
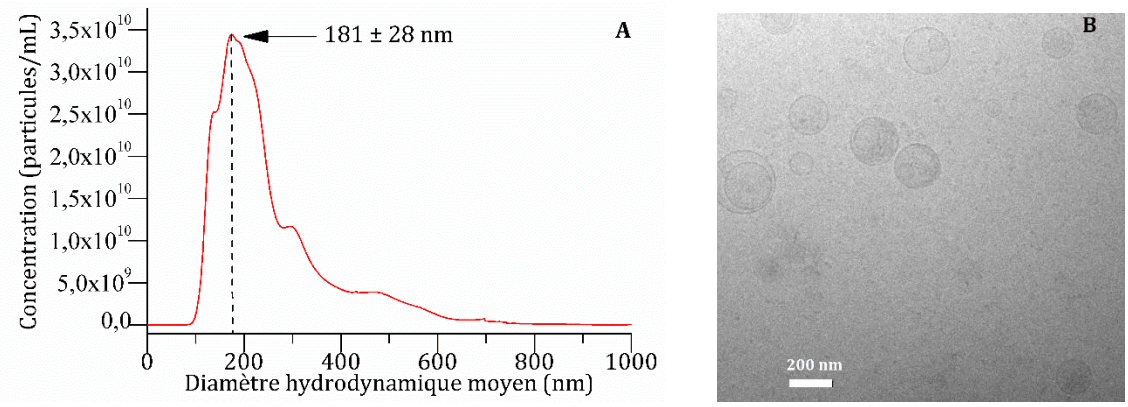


Figure 16. Optimisation de la fabrication des mTHPC-VE

(A) Courbe de croissance des cellules HUVEC. (B) Toxicité de la mTHPC sur les cellules HUVEC (6.10⁴ cellules/mL) à différentes concentrations. Le test de viabilité cellulaire est réalisé soit directement après 2 h d'incubation (courbe noire), soit après 2 h d'incubation, un lavage et 72 h à 37 °C dans du milieu sans sérum (courbe bleue).

La taille moyenne des mTHPC-VE obtenue par NTA est de 181 ± 28 nm de diamètre (Figure 17A) avec une charge de surface négative (- 15 mV). Les images acquises en cryo-TEM confirment la taille des mTHPC-VE (Figure 17B) et mettent en évidence une conservation de l'intégrité membranaire ainsi que la forme sphérique des VE. De plus, la solution mère de mTHPC-VE présente une concentration de 98 ± 22 µM de mTHPC pour une quantité moyenne de 4.10^{12}

VE/mL. La population de VE a été caractérisée à l'aide de marqueurs fluorescents en cytométrie en flux. Ainsi, trois marqueurs spécifiques des exosomes ont été utilisés (CD9, CD63, CD81) [173] et les marqueurs spécifiques des cellules d'origine des VE ont été utilisés pour identifier les microvésicules. Une proportion similaire entre exosomes et microvésicules est alors mis en évidence avec une petite prévalence pour les exosomes.



	CD9	CD63	CD81	CD31	CD144	Annexine V
mTHPC-VE marquées	58,4 ± 5,7 %	54,5 ± 2,8 %	58,9 ± 6,2 %	40,2 ± 0,9 %	44,1 ± 8,1%	50,8 ± 3,5 %

Figure 17. Caractérisation des mTHPC-VE

(A) Distribution de taille des mTHPC-VE réalisée au NTA après dilution dans du D-PBS. (B) Image de TEM des mTHPC-VE après dilution dans du D-PBS. (C) Caractérisation biologique des mTHPC-VE à l'aide de marqueurs fluorescents en cytométrie en flux.

Spectroscopiquement, les mTHPC-VE présentent des caractéristiques proches de la mTHPC libre dans l'éthanol ainsi que du Foslip® (Figure 18). Dans l'éthanol, la mTHPC libre est non agrégée et possède une absorbance maximale à 416 nm dans la bande de Soret et à 650 nm dans la bande Q [265]. Dans le D-PBS, ces valeurs se décalent vers le rouge témoignant de l'agrégation des molécules entre elles (428 et 654 nm) (Tableau 3). Dans le cas des mTHPC-VE, l'absorbance maximale est retrouvée à 420 nm, tout comme pour Foslip®, mettant en évidence l'incorporation de la mTHPC dans un nanovecteur. [141] De plus, la largueur à mi-hauteur des bandes spectrales est similaire entre mTHPC-VE, Foslip® et la mTHPC libre dans l'éthanol (Tableau 3) confirmant l'absence d'agrégation de la mTHPC dans le cas d'une incorporation dans les VE. Les valeurs de polarisation de fluorescence (0,25) montrent une intégration de la mTHPC dans la bicouche lipidique des VE. De plus, une absence de quenching de fluorescence est mise en évidence (0,99) comparée au Foslip® (0,12) (Tableau 3). Plus la quantité de mTHPC à l'intérieur du liposome est importante, plus la concentration locale augmente entrainant un quenching de fluorescence élevé (valeur proche de 0). Ainsi, diminuer la quantité de mTHPC dans les liposomes à un ratio mTHPC lipides de 1 :600 permet de s'affranchir du quenching (0,96) comparé au Foslip® possédant un

ratio 1 :12. [141] Cette valeur peut être mis en relation avec une faible capacité de chargement des VE avec la mTHPC, due à la méthode de production [230].

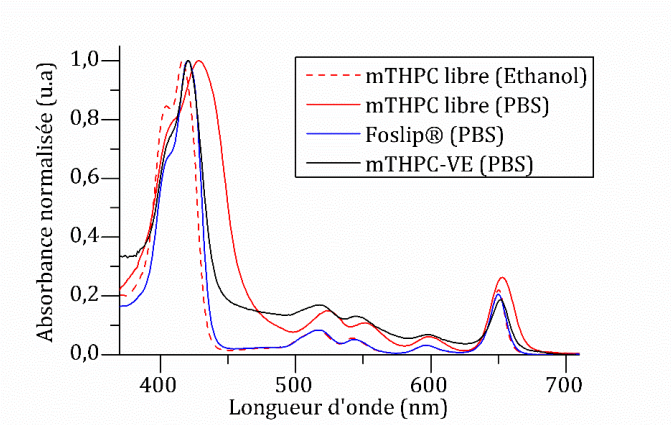


Figure 18. Spectres d'absorbance des formulations de mTHPC

Spectres d'absorbance normalisée de la mTHPC libre dans l'éthanol (ligne rouge pointillée) et diluée dans du D-PBS (ligne rouge) comparé à celui du Foslip® (ligne bleue) et des mTHPC-VE (ligne noire) également dilué dans du D-PBS. Concentration en mTHPC : 1,45 µM.

		Ethanol	D-PBS		
		mTHPC libre	**mTHPC libre**	**Foslip®**	**mTHPC-VE**
Absorbance					
Bande de Soret,	λmax (nm)	416	428	420	420
	υ (cm^{-1})	1890	2980	1920	1850
Bande Q,	λmax (nm)	650	653	650	650
	υ (cm^{-1})	360	560	360	390
Fluorescence					
λmax (nm)		652	654	652	652
ΦFL		1	0,01	0,79	1
Polarisation		0	0	0,082	0,25
Quenching de fluorescence		N.A	N.A	0,12	0,99

Tableau 3. Propriétés photophysiques des formulations de mTHPC

Abréviations : ΦFL : Rendement quantique de fluorescence ; λmax : Longueur d'onde maximale ; υ : Largueur de la bande spectrale à mi-hauteur

Les mTHPC-VE possédant les mêmes propriétés photophysiques que les liposomes de mTHPC, nous nous sommes demandé si leur comportement dans le plasma serait également similaire à celui des liposomes. Après incubation des échantillons à 37 °C dans du D-PBS stérile

supplémenté avec 20% de plasma murin exo-free, le Foslip® ainsi que les mTHPC-VE sont passés au NTA et comparés aux échantillons incubés dans du D-PBS sans sérum.

Concernant le Foslip®, la taille des liposomes intacts reste inchangée jusqu'à 24 h d'incubation (environ 120 nm). Cependant, environ 30% des liposomes sont détruits après seulement 1 h d'incubation, 50% après 6 h et 70% après 24 h (Figure 19A). Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature [52,144]. De plus, les images obtenues en cryo-TEM confirment cette destruction et mettent en évidence la présence de fragments de membrane liposomale avec une diminution du nombre de liposomes intacts (Figure 19B).

Les mTHPC-VE présentent, quant à elles, un comportement inattendu dans le plasma. En effet, la taille des mTHPC-VE n'est quasiment pas modifiée après 1 h d'incubation avec 20% de plasma murin exo-free. En revanche, après 6 h d'incubation, les VE comprises entre 300 et 500 nm disparaissent au profit d'une augmentation des VE de 100 à 150 nm. Après 24 h d'incubation, une population de VE majoritaire se dessine aux alentours de 60-70 nm de diamètre (Figure 19C). Les images obtenues en cryo-TEM montrent une conservation de l'intégrité membranaire des VE avec une absence de fragments membranaires (Figure 19D). De plus, ces images confirment la diminution de taille des mTHPC ainsi que l'augmentation de concentration en particules. La conservation de l'intégrité membranaire peut s'expliquer par la composition des VE, issues de cellules HUVEC, riche en cholestérol (23,5%) et en sphingomyéline (10,3%) ce qui inhibe le transfert des lipides à leur surface et augmente leur stabilité [230,266].

La stabilité de la mTHPC au sein des nanovecteurs est étudiée à l'aide d'un gel de migration permettant de visualiser la libération du PS. En effet, sous forme nanovectorisée, la mTHPC reste piégée dans le puit de dépôt. Cependant, libérée, la mTHPC migre dans le gel à la même distance que la mTHPC libre. De plus, les protéines plasmatiques migrent plus loin dans le gel que la mTHPC libre et leur auto-fluorescence reste négligeable.

Une libération rapide de la mTHPC à partir des liposomes est observée. En effet, dès 30 min d'incubation avec 20% de plasma murin exo-free, 50% de mTHPC n'est pas retenue dans le vecteur. Cette libération est ensuite plus lente dans le temps mais atteint 81% après 24 h d'incubation. [144] Cependant, concernant les mTHPC-VE, aucune libération de mTHPC n'est observée avant 3 h d'incubation, ce n'est qu'après 6 h d'incubation que 50% de la mTHPC est libérée. Cette libération reste ensuite stable jusque 24 h (Figure 19E).

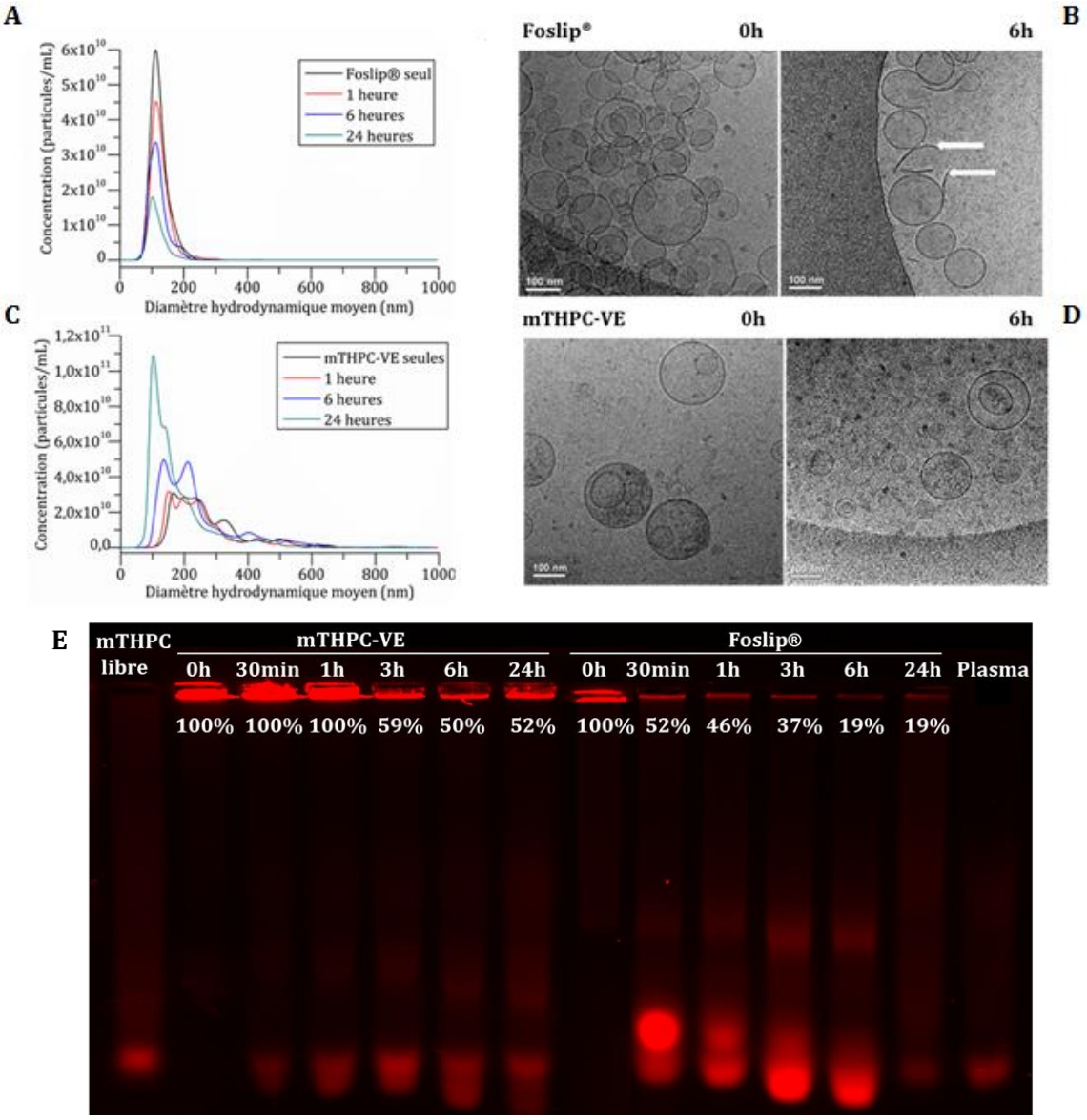


Figure 19. Comportement des nanovecteurs de mTHPC dans 20% de plasma murin

Les histogrammes de (A) Foslip® et des (C) mTHPC-VE représentent une distribution de taille obtenue par NTA. Concentration en mTHPC : 20 µM. Images de cryo-TEM de (B) Foslip® et des (D) mTHPC-VE. Les flèches montrent les fragments de membrane liposomale. Echelle : 100 nm. Concentration en mTHPC : 10 mM. (E) Le gel d'agarose montre le relargage de la mTHPC des nanovecteurs. Concentration en mTHPC : 20 µM. Les formulations de mTHPC sont incubées dans du D-PBS stérile (0 h) supplémenté avec 20% de plasma murin exo-free à 37 °C.

1.3. Conclusion

La caractérisation des mTHPC-VE a permis de mettre en évidence l'intérêt d'utiliser ce type de nanovectorisation comparé au Foslip® et à la mTHPC libre. En effet, en plus de présenter des capacités intrinsèques de ciblage tumoral, les mTHPC-VE se relevent plus stable dans le plasma que les liposomes de mTHPC et permettent une protection accrue de la mTHPC.

ETUDE DES VÉSICULES EXTRACELLULAIRES CHARGÉES DE mTHPC SUR CELLULES EN MONOCOUCHE

2.1. Matériels et Méthodes

2.1.1. Lignées et culture cellulaire

Les cellules cancéreuses HT29 sont des cellules d'adénocarcinome de colon humain provenant de la banque de cellules ATCC. Cette lignée de cellules adhérentes a été isolée à partir d'une tumeur primaire d'une femme de 44 ans pour la première fois en 1964 par J. Fogh. Elles sont conservées à -80 °C dans du milieu de congélation contenant 90% de sérum de veau fœtal (SVF) et 10% de diméthylsulfoxide (DMSO) pour éviter la formation de cristaux. Elles sont décongelées à passage 17 et utilisées jusqu'au passage 35 (un passage correspond à un repiquage hebdomadaire). Les cellules sont cultivées dans du milieu RPMI supplémenté avec 9% de SVF et 1% de glutamine à 200 mM (Sigma® Aldrich, France). Après trypsination des cellules, un comptage sur cellule de Thoma est réalisé permettant d'ensemencer des flasques à 2.10^4 cellules/mL. Les cellules sont incubées à 37 °C sous atmosphère humide avec 5% de CO_2 pendant une semaine.

Les cellules saines MRC5 sont des fibroblastes adhérents humains, d'origine pulmonaire, isolés pour la 1ère fois par J.P. Jacobs en 1966 sur un fœtus âgé de 14 semaines. Cette lignée est également conservée à -80 °C, utilisées de passage 5 à 10 et cultivées dans du milieu Minimum Essential Media (MEM) (GIBCO®, Royaume-Uni) supplémenté avec 9% de SVF, 1% de glutamine à 200 mM et 1% de Pyruvate de Sodium (GIBCO®, Royaume-Uni). Après trypsination des cellules, un comptage sur cellule de Thoma est réalisé et des flasques ensemencées à 2.10^4 cellules/mL. Les cellules sont incubées sous atmosphère humide (37 °C - 5% de CO_2) pendant une semaine.

2.1.2. Incorporation cellulaire de la mTHPC

Les cellules HT29, MRC5 (5.10^4 cellules/mL) et HUVEC (6.10^4 cellules/mL) sont ensemencées dans des plaques 24 puits pendant 72 h puis incubées avec une solution de mTHPC libre, Foslip® ou mTHPC-VE (0,1 µM) réalisée dans du milieu supplémenté avec 2% de SVF pendant 3, 6 et 24 h. Après trois lavages avec du D-PBS, une extraction chimique est effectuée. Les cellules sont trypsinées avec 500 µL de trypsine-EDTA et la réaction stoppée avec 1,5 mL de milieu complet. Après centrifugation (200 g – 5 min), le surnageant est éliminé et 500 µL d'éthanol absolu sont ajoutés sur le culot cellulaire. Après sonication (15 min – 4 °C), une centrifugation (400 g – 10 min) précède la lecture de la fluorescence de la mTHPC dans le surnageant (λexc: 416 nm; λem: 652 nm). La concentration de la mTHPC est déterminée grâce à l'utilisation d'une gamme étalon préalablement réalisée. Les résultats sont normalisés par rapport à la quantité de protéines.

Pour chaque expérience, un puit de cellules est utilisé pour l'extraction de protéines. Après trois lavages aux D-PBS, les cellules sont conservées à -20 °C pendant 1 h. 500 µL de tampon de lyse (EDTA 1 mM, 1% de Triton, 1% d'HCL 1 M, 1,21 g/mL de Tris ; pH 7,4) sont ajoutés par puit. La suspension cellulaire est placée sur de la glace pendant 30 min en vortexant toutes les 5 min puis une centrifugation est réalisée (15 000 g – 20 min – 4 °C). Le surnageant est dilué au 1/2 et au 1/5 dans de l'eau stérile et 5 µL de chaque dilution sont déposés en duplicat dans une plaque 96 puits. Parallèlement, une gamme de BSA a préalablement été réalisée et 5 µL de chaque dilution sont déposés en duplicat. Le kit Biorad DC protein assay est ensuite utilisé pour permettre la lecture de la densité optique au lecteur multiplaques Multiskan MCC/340 à 690 nm. La concentration en protéines totales est obtenue à l'aide de l'équation obtenue à partir de la courbe d'étalonnage de la BSA avec un R^2 de 0,99. La concentration est obtenue en mg de protéine/mL.

2.1.3. Mécanismes d'incorporation des nanovecteurs

Les cellules HT29 (5.10^4 cellules/mL) sont ensemencées dans des plaques 24 puits pendant 72 h et une solution de PS (1,45 µM) est ajoutée pendant 1 h soit à 37 °C comme contrôle d'incorporation cellulaire soit à 4 °C afin d'inhiber tous les mécanismes d'incorporation actif.

En parallèle, après trois lavages avec du D-PBS, les cellules sont pré-incubées pendant 30 min à 37 °C avec du milieu de culture contenant 100 µM d'EIPA, 400 µM de génistéine ou 10 µg/mL de chlorpromazine afin d'inhiber spécifiquement la macropinocytose, la voie cavéoline dépendante et la voie clathrine dépendante. Sans rinçage, une solution de PS (1,45 µM) est ajoutée pendant 1 h dans le noir à 37 °C. Après incubation, une extraction chimique de la mTHPC est réalisée comme décrit précédemment. Les résultats d'incorporation cellulaire sont normalisés par rapport au groupe contrôle (cellules 37 °C, sans inhibiteurs).

La toxicité des inhibiteurs a préalablement été vérifiée à l'aide d'un test MTT. Les cellules HT29 (4.10^4 cellules/mL) sont ensemencées dans une plaque 96 puits pendant 72 h et une solution d'inhibiteur à différentes concentrations est ajoutée pendant 1h30. A la fin de l'incubation, deux lavages au D-PBS sont effectués puis un lavage avec du milieu de culture. 150 µL de milieu complet sont disposés dans chacun des puits avec 50 µL de MTT (préparé à 2,5 mg/mL dans du D-PBS). La plaque 96 puits est placée à l'incubateur pendant 2 h puis 50 µL de DMSO sont ajoutés. La densité optique est lue à 540 nm sur le lecteur de plaque Multiskan.

2.1.4. Localisation subcellulaire

Les cellules HT29 ($1,5.10^4$ cellules/mL) sont ensemencées dans des Slideflasks (Nunc, Roskilde, Danemark) pendant 72 h puis une solution de PS (1,45 µM) est ajoutée pendant 24 h. Après trois lavages avec du D-PBS, les cellules sont incubées avec des sondes fluorescentes

spécifiques des organites intracellulaires : les mitochondries et les lysosomes sont marqués avec 500 µL de MitoTracker® à 0,2 µM ou de Lysotracker® à 0,15 µM respectivement (Molecular Probes, Oregon, USA) pendant 30 min à 37 °C. Le RE est mis en évidence avec 500 µL de $DiOC_6$ à 2,5 µg/mL pendant 1 min à température ambiante. L'appareil de Golgi est, quant à lui, marqué avec 500 µL de NBD-C_6 à 5 µM pendant 30 min à 4 °C puis 30 min à 37 °C. Après trois lavages avec du milieu, la fluorescence est observée à l'aide d'un microscope confocal à balayage (Leica SP5 X AOBS LCSM, Leica microsystem, Allemagne). Les sondes fluorescentes sont excitées à 488 nm et la mTHPC à 520 nm. L'émission est récupérée entre 505 et 550 nm et 635 et 700 nm respectivement pour les sondes fluorescentes (canal 1, vert) et la mTHPC (canal 2, rouge). Quinze plans focaux différents, observés à l'aide d'un objectif à immersion (X63), sont acquis (512*512 pixels) et le logiciel LAS Life de Leica est utilisé pour obtenir des images en projection maximale. Les images sont ensuite superposées pour réaliser une colocalisation, quantifiée à l'aide du coefficient de corrélation de Pearson par le logiciel d'analyse ImageJ.

2.1.5. Cytotoxicité et photocytotoxicité

Les cellules HT29 (4.10^4 cellules/mL) sont ensemencées dans une plaque 96 puits pendant 72 h et une solution de mTHPC-VE à différentes concentrations est incubée pendant 24 h. Après lavages, un test MTT est réalisé et les résultats sont normalisés par rapport à la viabilité cellulaire obtenue pour les cellules non incubées avec le PS.

Dans le cas de la photocytotoxicité, après incubation avec les différentes formulations de PS (0,1 µM) pendant 24 h, les cellules sont lavées trois fois avec du D-PBS et placées dans du RPMI à 2% de SVF. Elles sont ensuite irradiées à 652 nm à l'aide d'une diode laser (Cerelas, Biolitec GmbH, Allemagne) à différentes fluences et à une irradiance de 4,5 mW/cm^2. Le temps d'irradiation est calculé selon la formule suivante : (Fluence/Irradiance) x 1000. Le spot d'irradiation mesure 10 cm de diamètre et la puissance en sortie de fibre est de 353 mW. Après irradiation, le milieu est remplacé par du milieu complet et un test MTT est réalisé 24 h après irradiation.

2.2. Résultats & Discussion

Jusqu'à 6 h d'incubation, l'incorporation cellulaire en mTHPC est équivalente entre les différentes formulations. En revanche, après 24 h d'incubation, l'accumulation cellulaire est augmentée d'environ 2 fois avec les mTHPC-VE comparée à la mTHPC libre et au Foslip® (Figure 20). Ainsi, les mTHPC-VE issues de cellules HUVEC, tout comme celles issues de macrophages, possèdent une bonne sélectivité pour les cellules cancéreuses [252].

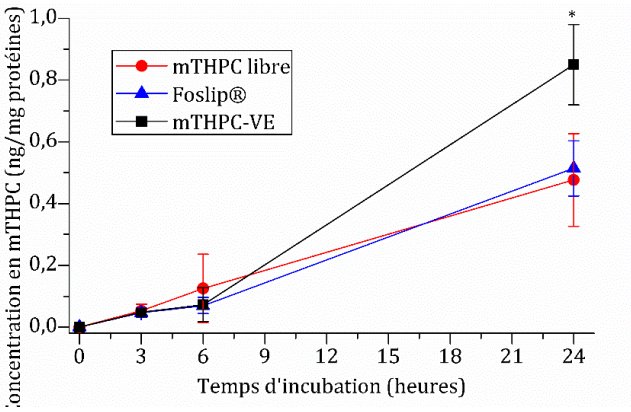


Figure 20. Incorporation cellulaire de la mTHPC dans des cellules cancéreuses

*La cinétique d'incorporation de la mTHPC dans les cellules cancéreuses HT29 (5.10⁴ cellules/ mL) a été réalisée après incubation avec de la mTHPC libre, du Foslip® et des mTHPC-VE (0,1 µM). La concentration en mTHPC est normalisée par rapport à la quantité de protéines en mg. * p<0,05.*

De plus, l'accumulation cellulaire des mTHPC-VE est également analysée sur des fibroblastes sains ainsi que sur les cellules d'origine des VE. Comme attendu, la concentration intracellulaire en mTHPC libre et en Foslip® est plus importante dans les fibroblastes et les cellules endothéliales que dans les cellules cancéreuses en raison d'un manque de sélectivité et de sensibilité intrinsèque [267,268]. En revanche, les mTHPC-VE s'accumulent d'une manière similaire dans les cellules cancéreuses et les fibroblastes pouvant prédire une augmentation de la sélectivité tumorale en comparaison de la mTHPC libre et du Foslip®. Les mTHPC-VE s'accumulent, quant à elles, préférentiellement dans les cellules HUVEC. En effet, les VE présentent un tropisme naturel pour leur cellule d'origine. Ce tropisme influence leur incorporation cellulaire et leur biodistribution *in vivo* contrairement à l'espèce d'origine (humain, souris, rat) qui n'affecte pas ces paramètres [175].

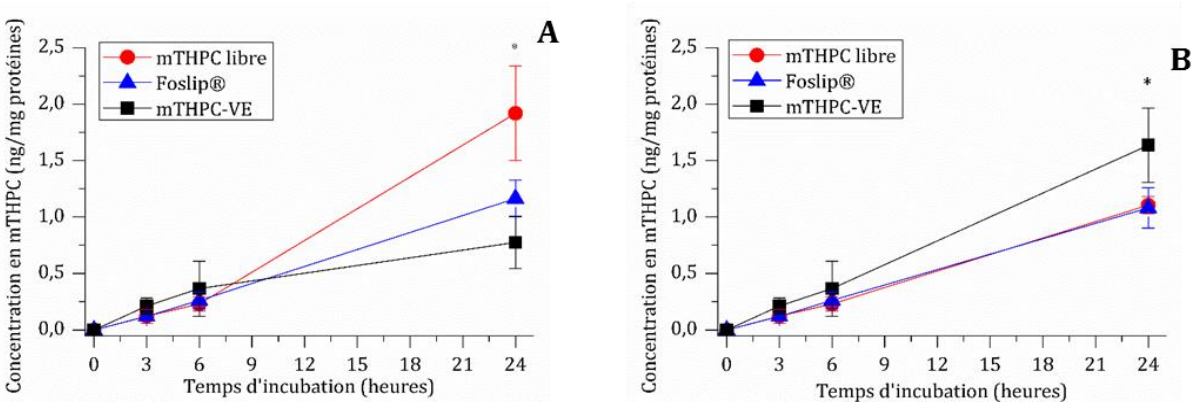


Figure 21. Incorporation cellulaire de la mTHPC dans des cellules saines

*(A) Cinétique d'incorporation de la mTHPC réalisée dans les cellules saines MRC5 (5.10⁴ cellules/ mL), et (B) celle réalisée dans les cellules HUVEC (6.10⁴ cellules/mL) après incubation avec de la mTHPC libre, du Foslip® et des mTHPC-VE (0,1 µM). La concentration en mTHPC est normalisée par rapport à la quantité de protéines en mg. * p<0,05.*

La localisation subcellulaire des différentes formulations de mTHPC est étudiée en microscopie confocale à l'aide de sondes fluorescentes spécifiques des différents organites intracellulaires. Toutes les formulations de mTHPC montrent une distribution homogène de la fluorescence dans le cytoplasme ainsi qu'une absence de fluorescence dans le noyau et la membrane plasmatique comme précédemment démontré pour la mTHPC libre et le Foslip® [42,43]. De plus, une corrélation modérée entre mitochondries/mTHPC (Figure 22A) et appareil de Golgi /mTHPC (Figure 22C) est mise en évidence après analyse des images de colocalisation (cf § Chap4. 3.2. Figure 3B). Toutes les formulations de mTHPC présentent également une forte corrélation avec le RE (Figure 22B) [41].

Cependant, la différence majeure est rencontrée avec les lysosomes (Figure 22D). La corrélation entre Lysotracker® et mTHPC est plus importante après une incubation avec les mTHPC-VE comparé à la mTHPC libre et au Foslip®. Ces résultats suggèrent une internalisation des mTHPC-VE par endocytose.

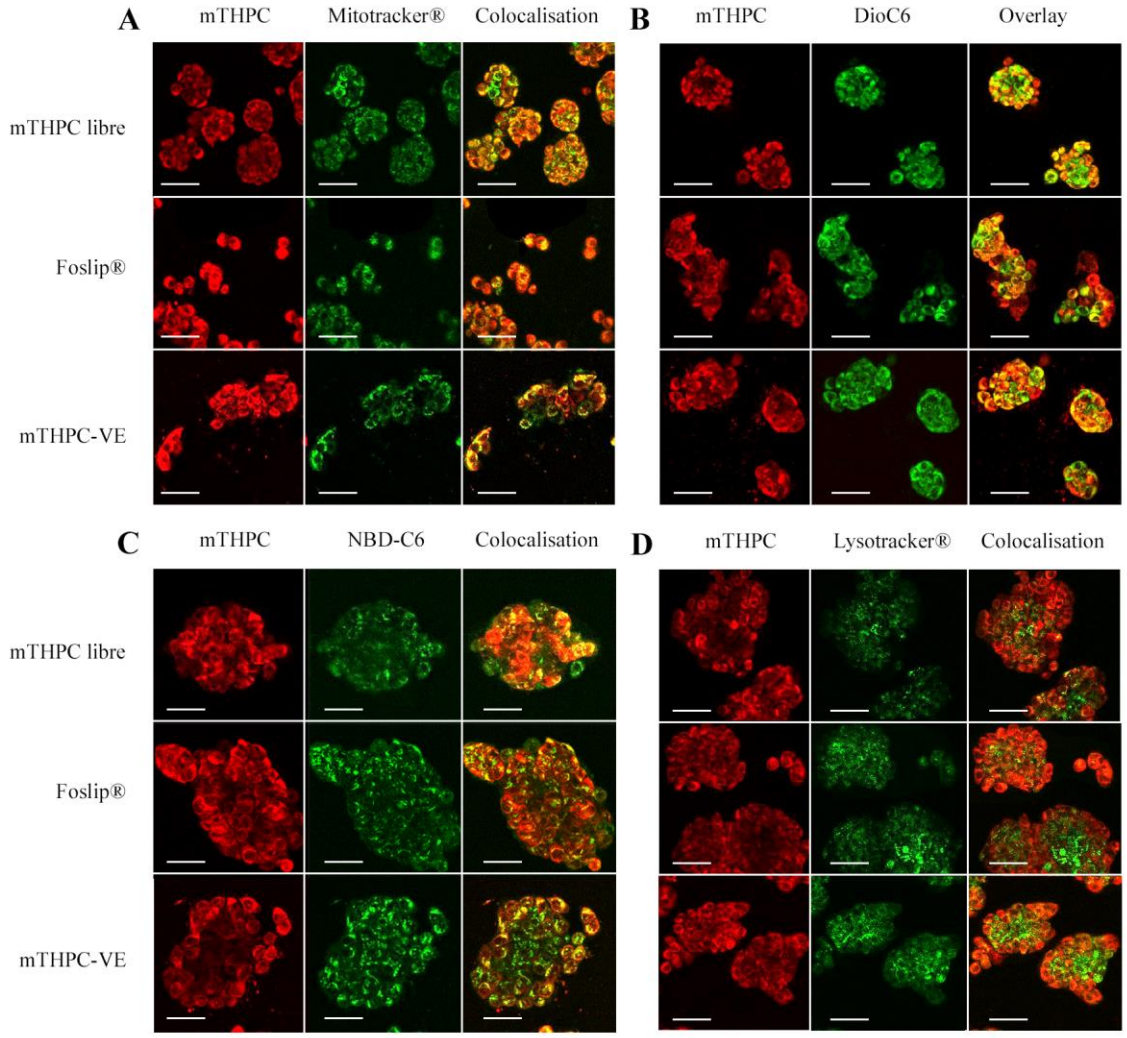


Figure 22. Localisation subcellulaire des formulations de mTHPC

Images typiques obtenues en microscopie confocale après une incubation pendant 24 h avec les différentes formulations de mTHPC (1,45 µM) et (A) du Mitotracker, (B) du $DiOC_6$, (C) du NBD et (D) du Lysotracker®. Les images de gauche montrent la fluorescence de la mTHPC, au centre celle des sondes fluorescentes et à droite, les images de colocalisation.

Dans le but de vérifier notre hypothèse, les différentes voies d'endocytose ont été étudiées. Une incubation à 4 °C des cellules avec le PS permet d'inhiber les mécanismes d'internalisation actifs, c'est-à-dire fusion cellulaire et endocytose [269]. En effet, cette technique n'affecte pas la diffusion passive au travers des membranes plasmiques. L'internalisation de la mTHPC ne semble pas impactée par l'incubation a 4 °C ce qui est en accord avec les données de la littérature [270]. Aucune différence significative avec le Foslip® n'est observée. Cependant, après incubation à 4 °C avec les mTHPC-VE, une inhibition de 80% de l'accumulation cellulaire est rencontrée. Des inhibiteurs spécifiques des voies d'endocytose ont par la suite été utilisés avec des concentrations n'entrainant pas de toxicité cellulaire : EIPA (Figure 23A) pour la macropinocytose, génistéine pour les voies dépendantes des cavéolines (Figure 23B) et chlorpromazine pour les voies dépendantes des clathrines (Figure 23C).

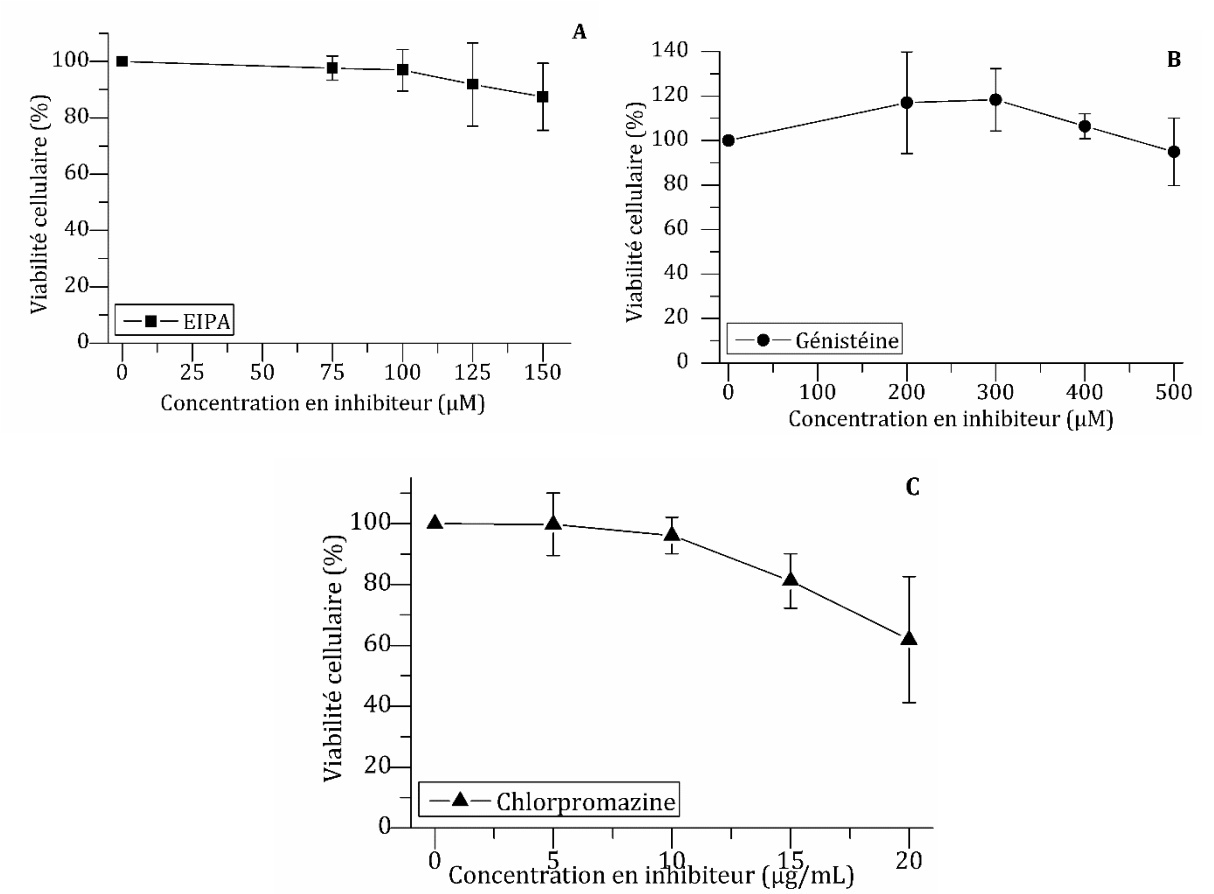


Figure 23. Toxicité des inhibiteurs des voies d'endocytose

Un test MTT permettant d'étudier la viabilité cellulaire est réalisé sur cellules HT29 après incubation avec des inhibiteurs des voies spécifiques de l'endocytose : (A) EIPA, (B) génistéine et (C) chlorpromazine.

L'accumulation cellulaire des mTHPC-VE n'est pas affectée par l'ajout d'EIPA (cf § Chap4. 3.2. Figure 3C). La localisation lysosomale est en faveur d'une internalisation par la voie clathrine dépendante. Cependant, uniquement 25% de l'incorporation cellulaire des mTHPC-VE est inhibée par l'ajout de chlorpromazine. Dans notre cas, le mécanisme majoritaire d'endocytose passe par la voie cavéoline dépendante. Ce phénomène a préalablement été observé dans le cas de micelles qui possèdent la capacité de contourner les endosomes et d'être transportées directement dans les lysosomes. Ce phénomène est dû à la dérégulation des mécanismes d'incorporation dans certaines cellules cancéreuses [91].

La survie des cellules HT29 est évaluée par un test MTT après 24 h d'incubation avec les différentes formulations de la mTHPC. Les données de la littérature montrent une absence de toxicité à l'obscurité de la mTHPC libre et du Foslip® à une concentration de 0,1 µM [48,271]. Il en est de même avec les mTHPC-VE (Figure 24A). Après application de faibles doses de lumière, aucune différence de photocytotoxicité n'est observée entre les différentes formulations de mTHPC. A partir d'1 J/cm^2, la mortalité cellulaire est plus importante pour le Foslip® et les mTHPC-VE comparée à la mTHPC libre. Cette différence s'accentue avec l'application d'une dose de lumière plus importante. A 3 J/cm^2, la survie cellulaire est d'environ 25% avec le Foslip® et les mTHPC-VE alors qu'elle est encore de 50% avec la mTHPC libre (Figure 24B). Ainsi, la nanovectorisation potentialise l'efficacité PDT de la mTHPC. Cependant, cette amélioration de l'activité thérapeutique semble indépendante de l'accumulation cellulaire. En effet, les mTHPC-VE s'accumulant plus que le Foslip®, une plus grande efficacité PDT était attendue. Une explication possible est la part importante de mTHPC-VE présente dans les lysosomes rendant alors la molécule inactive. En effet, cette localisation subcellulaire est en défaveur d'une photocytotoxicité importante [41].

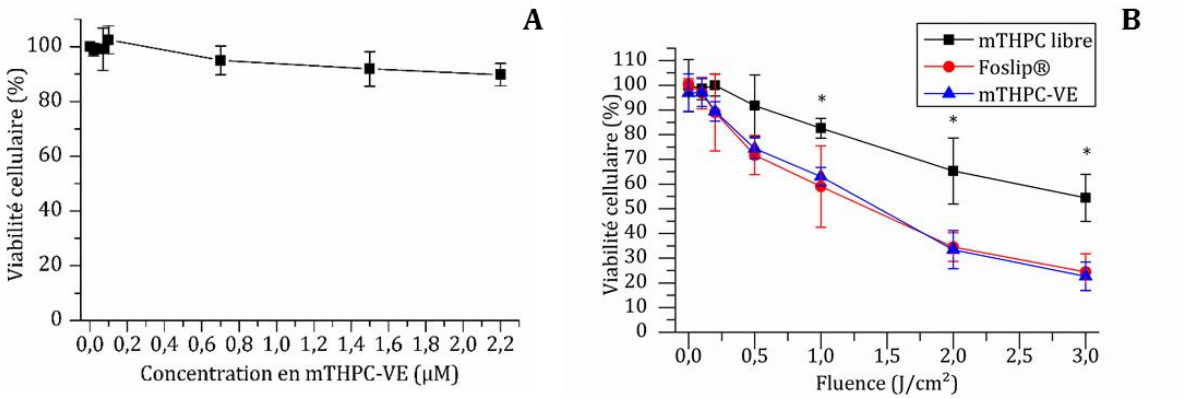


Figure 24. Cytotoxicité et photocytotoxicité des mTHPC-VE

(A) Toxicité à l'obscurité des mTHPC-VE sur les cellules HT29 après 24 h d'incubation avec différentes concentrations. (B) Photocytotoxicité des différentes formulations de mTHPC (0,1 µM) après 24 h d'incubation et irradiation à différentes fluences (irradiance : 4,5 mW/cm^2).

2.3. Conclusion

Les mTHPC-VE montre une efficacité PDT plus élevée comparé à la mTHPC libre en raison d'une accumulation cellulaire 2 fois plus importante dans les cellules cancéreuses HT29. Cependant, aucune différence n'est mise en évidence comparée au Foslip®. Cette observation peut s'expliquer par la différence de localisation subcellulaire. En effet, une part des mTHPC-VE est localisée de manière plus importante dans les lysosomes diminuant l'efficacité de la mTHPC.

Contrairement à la mTHPC libre qui est internalisée dans les cellules par diffusion passive, les liposomes de mTHPC semblent être internalisés par divers mécanismes : fusion membranaire, diffusion passive de la mTHPC après libération du liposome ou un transport de la mTHPC par les lipoprotéines à la suite d'une destruction liposomale. Les mTHPC-VE, quant à elles, sont internalisées par des mécanismes actifs : fusion cellulaire et endocytose médiée par la voie des cavéolines.

ETUDE DES NANOVECTEURS DE mTHPC SUR SPHÉROÏDES MULTICELLULAIRES

3.1. Modèle 3D et techniques d'analyse de la mTHPC nanovectorisée

Le modèle 3D de sphéroïdes multicellulaires est utilisé dans le but de prédire le comportement des agents thérapeutiques *in vivo*. Similaire aux microtumeurs avascularisées, ce modèle présente divers gradients de concentrations (O_2, pH et nutriments), contrairement aux cultures cellulaires en 2D, lui permettant d'étudier la capacité des agents thérapeutiques à diffuser et pénétrer dans le tissu tumoral. Concernant la mTHPC libre, l'intérêt du sphéroïde multicellulaire a précédemment été démontrée par notre équipe [259-261]. Cependant, une faible pénétration du PS en profondeur a été observée ainsi qu'une efficacité PDT limitée. Dans le but d'améliorer ces propriétés, des formulations nanovectorisées ont été développées.

La mTHPC, vectorisée à l'aide de cyclodextrines, a été utilisée afin de mettre en place le modèle de sphéroïdes multicellulaires HT29 ainsi que les différentes techniques d'analyse de la mTHPC nanovectorisée dans ce modèle 3D.

Les sphéroïdes multicellulaires sont formés à la suite d'une culture des cellules cancéreuses HT29 en flacon d'agitation (« spinner »). Les cellules sont ensemencées dans des flasques de culture préalablement traitées avec de l'agarose pour initier la formation des sphéroïdes. Après 3 jours de culture, les amas cellulaires sont placés dans les spinners contenant du milieu de culture supplémenté avec 9% de SVF et maintenus sous agitation magnétique durant 15 jours. Les sphéroïdes sont filtrés afin d'obtenir une population homogène en taille.

Différentes techniques ont été mises au point afin d'analyser le comportement de la mTHPC nanovectorisée dans le sphéroïde multicellulaire HT29. A la suite d'une extraction chimique, l'incorporation de la mTHPC nanovectorisée est doublée comparée à la mTHPC libre. Corrélé à ces résultats, une pénétration plus en profondeur a été visualisée grâce à la microscopie de fluorescence sur sphéroïdes entiers, 24 h après incubation. Cependant, la viabilité cellulaire après PDT est diminuée seulement de 25% après une incubation avec la formulation nanovectorisée de mTHPC. Ainsi, l'ensemble de ces résultats est présenté dans la publication scientifique ci-dessous (cf §3.2), parue en 2017 dans le journal *« International journal of Pharmaceutics »*.

En conclusion, le sphéroïde multicellulaire HT29 est un modèle 3D intéressant pour l'étude des nanovecteurs de mTHPC. Ces formulations étant connues pour s'accumuler dans les tumeurs *in vivo* grâce à l'effet EPR, ce modèle 3D représente parfaitement le microenvironnement rencontré par le nanovecteur après sa sortie des vaisseaux.

3.2. Publication n°1

International Journal of Pharmaceutics 529 (2017) 568–575

Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Pharmaceutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpharm

Research Paper

The alteration of temoporfin distribution in multicellular tumor spheroids by β-cyclodextrins

Ilya Yakavets[a,b,c], Igor Yankovsky[c], Marie Millard[a,b], Laureline Lamy[b], Henri-Pierre Lassalle[a,b], Arno Wiehe[d], Vladimir Zorin[c,e], Lina Bezdetnaya[a,b,*]

[a] Centre de Recherche en Automatique de Nancy (CRAN), CNRS UMR 7039 (Centre National de la Recherche Scientifique), Université de Lorraine, Campus Sciences, 54500, Vandœuvre-lès-Nancy, France
[b] Institut de Cancérologie de Lorraine, Research Department, Avenue de Bourgogne, 54519, Vandœuvre-lès-Nancy, France
[c] Laboratory of Biophysics and Biotechnology, Physics Faculty, Belarusian State University, 4 Nezavisimosti Av., 220030, Minsk, Belarus
[d] Biolitec Research GmbH, Otto-Schott-Str. 15, 07745 Jena, Germany
[e] Belarusian State University, ISEI BSU, Dauhabrodskaja 23, 220070 Minsk, Belarus

ARTICLE INFO

Article history:
Received 11 April 2017
Accepted 11 July 2017
Available online 12 July 2017

Chemical compounds studied in this article:
meta-Tetrakis(3-hydroxyphenyl)chlorin (PubChem CID: 60751)
Methyl-β-cyclodextrin (PubChem CID: 51051622)
2-Hydroxypropyl-β-cyclodextrin (PubChem CID: 44134771)

Keywords:
Cyclodextrins
mTHPC
Inclusion complexes
Photodynamic therapy
Spheroid
Penetration

ABSTRACT

To be effective anticancer drugs must penetrate tissue efficiently, reaching all target population of cancer cells in a concentration sufficient to exert a therapeutic effect. This study aimed to investigate the ability of methyl-β-cyclodextrin (Me-β-CD) and 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin (Hp-β-CD) to alter the penetration and diffusion of temoporfin (mTHPC) in HT29 multicellular tumor spheroids. mTHPC had a nonhomogenous distribution only on the periphery of spheroids. The presence of β-CDs significantly altered the distribution of mTHPC consisting in the increase of both the depth of photosensitizer penetration and accumulation in HT29 spheroids. We suggest that this improvement is related to the nanoshuttle mechanism of β-CD action, when β-CDs facilitate mTHPC transportation to the cells in the inner layers of spheroids. As a result of mTHPC distribution improvement, β-CDs enhance mTHPC photosensitizing activity towards HT29 multicellular tumor spheroids. The observed effects strongly depend on the type of β-CD. Thus, varying the type of β-CD we can finely tune the possibility of using mTHPC for diagnostic (delimitation of tumor margins) or therapeutic purposes.
© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Photodynamic therapy (PDT) is a promising approach for cancer treatment, which involves the photonic excitation of a photosensitizer (PS) in the presence of ambient oxygen, forming reactive oxygen species (Agostinis et al., 2011; Castano et al., 2004). These activated oxygen toxic species diffuse for a few tens of nanometers from PS binding site and therefore the PDT-induced phototoxic effect is limited to PS distribution volume and the compartments of PS intracellular localization (Josefsen and Boyle, 2012; Moan, 1990; Zorin et al., 1996). To be most effective anticancer drugs must penetrate tissue efficiently, reaching target population of cancer cells in a concentration sufficient to exert a therapeutic effect. Since a while, nanoscale materials were extensively considered in PDT since they can overcome critical limitations of conventional PSs related to unfavorable PS distribution and incomplete tumor elimination (Duchêne and Bochot, 2016; Lim et al., 2013; Marchal et al., 2015; St Denis and Hamblin, 2015).

Temoporfin (*meta*-tetrakis(3-hydroxyphenyl)chlorin, mTHPC) is a highly efficient clinically approved photosensitizer, used as an ethanol/propylene glycol-based formulation (Foscan®; biolitec Pharma Ltd., Jena, Germany) for the treatment of head and neck cancers (Senge, 2012; Senge and Brandt, 2011). Actual studies, focused on nanoparticle-based mTHPC formulations, including

Abbreviations: PDT, photodynamic therapy; PS, photosensitizer; mTHPC, *meta*-tetrakis(3-hydroxyphenyl)chlorin; β-CD, β-cyclodextrin; 3D, three-dimensional; MTS, multicellular tumor spheroid; Me-β-CD, methyl-β-cyclodextrin; Hp-β-CD, 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin; PBS, phosphate buffered saline.

* Corresponding author at: Institut de Cancerologie de Lorraine, 6 Avenue de Bourgogne, CS 30519, 54519 Vandoeuvre-les-Nancy, Cedex, France.
E-mail address: l.bolotine@nancy.unicancer.fr (L. Bezdetnaya).

http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.07.037
0378-5173/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

liposomes, demonstrated numerous advantages (solubility, delivery and photodynamic action) of these formulations over free mTHPC. However, a fragile mTHPC liposomal integrity in the circulation along with a limited penetration of mTHPC liposomal formulations in tumor tissue may restrain mTHPC-based liposomal applications (Gaio et al., 2016; Mitra et al., 2005; Reshetov et al., 2012).

Recently, we have demonstrated the perspectives of using cyclic oligosaccharides, β-cyclodextrin (β-CD) derivatives, as nanoscale delivery system for mTHPC. According to our data, β-CDs increase diffusion movement of mTHPC molecules between serum proteins, significantly accelerating the delivery of PS to targets cells and tissues (Yakavets et al., 2017; Yankovsky et al., 2016). We suggested that β-CDs extract mTHPC molecule from lipoprotein carrier and form inclusion complexes. The small size of inclusion complexes makes possible faster diffusion of PS molecule in blood and interstitial medium. This mechanism, termed "nanoshuttle" could be used to improve both limited penetration and spatial distribution of mTHPC throughout a solid tumor in the presence of CDs.

The three-dimensional (3D) spheroid cancer cells closely resemble small avascular *in vivo* tumors representing a reliable model for investigating the ability of anticancer drugs to penetrate and diffuse into the tumor. Spheroids were also suggested to be a good predictive platform for studying the drug delivery systems, including mTHPC-loaded solid lipid nanoparticles and liposomal formulations (Gaio et al., 2016; Hinger et al., 2016; Patel et al., 2015).

The aim of present work was to explore the possibility afforded by β-CDs to exert a nanoshuttle action on mTHPC delivery, distribution and diffusion in multicellular tumor spheroids (MTSs). The photoinduced toxicity of mTHPC/β-CDs complexes in spheroids was an end-point of the present research.

2. Material and methods

2.1. Chemicals and reagent preparation

mTHPC was kindly provided by biolitec research GmbH (Jena, Germany). mTHPC stock solution (1 mM) was prepared in absolute ethanol (99.6%) and kept at 4 °C in the dark. The concentration of mTHPC in the solution was estimated by a spectroscopy using molar extinction coefficient of 30,000 M^{-1} cm^{-1} at 650 nm in ethanol. For *in vitro* cell culture experiments mTHPC stock solution was diluted in phenol red-free Roswell Park Memorial Institute 1640 medium (RPMI-1640, Invitrogen™, Carlsbad, California, USA), supplemented with 2% fetal calf serum (Life Technologies, Carlsbad, California, USA) to reach, unless otherwise indicatedthe final mTHPC concentration of 4.5 μM.

Methyl-β-cyclodextrin (Me-β-CD) and 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin (Hp-β-CD) were purchased from AraChem (Tilburg, the Netherlands). Inclusion complexes between β-CDs and mTHPC (Scheme 1) were formed using co-precipitation method (Del Valle, 2004). Briefly, β-CDs were dissolved in phosphate buffered saline (PBS, GIBCO™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) at the required concentrations with the subsequent addition of mTHPC stock solution. The final content of ethanol in the mTHPC/β-CD solutions did not exceed 0.5%. Solution was thoroughly mixed over 15 min under magnetic stirring.

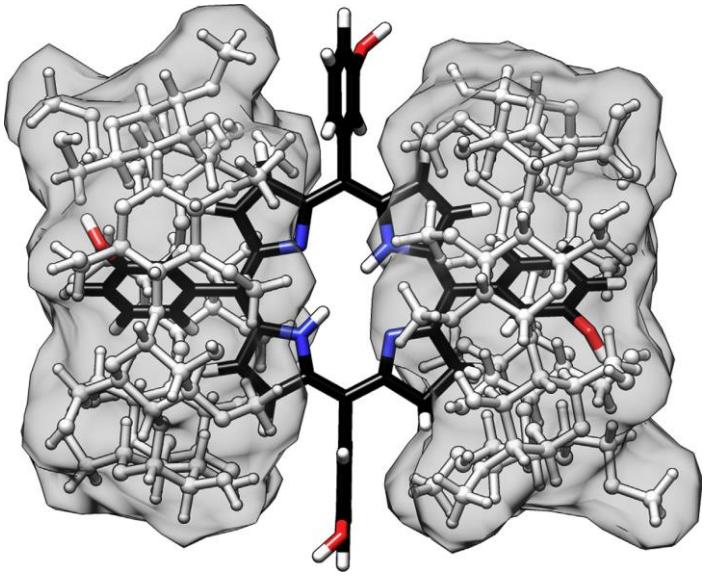
2.2. Monolayer and spheroid cell cultures

2.2.1. Culture conditions

HT29 human adenocarcinoma cells were obtained from the ATCC® (LGC Promochem, Molsheim, France) and regularly controlled for mycoplasma contamination. HT29 cells were maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 9% (vol/vol) heat-inactivated fetal calf serum, penicillin (10,000 IU), streptomycin (10,000 μg/mL), and 1% (vol/vol) 0.1 M glutamine (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Cells were kept as a monolayer culture in a humidified incubator (5% CO_2) at 37 °C. Cell culture was reseeded every week to ensure exponential growth.

2.2.2. Generation of spheroids

Multicellular spheroids were initiated by seeding 5×10^4 HT29 cells into 75 cm^2 flasks (Costar Corning, NY, USA) previously coated with 1% L-agarose. After 3 days, aggregates were transferred to 250 mL spinner flasks (Integra Biosciences, Zizers, Switzerland) containing 150 mL of culture medium. The flasks were then placed



Scheme 1. Possible structure of 1:2 inclusion complex of mTHPC/2β-CDs.

on magnetic plates (Integra Biosciences, Zizers, Switzerland) at 75 rpm in 5% CO_2 and 37 °C humidified atmosphere. Five days after seeding, aggregates were filtered through 100 and 150 μm sterile nylon screen (VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA) in order to obtain a homogeneous population of 100–150 μm in diameter. Spheroid culture medium was changed every 2–3 days. When spheroids reached 500 μm in diameter after 15 days, they were used for experiments.

For dissociation, spheroids were transferred into a 15 mL flask, washed twice with PBS and incubated with 0.05% trypsin (GIBCO™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) – 0.02% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, GIBCO™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). After dissociation, trypsin action was inhibited by addition of culture medium, cell suspension was centrifuged to a pellet and further resuspended in fresh medium.

2.2.3. Uptake of mTHPC in spheroids

mTHPC was added to a set of 50 spheroids at the concentration 4.5 μM. Photosensitizer incubation was performed in the dark at 37 °C in a humidified 5% CO_2 air atmosphere for 24 h. After that, spheroids were dissociated and individual cells were subjected to the extraction of mTHPC with ethanol (99.6%). The mTHPC fluorescence intensity was measured by spectrofluorometer (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) (λ_{ex} = 416 nm; λ_{em} = 652 nm) and was related to fluorescence calibration curves of mTHPC standard solution in ethanol. The obtained mTHPC concentration was normalized to the number of spheroids.

2.2.4. Flow cytometry experiments

Flow cytometry analysis was performed using FACSCalibur (BD, Franklin Lakes, USA), equipped with laser emitting at 488 nm. The mTHPC fluorescence was detected in fluorescence channel FL4 with a 661 ± 16 nm filter. HT29 cell suspension was obtained after spheroids dissociation. Data analysis was carried out with the trial version of Kaluza® Flow Analysis Software (Beckman Coulter, Inc., Brea, USA).

2.2.5. Imaging of mTHPC distribution

mTHPC was added to a set of 50 spheroids at the concentration 4.5 μM. Photosensitizer incubation was performed in the dark at 37 °C in a humidified 5% CO_2 air atmosphere for 24 h. After that spheroids have been transferred 35 mm Petri dishes, washed twice with PBS and directly observed on an upright epifluorescence microscope (AX-70 Provis, Olympus, Tokyo, Japan) equipped with a 100 W mercury vapor lamp and a Peltier cooled CCD camera (DP70, Olympus, Tokyo, Japan). The filter was set at 400–440 nm band pass excitation associated with a 570 nm dichroic mirror and a 590 nm long pass emission filter for mTHPC fluorescence measurements. Fluorescence images were recorded using 4 × objective from the spheroid surface. The line profiles were calculated from 15 radial lines, which were randomly drawn at the images of spheroid equatorial planes with the ImageJ software.

2.2.6. Photodynamic treatment

Fifty HT29 spheroids were transferred from the spinner flask to 35 mm Petri dishes. Incubation with 3 mL of complete medium containing 4.5 μM of mTHPC was performed at 37 °C in the dark for 24 h. After three washes with PBS, spheroids were transferred into 35 mm Petri dishes containing 3 mL culture medium and subjected to irradiation. Irradiations were performed at 652 nm with a Ceralas PDT diode laser (CeramOptec GmbH, Bonn, Germany) at various fluences administered at the fluence rate of 30 mW cm^{-2}. The irradiation times were adapted for each irradiation so that equivalent fluences of 10, 20, 30 and 40 J cm^{-2} were delivered. Control spheroids were exposed to mTHPC only (drug, no light).

2.2.7. Photocytotoxicity experiments

Cells were collected from spheroids with trypsin immediately after PDT. They were counted with a Thoma hemocytometer by using trypan blue exclusion assay in order to determine cell yield following PDT treatment. Intact cells were seeded in triplicate into 6-well plates for plating efficiency according to a clonogenic cell survival assay previously described (Franken et al., 2006). Over this bottom layer, 500 cells were plated in 1 mL culture medium. Cultures were incubated at 37 °C with 5% CO_2 in air for 14 days. Colonies composed of more than 50 cells were counted manually.

2.2.8. Statistics

All the experimental data were presented as mean values ± standard error of mean. The data were evaluated using Student's *t*-test. The difference was considered significant at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. mTHPC uptake in MTSs

mTHPC uptake in MTSs was evaluated at different β-CDs concentrations after 24 h incubation. Spheroids treated with mTHPC only (4.5 μM) were taken as a control sample (100% of

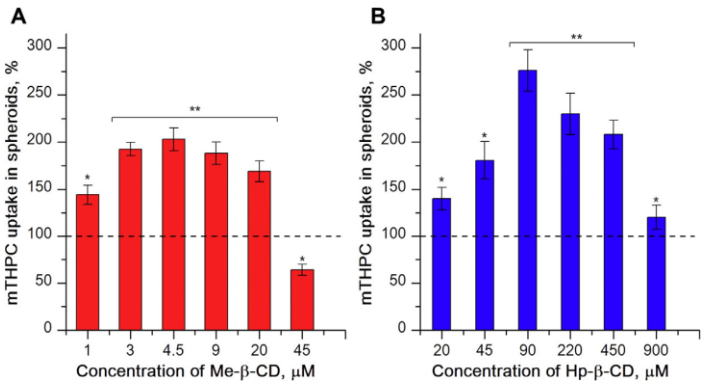


Fig 1. Effect of β-CDs on the relative level of mTHPC uptake in HT29 spheroids. mTHPC uptake in HT29 spheroids after 24 h incubation in the presence of (A) Me-β-CD and (B) Hp-β-CD. mTHPC uptake with β-CDs was normalized to control sample (mTHPC in β-CD free medium) taken as 100% (dashed line). *statistically different from control sample, $P < 0.05$; **statistically different from control, $P < 0.01$.

mTHPC uptake). According to Fig. 1(A&B), the β-CDs alter the mTHPC accumulation in MTSs. This effect critically depends on the concentration and on the type of β-CD derivatives. In a certain range of β-CDs concentrations, its increase leads to the enhancement of mTHPC uptake. Twice higher accumulation of mTHPC was observed at 4.5 μM Me-β-CD (Fig. 1A) while nearly a three times higher mTHPC uptake was registered in the presence of 90 μM Hp-β-CD (Fig. 1B). Further increase in concentrations of both β-CDs was accompanied by a gradual decrease of mTHPC uptake in MTSs.

In the next step we compared the rates of mTHPC accumulation in the presence of β-CDs. To observe the maximal effect, the optimal concentrations of β-CDs were taken as 4.5 μM and 90 μM for Me-β-CD and of Hp-β-CD respectively. HT29 spheroids incubated in the cyclodextrin-free medium accumulate mTHPC very slowly with a high initial uptake rate (0.75 ng spheroid^{-1} h^{-1} at 3 h of incubation) (Fig. 2). The addition of β-CDs significantly accelerates mTHPC accumulation. The highest effect was observed with Hp-β-CD (the initial uptake rate was up to 3.03 ng spheroid^{-1} h^{-1}) (Fig. 2), while in the presence of Me-β-CD we noted an increase of initial uptake rate up to 1.55 ng spheroid^{-1} h^{-1} (Fig. 2). The uptake rate at 24 h was 0.37 ng spheroid^{-1} h^{-1} for both Hp-β-CD and Me-β-CD inclusion complexes, compared to 0.17 ng spheroid^{-1} h^{-1} for mTHPC without β-CDs.

3.2. mTHPC distribution in HT29 spheroids

Epifluorescent microscopy technique was used to obtain the distribution patterns of either mTHPC alone or mTHPC/β-CD formulations in MTSs after 24 h incubation (Fig. 3). In this 3D tumor model, mTHPC without β-CDs was mainly accumulated on the MTS periphery (Fig. 3A). The analysis of linear profiles demonstrated a strong pattern of mTHPC fluorescence in the outer rim of the spheroid with the intensity 30 a.u. that fells off twice in the center (Fig. 3D). The addition of β-CDs significantly increased the overall mTHPC fluorescence intensity (Figures 3 B&C). The most interesting features were observed in the case of Me-β-CD. This compound completely modified mTHPC fluorescence distribution pattern (Fig. 3C). The fluorescence profiles were characterized by a smooth mTHPC distribution across the spheroid with the mean fluorescence intensity 35 a.u. (Fig. 3E). At the same time, Hp-β-CD demonstrated the increase of the fluorescence intensity on the periphery of MTSs up to 47 a.u. while in the central area it was comparable with that of Me-β-CD/mTHPC (30 a.u.) (Fig. 3F).

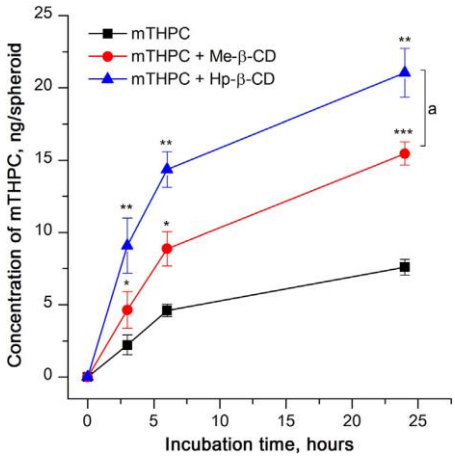


Fig. 2. Kinetics of mTHPC uptake in HT29 spheroids. Concentration of mTHPC was evaluated after the different times of spheroids incubation with mTHPC alone, mTHPC/Me-β-CD and mTHPC/Hp-β-CD. CDs concentrations were 4.5 μM for Me-β-CD and 90 μM for Hp-β-CD. mTHPC concentration was 4.5 μM. *statistically different from control (mTHPC alone) sample $P < 0.05$; **statistically different from control sample, $P < 0.01$; ***statistically different from control sample, $P < 0.001$; [a]statistically different between the samples with Me-β-CD and Hp-β-CD, $P < 0.05$.

The fluorescence microscopy study was further refined by evaluating the heterogeneity of mTHPC distribution in spheroid cells by flow cytometry technique (Fig. 4). The level of cellular autofluorescence in spheroid cells was very low (0.21 a.u.) (Fig. 4A). Typical fluorescence profiles of dissociated spheroids exposed to 4.5 μM mTHPC alone or to mTHPC/β-CDs are displayed on the Fig. 4(B–D). We discriminate two subpopulations of spheroid cells based on mTHPC fluorescence intensity: dimmest and brightest. In the case of mTHPC only, the brightest subpopulation (B+) counts for only 10.6% (Fig. 4B), while the addition of β-CDs leads to the increase of this fraction up to *ca* 32% and 51% for Hp-β-CD (Fig. 4C) and Me-β-CD (Fig. 4D) respectively. The degree of heterogeneity of mTHPC distribution was assessed through the ratio of mean fluorescence intensity of single cells (x-median value) in subpopulation (B+) to that of (B−). Without β-CDs, (B+) subpopulation was more than 50 times brighter as compared to the dimmest one. The presence of Hp-β-CD increased the heterogeneity of mTHPC distribution and the ratio reached 130. At the same time, the addition of Me-β-CD leads to a more homogeneous mTHPC distribution throughout spheroid. In this case, the intensity ratio (B+/B−) was only about 19. Taken as a whole, the flow cytometry results were consistent with fluorescent microscopy data and indicated the heterogeneity of mTHPC distribution in spheroid cells for all PS formulations decreasing in a range Hp-β-CD > mTHPC > Me-β-CD.

3.3. mTHPC photocytotoxicity in MTSs

Considering that the better mTHPC homogeneity in spheroids was achieved with Me-β-CD/mTHPC formulations, we further assessed the clonogenic ability of spheroids loaded with Me-β-CD/mTHPC and subjected to different fluences of red light irradiation (Fig. 5). The data were compared with photokilling activity of mTHPC only. For both formulations cellular viability strongly depended on the applied fluence with a higher photocytotoxicity observed for Me-β-CD/mTHPC formulations. At the light dose as low as 20 J cm^{-2} the Me-β-CD/mTHPC photocytotoxicity was 25% higher than that of mTHPC-PDT only ($P < 0.05$). This difference decreased at higher light fluences.

4. Discussion

High accumulation and penetration of anticancer drugs have always been primary factors responsible for optimal antitumor efficiency. These parameters must be carefully considered when evaluating photosensitizing agents, since their non-homogeneous distribution into the tumor mass may lead to incomplete tumor eradication (West and Moore, 1992). The distribution processes in tissues is especially important in the case of non-polar compounds, such as mTHPC (Senge, 2012), which possesses a complex time-dependent distribution in tumor tissues (Mitra et al., 2005). Multicellular spheroids allow to simulate the penetration and intratumor transport of anticancer nanomedicines, including photoactive nanoparticles (Evans, 2015; Khanna et al., 2014; Waite and Roth, 2012).

To date, numerous nano-platforms using a variety of organic and inorganic nanomaterials have been studied for efficient and targeted mTHPC delivery (Chen et al., 2010; Hinger et al., 2016; Hofman et al., 2008; Löw et al., 2011; Reshetov et al., 2013; Yankovsky et al., 2016). However, current mTHPC nanocarriers sometimes are not able to overcome the complications of mTHPC

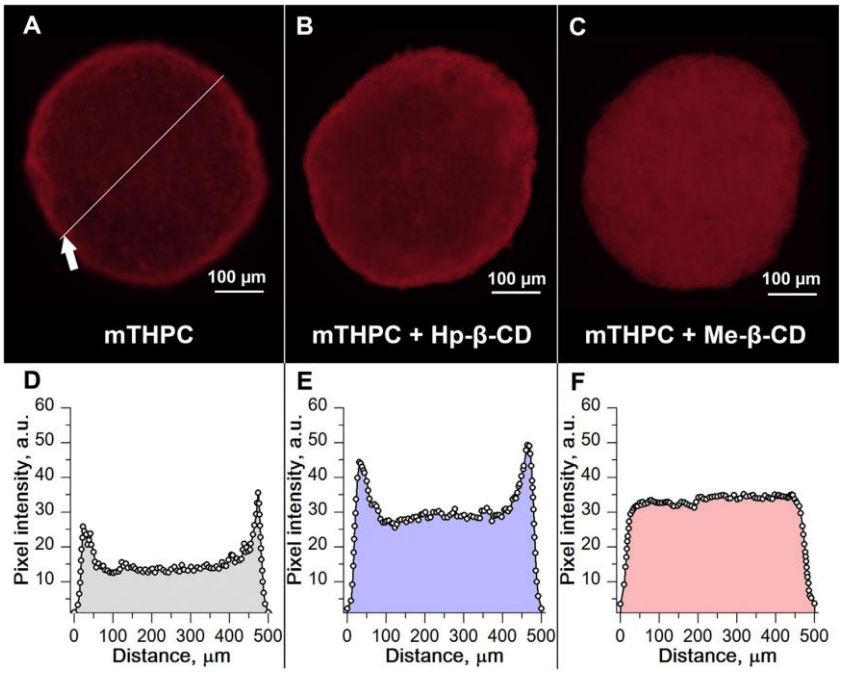


Fig. 3. Fluorescence patterns of spheroids after 24 h incubation with mTHPC, mTHPC/Me-β-CD and mTHPC/Hp-β-CD β-CDs. Fluorescence image (A) and fluorescence intensity profile (D) of mTHPC in HT29 spheroids. Fluorescence image (B) and fluorescence intensity profile (E) of mTHPC in spheroids in the presence of Hp-β-CD. Fluorescence image (C) and fluorescence intensity profile (F) of mTHPC in spheroids in the presence of Me-β-CD. Concentrations of Me-β-CD and Hp-β-CD were 4.5 μM and 90 μM respectively. mTHPC concentration was 4.5 μM.

distribution. For example, non-PEGylated (Foslip®) and PEGylated (Fospeg®) liposomal mTHPC formulations were unable to improve mTHPC distribution in HeLa spheroids (Gaio et al., 2016), perhaps due to limited penetration of liposomal carriers. Similar results were observed for nanostructured mTHPC lipid carriers (Lipidots) and mTHPC-loaded PLGA nanoparticles (Hinger et al., 2016; Löw et al., 2011). Authors suggested that the size of nanoparticles matters significantly (Hinger et al., 2016). However, even the smallest (50 nm) Lipidots demonstrated less penetration depth and uptake than mTHPC alone in 3D tumor model.

Recently, we proposed a new type of mTHPC formulations based on the inclusion complexation with cyclic oligosaccharides as β-CDs (Yakavets et al., 2017; Yankovsky et al., 2016). β-CD is a common drug delivery system and finds numerous applications in nanomedicine due to the unique ability to form noncovalent inclusion complexes with a variety of drugs (Bautista-Sanchez et al., 2005; Duchêne, 2011; Stella et al., 1999). The complexation of mTHPC with β-CDs results in a complete abolishment of mTHPC aggregation in aqueous solutions and significantly alters mTHPC distribution *in vitro* and *in vivo* through nanoshuttle mechanism. In the present study we addressed the mechanisms of β-CDs alteration of mTHPC distribution in multicellular tumor spheroids.

Figs. 1 and 2 illustrate the influence of β-CDs on mTHPC accumulation in HT29 spheroids. mTHPC uptake critically depends on concentration and type of β-CDs. Recently, we reported the similar concentration dependence pattern of mTHPC uptake in HT29 monolayer cells (Yankovsky et al., 2016). We demonstrated that at moderate concentrations β-CDs accelerated mTHPC transportation between serum proteins and cells, while excess of β-CDs led to the high probability of inclusion complex formation, hampering mTHPC availability for biological targets. An optimal mTHPC accumulation was obtained at the concentration of Me-β-CD 15–20 times less as compared to Hp-β-CD, being apparently the result of different mTHPC affinity to β-CDs. Indeed, according to Bautista-Sanchez et al. (Bautista-Sanchez et al., 2005), the Hp-β-CD binding constant is at least 5 times lower than that for Me-β-CD.

We further assessed an impact of β-CDs on mTHPC distribution in spheroid bulk. According to our results, the most intensive mTHPC fluorescence was observed on the periphery of MTSs (Fig. 3A&D). The application of a more sensitive laser confocal scanning microscopy technique suggested the heterogeneous fluorescence pattern of MTSs and showed that practically all mTHPC fluorescence concentrated in 2530 μm of HeLa and EMT6 spheroids outer layer (Coutier et al., 2001; Gaio et al., 2016). The presence of Hp-β-CD increases the overall fluorescence level, however mTHPC fluorescence pattern with the peripheral intensities peaks remains almost unchanged (Fig. 3B&E). A quite different mTHPC fluorescence distribution was observed in the case of another β-CD (Fig. 3C). In the presence of Me-β-CD mTHPC penetrated deeper in MTS and a more homogeneous mTHPC distribution was achieved (Fig. 3F).

Flow cytometry analysis confirmed the alteration of mTHPC distribution in HT29 spheroids in the presence of β-CDs (Fig. 4). According to our data, only 10% of cells incubated with mTHPC alone were characterized by an enhanced mTHPC fluorescence (Fig. 4B), suggesting a limited penetration depth of mTHPC through tumor tissue. This pattern could be attributed to the unique binding and retention mTHPC properties in cells (Ball et al., 1999; Mitra and Foster, 2005), conditioning an increased sequestration ability of mTHPC in cells and as such limiting the PS penetration in tissue. In the case of Hp-β-CD we observed 30% of bright cells, with the ratio between brightness and dimmest cell population intensities as 130 (Fig. 4C). The addition of Me-β-CD increased the number of cells with high mTHPC fluorescence intensity B+ (up to 50%) (Fig. 4D). In addition, Me-β-CD treatment leads to the

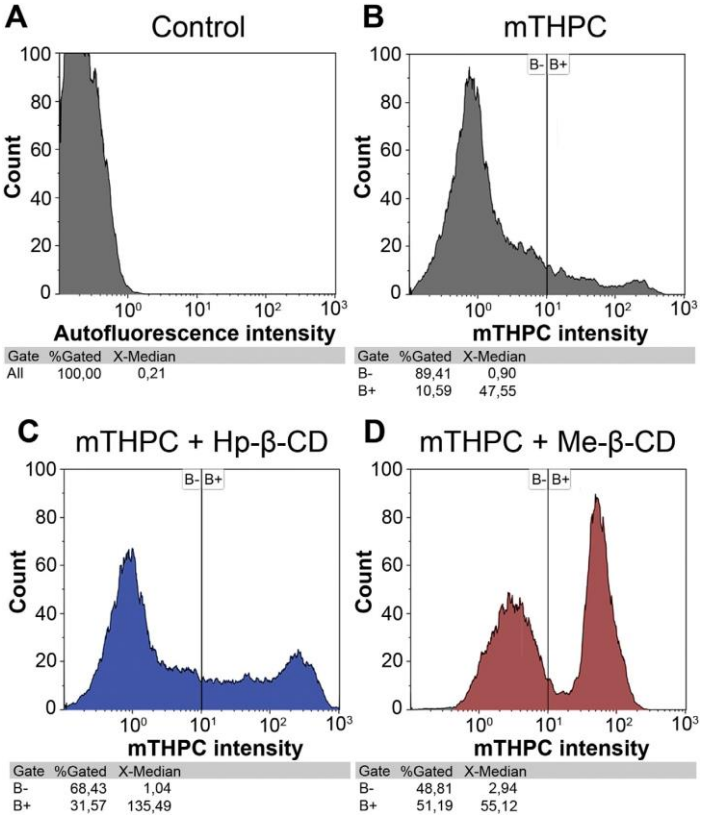


Fig. 4. Histogram of cellular autofluorescence and mTHPC fluorescence in function of cell counts in HT29 spheroids after 24 h incubation with different mTHPC formulations. (A) Spheroids cells autofluorescence. Spheroids treated with (B) mTHPC alone (4.5 μM), (C) mTHPC (4.5 μM) with 90 μM Hp-β-CD and (D) mTHPC (4.5 μM) with 4.5 μM Me-β-CD. Log scale fluorescence is shown on the x-axis. The brightest subpopulation (mTHPC intensity >10) was gated as (B+); (B−) stands for the dimmest cell subpopulation (mTHPC intensity <10).

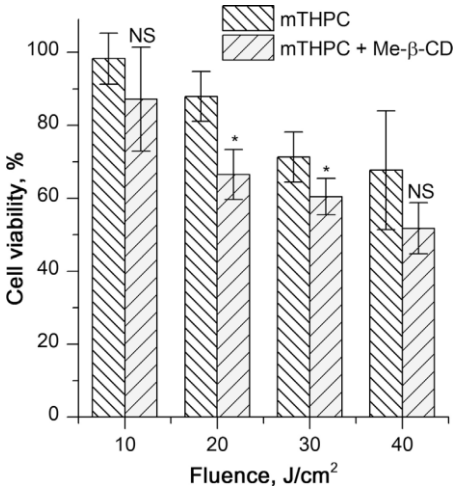
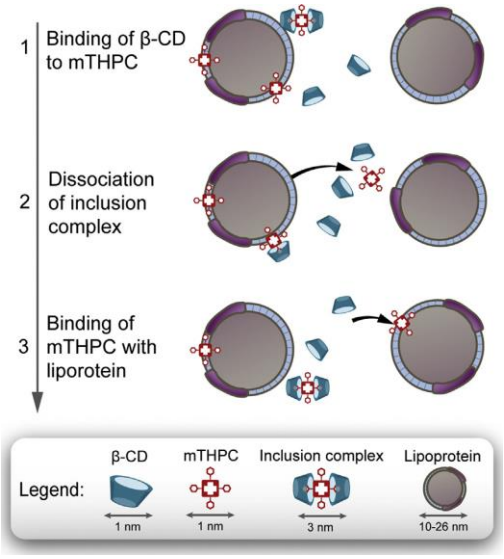


Fig. 5. Cell viability of spheroids incubated 24 h with different mTHPC formulations. The percentage of cell survival was counted by means of clonogenic assay 15 days after PDT. mTHPC concentration was 4.5 μM. *statistically different from mTHPC alone treatment at the given fluence, $P < 0.05$; NS – no singnificant differences from mTHPC alone treatment at the given fluence, $P > 0.05$.

increase of mTHPC fluorescence intensity of cells from internal spheroid volume. As a result, the ratio of mean cellular intensities (B+/B−) decreased from 53 (mTHPC alone) to 19. Therefore, Me-β-CD delivers mTHPC more efficiently to inaccessible inner cell layers of spheroid improving the mTHPC penetration. Varying the different types of β-CDs, an optimal balance could be achieved between efficient diffusion and cellular affinity.

According to the recent study (Yankovsky et al., 2016), nanoshuttle mechanism of β-CDs action consists in three main stages (Scheme 2): *i*) the extraction of mTHPC by β-CDs from lipoprotein carrier; *ii*) the diffusion of inclusion complex until its dissociation; *iii*) the binding of mTHPC molecule to the nearest target. While the first two stages are strongly dependent on the properties of β-CDs. The higher Me-β-CD affinity to mTHPC, as compared to Hp-β-CD (Bautista-Sanchez et al., 2005), determines longer lifetime of inclusion complexes (Stella et al., 1999), thus rending possible a deeper mTHPC penetration through spheroid, while inclusion complexes with Hp-β-CD are subjected to quick dissociation.

The additional factor, which facilitates PS penetration is a small size of β-CD inclusion complexes. According to numerous studies, the size of nanoparticles has a significant impact on their penetration rate into the tissues (Dreher et al., 2006). Inclusion complexes between mTHPC and β-CDs have a size about 3 nm (Glisoni et al., 2011). This value is much smaller as compared to the main natural transporter of mTHPC in plasma, lipoproteins (Sasnouski et al., 2005), with the size *ca.* 10–26 nm (Dobiásová



Scheme 2. Shematic representation of nanoshuttle mechanism exerted by β-cyclodextrins.

et al., 2005). Therefore, β-CD nanoshuttles can provide both the increase in intracellular mTHPC concentration and the improvement of mTHPC penetration across the spheroid. Similar mechanism may be involved in β-CD dependent alteration of mTHPC accumulation in the tumor tissues *in vivo* (Yankovsky et al., 2016).

Finally, we demonstrated that β-CDs impact the mTHPC-based PDT efficiency in HT29 spheroids. It is obvious, that enhanced mTHPC distribution should lead to the increased PDT efficacy. Me-β-CD induced 2 times higher mTHPC accumulation after 24 h incubation, compared to mTHPC only, while mTHPC-PDT cell viability decreased by only 25% in the presence of Me-β-CD/mTHPC complexes (Fig. 5). This could be related to the heterogeneous structure of spheroid with different properties of cell proliferation and with the various accessibility of deep layers to irradiation light (Patel et al., 2015).

5. Conclusions

Our study clearly demonstrated an advantage of using β-cyclodextrins as nanoshuttle systems inducing improved accumulation, diffusion and penetration of the photosensitizer mTHPC in spheroids. mTHPC formulations with Me-β-CD and Hp-β-CD showed 2 and 3 times higher mTHPC accumulation in spheroids. Microscopy and flow cytometry techniques demonstrated that besides higher mTHPC accumulation, different patterns of mTHPC distribution were inherent to both formulations. Hp-β-CD increases the mTHPC accumulation at the tumor periphery while in the presence of Me-β-CD intratumoral penetration of mTHPC is deeper and its distribution is much more homogeneous. Thus, varying the type of β-CD we can finely tune the possibility of using mTHPC for diagnostic (delimitation of tumor margins) or therapeutic purposes.

Acknowledgements

This work was supported by the Institut de Cancérologie de Lorraine, French "Ligue Nationale contre le Cancer (CCIR-GE)", Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (BRFFR) [grant number M16M-049 and grant number M17MC-028]. Ilya Yakavets acknowledges the fellowship of the Ministry of Education of Belarus.

References

Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K.A., Foster, T.H., Girotti, A.W., Gollnick, S.O., Hahn, S. M., Hamblin, M.R., Juzeniene, A., Kessel, D., Korbelik, M., Moan, J., Mroz, P., Nowis, D., Piette, J., Wilson, B.C., Golab, J., 2011. Photodynamic therapy of cancer: an update. CA Cancer J. Clin. 61, 250–281. doi:http://dx.doi.org/10.3322/caac.20114.

Ball, D.J., Vernon, D.I., Brown, S.B., 1999. The high photoactivity of m-THPC in photodynamic therapy. Unusually strong retention of m-THPC by RIF-1 cells in culture. Photochem. Photobiol. 69, 360–363. doi:http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-1097.1999. tb03299.x.

Bautista-Sanchez, A., Kasselouri, A., Desroches, M.-C., Blais, J., Maillard, P., de Oliveira, D.M., Tedesco, A.C., Prognon, P., Delaire, J., 2005. Photophysical properties of glucoconjugated chlorins and porphyrins and their associations with cyclodextrins. J. Photochem. Photobiol. B 81, 154–162. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2005.05.013.

Castano, A.P., Demidova, T.N., Hamblin, M.R., 2004. Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. Photodiagn. Photodyn. Ther. 1, 279–293. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00007-4.

Chen, K., Wacker, M., Hackbarth, S., Ludwig, C., Langer, K., Röder, B., 2010. Photophysical evaluation of mTHPC-loaded HSA nanoparticles as novel PDT delivery systems. J. Photochem. Photobiol. B 101, 340–347. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2010.08.006.

Coutier, S., Mitra, S., Bezdetnaya, L.N., Parache, R.M., Georgakoudi, I., Foster, T.H., Guillemin, F., 2001. Effects of fluence rate on cell survival and photobleaching in meta-tetra-(hydroxyphenyl)chlorin–photosensitized colo 26 multicell tumor spheroids. Photochem. Photobiol. 73, 297–303. doi:http://dx.doi.org/10.1562/0031-8655(2001)073<0297:EOFROC>2.0.CO;2.

Del Valle, E.M.M., 2004. Cyclodextrins and their uses: a review. Process Biochem. 39, 1033–1046. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00258-9.

Dobiásová, M., Urbanová, Z., Samánek, M., 2005. Relations between particle size of HDL and LDL lipoproteins and cholesterol esterification rate. Physiol. Res. Acad. Sci. Bohemoslov. 54, 159–165.

Dreher, M.R., Liu, W., Michelich, C.R., Dewhirst, M.W., Yuan, F., Chilkoti, A., 2006. Tumor vascular permeability, accumulation, and penetration of macromolecular drug carriers. J. Natl. Cancer Inst. 98, 335–344. doi:http://dx.doi.org/10.1093/jnci/djj070.

Duchêne, D., Bochot, A., 2016. Thirty years with cyclodextrins. Int. J. Pharm. 514, 58–72. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.07.030.

Duchêne, D., 2011. Cyclodextrins and their inclusion complexes. In: Bilensoy, E. (Ed.), Cyclodextrins in Pharmaceutics, Cosmetics, and Biomedicine. John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ USA, pp. 1–18.

Evans, C.L., 2015. Three-dimensional in vitro cancer spheroid models for photodynamic therapy: strengths and opportunities. Front. Phys. 3. doi:http://dx.doi.org/10.3389/fphy.2015.00015.

Franken, N.A.P., Rodermond, H.M., Stap, J., Haveman, J., van Bree, C., 2006. Clonogenic assay of cells in vitro. Nat. Protoc. 1, 2315–2319. doi:http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2006.339.

Gaio, E., Scheglmann, D., Reddi, E., Moret, F., 2016. Uptake and photo-toxicity of Foscan®, Foslip® and Fospeg® in multicellular tumor spheroids. J. Photochem. Photobiol. B 161, 244–252. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.05.011.

Glisoni, R.J., Chiappetta, D.A., Moglioni, A.G., Sosnik, A., 2011. Novel 1-indanone thiosemicarbazone antiviral candidates: aqueous solubilization and physical stabilization by means of cyclodextrins. Pharm. Res. 29, 739–755. doi:http://dx.doi.org/10.1007/s11095-011-0599-y.

Hinger, D., Navarro, F., Käch, A., Thomann, J.-S., Mittler, F., Couffin, A.-C., Maake, C., 2016. Photoinduced effects of m-tetrahydroxyphenylchlorin loaded lipid nanoemulsions on multicellular tumor spheroids. J. Nanobiotechnol. 14. doi:http://dx.doi.org/10.1186/s12951-016-0221-x.

Hofman, J.-W., Carstens, M.G., van Zeeland, F., Helwig, C., Flesch, F.M., Hennink, W.E., van Nostrum, C.F., 2008. Photocytotoxicity of mTHPC (Temoporfin) loaded polymeric micelles mediated by lipase catalyzed degradation. Pharm. Res. 25, 2065–2073. doi:http://dx.doi.org/10.1007/s11095-008-9590-7.

Josefsen, L.B., Boyle, R.W., 2012. Unique diagnostic and therapeutic roles of porphyrins and phthalocyanines in photodynamic therapy, imaging and theranostics. Theranostics 2, 916–966. doi:http://dx.doi.org/10.7150/thno.4571.

Khanna, S., Bhatt, A.N., Dwarakanath, B.S., 2014. Chapter 11 – multicellular spheroid: 3-D tissue culture model for cancer research A2. In: Verma, Ashish S., Singh, A. (Eds.), Animal Biotechnology. Academic Press, San Diego, pp. 195–210.

Löw, K., Knobloch, T., Wagner, S., Wiehe, A., Engel, A., Langer, K., von Briesen, H., 2011. Comparison of intracellular accumulation and cytotoxicity of free mTHPC and mTHPC-loaded PLGA nanoparticles in human colon carcinoma cells. Nanotechnology 22, 245102. doi:http://dx.doi.org/10.1088/0957-4484/22/24/245102.

Lim, S.P., Kumar, R., Akkamsetty, Y., Wang, W., Ho, K., Neilsen, P.M., Walther, D.J., Suetani, R.J., Prestidge, C., Callen, D.F., 2013. Development of a novel cell-based assay system EPISSAY for screening epigenetic drugs and liposome formulated decitabine. BMC Cancer 13, 113. doi:http://dx.doi.org/10.1186/1471-2407-13-113.

Marchal, S., Dolivet, G., Lassalle, H.-P., Guillemin, F., Bezdetnaya, L., 2015. Targeted photodynamic therapy in head and neck squamous cell carcinoma: heading into the future. Lasers Med. Sci. 30, 2381–2387. doi:http://dx.doi.org/10.1007/s10103-014-1703-4.
Mitra, S., Foster, T.H., 2005. Photophysical parameters, photosensitizer retention and tissue optical properties completely account for the higher photodynamic efficacy of meso-tetra-hydroxyphenyl-chlorin vs photofrin. Photochem. Photobiol. 81, 849–859. doi:http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-1097.2005.tb01453.x.
Mitra, S., Maugain, E., Bolotine, L., Guillemin, F., Foster, T.H., 2005. Temporally and spatially heterogeneous distribution of mTHPC in a murine tumor observed by two-color confocal fluorescence imaging and spectroscopy in a whole-mount model. Photochem. Photobiol. 81, 1123–1130. doi:http://dx.doi.org/10.1562/2005-03-24-RA-471.
Moan, J., 1990. On the diffusion length of singlet oxygen in cells and tissues. J. Photochem. Photobiol. B 6, 343–344. doi:http://dx.doi.org/10.1016/1011-1344(90)85104-5.
Patel, N.R., Aryasomayajula, B., Abouzeid, A.H., Torchilin, V.P., 2015. Cancer cell spheroids for screening of chemotherapeutics and drug-delivery systems. Ther. Deliv. 6, 509–520. doi:http://dx.doi.org/10.4155/tde.15.1.
Reshetov, V., Zorin, V., Siupa, A., D'Hallewin, M.-A., Guillemin, F., Bezdetnaya, L., 2012. Interaction of liposomal formulations of meta-tetra(hydroxyphenyl) chlorin (temoporfin) with serum proteins: protein binding and liposome destruction. Photochem. Photobiol. 88, 1256–1264. doi:http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-1097.2012.01176.x.
Reshetov, V., Lassalle, H.-P., François, A., Dumas, D., Hupont, S., Gräfe, S., Filipe, V., Jiskoot, W., Guillemin, F., Zorin, V., Bezdetnaya, L., 2013. Photodynamic therapy with conventional and PEGylated liposomal formulations of mTHPC (temoporfin): comparison of treatment efficacy and distribution characteristics in vivo. Int. J. Nanomed. 8, 3817–3831. doi:http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S51002.
Sasnouski, S., Zorin, V., Khludeyev, I., D'Hallewin, M.-A., Guillemin, F., Bezdetnaya, L., 2005. Investigation of Foscan interactions with plasma proteins. Biochim. Biophys. Acta 1725, 394–402. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2005.06.014.
Senge, M.O., Brandt, J.C., 2011. Temoporfin (Foscan®, 5,10,15,20-tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin)–a second-generation photosensitizer. Photochem. Photobiol. 87, 1240–1296. doi:http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-1097.2011.00986.x.
Senge, M.O., 2012. mTHPC –a drug on its way from second to third generation photosensitizer? Photodiagnosis Photodyn. Ther 9, 170–179. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2011.10.001.
St Denis, T.G., Hamblin, M.R., 2015. 22 – Supramolecular drug delivery platforms in photodynamic therapy. Applications of Nanoscience in Photomedicine. Chandos Publishing, Oxford, pp. 465–485.
Stella, V.J., Rao, V.M., Zannou, E.A., Zia, V., 1999. Mechanisms of drug release from cyclodextrin complexes. Adv. Drug Deliv. Rev. 36, 3–16. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0169-409X(98)00052-0.
Waite, C.L., Roth, C.M., 2012. Nanoscale drug delivery systems for enhanced drug penetration into solid tumors: current progress and opportunities. Crit. Rev. Biomed. Eng. 40, 21–41. doi:http://dx.doi.org/10.1615/CritRevBiomedEng.v40.i1.20.
West, C.M., Moore, J.V., 1992. Mechanisms behind the resistance of spheroids to photodynamic treatment: a flow cytometry study. Photochem. Photobiol. 55, 425–430. doi:http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-1097.1992. tb04257.x.
Yakavets, I., Yankovsky, I., Bezdetnaya, L., Zorin, V., 2017. Soret band shape indicates mTHPC distribution between β-cyclodextrins and serum proteins. Dyes Pigm. 137, 299–306. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.dyepig.2016.11.007.
Yankovsky, I., Bastien, E., Yakavets, I., Khludeyev, I., Lassalle, H.-P., Gräfe, S., Bezdetnaya, L., Zorin, V., 2016. Inclusion complexation with β-cyclodextrin derivatives alters photodynamic activity and biodistribution of meta-tetra (hydroxyphenyl)chlorin. Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci. 91, 172–182. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2016.06.012.
Zorin, V.P., Michalovsky, I., Zorina, T.E., Khludeyev, I.I., 1996. Distribution of chlorin-e6 derivatives in biological systems: investigation of pH-effect. Proc. SPIE 146–155. doi:http://dx.doi.org/10.1117/12.230981.

Les techniques mises au point lors de cette première étude ont été réutilisées et raffinées dans le but d'analyser d'une manière approfondie d'autres types de nanovectorisation de la mTHPC, les liposomes ainsi que les VE. Les sphéroïdes multicellulaires HT29 sont préparés avec la méthode du « spinner » pour les deux publications. De plus, la mTHPC libre est utilisée comme témoin dans les deux études et des résultats similaires ont été obtenus avec un confinement du PS en périphérie du sphéroïde ainsi qu'une efficacité PDT limitée.

3.3. Etude des vésicules extracellulaires chargées de mTHPC

Les mTHPC-VE montrent de remarquables propriétés physicochimiques ainsi que des résultats encourageants *in vitro* sur cellules en monocouche. Ainsi, dans le but de prédire la situation *in vivo*, la pénétration, accumulation et efficacité PDT sont étudiées dans le modèle 3D de sphéroïde multicellulaire HT29 précédemment décrit dans la publication n°1. L'absence de toxicité des mTHPC-VE sur les sphéroïdes HT29 à la concentration utilisée de 3,6 µM a préalablement été vérifiée avant réalisation des expérimentations (Figure 25).

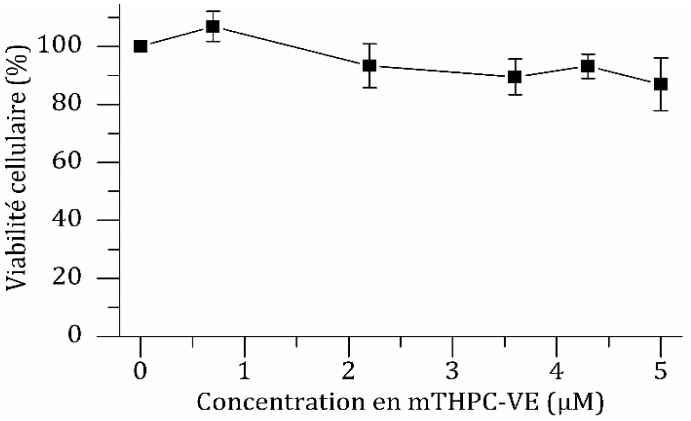


Figure 25. Cytotoxicité des mTHPC-VE sur sphéroïdes multicellulaires HT29

Viabilité cellulaire obtenue par essais clonaux après incubation 24 h avec une solution de mTHPC-VE à différentes concentrations diluée dans du milieu supplémenté avec 2% de SVF.

L'étude sur sphéroïdes multicellulaires HT29 démontre l'intérêt d'utiliser les mTHPC-VE comme nanovecteur de la mTHPC comparé au Foslip® ainsi qu'à la mTHPC libre. Une amélioration de l'accumulation cellulaire ainsi qu'une pénétration plus en profondeur de la mTHPC sont observées avec les VE. De plus, alors que la fluorescence de la mTHPC ne dépasse pas les 50 µm de profondeur dans le sphéroïde avec la mTHPC libre et le Foslip®, elle est encore de 25% à 100 µm de profondeur avec les mTHPC-VE. Ces deux paramètres peuvent expliquer l'efficacité PDT supérieure obtenue avec les mTHPC-VE. En effet, la dose de lumière nécessaire pour obtenir une photocytotoxicité de 50% est 2 fois plus faible comparé au Foslip® et 4,5 fois comparé à la mTHPC libre. En corrélation avec ce résultat, l'apoptose photoinduite suite à une irradiation à 30 J/cm^2 est également augmentée. L'ensemble de ces résultats est présenté dans la publication scientifique ci-dessous (cf §3.4).

En conclusion, l'incorporation de la mTHPC dans des VE peut améliorer l'efficacité PDT dans un modèle préclinique possédant une structure similaire à celle d'une tumeur *in vivo*. Ainsi, leurs propriétés seront étudiées *in vivo* et les résultats présentés dans la partie suivante.

3.4. Publication n°2

DRUG DELIVERY
https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1513609

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

RESEARCH ARTICLE

OPEN ACCESS Check for updates

mTHPC-loaded extracellular vesicles outperform liposomal and free mTHPC formulations by an increased stability, drug delivery efficiency and cytotoxic effect in tridimensional model of tumors

Marie Millard[a,b], Ilya Yakavets[a,b,c], Max Piffoux[d], Amanda Brun[d], Florence Gazeau[d], Jean-Michel Guigner[e], Jordane Jasniewski[f], Henri-Pierre Lassalle[a,b], Claire Wilhelm[d] and Lina Bezdetnaya[a,b]

[a]CNRS, CRAN, Université de Lorraine, Nancy, France; [b]Research Department, Institut de Cancérologie de Lorraine, Université de Lorraine, Nancy, France; [c]Laboratory of Biophysics and Biotechnology, Belarusian State University, Minsk, Belarus; [d]Laboratoire Matière et Systèmes Complexes, CNRS UMR, Université Paris-Diderot, Paris, France; [e]Laboratoire IMPMC, Université de la Sorbonne, Paris, France; [f]LIBio, Université de Lorraine, Nancy, France

Q1

ABSTRACT

Efficient photodynamic therapy with *meta*-tetra(hydroxyphenyl)chlorine requires the application of specific nanoformulations. mTHPC liposomal formulation (Foslip®) demonstrated favorable pharmacokinetics properties. However, rapid liposomes destruction in circulation and rapid mTHPC release impedes Foslip® applications. Alternatively, mTHPC nanovectorization using extracellular vesicles (EVs) could be an attractive option. EVs are naturally secreted by the organism to play a role in intercellular communication due to the capacity to transport proteins and nucleic acids. EVs also possess a natural ability to deliver therapeutic molecules into cancer cells. The aim of the present study was to evaluate photophysical and photobiological properties of mTHPC loaded in endothelial EVs as nanocarriers. We also studied efficiency of nanovectorisation on mTHPC distribution and PDT activity in multicellular tumor spheroids (MCTSs). MCTS is a nonvascularized in vitro 3D model of cells that mimics a similar microenvironment to in vivo situation. mTHPC-EVs were characterized by means of spectroscopic techniques, flow cytometry and nanoparticle tracking analysis. Compared with Foslip®, mTHPC-EVs are stable in murine plasma. Better mTHPC accumulation and penetration (up to 100 µm) in MCTS was observed for mTHPC-EVs compared with liposomal mTHPC. These factors could explain enhanced photodynamic activity of mTHPC-EVs compared with free and liposomal mTHPC. The light dose inducing 50% of cell death with mTHPC-EVs was 4 and 2.5-times lower than that of free and liposomal mTHPC. The obtained results demonstrate that EVs should be considered as perspective nanocarriers for mTHPC-mediated PDT.

ARTICLE HISTORY
Received 28 June 2018
Revised 9 August 2018
Accepted 15 August 2018

KEYWORDS
mTHPC; photodynamic therapy; multicellular tumor spheroid; extracellular vesicles; nanocarriers

Introduction

Photodynamic therapy (PDT) is a good alternative to surgery for the treatment of small light-accessible tumors. Tumor eradication induced by PDT is based on the activation of photosensitizing agent, termed photosensitizer (PS), by visible light in the presence of oxygen (Dougherty, 2002; Agostinis et al., 2011). A routine use of PDT in clinic is however hampered by poor water solubility of PSs leading to aggregation, suboptimal biodistribution and unfavorable pharmacokinetics (Konan et al., 2002; Jin & Zheng, 2011).

One of the most powerful PS is temoporfin (*meta*-tetra-(hydroxyphenyl)chlorin, mTHPC), marketed as Foscan® and clinically approved in Europe since 2001 (Senge & Brandt, 2011). mTHPC is characterized by high absorption in the deep red (652 nm) and high singlet oxygen quantum yield (Bonnett & Martínez, 2002). Highly aggregated in biological medium and bound to plasma proteins with strong affinity, mTHPC exhibits a long half-life in the bloodstream resulting in unfavorable biodistribution and moderate skin photosensitivity (Hopkinson et al., 1999; Sasnouski et al., 2005; de Visscher et al., 2011). Such adverse characteristics resulted in the development of two liposomal formulations of mTHPC, namely mTHPC encapsulated in conventional (Foslip®) or PEGylated liposomes (Fospeg®).

As was demonstrated in preclinical models, liposomal mTHPC present several advantages such as drug monomerisation, better tumor selectivity and decreased skin accumulation (Dragicevic-Curic & Fahr 2012; Maeda et al., 2016). However, fragility in the circulation of mTHPC loaded conventional liposomes (Reshetov et al., 2012) along with a limited penetration of liposomal mTHPC in tumor tissue restrain mTHPC-based liposomal applications (Lassalle et al., 2009; Gaio et al., 2016).

Attractive candidates for efficient drug delivery could be Extracellular Vesicles (EVs) (Van der Meel et al., 2014;

CONTACT Lina Bezdetnaya l.bolotine@nancy.unicancer.fr Institut de Cancérologie de Lorraine, 6 avenue de Bourgogne – CS 30519, 54519 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Supplemental material for this article can be accessed here.

© 2018 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Vader et al., 2016). This collective term includes different subtypes usually discriminated by their size and their intracellular origin. Exosomes (30–150 nm in size), originated from multivesicular endosomes, are released upon fusion with plasmatic membrane whereas microvesicles, more heterogeneous in size (up to 1000 nm) are generated directly from plasma membrane budding. Apoptotic bodies (50–5000 nm in size) are formed by cells undergoing apoptosis. Major advantages of EVs over synthetic nanocarriers are their biocompatibility and immunotolerance. Similarly to liposomes, the EV membrane is essentially a lipid bilayer enriched by phospholipids, cholesterol and other membrane-specific lipids (van Dommelen et al., 2012). In addition, numerous proteins including those involved in membrane integrity and trafficking (Van der Meel et al., 2014), contribute to EVs natural targeting properties, their stability in blood circulation and protection of the payload from degradation (van Dommelen et al., 2012; Vader et al., 2016). It has been also demonstrated that vesicular nanocarriers significantly improved drug release and penetration into tissues in contrast to conventional rigid liposomes (Pandey et al., 2015). Different porphyrins were reported to be efficiently loaded in EVs and significantly improved cellular uptake and PDT efficiency compared with free and liposomes-encapsulated drugs with similar membrane composition (phosphatidylcholine and cholesterol) (Fuhrmann et al., 2015). EVs loaded with magnetic NPs for imaging and mTHPC for PDT were also investigated with a theranostic purpose. Compared with free mTHPC, this new class of theranosomes demonstrated improved PDT efficacy in vivo in a murine cancer model after direct intratumor injection (Silva et al., 2013b).

The understanding of the full potential of PDT with mTHPC-based EVs requires a better comprehension of multiply parameters including mTHPC intratumor diffusion, EVs-mTHPC stability in circulation and mechanism of mTHPC cellular incorporation. A comparison with liposomal-mTHPC, Foslip® is also essential.

In this study, we evaluated photophysical and photobiological properties of mTHPC with EVs as nanocarriers in different experimental models and compared mTHPC-EVs with free and liposomal mTHPC. We investigated photophysical characteristics of mTHPC-EVs, their membrane integrity and stability in plasma. We further studied mTHPC-based EVs accumulation, penetration, intracellular distribution and photocytotoxicity in conventional monolayer cells and in multicellular tumor spheroids (MCTS). The use of MCTS in the studies of drug testing is rapidly increasing as MCTS better correspond to more complex and physiologically relevant cell culture model. Compared with monolayers, MCTS cultures better mimic in vivo small avascular tumors enabling the treatment optimization prior to in vivo studies (Patel et al., 2015; Millard et al., 2017; Lu & Stenzel, 2018).

Materials and methods

Photosensitizers

mTHPC [3,3′,3″,3‴-(2,3-dihydroporphyrin-5,10,15,20-tetrayl)-tetraphenol] and its liposomal formulation (Foslip®) were kindly provided by biolitec research GmbH (Jena, Germany). Foslip® is based on dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) and dipalmitoylphosphatidylglycerol (DPPG) and mTHPC with drug:lipid ratio of 1:12 (mol/mol) and DPPC:DPPG ratio of 9:1 (w/w). For different cell experiments, stock aqueous solutions of liposomal mTHPC or ethanol solution of free mTHPC, were diluted in cell culture medium supplemented with 2% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) to obtain final concentrations of either 0.1 μM or 1.45 μM for monolayer cells and 3.6 μM for spheroids cells. Final ethanol concentration in medium never exceeded 0.1%.

Production of mTHPC-EVs

Human umbilical vascular endothelial cells (HUVEC) were cultured as described earlier in DMEM endothelial medium (Gibco®, United Kingdom) containing 9% FCS at 37 °C (5% CO_2, humidified atmosphere) (Silva et al., 2013a). At near-confluence of cells, the medium was replaced by a 5 μM mTHPC in serum-free phenol red-free Roswall Park Memorial Institute (RPMI)-1640 medium (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) for 2 h at 37 °C. After washing with free RPMI, cells were maintained in this medium during 3 days at 37 °C to induce EVs release according to the method used previously (Silva et al., 2013b) with slight modifications. Briefly, the culture supernatant was centrifuged (2000*g* for 10 min) to eliminate cell debris and apoptotic bodies. After ultracentrifugation (100,000*g* for 1 h 10 min at 4 °C), EVs were characterized by nanoparticle (NP) tracking analysis (NTA 3.2 Software, Malvern Instruments, UK). mTHPC concentration was estimated with LS55 spectrofluorometer (Perkin Elmer, USA).

Flow cytometry analysis using antibodies (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) was conducted to characterize EVs. Exosomes were highlighted using established exosomal markers (CD9, CD63 and CD81) stained with phycoerythrin (PE); microvesicles were distinguished using endothelial membrane markers stained with fluorophores (CD31-FITC, CD144-PE). Phosphatidylserines, present on the microvesicle surface, were revealed by Annexin V-FITC staining.

Spectroscopic measurements

Absorption measurements were recorded with a Lambda 35 spectrometer (Perkin Elmer, USA) using integrating sphere and fluorescence measurements were conducted with LS55B spectrofluorometer (PerkinElmer, USA) equipped with polarizers, thermostated cuvette compartments and magnetic stirring for polarization experiments. Fluorescence quantum yield and photoinduced fluorescence quenching (PIQ) were measured as was previously described (λexc: 416 nm; λem: 652 nm) (Reshetov et al., 2011). mTHPC fluorescence polarization was performed as described earlier (Reshetov et al., 2011). Samples were excited at 435 nm and fluorescence was registered at 652 nm.

Size distribution, stability and transmission electron microscopy (TEM)

Size distribution profiles and stability of mTHPC-EVs were obtained using Nanosight LM10-T14 system (Malvern

PROOF ONLY

Instruments, UK) equipped with a 532 nm laser at 50 mW and the sCMOS camera. For NTA, mTHPC-EVs were diluted in PBS (1:5000). Each of six samples from different isolations was recorded five times for 30 s with temperature regulated at 25 °C. Particle diameter was calculated from Stokes-Einstein equation with NTA. For stability experiments, EVs-mTHPC and Foslip® were incubated with 20% of exo-free murine plasma in PBS at 37 °C up to 24 h. At different times, 100 µL of sample was diluted in PBS and cooled down to 4 °C in the dark until NTA measurements.

Gel migration was performed with mTHPC-EVs or Foslip® (at 10 µM of mTHPC) incubated in 20% exo-free murine plasma. Twenty microliter of samples were deposited in each well with 2 µL of blue juice on agarose gel (1% agarose and 10% Tris, Borate, EDTA buffer 10×). Migration was performed during 3 h at 100V. Control was realized with a solution of free-mTHPC in 0.3% triton-PBS.

For Cryo-TEM experiments, mTHPC-EVs and Foslip® were placed in PBS containing 20% of exo-free murine plasma at 37 °C for 6 and 24 h. Controls were realized without plasma. Five microliter droplets of samples were deposited on Quantifoil® (Quantifoil MicroTools GmbH, Germany) carbon membrane. After removing the excess of liquid with a filter paper, the membrane was rapidly immersed in liquid ethane cooled in liquid nitrogen. The samples were transferred to the microscope and observed at −180 °C using a LaB_6 JEOL JEM2100 (JEOL, Japan) cryomicroscope operating at 200 kV with a JEOL low dose system (Minimum Dose System, MDS).

Monolayer cell culture

HT29 human colon adenocarcinoma cells and MRC5 human lung fibroblasts (ATCC®, LGC Promochem, Molsheim, France) were grown at 37 °C (5% CO_2, humidified atmosphere) in RPMI medium and in minimum essential media (Gibco®, United Kingdom), respectively. Both medium were supplemented with 9% FCS and 1% 200 mM L-glutamine (Life Technologies, Carlsbad, USA).

MCTS formation

MCTS were initiated as previously described (Marchal et al., 2005). Briefly, flasks coated with 1% L-agarose were seeded with 5×10^4 HT29 cells/mL. After three days, cellular aggregates were transferred into spinner flasks (Integra Biosciences) containing 125 mL RPMI medium. Spinner flasks were placed under constant agitation at 75 rpm at 37 °C (5% CO_2, humidified atmosphere) during 15 days. Spheroids were filtered to obtain ~500 µm in diameter before conducting experiments.

Cellular uptake

Monolayer cells

HT29 cells (5×10^4 cells/mL) or MRC5 cells (6×10^4 cells/mL) were seeded in 24-well plates for 72 h and incubated with free mTHPC, Foslip® or mTHPC-EVs (0.1 µM) during 3, 6 or 24 h. After three washings with PBS, chemical extraction was performed. Cells were trypsinized and absolute ethanol was added to cell pellet. After sonication (15 min) and centrifugation (5 min, 1500 rpm), the fluorescence of supernatant containing mTHPC was assessed (λexc: 416 nm; λem: 652 nm). mTHPC concentrations were determined by using a calibration curve obtained from a standard mTHPC solution in absolute ethanol. Results were normalized to the quantity of proteins measured by DC protein assay (Biorad).

Spheroid cells

Fifty spheroids were collected and washed three times before incubation with mTHPC formulations (3.6 µM) for 3, 6 or 24 h. After three washings with PBS, chemical extraction of mTHPC was performed as previously described for monolayer cells. Results were normalized to the number of spheroids.

Mechanism of nanocarriers uptake

HT29 cells (5×10^4 cells/mL) were seeded in 24-well plates for 72 h, and mTHPC formulations (1.45 µM) were added to cells at 4 °C for 1 h. After three washings with PBS, cells were pre-incubated for 30 min at 37 °C with medium containing either 100 µM EIPA or 400 µM genistein or 10 µg mL^{-1} chlorpromazin. Free mTHPC, Foslip® and mTHPC-EVs (1.45 µM) were added for 1 h in the dark at 37 °C. Cell extraction was realized as described above. Results were normalized to mTHPC uptake obtained for control group (37 °C, without inhibitors).

Confocal microscopy

Subcellular colocalization

HT29 cells (1.5×10^4 cells/mL) were seeded into Slideflasks (Nunc, Roskilde, Denmark). After 72 h, mTHPC formulations (1.45 µM) were incubated with cells for 24 h and after three washings in PBS, organelle specific fluorescent probes were added: mitochondria and lysosomes were labelled at 37 °C for 30 min with 0.2 µM of MitoTracker® Green or 0.15 µM of LysoTracker®, respectively (Molecular Probes, OR); endoplasmic reticulum (ER) was labelled at room temperature for 1 min with 2.5 µg/mL of $DiOC_6$ whereas Golgi apparatus was labelled with 5 µM of NBD-C_6 ceramide for 30 min at 4 °C followed by 30 min at 37 °C. After three washings, fluorescence was observed with a confocal laser-scanning microscope (Leica SP5 X AOBS LCSM, Leica microsystem, Wetzlar, Germany). Organelle-specific fluorescent probes were excited at 488 nm and mTHPC at 520 nm. Band-pass emission filters of 505–550 and 635–700 nm were, respectively, used to discriminate organelles probes (channel 1, green) from mTHPC (channel 2, red) fluorescence. Fifteen different focal planes observed with a water immersion objective (X63) were acquired (512*512 pixels) and the LAS Life software (Leica microsystem, Wetzlar, Germany) was used to obtain maximum projection images. Colocalisation was quantified with Pearson's correlation coefficient (PCC) by ImageJ software.

PROOF ONLY

mTHPC diffusion inside spheroids

Thirty spheroids were collected and washed three times before 24 h incubation with mTHPC formulations (3.6 μM). After three washings, spheroids were frozen in Tissue-Tek® O.C.T.™ and 14 μm thick sections were used for confocal microscopy. Band pass emission filters were set as described above. Imaging of mTHPC diffusion was performed at the central section of the spheroid (the one corresponding to the largest diameter) and image acquisition of this section was done on 20 different focal planes in 1024*1024 pixels by the LAS AF Life software to obtain maximum projection images. Ten radial lines (regions of interest, ROI) were randomly drawn in the maximum projection images to obtain fluorescence profiles. The fluorescence profile of each spheroid as a function of depth was determined with the ImageJ software. The percentage of fluorescence intensity (relative to peak intensity) found at different radial distances from the outer spheroid periphery was used to obtain mTHPC penetrative capacity.

Photodynamic treatment

Monolayer cells

HT29 cells (4×10^4 cells/mL) were seeded in 96-well plates for 72 h. mTHPC formulations (0.1 μM) were incubated with cells for 24 h. After washing, cells were irradiated at 652 nm with a diode laser (Cerelas, Biolitec GmbH, Germany) at different fluences (fluence rate 4.5 mW/cm^2), medium was replaced by the fresh one supplemented with 9% FCS, 24 h later, cellular viability was evaluated by MTT test as described previously (Marchal et al., 2005). Photocytotoxicity was evaluated using LD_{50}, defined as the light dose inducing 50% of cell death.

Spheroid cells

Fifty spheroids were collected and washed three times before incubation with mTHPC formulations (3.6 μM) for 24 h. After that, spheroids were transferred into 35 mm Petri dishes containing 3 mL of medium and irradiated at 652 nm with different fluences at the fluence rate of 30 mW/cm^2. Control spheroids were exposed to culture medium only (no drug, no light) or to free mTHPC only (drug, no light). Immediately after irradiation, cell survival assay was performed as previously reported (Marchal et al., 2005). Briefly, spheroids were dissociated and 500 cells were seeded in triplicate into 6-well plates. After 10 days, cell colonies fixed in 70% ethanol were stained with 1% crystal violet for 5 min. Cell survival was normalized to the number of colonies (more than 50 cells) obtained from control spheroids.

Immunohistochemistry (IHC) for apoptosis evaluation

Thirty spheroids were irradiated (30 mW/cm^2, 30 J/cm^2) as indicated above and 6 h after treatment, spheroids were fixed with 4% formaldehyde for 16 h and embedded in paraffin to realize 4-μm-thick sections. Apoptotic cells staining by IHC was performed as described earlier (Bressenot et al., 2009) with slight modifications. Briefly, sections were incubated in 10 mM Tris/EDTA solution (pH = 8) at 98 °C for 10 min. Endogenous peroxidase activity was blocked in a 3% hydrogen peroxide solution for 5 min and after washings in PBST, primary antibodies (diluted 1:100) were added for 1 h at room temperature. The biotinylated secondary antibody (diluted 1:200) was applied after washing for another 1 h. Sections were then washed and incubated in streptavidin-peroxydase for 30 min at room temperature. After washings, bound peroxidase was identified using the NovaRED system and nuclear counterstaining with hematoxylin coloration was performed. The apoptotic cell index was calculated as the number of labelled cells per total number of cells in spheroid section.

Statistics

The data from at least three independent experiments are presented as mean ± standard deviation. The data were evaluated using nonparametric Mann Whitney's U test (StatView™ software) with a significant level of $p < .05$.

Results

Characterization of mTHPC-EVs

mTHPC-EVs were characterized by NTA and the mean hydrodynamic diameter of EVs was 181 ± 28 nm (Figure 1(A)). The surface charge was negative with a Zeta potential value of (–15) mV. After isolation procedure, the concentration of mTHPC in EV stock solution, determined spectroscopically, was 98 ± 22 μM. NTA assessed EVs density was further estimated as 4×10^{12}/mL. The composition of mTHPC-EVs was assessed by flow cytometry using conventional exosomal markers (CD9, CD63 and CD81) and microvesicles markers, including CD31 and CD144, which correspond to EVs derived from endothelial cells membrane and phosphatidylserine (Annexin-V). As follows from Figure 1(A), mTHPC-EVs have revealed a roughly similar proportion of exosomes and microvesicles with a slight prevalence of exosomes.

Photophysical properties of mTHPC-EVs

Spectroscopic characteristics of mTHPC-based different formulations are displayed in Figure 1(B). In ethanol, the absorption spectrum of monomerized mTHPC is characterized by Soret band (maximum at 416 nm) and four Q-bands with a prominent peak at 650 nm (Figure 1(B), right panel). Absorption spectra of Foslip® and mTHPC-EVs in PBS solution were very close to that of mTHPC in ethanol, thus indicating that mTHPC is present in monomeric form in both formulations (Figure 1(B)).

Relative fluorescence quantum yield of mTHPC embedded in EVs was comparable with mTHPC ethanol solution and was 20% higher than that of Foslip® (Figure 1(B)). There are several parameters characterizing mTHPC microenvironment in nanoformulations, such as fluorescence polarization (p) and PIQ of fluorescence (I/I_{x-100}). Consistent with our

PROOF ONLY

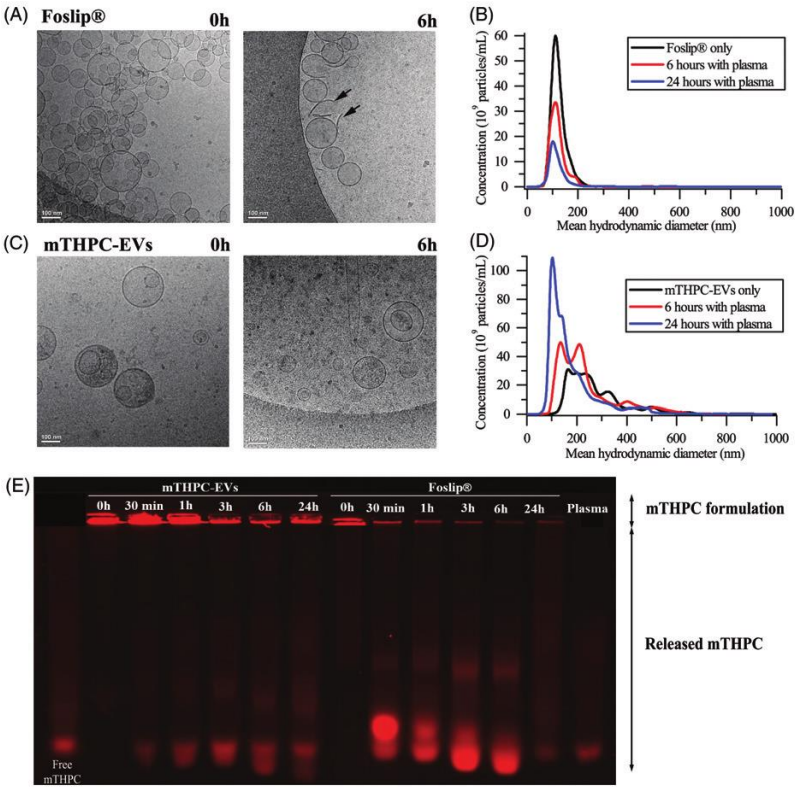


Figure 2. Cryo-TEM images of (A) Foslip® and (C) mTHPC-EVs. Arrows show membrane fragments of Foslip®. Scale bar: 100 nm. mTHPC concentration was 10 mM. Histograms of (B) Foslip® and (D) mTHPC-EVs particles distribution obtain by NTA. (E) Fluorescence profile of mTHPC formulations after migration in agarose gel showing mTHPC leakage from nanocarriers. Nanocarriers were incubated in PBS (0 h) or 20% murine plasma at 37 °C. mTHPC concentration was 20 μM.

intensity of each well, we can deduce that more than 50% of mTHPC was release from liposomes at already 30 min after incubation whereas it takes about 6 h for EVs, thus pointing out to mTHPC-EVs stability in plasma enriched solution.

mTHPC uptake in monolayer cells

mTHPC accumulation

Until 6 h incubation, cellular uptake of mTHPC-EVs was similar to that obtained with other mTHPC formulations. From 6 to 24 h, mTHPC-EVs uptake was increased by a factor of 12 and after 24 h mTHPC-EVs intracellular concentration was 1.7-times higher than that with free mTHPC and Foslip® (0.51 ng/mg protein and 0.48 ng/mg protein, respectively) (Supplementary Material Figure S2).

Subcellular colocalization

Subcellular localization of mTHPC was evaluated by confocal microscopy after 24 h incubation with cells (Figure 3(A), Supplementary Material Figure S3). All mTHPC formulations displayed almost homogeneous distribution in cytoplasm outside both nucleus and plasma membrane (Figure 3(A), Supplementary Material Figure S3 left panel). Specific organelles probes were applied to evaluate subcellular localization (Figure 3(A), Supplementary Material Figure S3 center panel). Costained microscopy images (Figure 3(A), Supplementary Material Figure S3 right panel) were further used to compute PCC (Figure 3(B)). All mTHPC formulations showed a strong correlation with ER probe (PCC >0.7) and a moderate correlation (PCC >0.5) with mitochondrial and Golgi apparatus probes (Supplementary Material Figure S3, Figure 3(B)). The major difference was demonstrated for lysosomal localization (Figure 3(A)). PCC of mTHPC-EVs increased significantly compared with free mTHPC and Foslip® (0.57 vs 0.39, $p < .05$) suggesting endocytosis pathway for mTHPC-EV intracellular incorporation (Figure 3(B)).

Inhibition of endocytosis pathways

Considering that mTHPC-EVs demonstrated a significantly better localization of mTHPC in lysosomes compared with other formulations, we further assessed inhibition of different endocytosis pathways (Figure 3(C)). Endocytosis of mTHPC-EVs was firstly evidenced by significant decrease in mTHPC uptake (that dropped to 34%) when cells were exposed to mTHPC-EVs at 4 °C for 1 h. We examined the mechanisms of mTHPC-EVs endocytosis using specific inhibitors as EIPA, genistein and chlorpromazine that target, respectively, micropinocytosis, caveolae and clathrin-dependent endocytosis. Cellular uptake of mTHPC-EVs was not affected by EIPA treatment but was significantly reduced (by 50%) after

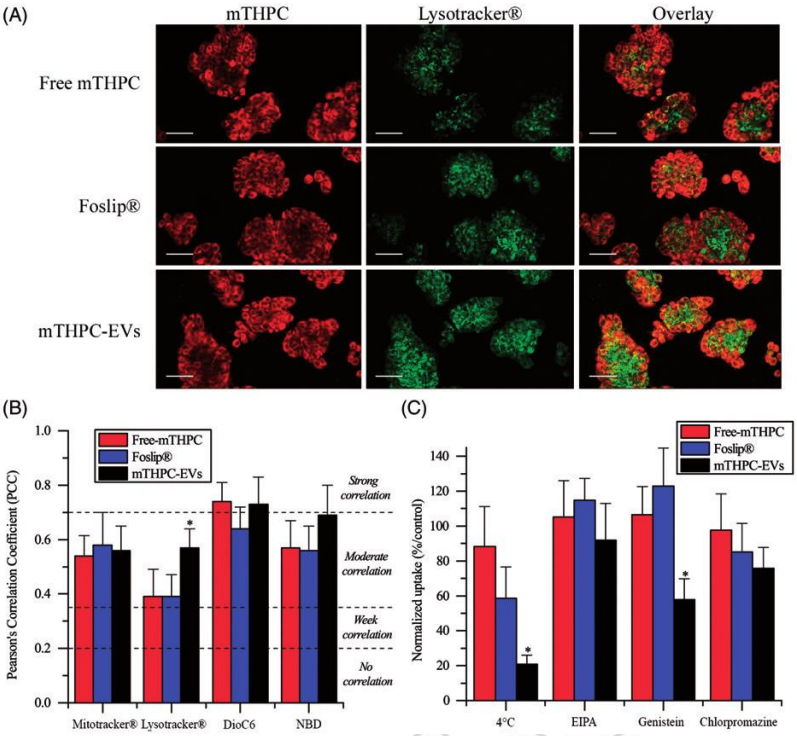


Figure 3. (A) Typical confocal images HT29 cells costaining with different mTHPC formulations (1.45 µM) and Lysotracker®. Left panel displays mTHPC images, center panel displays Lysotracker® images and right panel displays overlay images. These images were representative of three independent experiments. Scale bar: 50 µm (B) PCC values obtained from overlay images. (C) Endocytosis pathways inhibition of cellular uptake of mTHPC formulations after incubation at 4 °C or 37 °C with endocytosis inhibitors. *: $p < .05$ compared to free and liposomal mTHPC.

preincubation with genistein ($p < .05$) and to a lesser extent (by 25%) after preincubation with chlorpromazine. These results suggest the predominance of caveolae-dependent mechanism of endocytosis together with a strong probability of clathrin involvement. At the same time, cellular uptake of free mTHPC was unaffected neither at 4 °C or in the presence of specific inhibitors. No specific inhibition of endocytosis was observed for Foslip®, while at 4 °C, we noted a decrease of uptake by 40%, albeit it was not significant compared with free mTHPC (Figure 3(C)).

mTHPC uptake in spheroid cells

mTHPC accumulation

mTHPC concentration in spheroids was measured after 3, 6 and 24 h incubation with mTHPC-EVs, free mTHPC and Foslip®. Irrespective of the compound, kinetics revealed similar profiles of mTHPC accumulation with progressive increase until 24 h (Figure 4). Already after 3 h incubation, significantly higher mTHPC accumulation was observed with mTHPC-EVs (0.7 ng/spheroid) compared with 0.4 ng/spheroid for free mTHPC and 0.2 ng/spheroid for Foslip® ($p < .05$). At the end of incubation period, mTHPC-EVs provided mTHPC intraspheroid concentration of 4.8 ng/spheroid, which was twice higher compared with Foslip® and 1.3-times higher than that for free mTHPC (2.3 and 3.7 ng mTHPC/spheroid, respectively).

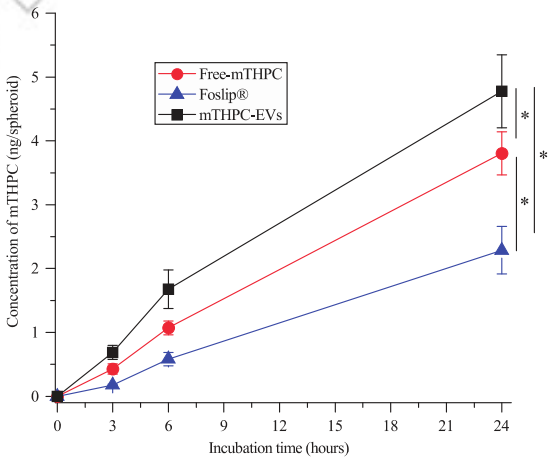


Figure 4. Kinetics of mTHPC uptake in HT29 spheroids after incubation with free mTHPC, Foslip® and mTHPC-EVs. mTHPC concentration was 3.6 µM. Chemical extraction of mTHPC was realized in absolute ethanol. *: $p < .05$.

mTHPC diffusion inside spheroids

Confocal microscopy was used to evaluate mTHPC diffusion inside spheroids (Figure 5). Images revealed identical maximum fluorescence intensity at the spheroid periphery for all formulations with apparent differences in fluorescence repartition from the periphery to the spheroid core (Figure 5(A–C)). The corresponding profiles (Figure 5(D–F)) indicated

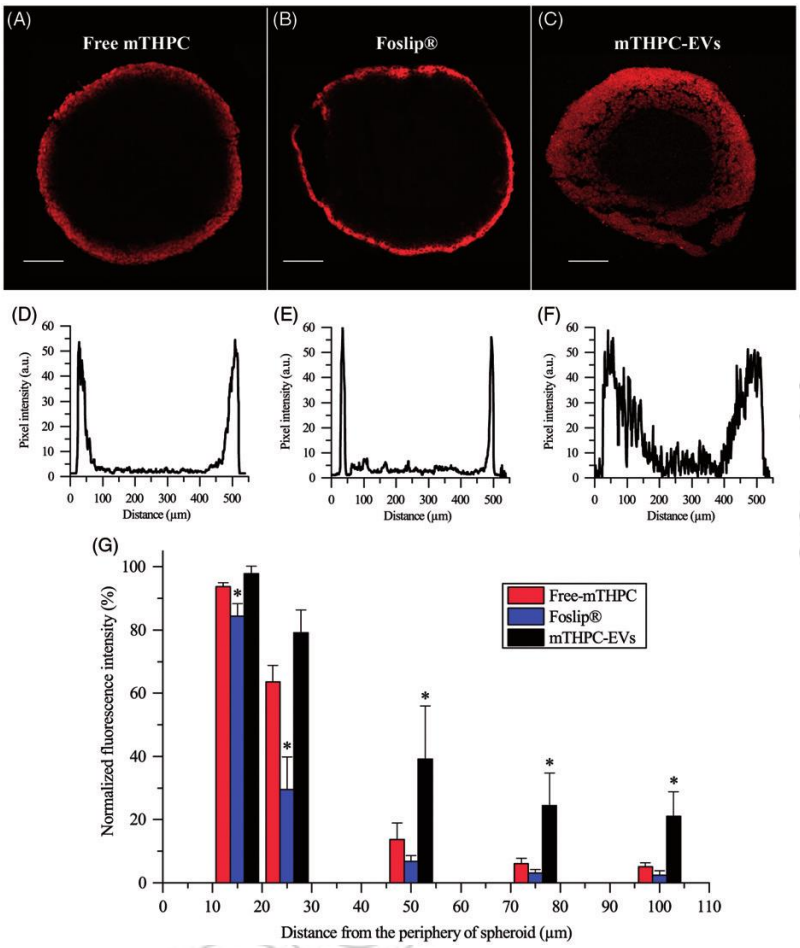


Figure 5. Typical fluorescence images and corresponding fluorescence profiles of spheroids after 24 h incubation with (A, D) free mTHPC, (B, E) Foslip® and (C, F) mTHPC-EVs. mTHPC concentration was 3.6 µM. Scale bar: 100 µm. (G) Based on fluorescence plot profiles, normalized fluorescence was computed in a function of the distance from the periphery of spheroids. *: $p < .05$ compared to free mTHPC.

that the fluorescence of free and liposomal mTHPC was limited to the external rim of the spheroid while fluorescence in the internal cell layers of the spheroid was detectable only for mTHPC-EVs. These observations were supported by the decrease of fluorescence intensity observed from the periphery to the spheroid core (Figure 5(G)). A sharp drop of fluorescence intensity was observed for both free and liposomal mTHPC at already 50 µm from periphery with a barely detectable signal at 100 µm. As for mTHPC-EVs, a gradual decrease of fluorescence was registered until 100 µm from the periphery resulting in a 22% of remaining mTHPC fluorescence detectable at this depth (Figure 5(G)).

Photocytotoxicity of mTHPC

Cell survival after PDT in monolayer cells and spheroids

No significant dark cytotoxicity was observed after 24 h incubation of monolayer cells or spheroids with all mTHPC formulations. Monolayer cells incubated with mTHPC remained intact after 24 h incubation. The dark cytotoxicity of spheroids treated with EVs was 88.3 ± 3.1% and was similar to that of free mTHPC and Foslip® (96.7 ± 4.5% and 97.0 ± 2.5%, respectively). Red light irradiation induced a significant decrease in cell survival in function of applied fluence (Supplementary Material Figure S4). Two major observations emerge from dose-response experiments in both cell models.

Firstly, free mTHPC was by far less photocytotoxic than mTHPC loaded in EVs or liposomes in monolayer (Supplementary Material Figure S4) and in spheroid cells (Figure 6(A)). In monolayer cells, the LD_{50} was the same for Foslip® and mTHPC-EVs (3.1 J/cm^2) and nearly 2.5-times lower than that for free mTHPC (1.3 J/cm^2) (insert to Supplementary Material Figure S4). In spheroid cells, the LD_{50} for free mTHPC was significantly higher than for Foslip® (55.3 J/cm^2 vs 21.3 J/cm^2). The highest photocytotoxicity was noted for mTHPC-EVs with LD_{50} as 12.8 J/cm^2) (insert to Figure 6(A)).

Secondly, mTHPC-EVs and Foslip® displayed comparable pattern of cell death in 2D cells while photocytotoxicity of mTHPC-EVs was nearly twice higher in spheroids compared to that of Foslip® (Figure 6(A)).

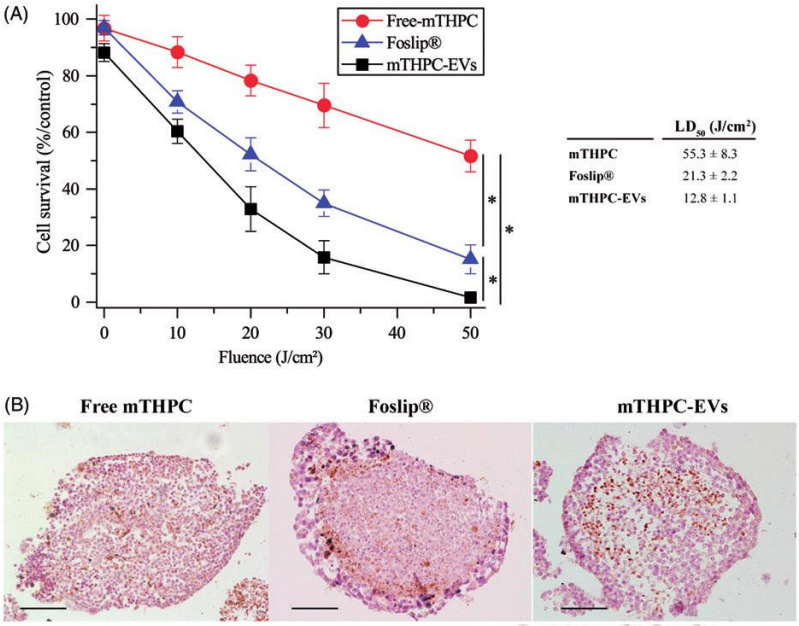


Figure 6. Photocytotoxicity of mTHPC formulations (3.6 μM) after 24 h incubation with spheroids. (A) Cell survival in function of applied fluence (fluence rate 30 mW/cm^2). *: $p < .05$. On the insert, the light dose inducing 50% of cell death (LD_{50}) is presented for each formulation. (B) IHC images of active caspase-3 staining (×10) in spheroids loaded with different mTHPC formulations and assessed 6 h post irradiation (30 mW/cm^2; 30 J/cm^2). These images are representative of three independent experiments. Scale bar: 100 μm.

Photoinduced apoptosis in spheroids

Figure 6(B) shows the distribution of apoptotic cells detected by active caspase-3 staining after photodynamic treatment at 30 J/cm^2. A loss of cell cohesion was observed after irradiation of all mTHPC formulations. The distribution patterns of apoptotic cells after PDT with free mTHPC or mTHPC-EVs (Figure 6(B), left and right panel) were similar and showed a diffusive distribution of apoptotic cells between the periphery and the necrotic core. This distribution was also demonstrated for drug only treated spheroids (Supplementary Material Figure S5) and was consistent with our previous data on residual apoptotic cells in spheroids treated with mTHPC only (Bressenot et al., 2009). In contrast, spheroids exposed to Foslip®/PDT displayed a large number of apoptotic cells located preferentially at the periphery of spheroid (Figure 6(B), center panel).

In control (nonirradiated spheroids), the apoptotic index (AI) was about 15% irrespective of mTHPC formulation and this percentage was not significantly increased upon PDT with free mTHPC (AI = 17.4 ± 2.8%, Supplementary Material Table S1). In contrast, we observed 1.5-times more apoptotic cells for Foslip®/PDT (AI = 26.3 ± 4.6%) and 2-times for mTHPC-EVs/PDT (AI = 32.4 ± 7.3%) (Supplementary Material Table S1).

Discussion

EVs possess negligible immunogenicity, excellent bioavailability and are natural drug delivery vehicles contrary to synthetic nanovectors as liposomes (van Dommelen et al., 2012). In addition, membrane composition of EVs allows increasing drug delivery efficiency to targeted cells (Vader et al., 2016; Kim & Kim, 2017). As was shown recently, the EVs produced from HUVEC demonstrated both increased stability and cell-binding ability. These properties were attributed to the HUVEC membrane composition rich in cholesterol, sphingomyelin (SM) and proteins compared with cholesterol-free liposomes (Fuhrmann et al., 2015). The loading of these HUVEC-derived EVs with different porphyrins resulted in PSs better intracellular uptake compared with liposomal PS formulations. Therefore, favorable properties of mTHPC loaded in HUVEC derived EVs were anticipated. Indeed, much better stability (Supplementary Material Figure S1) and intracellular accumulation (Supplementary Material Figure S2) was demonstrated for mTHPC-EVs compared to mTHPC liposomal formulation.

Spectral properties of mTHPC in different formulations are summarized in Figure 1(B) (right panel). mTHPC is prone to aggregation in aqueous solvent forming large aggregates. Similar to other studies (Belitchenko et al., 1998; Kascáková et al., 2008), mTHPC aggregation was characterized by decreased extinction coefficients and bathochromic shifts of the main peaks (416–428 nm and 650–653 nm) (Figure 1B). mTHPC embedding into liposomal nanovectors prevents PS aggregation (Reshetov et al., 2012). Absorption spectra of both liposomal and EVs-mTHPC were very close to monomeric mTHPC solution in ethanol (Figure 1(B), left panel) thus clearly indicating monomeric state of mTHPC in EVs.

The loading capacity of NPs could be deduced from PIQ experiments (Reshetov et al., 2011). mTHPC-EVs provided fluorescence quenching 0.99 (Figure 1(B), right panel), which is close to that (0.96) previously shown for mTHPC loaded

into liposomes at the ratio 1:600, being significantly lower than that for Foslip (1:12) (Reshetov et al., 2011). This low loading capacity of EVs could be related to the production method of EVs. As was recently demonstrated, the loading of cells with the drug before EVs production is less effective compared with drug loading after the EVs production (Vader et al. 2016). Indeed, as was shown in the article of Fuhrmann et al. (2015), the loading efficiency was 8 times higher when EVs were loaded with porphyrins after EV production compared to passive loading (Fuhrmann et al., 2015).

Q2 While in circulation, phosphatidylcholine vesicles are accommodated by lipoproteins ceasing to exist as identifiable entities (Damen et al., 1981; Bonté & Juliano, 1986). Earlier, we observed this rapid destruction of DPPC/DPPG liposomes, empty or loaded with mTHPC (Foslip®) in the presence of plasma proteins (Reshetov et al., 2012). As can be seen in the Figure 2(A), there are the pin-shaped fragments of liposomes after 6 h of incubation of Foslip® with plasma. EVs exhibit the behavior completely different to Foslip®. According to the data obtained with cryo-TEM and NTA, incubation of EVs with murine plasma leads to the decrease of large size vesicles (>150 nm) with the subsequent increase of small size vesicles (60 nm) (Figure 2(D); Supplementary Material Figure S1B). Several factors could affect EVs stability against plasma proteins.

Firstly, EVs contains membrane proteins (tetraspanins, cell-specific receptors, …), which interact with near located lipids forming the lipid rafts (Rosa-Fernandes et al., 2017). Lipid rafts restrict interaction of plasma components with EVs thus protecting vesicles from degradation (Maas et al., 2017).

Q3 Further, EVs membrane produced from HUVEC cells is rich in cholesterol (23.5%) and SM (10.3%) (Fuhrmann et al., 2015), both of which significantly increase stability of vesicles in serum due to the inhibition of lipid transfer to High Density Lipoprotein/Low Density Lipoprotein (Hernández-Caselles et al., 1993). Following removal of lipids from non-raft domains to lipoproteins, the raft lipids like cholesterol and SM as well as membrane proteins get concentrated. At the end, the surface of small EVs is made almost exclusively of membrane proteins that can protect the surface by steric repulsion. As a result, we observed a decrease of EVs size (Figure 2, Supplementary Material Figure S1). Moreover, the fractionations of EVs upon the interaction with serum proteins could not be excluded.

In monolayer cells, mTHPC-EVs showed two times higher photocytotoxicity than free mTHPC. Similar results were obtain with exosomes charged with acridine orange (AO) due to a better cellular uptake of AO-loaded exosomes compared with free AO (Iessi et al., 2017). Unexpectedly, no difference in photocytotoxicity was observed between liposomal mTHPC and mTHPC-EVs despite better mTHPC uptake after cells incubation with mTHPC-EVs (Supplementary Material Figure S5). A possible explanation could be an important lysosomal localization of mTHPC-EVs compared to free mTHPC and Foslip® (PCC: 0.57 vs 0.39) (Figure 3(B)). Lysosomes are organelles involved in degradation of materials, resulting in a partial drug inactivation. In consequence, a subcellular localization of mTHPC in lysosomes is less favorable in terms of photocytotoxicity (Teiten et al., 2003).

Considering that mTHPC-EVs displayed an important localization in lysosomes, a study of endocytosis pathways was realized and showed that mTHPC-EVs were incorporated in cells preferentially by endocytosis (Figure 3(C)). This subcellular localization is in favor of clathrin dependent endocytosis (Sahay et al., 2010). However, our results obtained by using specific inhibitors indicated that only 25% of internalization in cells is due to a chlatrin dependent mechanism. The major uptake mechanism of EVs could be attributed to the caveolae dependent pathway (Figure 3(C)). This phenomenon was already reported for polymeric micelles that bypass endosomes and are further transported to lysosomes. Authors suggested that endocytosis pathways can be deregulated in cancer cells resulting in a nanocarrier transportation to lysosomes by caveolae (Sahay et al., 2010). Similar to other observations (Peng et al., 2014), free mTHPC uptake was not much affected by 4 °C thus indicating a passive diffusion mechanism. At the same time at 4 °C, uptake of Foslip® was inhibited by 40% while uptake in the presence of specific inhibitors was unaffected (Figure 3(C)). This could indicate incorporation of Foslip® by fusion of liposomes with plasma membrane. Batzri and Korn have demonstrated that uptake by fusion was inhibited almost completely at low temperature (Batzri & Korn, 1975). Two other mechanisms could be involved in Foslip® uptake, namely a diffusion of mTHPC from the liposomes to the plasma membrane (Hefesha et al., 2011) and transport of mTHPC by lipoproteins after liposome destruction and PS redistribution (Kiesslich et al., 2007).

MCTS are known to be a suitable model to study PDT parameters and to evaluate the penetration of nanodrugs. mTHPC shows a high sequestration in cells and therefore, displays an unhomogeneous distribution inside MCTS (Foster et al., 1993; Gaio et al., 2016). Consistent with this observation, free mTHPC was confined at the spheroid periphery and fluorescence intensity was decreased 8–10 times at already 50 µm in depth (Figure 5(A,D)). The same fluorescence pattern has been demonstrated for Foslip® (Figure 5(B,E)). This result is consistent with numerous studies, where mTHPC embedded in liposomes, PLGA or solid lipid NPs did not enhance mTHPC diffusion in MCTS compared with free mTHPC (Löw et al., 2011; Gaio et al., 2016; Hinger et al., 2016). Authors suggested that the physicochemical properties of NPs are important for its transport and distribution in MCTS. Contrary to liposomal mTHPC, mTHPC-EVs display an improvement of mTHPC diffusion inside spheroid (Figure 5(F,G)). This phenomenon can be explained by the decrease of mTHPC-EV size during incubation (160–60 nm at 24 h incubation) (Figure 2(D), Supplementary Material Figure S2). It was demonstrated that small NPs (*ca.* 50 nm in diameter) showed a better penetration into spheroid compared to NPs with a diameter at 120 nm (Hinger et al., 2016; Millard et al., 2017). Another explanation could be related to the capacity of EVs to fuse with cell membrane and penetrate inside the spheroid by successive rounds of EVs uptake (Lee et al., 2015). The authors suggested that EVs were incorporated into the first cell layer of spheroid and transferred

PROOF ONLY

their cargo into neighboring cells by production of new EVs (Lee et al., 2015).

A better intracellular uptake was also demonstrated for mTHPC-EVs compared with other formulations (Figure 4). As was shown earlier exosomes loaded with AO displayed an improved incorporation and longer retention in melanoma spheroids compared with free AO. This observatiobn was attributed to the membrane composition of exosomes creating electrostatic and lipid-lipid interactions with cells resulting in improved AO retention (Iessi et al., 2017).

Impact of mTHPC encapsulation on PDT efficiency was evaluated by clonogenic assays (Figure 6(A)). As anticipated a better photocytotoxicity was demonstrated with mTHPC-EVs loaded spheroids compared with other formulations (Figure 6(A)). A complex relationship beteween cytotoxicity, drugs uptake and drugs diffusion into spheroids was already highlighted in the article of Solomon et al., (2016). As was stated, a diffusion of NPs into spheroids is a key factor determining improved nanodrugs-mediated cytotoxicity. A possible explanation was attributed to the loss of proliferative layer during treatment conducting to the reactivation of quiecent cells in spheroids (Solomon et al., 2016).

Increase of photocytotoxicity is correlated with an increment of percentage of apoptosis. After irradiation, Foslip® and mTHPC-EVs induced 1.5–2 times more apoptosis in spheroids compared to free mTHPC (Supplementary Material Table S1). It was already demonstrated that nanovectorized formulations lead to a loss of membrane integrity of spheroid cells (Solomon et al., 2016) involving membrane damage and triggering apoptotic cell death (Gaio et al., 2016).

Conclusions

EVs have been newly introduced as a novel strategy for the delivery of PSs at tumor sites. As demonstrated in this study mTHPC delivery with EVs to 3D tumor models, evaluated in temrs of accumulation and penetraion leaves far beyond liposomal mTHPC. The putative mechanism could be related to the unique behavior of mTHPC-EVs in plasma. Taking as a whole, loading of EVs with mTHPC may provide enhanced drug delivery, thus decreasing toxicity and diminishing side effects, and as such representing the future for PDT of cancer.

Acknowledgments

The authors are grateful to IBISA plateforme for the acquisition of confocal images. The authors acknowledge biolitec research GmbH (Jena, Germany) for kindly providing mTHPC and Foslip®.

Disclosure statement

The authors report no conflict of interest.

Funding

This work was supported by "Institut de Cancérologie de Lorraine" Reseach Funds and French "Ligue Nationale contre le Cancer (CCIR-GE)".

References

Agostinis P, Berg K, Cengel K, et al. (2011). Photodynamic therapy of cancer: an update. CA Cancer J Clin 61:250–81.
Batzri S, Korn E. (1975). Interaction of phospholipid vesicles with cells. J Cell Biol 66:621–34.
Belitchenko I, Melnikova V, Bezdetnaya L, et al. (1998). Characterization of photodegradation of meta-tetra (hydroxyphenyl)chlorin (mTHPC) in solution: biological consequences in human tumor cells. Photochem Photobiol 67:584–90.
Bonnett R, Martínez G. (2002). Photobleaching of compounds of the 5,10,15,20-Tetrakis(m-hydroxyphenyl)porphyrin Series (m-THPP, m-THPC, and m-THPBC). Org Lett 4:2013–16.
Bonté F, Juliano RL. (1986). Interactions of liposomes with serum proteins. Chem Phys Lipids 40:359–72.
Bressenot A, Marchal S, Bezdetnaya L, et al. (2009). Assessment of apoptosis by immunohistochemistry to active caspase-3, active caspase-7, or cleaved PARP in monolayer cells and spheroid and subcutaneous xenografts of human carcinoma. J Histochem Cytochem 57:289–300.
Damen J, Regts J, Scherphof G. (1981). Transfer and exchange of phospholipid between small unilamellar liposomes and rat plasma high density lipoproteins Dependence on cholesterol content and phospholipid composition. Biochim Biophys Acta 665:538–45.
de Visscher S, Kaščáková S, de Bruijn H, et al. (2011). Fluorescence localization and kinetics of mTHPC and liposomal formulations of mTHPC in the window-chamber tumor model. Lasers Surg Med 43:528–36.
Dougherty T. (2002). An update o photodynamic therapy applications. J Clin Laser Med Surg 20:3–7.
Dragicevic-Curic N, Fahr A. (2012). Liposomes in topical photodynamic therapy. Expert Opin Drug Deliv 9:1015–32.
Foster T, Hartley D, Nichols M, Hilf R. (1993). Fluence rate effects in photodynamic therapy of multicell tumor spheroids. Cancer Res 53: 1249–1254.
Fuhrmann G, Serio A, Mazo M, et al. (2015). Active loading into extracellular vesicles significantly improves the cellular uptake and photodynamic effect of porphyrins. J Control Release 205:35–44.
Gaio E, Scheglmann D, Reddi E, Moret F. (2016). Uptake and photo-toxicity of Foscan®, Foslip® and Fospeg® in multicellular tumor spheroids. J Photochem Photobiol B 161:244–52.
Hefesha H, Loew S, Liu X, et al. (2011). Transfer mechanism of temoporfin between liposomal membranes. J Control Release 150:279–86.
Hernández-Caselles T, Villalaín J, Gómez-Fernández JC. (1993). Influence of liposome charge and composition on their interaction with human blood serum proteins. Mol Cell Biochem 120:119–26.
Hinger D, Navarro F, Käch A, et al. (2016). Photoinduced effects of m-tetrahydroxyphenylchlorin loaded lipid nanoemulsions on multicellular tumor spheroids. J Nanobiotechnol 14:68.
Hopkinson H, Vernon D, Brown S. (1999). Identification and partial characterization of an unusual distribution of the photosensitizer meta-tetrahydroxyphenyl chlorin (temoporfin) in human plasma. Photochem Photobiol 69:482–8.
Iessi E, Logozzi M, Lugini L, et al. (2017). Acridine orange/exosomes increase the delivery and the effectiveness of acridine orange in human melanoma cells: a new prototype for theranostics of tumors. J Enzyme Inhib Med Chem 32:648–57.
Jin C, Zheng G. (2011). Liposomal nanostructures for photosensitizer delivery. Lasers Surg Med 43:734–8.
Kascáková S, Kruijt B, de Bruijn HS, et al. (2008). Ex vivo quantification of mTHPC concentration in tissue: influence of chemical extraction on the optical properties. J Photochem Photobiol B 91:99–107.
Kiesslich T, Berlanda J, Plaetzer K, et al. (2007). Comparative characterization of the efficiency and cellular pharmacokinetics of Foscan® - and Foslip®-based photodynamic treatment in human biliary tract cancer cell lines. Photochem Photobiol Sci 6:619–27.
Kim S-M, Kim H-S. (2017). Engineering of extracellular vesicles as drug delivery vehicles. Stem Cell Investig 4:74.
Konan Y, Gurny R, Allémann E. (2002). State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. J Photochem Photobiol B 66:89–106.

PROOF ONLY

Lassalle H, Dumas D, Gräfe S, et al. (2009). Correlation between in vivo pharmacokinetics, intratumoral distribution and photodynamic efficiency of liposomal mTHPC. J Control Release 134:118–24.

Lee J, Kim J, Jeong M, et al. (2015). Liposome-based engineering of cells to package hydrophobic compounds in membrane vesicles for tumor penetration. Nano Lett 15:2938–44.

Löw K, Knobloch T, Wagner S, et al. (2011). Comparison of intracellular accumulation and cytotoxicity of free mTHPC and mTHPC-loaded PLGA nanoparticles in human colon carcinoma cells. Nanotechnology 22:245102.

Lu H, Stenzel M. (2018). Multicellular tumor spheroids (MCTS) as a 3D in vitro evaluation tool of nanoparticles. Small 14:e1702858.

Maeda H, Tsukigawa K, Fang J. (2016). A retrospective 30 years after discovery of the enhanced permeability and retention effect of solid tumors: next-generation chemotherapeutics and photodynamic therapy-problems, solutions, and prospects. Microcirculation 23:173–82.

Marchal S, Fadloun A, Maugain E, et al. (2005). Necrotic and apoptotic features of cell death in response to Foscan photosensitization of HT29 monolayer and multicell spheroids. Biochem Pharmacol 69: 1167–76.

Millard M, Yakavets I, Zorin V, et al. (2017). Drug delivery to solid tumors: the predictive value of the multicellular tumor spheroid model for nanomedicine screening. Int J Nanomed 12:7993–8007.

Pandey V, Golhani D, Shukla R. (2015). Ethosomes: versatile vesicular carriers for efficient transdermal delivery of therapeutic agents. Drug Deliv 22:988–1002.

Patel N, Aryasomayajula B, Abouzeid A, Torchilin V. (2015). Cancer cell spheroids for screening of chemotherapeutics and drug-delivery systems. Ther Deliv 6:509–20.

Peng W, Samplonius D, de Visscher S, et al. (2014). Photochemical internalization (PCI)-mediated enhancement of bleomycin cytotoxicity by liposomal mTHPC formulations in human head and neck cancer cells. Lasers Surg Med 46:650–8.

Reshetov V, Kachatkou D, Shmigol T, et al. (2011). Redistribution of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (m-THPC) from conventional and PEGylated liposomes to biological substrates. Photochem Photobiol Sci 10:911–9.

Reshetov V, Zorin V, Siupa A, et al. (2012). Interaction of liposomal formulations of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (temoporfin) with serum proteins: protein binding and liposome destruction. Photochem Photobio 88:1256–64.

Rosa-Fernandes L, Rocha VB, Carregari VC, et al. (2017). A perspective on extracellular vesicles proteomics. Front Chem 5:102.

Sahay G, Kim J, Kabanov A, Bronich T. (2010). The exploitation of differential endocytic pathways in normal and tumor cells in the selective targeting of nanoparticulate chemotherapeutic agents. Biomaterials 31:923–33.

Sasnouski S, Zorin V, Khludeyev I, et al. (2005). Investigation of Foscan interactions with plasma proteins. Biochim Biophys Acta 1725: 394–402.

Senge M, Brandt J. (2011). Temoporfin (foscan, 5,10,15,20-tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin)— a second-generation photosensitizer. Photochem Photobiol 87, 1240–96.

Silva A, Di Corato R, Pellegrino T, et al. (2013a). Cell-derived vesicles as a bioplatform for the encapsulation of theranostic nanomaterials. Nanoscale 5:11374–84.

Silva A, Kolosnjaj-Tabi J, Bonneau S, et al. (2013b). Magnetic and photoresponsive theranosomes: translating cell-released vesicles into smart nanovectors for cancer therapy. ACS Nano 7:4954–66.

Solomon M, Lemera J, D'Souza G. (2016). Development of an in vitro tumor spheroid culture model amenable to high-throughput testing of potential anticancer nanotherapeutics. J Liposome Res 26:246–60.

Teiten M-H, Bezdetnaya L, Morlière P, et al. (2003). Endoplasmic reticulum and Golgi apparatus are the preferential sites of Foscan localisation in cultured tumour cells. Br J Cancer 88:146–52.

Vader P, Mol E, Pasterkamp G, Schiffelers R. (2016). Extracellular vesicles for drug delivery. Adv Drug Deliv Rev 106:148–56.

Van der Meel R, Fens M, Vader P, et al. (2014). Extracellular vesicles as drug delivery systems: lessons from the liposome field. J Control Release 195:72–85.

van Dommelen S, Vader P, Lakhal S, et al. (2012). Microvesicles and exosomes: opportunities for cell-derived membrane vesicles in drug delivery. J Control Release 161:635–44.

PROOF ONLY

ETUDE *IN VIVO* DES VÉSICULES EXTRACELLULAIRES CHARGÉES DE mTHPC SUR SOURIS NUDE

4.1. Matériels et Méthodes

4.1.1. Photosensibilisateur

Les mTHPC-VE sont produites par l'équipe parisienne et fournies dans du milieu de culture à une concentration de 5.10^{-3} M de mTHPC. Une solution mère de Foslip® est réalisée à une concentration de $2,2.10^{-3}$ M de mTHPC dans de l'eau stérile et une solution mère de mTHPC est réalisée dans de l'éthanol à 3.10^{-3} M. Ces solutions sont diluées dans le l'eau pour injection, ou un mélange éthanol/PEG/eau pour la mTHPC libre, afin d'obtenir une concentration de 0,3 mg/kg.

4.1.2. Animaux et culture cellulaire

Toutes les expérimentations animales sont réalisées en accord avec la directive européenne 2010/63/UE, suite à l'obtention de l'autorisation de projet (#1353 ; #2438) et selon les recommandations données par le comité d'éthique. Ces expérimentations sont menées sur des souris « *nude* $NMRI^{nu/nu}$ » femelles âgées de 6 semaines de 25 g environ (Janvier®, St Berthevin, France), maintenues dans une animalerie conventionnelle sous conditions standards. Les souris sont traitées après 2 semaines d'acclimatation (4 à 9 animaux par groupe).

Les cellules cancéreuses HT29 sont maintenues en culture dans du milieu RPMI 1640 complet sous atmosphère humide (37 °C – 5 % de CO_2). Pour l'inoculation des cellules chez les animaux, une fois à confluence, les cellules sont trypsinées puis mélangées à une solution d'injection (eau glucosée 5%) afin d'obtenir une suspension cellulaire à 8.10^7 cellules/mL. 100 µL de cellules sont injectées en sous-cutanée pour chaque souris.

4.1.3. Biodistribution par imagerie de fluorescence

Les cellules HT29 sont injectées en sous-cutanée entre les omoplates des souris. Quand les tumeurs ont atteint le volume de 100 ± 20 mm^3, 100 µL d'une solution de Foslip® ou de mTHPC-VE à 0,3 mg/kg sont injectés en i.v dans la veine caudale. Le suivie de la distribution du PS est réalisé à différents temps après injection (1 h, 3 h, 6 h, 9 h, 15 h, 24 h, 48 h) à l'aide de l'imageur petit animal FluorVivo (FluorVivo TM 300, INDEC BioSystems) sur souris anesthésiées à l'isoflurane. Après mise à mort des souris (4-6 par groupe), les organes sont prélevés puis rincés dans du NaCl 0,9 % avant acquisition des images de fluorescence. La distribution du PS au sein des différents organes est étudiée après analyse des images de fluorescence à différents temps après i.v (30 min, 1 h, 3 h, 6 h, 15 h, 24 h, 48 h).

Les images acquises après 8 sec d'exposition lumineuse (gain à 150) sont analysées grâce au logiciel ImageJ, après élimination du bruit de fond obtenu grâce aux images réalisées à partir d'une souris injectée avec du D-PBS. Un code couleur allant du bleu au blanc est appliqué en fonction des intensités de fluorescence détectées.

4.1.4. Pharmacocinétique

Le sang des souris utilisées pour la biodistribution (30 min, 1 h, 3 h, 6 h, 15 h, 24 h, 48 h) est prélevé par une ponction intracardiaque puis placé dans des tubes Vacutainer® coatés à l'héparine (BD Diagnostics, Le Pont de Claix, France) avant centrifugation (4°C - 1200 g – 15 min). Par la suite, la fraction plasmatique est récupérée et conservée au froid jusqu'à réalisation de l'extraction de la mTHPC.

Pour l'extraction de la mTHPC, le plasma de souris est dilué dans un mélange D-PBS/Triton 3% jusqu'à l'obtention d'une densité optique inférieure à 0,1 à 652 nm. Les échantillons sont ensuite passés au spectrofluorimétre dans des cuves en quartz d'1 mL. Le voltage est réglé à 800 volts et la longueur d'onde d'excitation à 420 nm. L'intensité de fluorescence observée est reportée sur une courbe étalon, préalablement réalisée dans les mêmes conditions, ayant les paramètres suivants : intensité de fluorescence en ordonnée ; concentration en mTHPC en ng/mL en abscisse, y= 25,74x et R^2 = 0,9926. La concentration de l'échantillon ainsi obtenue est multiplié par la dilution afin d'obtenir la concentration réelle en mTHPC.

4.1.5. Traitement photodynamique et efficacité PDT

Les cellules HT29 sont injectées en sous-cutanée au niveau de la cuisse postérieure droite des souris. Quand les tumeurs ont atteint le volume de 50 ± 5 mm^3, 100 µL de D-PBS (groupe contrôle sans PS, sans irradiation, n=4) ou d'une solution de PS contenant 0,3 mg/kg de mTHPC libre, Foslip® ou mTHPC-VE sont injectés en i.v dans la veine caudale. Vingt-quatre heures après l'injection, la tumeur est irradiée à 652 nm à l'aide d'une diode laser (Cerelas, Biolitec GmbH, Allemagne). Les conditions d'application de la PDT sont les suivantes : fluence à 10 J/cm^2, irradiance à 90 mW/cm^2 avec un spot d'irradiation mesurant 4 cm de diamètre et une puissance en sortie de fibre de 1,26 W. Le temps d'irradiation est calculé selon la formule suivante : Fluence/Irradiance x 1000 soit 111 sec. Après irradiation, les souris reçoivent une injection de Metacam® à 1 mg/kg associée à de la buprénorphine à 0,08 mg/kg pendant 2 jours et sont maintenues à l'obscurité 4 jours. Trois fois par semaine, le volume des tumeurs est calculée selon l'équation $V = W^2 \times Y/2$ avec W : le diamètre le plus petit et Y : le diamètre le plus grand. Une absence de repousse après 90 jours est qualifiée de cure tumorale. Les animaux sont mis à mort lorsque les tumeurs atteignent 1000 mm^3.

4.2. Résultats & Discussion

Le suivi de la biodistribution après une injection de 0,15 mg/kg s'est avéré impossible en raison d'une fluorescence trop faible au niveau tumoral. A la suite de l'injection i.v des mTHPC-VE, un très faible signal de fluorescence a été détecté au niveau des poumons et du foie 6 et 9 h après injection. Ainsi, après injection du Foslip® ou des mTHPC-VE dans la veine caudale de la souris à une concentration équivalente de 0,3 mg/kg, la distribution du PS dans l'organisme entier est suivie grâce à un imageur petit animal jusque 48 h après i.v.

La fluorescence de la mTHPC au niveau tumoral (rond jaune) est détectable 6 h après i.v quelle que soit la formulation de mTHPC : Foslip® (Figure 26A) ou mTHPC-VE (Figure 26B). Vingt-quatre heures après injection, l'intensité de fluorescence au niveau tumorale semble plus importante pour les mTHPC-VE. De plus, dès 6 h, la fluorescence semble plus élevée au niveau des poumons après une injection de mTHPC-VE comparé à une injection de Foslip®.

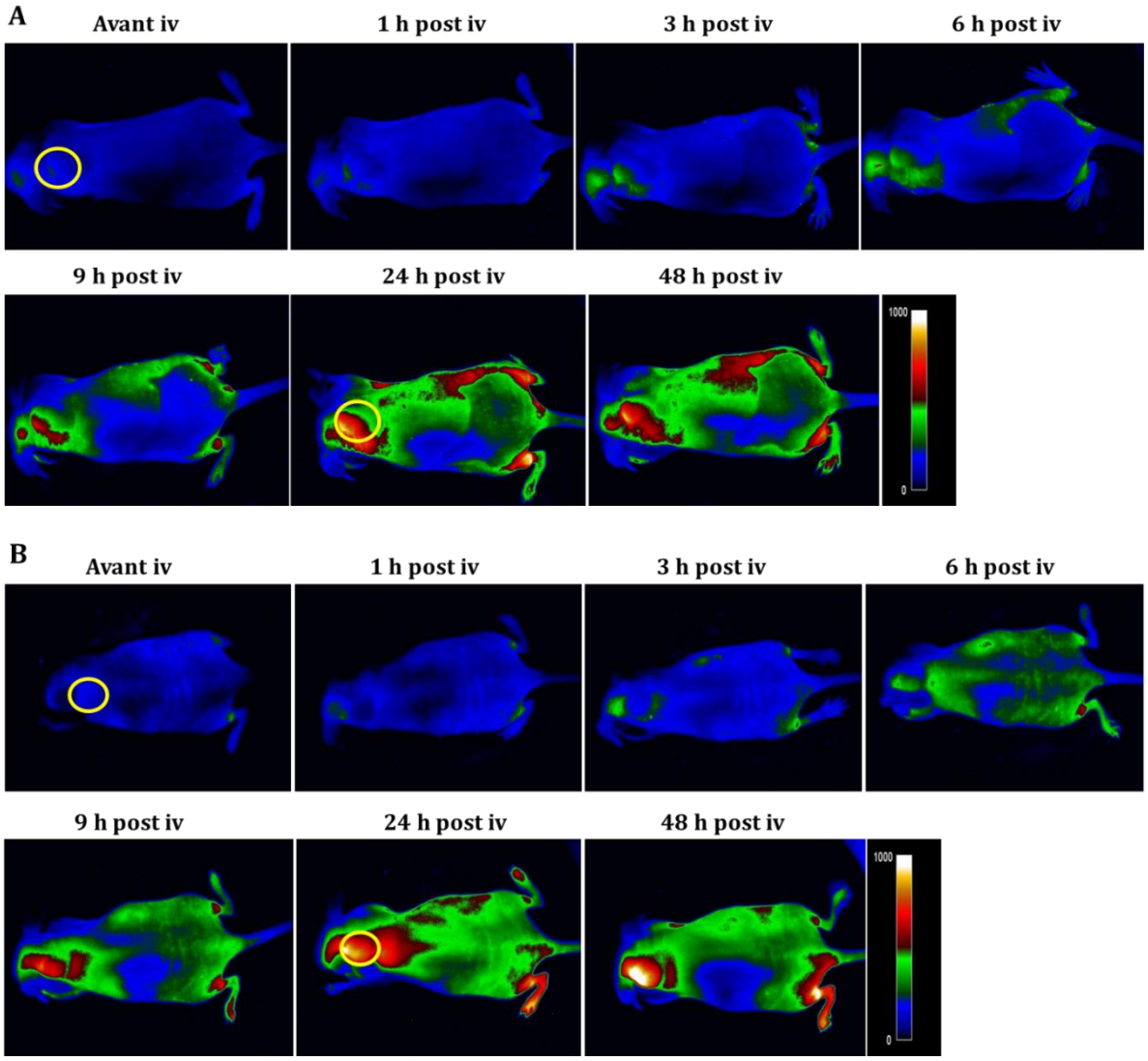


Figure 26. Imagerie de fluorescence de souris « nude » xénogreffée

Lorsque la tumeur HT29 atteint 100 mm³, une injection i.v de (A) Foslip® ou de (B) mTHPC-VE est réalisée (0,3 mg/kg). Le cercle jaune indique l'emplacement de la tumeur. Les images sont représentatives de la situation observée chez toutes les souris 48 h (n=5).

Suite aux résultats obtenus sur organisme entier, des temps spécifiques ont été sélectionnés et les organes extraits afin de réaliser une analyse plus fine. Rapidement après injection i.v, la fluorescence de la mTHPC est importante dans la rate et le foie pour le Foslip® (Figure 27A) et dans les poumons et le foie pour les mTHPC-VE (Figure 27B). Au niveau tumoral, la fluorescence de la mTHPC est présente dès 6 h après i.v confirmant la tendance obtenue sur organisme entier. Aucune fluorescence significative n'est observée au niveau du cœur.

Après analyse des images des organes, des cinétiques d'incorporation de la mTHPC obtenues grâce à son intensité de fluorescence sont tracées (Figure 28). Au niveau tumoral, la fluorescence de la mTHPC est constante à partir de 15 h après i.v de Foslip® (Figure 28A). Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature obtenues après extraction par chromatographie HPLC [144]. Après i.v des mTHPC-VE, le plateau est plus rapidement atteint, 6 h après injection (Figure 28B). L'intensité maximale de fluorescence dans la tumeur n'est pas significativement différente entre les deux formulations de mTHPC. L'accumulation dans la peau suit le même profil de fluorescence que dans la tumeur avec des niveaux plus faible. Cependant, aucune différence n'est observée entre Foslip® et mTHPC-VE. De plus, le muscle est l'organe accumulant le moins la mTHPC et ce quel que soit le temps post i.v.

La fluorescence la plus importante de mTHPC est présente au niveau du foie pour les liposomes de mTHPC (Figure 28C) tout comme pour les mTHPC-VE avec un niveau de fluorescence également élevé dans les poumons (Figure 28D). Le foie est un organe d'accumulation préférentielle des NP ce qui explique le fort signal de fluorescence dans les deux cas. De plus, récemment, il a été montré que les VE et plus particulièrement la catégorie des exosomes, se retrouvent préférentiellement dans les poumons. Wen et *al.* ont montré une accumulation 13 fois plus importante dans les poumons, 24 h après une injection i.v d'exosomes comparé à une injection i.v de liposomes et légèrement plus importante au niveau du foie [272]. De plus, suite à un marquage des exosomes à l'aide d'iode radioactif, une localisation préférentielle dans le foie et les poumons 4 h après injection i.v ce qui est en accord avec nos résultats de biodistribution (Figure 28D) [273]. Précédemment, une accumulation préférentielle des exosomes au niveau pulmonaire a été constatée, 30 min après injection i.v, suivie d'une longue redistribution au niveau du foie [274]. Les auteurs attribuent cette localisation des VE à une forte concentration en macrophages au niveau pulmonaire ainsi qu'à un grand nombre de protéines cibles des exosomes. Il a également été montré que les VE détectées dans les poumons sont rapidement captées par les cellules endothéliales, d'autant plus lorsque les VE sont d'origine endothéliale [275].

Une très faible accumulation de la mTHPC au niveau de la rate et des reins est constatée. Ces organes ne semblent pas être des cibles majoritaires des VE. En revanche, une forte accumulation dès les premières heures suivants l'injection de Foslip® est observée dans la rate. Cette élimination par le SRE a précédemment été décrite dans la littérature pour les liposomes conventionnels [147].

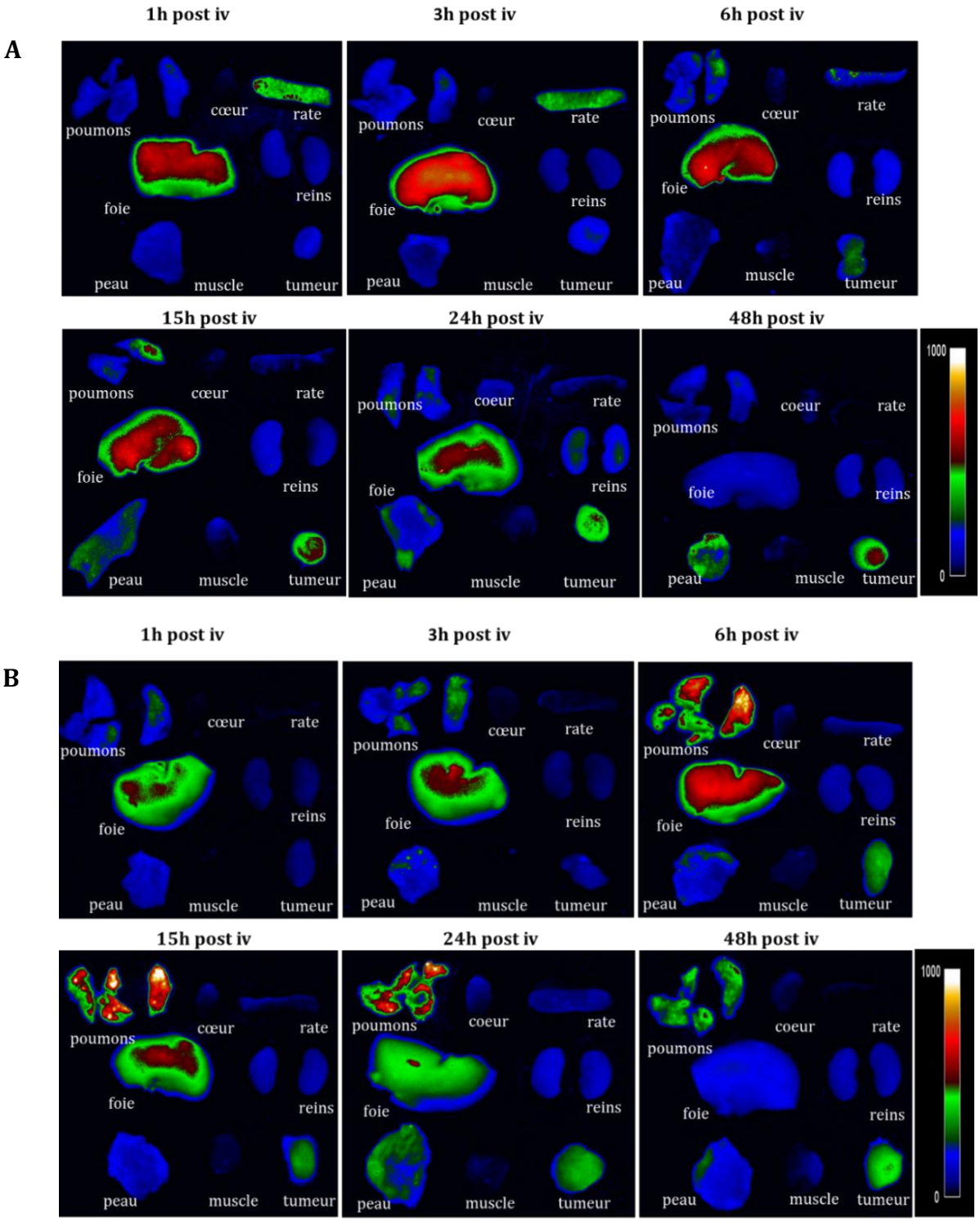


Figure 27. Imagerie de fluorescence réalisée sur organes *ex vivo*

Après une injection i.v de (A) Foslip® ou de (B) mTHPC-VE (0,3 mg/kg), l'animal est sacrifié et les images de fluorescence sont réalisées sur les organes préalablement lavés dans du NaCl. Les images sont représentatives de la situation observée chez toutes les souris injectées (n = 4-6 par groupe).

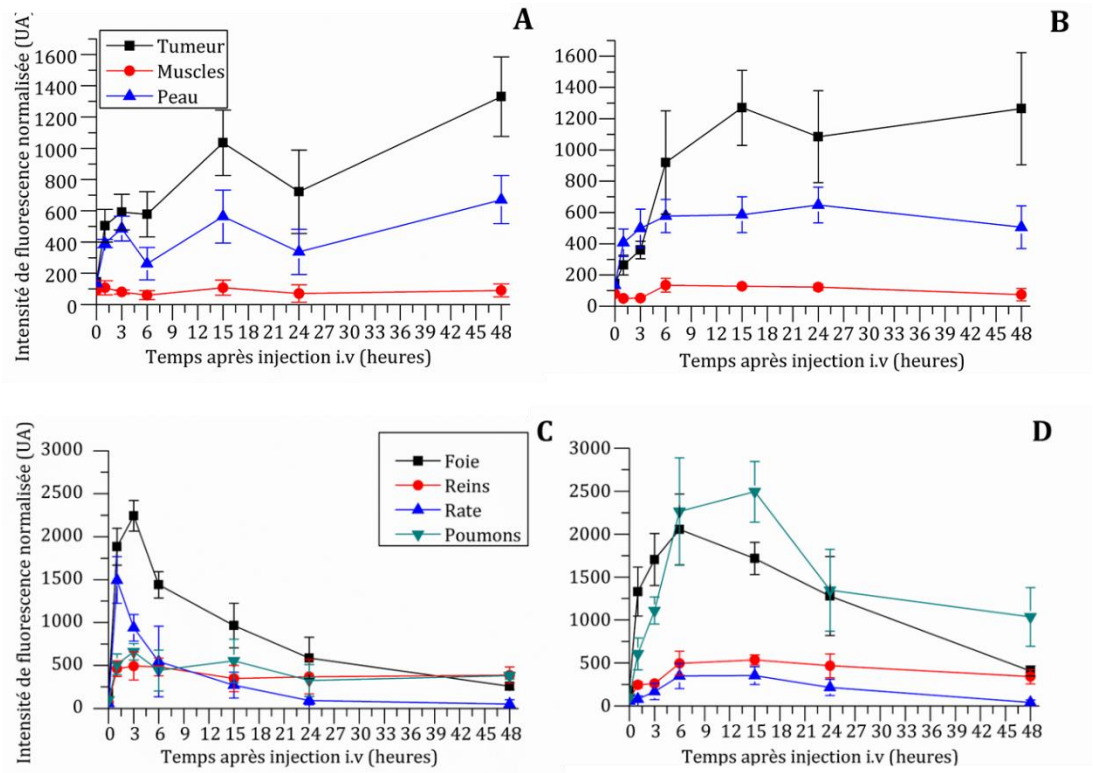


Figure 28. Intensité de fluorescence de la mTHPC dans les organes en fonction du temps

Intensité de fluorescence dans (A - B) la tumeur, la peau et le muscle et dans (C – D) le foie, les reins, la rate et les poumons après une injection i.v de (A - C) Foslip® et de (B - D) mTHPC-VE. n = 4 à 6 souris/groupe.

Après extraction de la mTHPC présente dans la circulation sanguine, la pharmacocinétique du Foslip® et des mTHPC-VE a pu être analysée (Figure 29A).

Après injection i.v de Foslip®, la plus forte concentration en mTHPC dans le plasma est mesurée 30 min après injection suivie d'une décroissance rapide. Ainsi, 6 h après i.v, la concentration en mTHPC présente dans le plasma est négligeable. Ces résultats sont en accord avec les résultats précédemment obtenus après une injection i.v de Foslip® à une concentration de 0,15 mg/kg [144]. La décroissance rapide ainsi que la forte capture par le foie et la rate est typique du profil de la mTHPC libre [58]. Cette similitude peut s'expliquer par une rapide destruction des liposomes en circulation corrélée avec une rapide libération de la mTHPC (Figure 19).

Après injection i.v des mTHPC-VE, le profil de distribution dans le plasma apparait très différent de celui obtenu avec le Foslip®. En effet, dès 30 min après injection i.v, la concentration en mTHPC dans le plasma est négligeable. En revanche, 6 h après i.v, une forte concentration en mTHPC est observée (Figure 29A). Cette pharmacocinétique surprenante a également été

observée après injection i.v de mTHPC-VE d'une autre origine cellulaire (cellules souches mésenchymateuses) (Figure 29B), mettant en évidence une relation entre cette pharmacocinétique et les propriétés des VE. L'étude de Takahashi et *al*. a démontré un très faible temps de demi-vie des VE en circulation (entre 2 et 4 min maximum). En effet, 5 min après injection i.v, seulement 5% des VE sont retrouvés dans le sérum murin. Cette étude a également mis en évidence une rapide capture des VE par le foie et les poumons [276,277]. Ces résultats peuvent ainsi expliquer qu'à 30 min après injection des mTHPC-VE, la concentration de la mTHPC dans le plasma soit négligeable. Une seconde étude a également mis en évidence cette rapide clairance en raison d'une forte capture des VE par les macrophages [277]. Ainsi, après une rapide captation des mTHPC-VE par les organes, une lente libération de la mTHPC est observée comme en témoigne le pic 6h après i.v (Figure 29A). Afin de réalisation une corrélation précise entre la concentration en mTHPC présente dans le plasma et celle présente dans les organes, une extraction chimique de la mTHPC à partir des organes sera nécessaire.

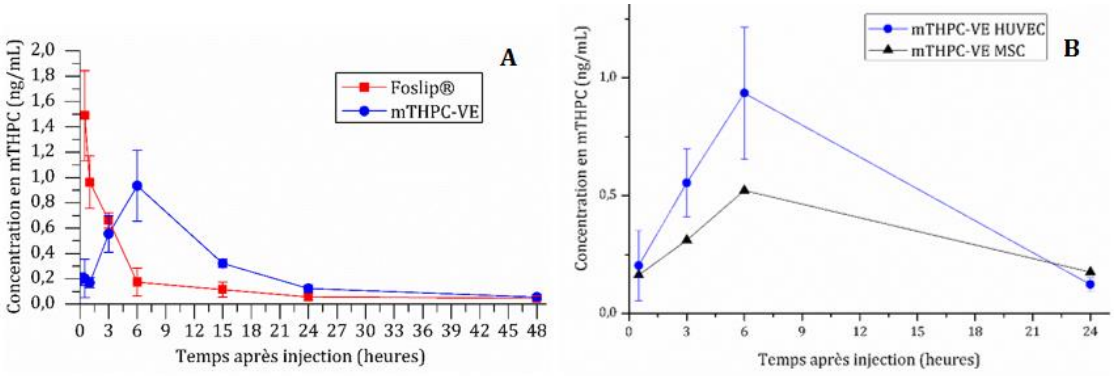


Figure 29. Pharmacocinétiques

Concentration en mTHPC dans le plasma après extraction chimique à la suite d'une injection i.v (A) de Foslip® (courbe rouge) et de mTHPC-VE issues de cellules HUVEC (courbe bleue). n = 4-6 souris/groupe (B) Zoom de la pharmacocinétique obtenue avec les mTHPC-VE comparée à celle obtenue avec des mTHPC-VE issue de cellules souches mésenchymateuses (courbe noire).

Aucune différence de croissance tumorale n'est mesurée dans les groupes témoins y compris dans le groupe mTHPC-VE sans irradiation mettant en évidence une absence d'activité tumorale de la mTHPC ou des VE à l'obscurité (Tableau 4). Après une injection i.v à 0,3 mg/kg de Foslip® suivie d'une irradiation, le retard de croissance tumorale n'est pas significativement différent comparé aux groupes témoins. En effet, il a précédemment été démontré que le meilleur retard de croissance apparait avec un IDL de 15 h [147]. Concernant les mTHPC-VE, le temps nécessaire pour atteindre 10 fois le volume initial est doublé comparé aux témoins, 1,5 fois comparé au Foslip® et non significativement différent comparé à la mTHPC libre (Tableau 4). Ce retard de croissance tumorale avec les mTHPC-VE a déjà été observé après une injection intratumorale [252]. L'analyse de l'efficacité de traitement par Kaplan-Meier a mis en évidence une

différence de cure tumorale. En effet, 90 jours après irradiation, une absence de repousse tumorale est constatée pour 33% des souris injectées avec les mTHPC-VE contrairement à 20% pour les souris injectées avec la mTHPC libre (Figure 30). Aucune cure tumorale n'est mise en évidence pour le Foslip® ce qui est en accord avec les résultats précédemment obtenus avec des tumeurs HT29 [144]. L'efficacité PDT est d'autant plus importante lorsque la mTHPC se localise à la fois dans les vaisseaux tumoraux et dans le parenchyme tumoral [10]. Nous pouvons alors émettre l'hypothèse que les mTHPC-VE, en raison de leur origine endothéliale et de leur stabilité augmentée dans la circulation, présentent cette double localisation entrainant une efficacité PDT augmentée. Cette hypothèse sera vérifiée par macroscopie confocale après marquage des vaisseaux par une sonde fluorescente, dans la suite de cette étude.

	D-PBS	Foslip®	mTHPC libre	mTHPC-VE
Témoin	22,5 ± 3,5	20,1 ± 2,2	22,2 ± 4,4	22,8 ± 6,1
PDT		29,8 ± 7,4	34,6 ± 8,2[a]	46,9 ± 5,7[a,b]

Tableau 4. Nombre de jours après injection nécessaire pour atteindre 10 fois le volume tumoral initial excluant les cures tumorales

Les souris présentant une cure tumorale 90 jours après PDT sont exclues du calcul : 0/7 pour le Foslip®, 1/5 pour la mTHPC libre, 3/8 pour les mTHPC-VE. n = 5-8 souris/groupe. p<0,05, [a] comparaison avec les souris D-PBS, [b] comparaison avec les souris Foslip®/PDT.

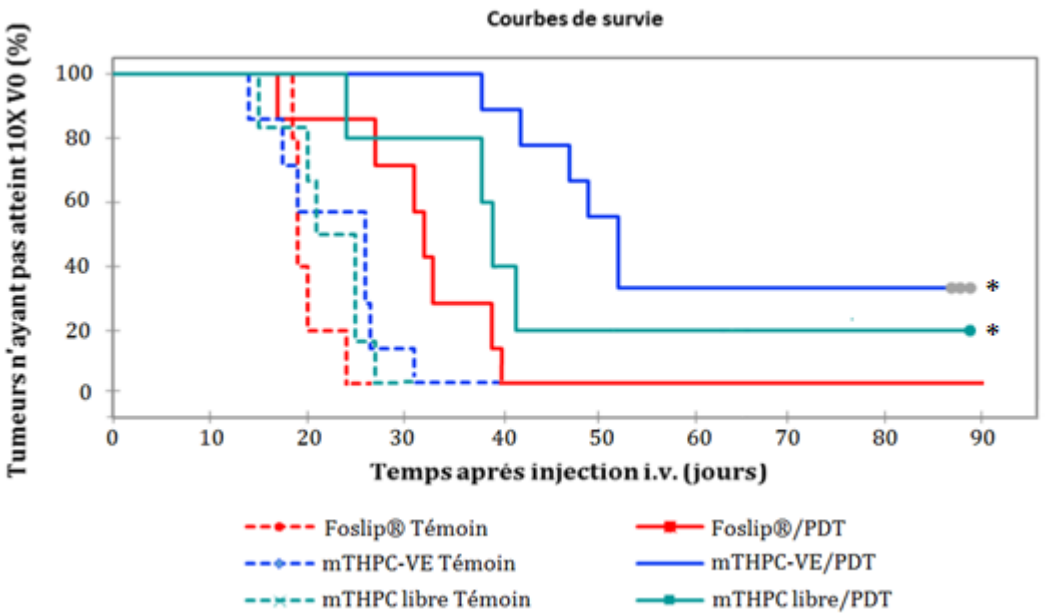


Figure 30. Retard de croissance tumorale après application de la thérapie photodynamique en incluant les cures tumorales

*n = 5-8 souris/groupe. p<0,05, * comparaison avec les groupes témoins (PS, sans irradiation).*

4.3. Conclusion

Ces résultats ont mis en évidence une corrélation entre un ensemble de paramètres comme les propriétés de libération de la mTHPC à partir d'un vecteur, la stabilité des vecteurs, la biodistribution, les paramètres pharmacocinétiques et l'efficacité de la PDT. Les caractéristiques de libération de la mTHPC et de stabilité décrit dans la partie 1 des résultats sont étroitement liés aux résultats de pharmacocinétiques. Les liposomes de mTHPC montrent une élimination rapide de la circulation sanguine en raison de la libération de la mTHPC dès 30 min corrélée avec une destruction des liposomes. En toute probabilité, les mTHPC-VE possèdent une élimination de la circulation extrêmement rapide due à une capture par les macrophages circulants et une forte capture par le foie et les poumons suivie d'une redistribution maximale 6 h après injection corrélée avec une libération de la mTHPC. De plus, l'efficacité PDT est augmentée grâce à l'utilisation de VE comme en témoigne le retard de croissance tumorale ainsi que les cures tumorales 90 jours après injection.

Discussion générale

Les VE, naturellement produites par l'organisme à la suite d'un stimulus, sont caractérisées par une structure sous forme d'une bicouche phospholipide. Leur composition membranaire confère une parfaite biocompatibilité, une immunotolérance ainsi qu'une capacité naturelle de ciblage tumoral contrairement aux nanovecteurs synthétiques comme les liposomes [278]. Les VE sont des nanovecteurs naturels capables de transférer leur contenu aux cellules cibles. Elles peuvent donc être utilisées comme biomarqueurs et comme vecteurs de molécules thérapeutiques pour le traitement anti-cancéreux.

Dérivées de cellules endothéliales HUVEC, leur membrane est riche en cholestérol, sphingomyélines et protéines augmentant leur capacité d'incorporation cellulaire et leur stabilité en comparaison des liposomes conventionnels sans cholestérol. Chargées de porphyrines, les VE issues de cellules HUVEC ont montré une bonne capacité de chargement du PS et *in vitro*, une accumulation cellulaire 5 fois plus importante que des liposomes chargés [230]. Ainsi, en tant que nanovecteur de mTHPC, de meilleurs résultats sont attendus avec ces VE.

La capacité de chargement de la mTHPC dans les VE est déduite grâce aux expériences de quenching de fluorescence photoinduit. En effet, les mTHPC-VE possèdent une valeur de quenching proche de 1 (0,99), ce qui est similaire à la valeur obtenue précédemment pour des liposomes conventionnels dont le ratio mTHPC :lipides est de 1 :600 (quenching à 0,96). En comparaison avec le Foslip®, présentant un ratio de 1 :12 (quenching à 0,11), les mTHPC-VE possèdent une capacité de chargement inférieure à celle des liposomes [141]. Ce résultat s'explique en partie par la méthode de chargement utilisée. En effet, un chargement avant production des VE, permet de conserver l'intégrité membranaire et leur confère une certaine stabilité. Cependant, l'inconvénient majeur de cette technique est le taux d'incorporation de l'agent thérapeutique [229,241]. Récemment, un modèle hybride de fusion entre des VE chargées de mTHPC et des liposomes a montré une capacité de chargement de la mTHPC améliorée (90% *vs* 3% pour les mTHPC-VE). En revanche, dans un modèle 3D de sphéroïdes multicellulaires, la pénétration des VE hybrides ne s'est pas révélée supérieure à celle des mTHPC-VE [254]. Ces résultats montrent que, malgré l'importance de ce paramètre, la capacité de chargement des VE ne conditionne pas leur efficacité et leur comportement dans une situation biologique.

Une des particularités des mTHPC-VE est leur comportement dans le plasma. En effet, 6 h après incubation dans 20% de plasma murin exo-free, les VE de 160 nm de diamètre se divisent en plus petites vésicules de 70 nm expliquant le doublement de concentration en mTHPC-VE.

Durant ce phénomène, l'intégrité membranaire des VE est conservée ainsi que leur forme sphérique. L'absence de destruction membranaire des VE peut s'expliquer par la présence de protéines à la surface des petites VE permettent de les protéger par une répulsion stérique. Leur composition membranaire riche en cholestérol (23,5%) permet également d'expliquer cette stabilité grâce à une inhibition du transfert des protéines HDL et LDL [279]. Il a précédemment été démontré que des liposomes DPPC :DPPG composés de 22,5% de cholestérol présentent une stabilité dans le plasma 2 fois plus importante que les liposomes composés de 7,5% de cholestérol, eux-mêmes plus stables que les liposomes dépourvus de cholestérol [143]. Ces résultats expliquent en partie la destruction graduelle du Foslip® dans le plasma.

La destruction rapide et progressive du Foslip® est corrélée avec une libération de la mTHPC. Sous forme libre, la mTHPC s'incorpore dans les cellules par diffusion passive au travers des membranes. Ainsi, une étude *in vitro* des mécanismes d'internalisation cellulaire de la mTHPC a été réalisée sur cellules cancéreuses HT29 en monocouche. Une incubation à 4 °C, température inhibant l'ensemble des mécanismes actifs d'incorporation cellulaire, a montré une inhibition de 40% de l'internalisation cellulaire du Foslip®, non affectée par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des voies d'endocytose. Ainsi, un mécanisme actif de fusion entre la membrane liposomale et la membrane cellulaire permet d'expliquer ces résultats [269]. Concernant les mTHPC-VE, une inhibition de 80% de l'internalisation cellulaire est observée après une incubation à 4°C. Le faible pourcentage d'incorporation cellulaire par diffusion passive (20%) s'explique en partie par l'absence de destruction des mTHPC-VE combinée à une faible libération de la mTHPC durant l'incubation. Ainsi, les mTHPC-VE s'accumulent dans les cellules par fusion membranaire ou par un mécanisme d'endocytose actif [253]. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des différentes voies d'endocytose a mis en évidence une internalisation préférentielle par la voie d'endocytose dépendante des cavéolines ce qui est en accord avec les données de la littérature sur l'internalisation des exosomes [96]. Il a été démontré, après incubation de micelles sur des cellules tumorales, que les NP internalisées par cette voie d'endocytose possèdent la capacité de s'accumuler dans les lysosomes [91]. Ainsi, les mTHPC-VE ont montré une importante localisation lysosomale contrairement à la mTHPC libre et au Foslip®.

Dans le but de reproduire la complexité d'une tumeur et de prédire le comportement des mTHPC-VE *in vivo*, le modèle 3D de sphéroïde multicellulaire a été utilisé. Contrairement aux cellules cultivées en monocouche, les sphéroïdes sont plus représentatifs de la situation clinique et suscite un grand intérêt en cancérologie en raison de propriétés physiologiques, proches des métastases avasculaires rencontrées chez certains patients [77,257]. Le manque d'utilisation de ce modèle dans le cas de petites molécules libres est lié à l'absence de vascularisation. En effet, *in vivo* ces molécules ont une faible capacité de rétention dans les tumeurs et un manque de

sélectivité tumorale empêche ce modèle de prédire convenablement la réponse des agents thérapeutiques. En revanche, les nanovecteurs sont connus pour s'accumuler au niveau tumoral grâce à l'effet EPR. Ainsi, le sphéroïde représente parfaitement le microenvironnement rencontré par le nanovecteur après sa sortie des vaisseaux et en fait un modèle idéal pour l'étude de la distribution de NP, la survie cellulaire, la prolifération cellulaire, la résistance aux thérapies ainsi que les phénomènes d'hypoxie [264].

La distribution de la mTHPC libre au sein du sphéroïde a préalablement été étudiée et a mis en évidence une forte séquestration du PS dans les cellules de la périphérie ainsi qu'une distribution non homogène dans le sphéroïde [259]. En accord avec les données de la littérature, à 50 µm de profondeur dans le sphéroïde, l'intensité de fluorescence de la mTHPC diminue de 8 à 10 fois comparée à celle obtenue en périphérie [260]. Un profil de fluorescence similaire a été observé après une incubation avec le Foslip® due à la composition des liposomes de mTHPC. En effet, le comportement de la molécule dans le sphéroïde est fortement dépendant des propriétés intrinsèques du vecteur. Il a été montré que les liposomes composés de phosphatidylcholine et cholestérol pénètrent jusqu'à 100 µm de profondeur dans le sphéroïde contrairement à des liposomes composés de DOTAP (dioleoyloxy-propyl-trimethylammonium methyl-sulfate) qui ne dépasse pas les 40 µm de profondeur ou sans cholestérol [263,264]. Ainsi, la composition des mTHPC-VE, riche en cholestérol, sphingomyéline et phosphatidylcholine est en faveur d'une pénétration plus en profondeur dans le sphéroïde.

Le second facteur pouvant expliquer l'amélioration de la diffusion des mTHPC-VE (jusqu'à 100 µm de profondeur dans le sphéroïde HT29) est la diminution de taille des vésicules au cours de l'incubation. Ce phénomène, demontré pour la première fois lors de nos travaux, a mis en évidence l'apparition d'une population majoritaire de mTHPC-VE d'un diamètre d'environ 70 nm après 24 h d'incubation ainsi qu'une diminution de la population de vésicules supérieures à 180 nm. Les nanovecteurs, dont les capacités de pénétration sont les plus importantes, possèdent une taille d'environ 70 nm comme précédemment constaté avec des NP d'or chargées de PS. Les mêmes NP d'un diamètre de 19 et 106 nm ont présenté des capacités d'accumulation et de pénétration bien inférieures à celles obtenues avec les NP de 66 nm [108].

La pénétration importante de la mTHPC dans sphéroïde ainsi qu'une augmentation de l'accumulation cellulaire peuvent être associées à une meilleure photocytotoxicité. Dans le cas de nanovecteur, Solomon et *al.,* ont mis en évidence une corrélation entre accumulation cellulaire, pénétration et activité cytotoxique de la molécule vectorisée. Les formulations possédant la plus importante pénétration dans le sphéroïde présentent une bonne cytotoxicité. Cependant, l'effet le plus important a été rencontré pour les formulations présentant une forte accumulation et une

forte pénétration dans le sphéroïde. [264] Ainsi, l'augmentation de l'efficacité PDT après incubation avec des mTHPC-VE ainsi que la diminution de la dose de lumière nécessaire pour atteindre 50% de mort cellulaire s'expliquent en partie par les résultats de pénétration et d'accumulation cellulaire.

Les résultats prometteurs obtenus dans le sphéroïde multicellulaire HT29 ont conduit à la réalisation d'expérimentations *in vivo*. Un fort parallèle existe entre les capacités d'accumulation et d'activité du principe actif dans le sphéroïde et les résultats obtenus *in vivo* [77]. Par exemple, des petites NP d'or exposent une meilleure accumulation et diffusion dans le sphéroïde contrairement à de larges NP de silices. Ces résultats, comparable à ceux obtenus sur un modèle de xénogreffe orthotopique, montrent la valeur prédictive de ce modèle [280,281]. Ainsi, comme attendu, l'efficacité PDT s'est révélée également plus favorable après injection i.v des mTHPC-VE suivie d'une irradiation. Un délai de 47 jours est nécessaire avec les mTHPC-VE pour atteindre un volume tumoral 10 fois supérieur au volume de départ (50 mm^3). De plus, pour 43% des souris traitées, aucune repousse tumorale n'est visible 90 jours après injection i.v et irradiation. Cette efficacité supérieure à celles obtenues avec la mTHPC libre et le Foslip® pourrait s'expliquer par une double localisation des mTHPC-VE au moment de l'irradiation. En effet, une guérison complète des souris a précédemment été démontrée par l'intermédiaire d'une double injection de mTHPC libre afin de cibler le parenchyme tumoral et la vascularisation [10]. De plus, 24 h après injection, les mTHPC-VE sont plus concentrées dans la tumeur que le Foslip® (intensité de fluorescence 1,5 fois plus importante) ce qui semble donc être un intervalle drogue-lumière optimal pour les mTHPC-VE. En effet, concernant le Foslip®, le meilleur ratio tumeur/peau ainsi que la plus forte concentration intratumorale en mTHPC est obtenu 15 h après injection i.v [144].

A 24 h après une injection i.v de mTHPC-VE, une importante fluorescence de la mTHPC est encore présente dans le foie et les poumons avec un maximum déjà atteint 6 h après injection. Cette forte rétention est liée à la mTHPC libérée des VE ainsi qu'à la mTHPC encore présente sous forme vésiculaire en raison d'une longue stabilité en circulation. Ainsi, la forte accumulation des mTHPC-VE dans les poumons et le foie est liée à la biodistribution spécifique des VE elles-mêmes. Il a précédemment été démontré, après marquage d'exosomes à l'aide d'un traceur fluorescent, une accumulation préférentielle dans les poumons et le foie, 24 h après injection et ce quel que soit l'origine des exosomes (étude réalisée avec 3 lignées cellulaires) [272]. De plus, de nombreuses études ont mis en évidence une importante capture des VE par les macrophages hépatiques et pulmonaires ainsi qu'une forte localisation au niveau des cellules endothéliales de ces organes [272,274,276]. Cette localisation spécifique des VE est observée dès les premières heures suivants l'injection. Ce résultat peut alors être mis en relation avec la pharmacocinétique extrêmement rapide des mTHPC-VE. En effet, 30 min après injection i.v, la concentration plasmatique en mTHPC

est négligeable due à une récupération du plasma trop tardive. En effet, il a été montré que 30 min après injection, uniquement 5% des VE sont conservées dans la circulation [282]. Le temps de demi-vie des VE en circulation ne dépasse pas les 4 min après injection [276].

L'ensemble de ces résultats présente les VE comme, à ce jour, un type de vectorisation de la mTHPC permettant d'améliorer considérablement l'efficacité PDT. Cependant, l'hétérogénéité de la population vésiculaire reste un inconvénient pour une éventuelle utilisation clinique.

Conclusions

En conclusion de cette étude, les VE chargées de mTHPC présentent des caractéristiques photophysiques favorables pour la PDT en raison d'une monomérisation de la mTHPC ainsi qu'une absence de quenching de fluorescence photoinduit. En présence de protéines plasmatiques, les mTHPC-VE se sont révélées plus stables que les liposomes de mTHPC avec une conservation de l'intégrité membranaire tout au long de l'incubation ainsi qu'une libération de la mTHPC minimisée.

In vitro, l'internalisation cellulaire est bien supérieure à celle obtenue avec le Foslip® *via* un mécanisme actif d'endocytose et de fusion cellulaire. A la suite de cette incorporation, une localisation lysosomale préférentielle est rencontrée, expliquant l'absence d'amélioration de l'efficacité PDT entre ces deux formes nanovectorisées. En effet, cette localisation subcellulaire est moins propice à induire la mort cellulaire contrairement aux autres organites intracellulaires.

Dans un modèle 3D de sphéroïdes multicellulaires, la diffusion est considérablement augmentée après incubation avec les mTHPC-VE comparé à la mTHPC libre et au Foslip®. Corrélé à une incorporation cellulaire supérieure, les mTHPC-VE ont démontré une meilleure efficacité PDT avec une augmentation de l'apoptose photoinduite.

In vivo, l'accumulation tumorale des VE a été mis en évidence avec une valeur d'intensité de fluorescence de la mTHPC augmentée en comparaison de la formulation liposomale. De plus, l'efficacité du traitement PDT s'est révélé bien supérieure avec des cures tumorales non observée après une injection i.v de Foslip®.

Les VE chargées de mTHPC semblent donc être des nanovecteurs intéressant en PDT afin d'améliorer l'efficacité du traitement.

Perspectives

Les perspectives majeures de ce travail portent sur la comparaison entre sphéroïdes multicellulaires et situation *in vivo* ainsi que sur le raffinement et l'explication des résultats obtenus *in vivo*.

L'utilisation de VE d'une autre origine cellulaire, dans le sphéroïde multicellulaire dans un premier temps, permettrait de mettre en relation l'augmentation de l'efficacité PDT avec les propriétés intrinsèques des VE ou avec l'origine endothéliale de nos mTHPC-VE. De plus, le modèle sphéroïde étant un modèle prédictif au comportement des NP *in vivo*, des résultats similaires au niveau de l'efficacité PDT ont précédemment été démontrés. Il serait intéressant d'étudier la diffusion intratumorale de la mTHPC par microscopie de fluorescence après réalisation de coupes ainsi que la distribution des cellules apoptotiques à l'aide d'un immunomarquage de la protéine caspse-3 activée.

Dans le but de raffiner les résultats de biodistribution, une extraction chimique de la mTHPC sera réalisée sur les différents organes d'intérêt, notamment la tumeur, la peau et le muscle. Ainsi, des ratios tumeur/muscle et tumeur/peau pourront être calculés. De plus, il serait intéressant de comparer la biodistribution obtenue en suivant la mTHPC avec la biodistribution des VE en elles-mêmes. Le suivi des VE peut s'effectuer par deux techniques différentes : un marquage de la membrane vésiculaire à l'aide d'un traceur fluorescent [175] ou l'utilisation d'un radiotraceur comme de l'iode radioactif dont le suivi peut être réalisé grâce à la tomographie par émission de positrons [273]. Afin d'obtenir une pharmacocinétique complète, une extraction chimique de la mTHPC dans le plasma sera réalisée 2 min après injection i.v des mTHPC-VE.

L'efficacité PDT supérieure obtenue après injection i.v des mTHPC-VE pourrait s'expliquer par une localisation de la mTHPC au niveau du parenchyme tumoral mais également au niveau de la vascularisation. Cette hypothèse sera vérifiée par macroscopie confocale après un marquage de la perfusion vasculaire à l'aide d'un traceur fluorescent vert. Précédemment, une importante colocalisation mTHPC/vaisseaux a été démontrée 6 h après une injection i.v de Foslip®. Ces résultats étaient en relation avec une efficacité PDT supérieure à celle obtenue 24 h après injection [147]. Par la suite, l'étude des dommages vasculaires après PDT pourront été étudiés sur un modèle de membrane chorio-allantoïdienne de l'œuf de poule [51]. L'ensemble de ces résultats pourront permettre d'utiliser un intervalle drogue-lumière optimal et de réaliser une comparaison avec les données obtenues 24 h après injection i.v.

Bibliographie

1. Ackroyd, R., Kelty, C., Brown, N. & Reed, M. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* **74,** 656–669 (2001).
2. van Straten, D., Mashayekhi, V., de Bruijn, H. S., Oliveira, S. & Robinson, D. J. Oncologic Photodynamic Therapy: Basic Principles, Current Clinical Status and Future Directions. *Cancers* **9,** (2017).
3. Lipson, R., Baldes, E. & Olsen, A. The use of a derivative of hematoporhyrin in tumor detection. *J. Natl. Cancer Inst.* **26,** 1–11 (1961).
4. Dougherty, T., Kaufman, J., Goldfarb, A., Weishaupt, K., Boyle, D. & Mittleman, A. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res.* **38,** 2628–2635 (1978).
5. Dougherty, T. An Update of Photodynamic Therapy Applications. *J. Clin. Laser Med. Surg.* **20,** 3–7 (2002).
6. Master, A., Livingston, M. & Sen Gupta, A. Photodynamic nanomedicine in the treatment of solid tumors: perspectives and challenges. *J. Control. Release.* **168,** 88–102 (2013).
7. Agostinis, P. *et al.* Photodynamic Therapy of Cancer: An Update. *CA. Cancer J. Clin.* **61,** 250–281 (2011).
8. Sharman, W., Allen, C. & van Lier, J. Role of activated oxygen species in photodynamic therapy. *Methods Enzymol.* **319,** 376–400 (2000).
9. Moan, J. & Berg, K. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochem. Photobiol.* **53,** 549–553 (1991).
10. Garrier, J. *et al*. Compartmental targeting for mTHPC-based photodynamic treatment in vivo: Correlation of efficiency, pharmacokinetics, and regional distribution of apoptosis. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **78,** 563–571 (2010).
11. Henderson, B., Gollnick, S., Snyder, J., Busch, T., Kousis, P., Cheney, R. & Morgan, J. Choice of oxygen-conserving treatment regimen determines the inflammatory response and outcome of photodynamic therapy of tumors. *Cancer Res.* **64,** 2120–2126 (2004).
12. Mroz, P., Yaroslavsky, A., Kharkwal, G. & Hamblin, M. Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. *Cancers* **3,** 2516–2539 (2011).
13. Marchal, S., Fadloun, A., Maugain, E., D'Hallewin MA., Guillemin, F., & Bezdetnaya, L. Necrotic and apoptotic features of cell death in response to Foscan photosensitization of HT29 monolayer and multicell spheroids. *Biochem. Pharmacol.* **69,** 1167–1176 (2005).
14. Rangasamy, S., Ju, H., Um, S., Oh, D. & Song, J. Mitochondria and DNA Targeting of 5,10,15,20-Tetrakis(7-sulfonatobenzo[b]thiophene) Porphyrin-Induced Photodynamic Therapy via Intrinsic and Extrinsic Apoptotic Cell Death. *J. Med. Chem.* **58,** 6864–6874 (2015).
15. François, A., Marchal, S., Guillemin, F. & Bezdetnaya, L. mTHPC-based photodynamic therapy induction of autophagy and apoptosis in cultured cells in relation to mitochondria and endoplasmic reticulum stress. *Int. J. Oncol.* **39,** 1537–1543 (2011).

16. Kessel, D., Vicente, M. & Reiners, J. Initiation of apoptosis and autophagy by photodynamic therapy. *Autophagy* **2,** 289–290 (2006).

17. Fingar, V., Taber, S., Haydon, P., Harrison, L., Kempf, S. & Wieman, T. Vascular damage after photodynamic therapy of solid tumors: a view and comparison of effect in pre-clinical and clinical models at the University of Louisville. *In Vivo (Athens Greece)* **14,** 93–100 (2000).

18. Krammer, B. Vascular effects of photodynamic therapy. *Anticancer Res.* **21,** 4271–4277 (2001).

19. Skupin-Mrugalska, P., Sobotta, L., Kucinska, M., Murias, M., Mielcarek, J. & Düzgüneş, N. Cellular changes, molecular pathways and the immune system following photodynamic treatment. *Curr. Med. Chem.* **21,** 4059–4073 (2014).

20. Gollnick, S. O. *et al.* Role of cytokines in photodynamic therapy-induced local and systemic inflammation. *Br. J. Cancer* **88,** 1772–1779 (2003).

21. Josefsen, L. & Boyle, R. Unique diagnostic and therapeutic roles of porphyrins and phthalocyanines in photodynamic therapy, imaging and theranostics. *Theranostics* **2,** 916–966 (2012).

22. Dougherty, T. Introduction. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **635,** 1–6 (2010).

23. Ormond, A. & Freeman, H. Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy. *Mater. Basel Switz.* **6,** 817–840 (2013).

24. Pushpan, S., Venkatraman, S., Anand, V., Sankar, J., Parmeswaran, D., Ganesan, S. & Chandrashekar, T. Porphyrins in photodynamic therapy - a search for ideal photosensitizers. *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents* **2,** 187–207 (2002).

25. Dobson, J., de Queiroz, G. & Golding, J. Photodynamic therapy and diagnosis: Principles and comparative aspects. *Vet. J. Lond. Engl. 1997* **233,** 8–18 (2018).

26. Senge, M. & Brandt, J. Temoporfin (Foscan , 5,10,15,20-Tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin)— A Second-generation Photosensitizer. *Photochem. Photobiol.* **87,** 1240–1296 (2011).

27. Yi, G., Hong, S., Son, J., Yoo, J., Park, C., Choi, Y. & Koo, H. Recent advances in nanoparticle carriers for photodynamic therapy. *Quant. Imaging Med. Surg.* **8,** 433–443 (2018).

28. Chilakamarthi, U. & Giribabu, L. Photodynamic Therapy: Past, Present and Future. *Chem. Rec.* **17,** 775–802 (2017).

29. Sasnouski, S., Pic, E., Dumas, D., Zorin, V., D'Hallewin, MA., Guillemin, F. & Bezdetnaya, L. Influence of incubation time and sensitizer localization on meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (mTHPC)-induced photoinactivation of cells. *Radiat. Res.* **168,** 209–217 (2007).

30. Siboni, G., Weitman, H., Freeman, D., Mazur, Y., Malik, Z. & Ehrenberg, B. The correlation between hydrophilicity of hypericins and helianthrone: internalization mechanisms, subcellular distribution and photodynamic action in colon carcinoma cells. *Photochem. Photobiol. Sci.* **1,** 483–491 (2002).

31. Nishie, H. *et al.* A next-generation bifunctional photosensitizer with improved water-solubility for photodynamic therapy and diagnosis. *Oncotarget* **7,** 74259–74268 (2016).

32. Kessel, D. Apoptosis, Paraptosis and Autophagy: Death and Survival Pathways Associated with Photodynamic Therapy. *Photochem. Photobiol.* (2018).

33. Bisland, S., Goebel, E., Hassanali, N., Johnson, C. & Wilson, B. Increased expression of mitochondrial benzodiazepine receptors following low-level light treatment facilitates enhanced protoporphyrin IX production in glioma-derived cells in vitro. *Lasers Surg. Med.* **39,** 678–684 (2007).

34. Kessel, D., Conley, M., Vicente, M. & Reiners, J. Studies on the subcellular localization of the porphycene CPO. *Photochem. Photobiol.* **81,** 569–572 (2005).

35. Bonneau, S., Morlière, P. & Brault, D. Dynamics of interactions of photosensitizers with lipoproteins and membrane-models: correlation with cellular incorporation and subcellular distribution. *Biochem. Pharmacol.* **68,** 1443–1452 (2004).

36. Li, L. & Luo, R. Effect of drug-light interval on the mode of action of Photofrin photodynamic therapy in a mouse tumor model. *Lasers Med. Sci.* **24,** 597–603 (2009).

37. D'Cruz, A., Robinson, M. & Biel, M. mTHPC-mediated photodynamic therapy in patients with advanced, incurable head and neck cancer: a multicenter study of 128 patients. *Head Neck* **26,** 232–240 (2004).

38. Senge, M. mTHPC — A drug on its way from second to third generation photosensitizer? *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **9,** 170–179 (2012).

39. Bonnett, R., Charlesworth, P., Djelal, B., Foley, S., McGarvey, D. & Truscott, T. Photophysical properties of 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)porphyrin (m-THPP), 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)chlorine (m-THPC): a comparative study. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **2,** 325–328 (1999).

40. Leung, W., Sun, X., Mak, N. & Yow, C. Photodynamic effects of mTHPC on human colon adenocarcinoma cells: photocytotoxicity, subcellular localization and apoptosis. *Photochem. Photobiol.* **75,** 406–411 (2002).

41. Teiten, M., Bezdetnaya, L., Morlière, P., Santus, R. & Guillemin, F. Endoplasmic reticulum and Golgi apparatus are the preferential sites of Foscan localisation in cultured tumour cells. *Br. J. Cancer* **88,** 146–152 (2003).

42. Kiesslich, T., Berlanda, J., Plaetzer, K., Krammer, B. & Berr, F. Comparative characterization of the efficiency and cellular pharmacokinetics of Foscan- and Foslip-based photodynamic treatment in human biliary tract cancer cell lines. *Photochem. Photobiol. Sci.* **6,** 619–627 (2007).

43. Marchal, S., François, A., Dumas, D., Guillemin, F. & Bezdetnaya, L. Relationship between subcellular localisation of Foscan and caspase activation in photosensitised MCF-7 cells. *Bristish J. Cancer* **96,** 944–951 (2007).

44. Yow, C., Chen, J., Mak, N., Cheung, N. & Leung, A. Cellular uptake, subcellular localization and photodamaging effect of temoporfin (mTHPC) in nasopharyngeal carcinoma cells: comparison with hematoporphyrin derivative. *Cancer Lett.* **157,** 123–131 (2000).

45. Teiten, M., Marchal, S., D'Hallewin, MA., Guillemin, F. & Bezdetnaya, L. Primary photodamage sites and mitochondrial events after Foscan photosensitization of MCF-7 human breast cancer cells. *Photochem. Photobiol.* **78,** 9–14 (2003).

46. Kessel, D. & Castelli, M. Evidence that bcl-2 is the target of three photosensitizers that induce a rapid apoptotic response. *Photochem. Photobiol.* **74,** 318–322 (2001).

47. Reidy, K., Campanile, C., Muff, R., Born, W. & Fuchs, B. mTHPC-mediated photodynamic therapy is effective in the metastatic human 143B osteosarcoma cells. *Photochem. Photobiol.* **88,** 721–727 (2012).

48. Meier, D. *et al.* Foscan and foslip based photodynamic therapy in osteosarcoma in vitro and in intratibial mouse models. *Int. J. Cancer* **140,** 1680–1692 (2017).

49. Sasnauskiene, A., Kadziauskas, J., Vezelyte, N., Jonusiene, V. & Kirveliene, V. Apoptosis, autophagy and cell cycle arrest following photodamage to mitochondrial interior. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* **14,** 276–286 (2009).

50. Tran, N. *et al.* Correlation of photodynamic activity and fluorescence signaling for free and pegylated mTHPC in mesothelioma xenografts. *Lasers Surg. Med.* **39,** 237–244 (2007).

51. Garrier, J., Reshetov, V., Gräfe, S., Guillemin, F., Zorin, V. & Bezdetnaya, L. Factors affecting the selectivity of nanoparticle-based photoinduced damage in free and xenografted chorioallantoïc membrane model. *J. Drug Target.* (2013).

52. Reshetov, V., Zorin, V., Siupa, A., D'Hallewin, MA., Guillemin, F. & Bezdetnaya, L. Interaction of liposomal formulations of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (temoporfin) with serum proteins: protein binding and liposome destruction. *Photochem. Photobiol.* **88,** 1256–1264 (2012).

53. Triesscheijn, M., Ruevekamp, M., Out, R., Van Berkel, T., Schellens, J., Baas, P. & Stewart, F. The pharmacokinetic behavior of the photosensitizer meso-tetra-hydroxyphenyl-chlorin in mice and men. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **60,** 113–122 (2007).

54. Hopkinson, H., Vernon, D. & Brown, S. Identification and partial characterization of an unusual distribution of the photosensitizer meta-tetrahydroxyphenyl chlorin (temoporfin) in human plasma. *Photochem. Photobiol.* **69,** 482–488 (1999).

55. de Visscher, S. *et al.* Fluorescence Localization and Kinetics of mTHPC and Liposomal Formulations of mTHPC in the Window-Chamber Tumor Model. *Lasers Surg Med* **43,** 528–536 (2011).

56. Whelpton, R., Michael-Titus, A., Jamdar, R., Abdillahi, K. & Grahn, M. Distribution and excretion of radiolabeled temoporfin in a murine tumor model. *Photochem. Photobiol.* **63,** 885–891 (1996).

57. Ronn, A. *et al.* Comparative biodistribution of meta-Tetra(Hydroxyphenyl)chlorin in multiple species: clinical implications for photodynamic therapy. *Lasers Surg. Med.* **20,** 437–442 (1997).

58. Jones, H., Vernon, D. & Brown, S. Photodynamic therapy effect of m-THPC (Foscan) *in vivo*: correlation with pharmacokinetics. *Br. J. Cancer* **89,** 398–404 (2003).

59. Veenhuizen, R., Oppelaar, H., Ruevekamp, M., Schellens, J., Dalesio, O. & Stewart, F. Does tumour uptake of Foscan determine PDT efficacy? *Int. J. Cancer* **73,** 236–239 (1997).

60. Mitra, S., Maugain, E., Bolotine, L., Guillemin, F. & Foster, T. Temporally and spatially heterogeneous distribution of mTHPC in a murine tumor observed by two-color confocal fluorescence imaging and spectroscopy in a whole-mount model. *Photochem. Photobiol.* **81,** 1123–1130 (2005).

61. Wicki, A., Witzigmann, D., Balasubramanian, V. & Huwyler, J. Nanomedecine in cancer therapy: Challenges, opportunities and clinical applications. *J. Control Release.* **200,** 138–157 (2015).

62. Shi, J., Kantoff, P., Wooster, R. & Farokhzad, O. Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. *Nat. Rev. Cancer* **17,** 20–37 (2017).

63. Soliman, G., Redon, R., Sharma, A., Mejia, D., Maysinger, D. & Kakkar, A. Miktoarm star polymer based multifunctional traceable nanocarriers for efficient delivery of poorly water soluble pharmacological agents. *Macromol. Biosci.* **14,** 1312–1324 (2014).

64. Chen, X., Hui, L., Foster, D. & Drain, C. Efficient synthesis and photodynamic activity of porphyrin-saccharide conjugates: targeting and incapacitating cancer cells. *Biochemistry (Mosc.)* **43,** 10918–10929 (2004).

65. Suchaoin, W. & Bernkop-Schnürch, A. Nanocarriers protecting toward an intestinal pre-uptake metabolism. *Nanomed.* **12,** 255–269 (2017).

66. Muchow, M., Maincent, P. & Muller, R. Lipid nanoparticles with a solid matrix (SLN, NLC, LDC) for oral drug delivery. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **34,** 1394–1405 (2008).

67. Perera, G., Greindl, M., Palmberger, T. & Bernkop-Schnürch, A. Insulin-loaded poly(acrylic acid)-cysteine nanoparticles: Stability studies towards digestive enzymes of the intestine. *Drug Deliv.* **16,** 254–260 (2009).

68. Asem, H. *et al.* Development and biodistribution of a theranostic aluminum phthalocyanine nanophotosensitizer. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **13,** 48–57 (2016).

69. Hu, C. & Zhang, L. Therapeutic nanoparticles to combat cancer drug resistance. *Curr. Drug Metab.* **10,** 836–841 (2009).

70. Punfa, W., Suzuki, S., Pitchakarn, P., Yodkeeree, S., Naiki, T., Takahashi, S. & Limtrakul, P. Curcumin-loaded PLGA nanoparticles conjugated with anti-P-glycoprotein antibody to overcome multidrug resistance. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **15,** 9249–9258 (2014).

71. Soma, C., Dubernet, C., Bentolila, D., Benita, S. & Couvreur, P. Reversion of multidrug resistance by co-encapsulation of doxorubicin and cyclosporin A in polyalkylcyanoacrylate nanoparticles. *Biomaterials* **21,** 1–7 (2000).

72. Lu, H., Syu, W., Nishiyama, N., Kataoka, K. & Lai, P. Dendrimer phthalocyanine-encapsulated polymeric micelle-mediated photochemical internalization extends the efficacy of photodynamic therapy and overcomes drug-resistance *in vivo*. *J. Control. Release.* **155,** 458–464 (2011).

73. Mühleisen, L. *et al.* Analysis of Hypericin-Mediated Effects and Implications for Targeted Photodynamic Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **18,** (2017).

74. Li, Z. *et al.* Enhanced effect of photodynamic therapy in ovarian cancer using a nanoparticle drug delivery system. *Int. J. Oncol.* **47,** 1070–1076 (2015).

75. Nagy, J. & Dvorak, H. Heterogeneity of the tumor vasculature: the need for new tumor blood vessel type-specific targets. *Clin. Exp. Metastasis* **29,** 657–662 (2012).

76. Matsumura, Y. & Maeda, H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res.* **46,** 6387–92 (1986).

77. Millard, M., Yakavets, I., Zorin, V., Kulmukhamedova, A., Marchal. & Bezdetnaya, L. Drug delivery to solid tumors: the predictive value of the multicellular tumor spheroid model for nanomedicine screening. *Int. J. Nanomedicine* **12,** 7993–8007 (2017).

78. Fang, J., Nakamura, H. & Maeda, H. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **63,** 136–151 (2011).

79. Bertrand, N., Wu, J., Xu, X., Kamaly, N. & Farokhzad, O. Cancer Nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **66,** 2–25 (2014).

80. Maeda, H., Tsukigawa, K. & Fang, J. A Retrospective 30 Years After Discovery of the Enhanced Permeability and Retention Effect of Solid Tumors: Next-Generation Chemotherapeutics and Photodynamic Therapy-Problems, Solutions, and Prospects. *Microcirculation* **23,** 173–182 (2016).

81. Bae, Y. & Park, K. Targeted drug delivery to tumors: myths, reality and possibility. *J. Control. Release.* **153,** 198–205 (2011).

82. Gong, H. *et al.* Hyaluronidase To Enhance Nanoparticle-Based Photodynamic Tumor Therapy. *Nano Lett.* **16,** 2512–2521 (2016).

83. Zhou, Y. & Dai, Z. New Strategies in the Design of Nanomedicines to Oppose Uptake by the Mononuclear Phagocyte System and Enhance Cancer Therapeutic Efficacy. *Chem. Asian J.* (2018).

84. Tatar, A., Nagy-Simon, T., Tomuleasa, C., Boca, S. & Astilean, S. Nanomedicine approaches in acute lymphoblastic leukemia. *J. Control. Release.* **238,** 123–138 (2016).

85. van Elk, M. *et al.* Nanomedicines for advanced cancer treatments: Transitioning towards responsive system. *Int. J. Pharm.* **515,** 132–164 (2016).

86. Lin, G., Chen, S. & Mi, P. Nanoparticles Targeting and Remodeling Tumor Microenvironment for Cancer Theranostics. *J. Biomed. Nanotechnol.* **14,** 1189–1207 (2018).

87. Obaid, G., Chambrier, I., Cook, M. & Russell, D. Cancer targeting with biomolecules: a comparative study of photodynamic therapy efficacy using antibody or lectin conjugated phthalocyanine-PEG gold nanoparticles. *Photochem. Photobiol. Sci.* **14,** 737–747 (2015).

88. Kirpotin, D. *et al.* Antibody Targeting of Long-Circulating Lipidic Nanoparticles Does Not Increase Tumor Localization but Does Increase Internalization in Animal Models. *Cancer Res.* **66,** 6732–6740 (2006).

89. Wu, J., Feng, S., Liu, W., Gao, F. & Chen, Y. Targeting integrin-rich tumors with temoporfin-loaded vitamin-E -succinate-grafted chitosan oligosaccharide/D-a-tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate nanoparticles to enhance photodynamic therapy efficiency. *Int. J. Pharm.* **528,** 287–298 (2017).

90. Gosk, S., Moos, T., Gottstein, C. & Bendas, G. VCAM-1 directed immunoliposomes selectively target tumor vasculature in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* **1778,** 854–863 (2008).

91. Sahay, G., Kim, J., Kabanov, A. & Bronich, T. The exploitation of differential endocytic pathways in normal and tumor cells in the selective targeting of nanoparticulate chemotherapeutic agents. *Biomaterials* **31,** 923–933 (2010).

92. Rauch, C., Pluen, A., Foster, N., Loughna, P., Mobasheri, A., Lagadic-Gossman, D. & Counillon, L. On some aspects of the thermodynamic of membrane recycling mediated by fluid phase endocytosis: evaluation of published data and perspectives. *Cell Biochem. Biophys.* **56,** 73–90 (2010).

93. Sahay, G., Alakhova, D. & Kabanov, A. Endocytosis of nanomedicines. *J. Control. Release.* **145,** 182–195 (2010).

94. Kiew, L. *et al.* Near-infrared activatable phthalocyanine-poly-L-glutamic acid conjugate: increased cellular uptake and light-dark toxicity ratio toward an effective photodynamic cancer therapy. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **13,** 1447–1458 (2017).

95. Parton, R. & Simons, K. The multiple faces of caveolae. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8,** 185–194 (2007).

96. Nanbo, A., Kawanishi, E., Yoshida, R. & Yoshiyama, H. Exosomes derived from Epstein-Barr virus-infected cells are internalized via caveola-dependent endocytosis and promote phenotypic modulation in target cells. *J. Virol.* **87,** 10334–10347 (2013).

97. Bastien, E. *et al.* PAMAM G4.5-chlorin e6 dendrimeric nanoparticles for enhanced photodynamic effects. *Photochem. Photobiol. Sci.* **14,** 2203–2212 (2015).

98. Mayor, S., Parton, R. & Donaldson, J. Clathrin-independent pathways of endocytosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **6,** (2014).

99. Lamaze, C., Dujeancourt, A., Baba, T., Lo, C., Benmerah, A. & Dautry-Varsat, A. Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Mol. Cell* **7,** 661–671 (2001).

100. Ernsting, M., Murakami, M., Roy, A. & Li, S. Factors Controlling the Pharmacokinetics, Biodistribution and Intratumoral Penetration of Nanoparticles. *J. Control Release.* **172,** 782–794 (2013).

101. Agarwal, R., Jurney, P., Raythatha, M., Singh, V., Sreenivasan, S., Shi, L. & Roy, K. Effect of shape, size, and aspect ratio on nanoparticle penetration and distribution inside solid tissues using 3D spheroid models. *Adv. Healthc. Mater.* **4,** 2269–2280 (2015).

102. Cabral, H. *et al.* Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size. *Nat. Nanotechnol.* **6,** 815–823 (2011).

103. Lee, H., Fonge, H., Hoang, B., Reilly, R. & Allen, C. The effects of particle size and molecular targeting on the intratumoral and subcellular distribution of polymeric nanoparticles. *Mol. Pharm.* **7,** 1195–1208 (2010).

104. Dreher, M., Liu, W., Michelich, C., Dewhirst, M., Yuan, F. & Chilkoti, A. Tumor vascular permeability, accumulation, and penetration of macromolecular drug carriers. *J. Natl. Cancer Inst.* **98,** 335–344 (2006).

105. Mikhail, A., Eetezadi, S., Ekdawi, S., Stewart, J. & Allen, C. Image-based analysis of the size- and time-dependent penetration of polymeric micelles in multicellular tumor spheroids and tumor xenografts. *Int. J. Pharm.* **464,** 168–177 (2014).

106. Liu, D., Mori, A. & Huang, L. Role of liposome size and RES blockade in controlling biodistribution and tumor uptake of GM1-containing liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* **1104,** 95–101 (1992).

107. Li, S. & Huang, L. Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles. *Mol. Pharm.* **5,** 496–504 (2008).

108. Khaing Oo, M., Yang, Y., Hu, Y., Gomez, M., Du, H. & Wang, H. Gold nanoparticle-enhanced and size-dependent generation of reactive oxygen species from protoporphyrin IX. *ACS Nano* **6,** 1939–1947 (2012).

109. Wong, C. *et al.* Multistage nanoparticle delivery system for deep penetration into tumor tissue. *PNAS USA.* **108,** 2426–2431 (2011).

110. Truong, N., Whittaker, M., Mak, C. & Davis, T. The importance of nanoparticle shape in cancer drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* **12,** 129–142 (2015).

111. Chithrani, B., Ghazani, A. & Chan, W. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett.* **6,** 662–668 (2006).

112. Champion, J. & Mitragotri, S. Shape induced inhibition of phagocytosis of polymer particles. *Pharm. Res.* **26,** 244–249 (2009).

113. Dube, E., Oluwole, D., Nwaji, N. & Nyokong, T. Glycosylated zinc phthalocyanine-gold nanoparticle conjugates for photodynamic therapy: Effect of nanoparticle shape. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **203,** 85–95 (2018).

114. Ruggiero, A. *et al.* Paradoxical glomerular filtration of carbon nanotubes. *PNAS USA.* **107,** 12369–12374 (2010).

115. Chauhan, V., Popović, Z., Chen, O., Cui, J., Fukumura, D., Bawendi, M. & Jain, R. Fluorescent Nanorods and Nanospheres for Real-Time In Vivo Probing of Nanoparticle Shape-Dependent Tumor Penetration. *Angew. Chem. Int. Ed.* **50,** 11417–11420 (2012).

116. Geng, Y., Dalhaimer, P., Cai, S., Tsai, R., Tewari, M, Minko, T. & Discher, D. Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery. *Nat. Nanotechnol.* **2,** 249–255 (2007).

117. Stylianopoulos, T., Poh, M., Insin, N., Bawendi, M., Kukumura, D., Munn, L. & Jain, R. Diffusion of particles in the extracellular matrix: The effect of repulsive electrostatic interactions. *Biophys. J.* **99,** 1342–1349 (2010).

118. Lieleg, O., Baumgärtel, R. & Bausch, A. Selective filtering of particles by the extracellular matrix: an electrostatic bandpass. *Biophys. J.* **97,** 1569–1577 (2009).

119. Fröhlich, E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *Int. J. Nanomedecine* **7,** 5577–5591 (2012).

120. Cullis, P., Chonn, A. & Semple, S. Interactions of liposomes and lipid-based carrier systems with blood proteins: Relation to clearance behaviour *in vivo*. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **32,** 3–17 (1998).

121. Xiao, K. *et al.* The effect of surface charge on *in vivo* biodistribution of PEG-oligocholic acid based micellar nanoparticles. *Biomaterials* **32,** 3435–3446 (2011).

122. Levchenko, T., Rammohan, R., Lukyanov, A., Whiteman, K. & Torchilin, V. Liposome clearance in mice: the effect of a separate and combined presence of surface charge and polymer coating. *Int. J. Pharm.* **240,** 95–102 (2002).

123. Nomura, T., Koreeda, N., Yamashita, F., Takakura, Y. & Hashida, M. Effect of particle size and charge on the disposition of lipid carriers after intratumoral injection into tissue-isolated tumors. *Pharm. Res.* **15,** 128–132 (1998).

124. Xu, Q. *et al.* Impact of Surface Polyethylene Glycol (PEG) Density on Biodegradable Nanoparticle Transport in Mucus *ex vivo* and Distribution in vivo. *ACS Nano* **9,** 9217–9227 (2015).

125. Walkey, C., Olsen, J., Guo, H., Emili, A. & Chan, W. Nanoparticle size and surface chemistry determine serum protein adsorption and macrophage uptake. *J. Am. Chem. Soc.* **134,** 2139–2147 (2012).

126. Haimov, E., Weitman, H;, Polani, S., Schori, H., Zitoun, D. & Shefi, O. meso-Tetrahydroxyphenylchlorin-Conjugated Gold Nanoparticles as a Tool To Improve Photodynamic Therapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **10,** 2319–2327 (2018).

127. Compagnin, C. *et al.* The cellular uptake of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin entrapped in organically modified silica nanoparticles is mediated by serum proteins. *Nanotechnology* **20,** 345101 (2009).

128. Löw, K., Knobloch, T., Wagner, S., Wiehe, A., Engel, A., Langer, K. & von Briesen, H. Comparison of intracellular accumulation and cytotoxicity of free mTHPC and mTHPC-loaded PLGA nanoparticles in human colon carcinoma cells. *Nanotechnology* **22,** 245102 (2011).

129. Rojnik, M. *et al. In vitro* and *in vivo* characterization of temoporfin-loaded PEGylated PLGA nanoparticles for use in photodynamic therapy. *Nanomed.* **7,** 663–677 (2012).

130. Villa Nova, M. *et al.* Nanocarriers for photodynamic therapy-rational formulation design and medium-scale manufacture. *Int. J. Pharm.* **491,** 250–260 (2015).

131. Hussein, Y. & Youssry, M. Polymeric Micelles of Biodegradable Diblock Copolymers: Enhanced Encapsulation of Hydrophobic Drugs. *Mater. Basel Switz.* **11,** (2018).

132. Hofman, J., Carstens, M., van Zeeland, F., Helwig, C., Flesch, F., Hennink, W. & van Nostrum, C. Photocytotoxicity of mTHPC (temoporfin) loaded polymeric micelles mediated by lipase catalyzed degradation. *Pharm. Res.* **25,** 2065–2073 (2008).

133. Shieh, M., Peng, C., Chiang, W., Wang, C., Hsu, C., Wang, S. & Lai, P. Reduced skin photosensitivity with meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin-loaded micelles based on a poly(2-ethyl-2-oxazoline)-b-poly(d,l-lactide) diblock copolymer *in vivo*. *Mol. Pharm.* **7,** 1244–1253 (2010).

134. Syu, W. *et al.* Improved Photodynamic Cancer Treatment by Folate-Conjugated Polymeric Micelles in a KB Xenografted Animal Model. *Small* **14,** (2018).

135. Navarro, F. *et al.* Preparation and characterization of mTHPC-loaded solid lipid nanoparticles for photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol.* **130,** 161–169 (2014).

136. Brezaniova, I. *et al.* Temoporfin-loaded 1-tetradecanol-based thermoresponsive solid lipid nanoparticles for photodynamic therapy. *J. Control. Release.* **241,** 34–44 (2016).

137. Hinger, D., Navarro, F., Käch, A., Thomann, J., Mittler, F., Couffin, A. & Maake, C. Photoinduced effects of m‑tetrahydroxyphenylchlorin loaded lipid nanoemulsions on multicellular tumor spheroids. *J. Nanobiotechnology* **14,** 68 (2016).

138. Hinger, D. *et al.* Lipid nanoemulsions and liposomes improve photodynamic treatment efficacy and tolerance in CAL-33 tumor bearing nude mice. *J. Nanobiotechnology* **14,** 71 (2016).

139. Bozzuto, G. & Molinari, A. Liposomes as nanomedical devices. *Int. J. Nanomedicine* **10,** 975–999 (2015).

140. Kuntsche, J., Freisleben, I., Steiniger, F. & Fahr, A. Temoporfin-loaded liposomes: physicochemical characterization. *Eur. J. Pharm. Sci.* **40,** 305–315 (2010).

141. Reshetov, V., Kachatkou, D., Shmigol, T., D'Hallewin, MA., Guillemin, F. & Bezdetnaya, L. Redistribution of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (m-THPC) from conventional and PEGylated liposomes to biological substrates. *Photochem. Photobiol. Sci.* **10,** 911–919 (2011).

142. Decker, C., Steiniger, F. & Fahr, A. Transfer of a lipophilic drug (temoporfin) between small unilamellar liposomes and human plasma proteins: influence of membrane composition on vesicle integrity and release characteristics. *J. Liposome Res.* **23,** 154–165 (2013).

143. Holzschuh, S., Kaeß, K., Bossa, G., Decker, C., Fahr, A. & May, S. Investigations of the influence of liposome composition on vesicle stability and drug transfer in human plasma: a transfer study. *J. Liposome Res.* **28,** 22–34 (2018).

144. Reshetov, V. *et al.* Photodynamic therapy with conventional and PEGylated liposomal formulations of mTHPC (temoporfin): comparison of treatment efficacy and distribution characteristics in vivo. *Int. J. Nanomedecine* **8,** 3817–3831 (2013).

145. Scherphof, G. & Morselt, H. On the size-dependent disintegration of small unilamellar phosphatidylcholine vesicles in rat plasma. Evidence of complete loss of vesicle structure. *Biochem. J.* **221,** 423–429 (1984).

146. Svensson, J. *et al.* Tumor selectivity at short times following systemic administration of a liposomal temoporfin formulation in a murine tumor model. *Photochem. Photobiol.* **83,** 1211–1219 (2007).

147. Lassalle, H., Dumas, D., Gräfe, S., D'Hallewin, MA. & Bezdetnaya, L. Correlation between *in vivo* pharmacokinetics, intratumoral distribution and photodynamic efficiency of liposomal mTHPC. *J. Control. Release.* **134,** 118–124 (2009).

148. Buchholz, J. *et al.* Optimizing photodynamic therapy: *in vivo* pharmacokinetics of liposomal meta-(tetrahydroxyphenyl)chlorin in feline squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **11,** 7538–7544 (2005).

149. Xie, H. *et al.* Pharmacokinetic and biodistribution study following systemic administration of Fospeg®, a Pegylated liposomal mTHPC formulation in a murine model. *J. Biophotonics* **8,** 142–152 (2015).

150. Bovis, M., Woodhams, J., Loizidou, M., Scheglmann, D., Bown, S. & Macrobert, A. Improved *in vivo* delivery of m-THPC via pegylated liposomes for use in photodynamic therapy. *J. Control. Release.* **157,** 196–205 (2012).

151. Buchholz, J., Wergin, M., Walt, H., Gräfe, S., Bley, C. & Kaser-Hotz, B. Photodynamic therapy of feline cutaneous squamous cell carcinoma using a newly developed liposomal photosensitizer: preliminary results concerning drug safety and efficacy. *J. Vet. Intern. Med.* **21,** 770–775 (2007).

152. Pegaz, B. *et al.* Photothrombic activity of m-THPC-loaded liposomal formulations: pre-clinical assessment on chick chorioallantoic membrane model. *Eur. J. Pharm. Sci.* **28,** 134–140 (2006).

153. Trams, E., Lauter, C., Salem, N. & Heine, U. Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **645,** 63–70 (1981).

154. Johnstone, R., Adam, M., Hammond, J., Orr, L. & Turbide, C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J. Biol. Chem.* **262,** 9412–9420 (1987).

155. Raposo, G., Nijman, H., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C., Melief, C. & Geuze, H. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J. Exp. Med.* **183,** 1161–1172 (1996).

156. Théry, C., Boussac, M., Véron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Garin,J. & Amigorena, S. Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J. Immunol.* **166,** 7309–7318 (2001).

157. Bebelman, M., Smit, M., Pegtel, D. & Baglio, S. Biogenesis and function of extracellular vesicles in cancer. *Pharmacol. Ther.* (2018).

158. Juan, T. & Fürthauer, M. Biogenesis and function of ESCRT-dependent extracellular vesicles. *Semin. Cell Dev. Biol.* **74,** 66–77 (2018).

159. Kowal, J. *et al.* Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *PNAS USA.* **113,** E968-977 (2016).

160. Roucourt, B., Meeussen, S., Bao, J., Zimmermann, P. & David, G. Heparanase activates the syndecan-syntenin-ALIX exosome pathway. *Cell Res.* **25,** 412–428 (2015).

161. Ventimiglia, L. & Alonso, M. Biogenesis and Function of T Cell-Derived Exosomes. *Front. Cell Dev. Biol.* **4,** 84 (2016).

162. Ostrowski, M. *et al.* Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat. Cell Biol.* **12,** 19–30; sup pp 1-13 (2010).

163. Li, W., Hu, Y., Jiang, T., Han, Y., Han, G., Chen, J. & Li, X. Rab27A regulates exosome secretion from lung adenocarcinoma cells A549: involvement of EPI64. *APMIS.* **122,** 1080–1087 (2014).

164. Wang, Q. & Lu, Q. Plasma membrane-derived extracellular microvesicles mediate non-canonical intercellular NOTCH signaling. *Nat. Commun.* **8,** 709 (2017).

165. Bianco, F. *et al.* Acid sphingomyelinase activity triggers microparticle release from glial cells. *EMBO J.* **28,** 1043–1054 (2009).

166. García-Martínez, V., Montes, M., Villanueva, J., Gimenez-Molina, Y., de Toledo, G. & Gutiérrez, L. Sphingomyelin derivatives increase the frequency of microvesicle and granule fusion in chromaffin cells. *Neuroscience* **295,** 117–125 (2015).

167. Sedgwick, A. & D'Souza-Schorey, C. The biology of extracellular microvesicles. *Traffic* (2018).

168. Li, B., Antonyak, M., Zhang, J. & Cerione, R. RhoA triggers a specific signaling pathway that generates transforming microvesicles in cancer cells. *Oncogene* **31,** 4740–4749 (2012).

169. Bucki, R., Bachelot-Loza, C., Zachowski, A., Giraud, F. & Sulpice, J. Calcium induces phospholipid redistribution and microvesicle release in human erythrocyte membranes by independent pathways. *Biochemistry (Mosc.)* **37,** 15383–15391 (1998).

170. Lichtenauer, M. *et al.* Simulated temporary hypoxia triggers the release of CD31+/Annexin+ endothelial microparticles: A prospective pilot study in humans. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **61,** 83–90 (2015).

171. Carver, K. & Yang, D. N-Acetylcysteine Amide Protects Against Oxidative Stress-Induced Microparticle Release From Human Retinal Pigment Epithelial Cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **57,** 360–371 (2016).

172. Park, J. *et al.* Identification and characterization of proteins isolated from microvesicles derived from human lung cancer pleural effusions. *Proteomics* **13,** 2125–2134 (2013).

173. György, B. *et al.* Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell. Mol. Life Sci.* **68,** 2667–2688 (2011).

174. Horstman, L., Jy, W., Jimenez, J. & Ahn, Y. Endothelial microparticles as markers of endothelial dysfunction. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **9,** 1118–1135 (2004).

175. Wiklander, O. *et al.* Extracellular vesicle *in vivo* biodistribution is determined by cell source, route of administration and targeting. *J. Extracell. Vesicles* **4,** 26316 (2015).

176. Bovy, N. *et al.* Endothelial exosomes contribute to the antitumor response during breast cancer neoadjuvant chemotherapy via microRNA transfer. *Oncotarget* **6,** 10253–10266 (2015).

177. Colombo, M., Raposo, G. & Théry, C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **30,** 255–289 (2014).

178. Losito, I., Conte, E., Cataldi, T., Cioffi, N., Megli, F. & Palmisano, F. The phospholipidomic signatures of human blood microparticles, platelets and platelet-derived microparticles: a comparative HILIC-ESI-MS investigation. *Lipids* **50,** 71–84 (2015).

179. Dang, V., Jella, K., Ragheb, R., Denslow, N. & Alli, A. Lipidomic and proteomic analysis of exosomes from mouse cortical collecting duct cells. *FASEB J.* **31,** 5399–5408 (2017).

180. Skotland, T., Sandvig, K. & Llorente, A. Lipids in exosomes: Current knowledge and the way forward. *Prog. Lipid Res.* **66,** 30–41 (2017).

181. Hough, K. *et al.* Unique Lipid Signatures of Extracellular Vesicles from the Airways of Asthmatics. *Sci. Rep.* **8,** 10340 (2018).

182. Del Conde, I., Shrimpton, C., Thiagarajan, P. & López, J. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood* **106,** 1604–1611 (2005).

183. Ridder, K. *et al.* Extracellular Vesicle-Mediated Transfer of Genetic Information between the Hematopoietic System and the Brain in Response to Inflammation. *PLoS Biol.* **12,** (2014).

184. Laulagnier, K. *et al.* Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization. *Biochem. J.* **380,** 161–171 (2004).

185. Parolini, I. *et al.* Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *J. Biol. Chem.* **284,** 34211–34222 (2009).

186. Saunderson, S., Dunn, A., Crocker, P. & McLellan, A. CD169 mediates the capture of exosomes in spleen and lymph node. *Blood* **123,** 208–216 (2014).

187. Keerthikumar, S. *et al.* ExoCarta: A Web-Based Compendium of Exosomal Cargo. *J. Mol. Biol.* **428,** 688–692 (2016).

188. Keller, S., Sanderson, M., Stoeck, A. & Altevogt, P. Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. *Immunol. Lett.* **107,** 102–108 (2006).

189. Kalra, H. *et al.* Vesiclepedia: A Compendium for Extracellular Vesicles with Continuous Community Annotation. *PLoS Biol.* **10,** (2012).

190. Sun, Y. *et al.* Comparative Proteomic Analysis of Exosomes and Microvesicles in Human Saliva for Lung Cancer. *J. Proteome Res.* **17,** 1101–1107 (2018).

191. Haraszti, R. *et al.* High-resolution proteomic and lipidomic analysis of exosomes and microvesicles from different cell sources. *J. Extracell. Vesicles* **5,** 32570 (2016).

192. Balaj, L., Lessard, R., Dai, L., Cho, YJ., Pomeroy, S., Breakefield, X. & Skog, J. Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. *Nat. Commun.* **2,** 180 (2011).

193. Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. & Lötvall, J. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* **9,** 654–659 (2007).

194. Squadrito, M. *et al.* Endogenous RNAs modulate microRNA sorting to exosomes and transfer to acceptor cells. *Cell Rep.* **8,** 1432–1446 (2014).

195. Koppers-Lalic, D. *et al.* Nontemplated nucleotide additions distinguish the small RNA composition in cells from exosomes. *Cell Rep.* **8,** 1649–1658 (2014).

196. Kahlert, C. *et al.* Identification of double-stranded genomic DNA spanning all chromosomes with mutated KRAS and p53 DNA in the serum exosomes of patients with pancreatic cancer. *J. Biol. Chem.* **289,** 3869–3875 (2014).

197. Svennerholm, K. *et al.* DNA Content in Extracellular Vesicles Isolated from Porcine Coronary Venous Blood Directly after Myocardial Ischemic Preconditioning. *PloS One* **11,** e0159105 (2016).

198. Théry, C., Duban, L., Segura, E., Véron, P., Lantz, O. & Amigorena, S. Indirect activation of naïve CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat. Immunol.* **3,** 1156–1162 (2002).

199. Ariza, M., Rivailler, P., Glaser, R., Chen, M. & Williams, M. Epstein-Barr virus encoded dUTPase containing exosomes modulate innate and adaptive immune responses in human dendritic cells and peripheral blood mononuclear cells. *PloS One* **8,** e69827 (2013).

200. Hedlund, M., Nagaeva, O., Kargl, D., Baranov, V. & Mincheva-Nilsson, L. Thermal- and oxidative stress causes enhanced release of NKG2D ligand-bearing immunosuppressive exosomes in leukemia/lymphoma T and B cells. *PloS One* **6,** e16899 (2011).

201. Jang, J., Lee, J., Jeon, Y. & Kim, C. Exosome derived from epigallocatechin gallate treated breast cancer cells suppresses tumor growth by inhibiting tumor-associated macrophage infiltration and M2 polarization. *BMC Cancer* **13,** 421 (2013).

202. Besse, B. *et al.* Dendritic cell-derived exosomes as maintenance immunotherapy after first line chemotherapy in NSCLC. *Oncoimmunology* **5,** e1071008 (2016).

203. Taverna, S. *et al.* Role of exosomes released by chronic myelogenous leukemia cells in angiogenesis. *Int. J. Cancer* **130,** 2033–2043 (2012).

204. Lawson, J., Dickman, C., MacLellan, S., Towle, R., Jabalee, J., Lam, S. & Garnis, C. Selective secretion of microRNAs from lung cancer cells via extracellular vesicles promotes CAMK1D-mediated tube formation in endothelial cells. *Oncotarget* **8,** 83913–83924 (2017).

205. Al-Nedawi, K., Meehan, B., Micallef, J., Lhotak, V., May, L., Guha, A. & Rak J. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat. Cell Biol.* **10,** 619–624 (2008).

206. Hsu, Y. *et al.* Hypoxic lung cancer-secreted exosomal miR-23a increased angiogenesis and vascular permeability by targeting prolyl hydroxylase and tight junction protein ZO-1. *Oncogene* **36,** 4929–4942 (2017).

207. Camussi, G., Deregibus, M. & Tetta, C. Paracrine/endocrine mechanism of stem cells on kidney repair: role of microvesicle-mediated transfer of genetic information. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **19,** 7–12 (2010).

208. Gutzeit, C. *et al.* Exosomes derived from Burkitt's lymphoma cell lines induce proliferation, differentiation, and class-switch recombination in B cells. *J. Immunol.* **192,** 5852–5862 (2014).

209. Rodrigues, C. *et al.* Stroma-derived IL-6, G-CSF and Activin-A mediated dedifferentiation of lung carcinoma cells into cancer stem cells. *Sci. Rep.* **8,** 11573 (2018).

210. Shabbir, A., Cox, A., Rodriguez-Menocal, L., Salgado, M. & Van Badiavas, E. Mesenchymal Stem Cell Exosomes Induce Proliferation and Migration of Normal and Chronic Wound Fibroblasts, and Enhance Angiogenesis *In Vitro*. *Stem Cells Dev.* **24,** 1635–1647 (2015).

211. Baj-Krzyworzeka, M. *et al.* Platelet-derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells. *Exp. Hematol.* **30,** 450–459 (2002).

212. Xiao, H. *et al.* Mast cell exosomes promote lung adenocarcinoma cell proliferation - role of KIT-stem cell factor signaling. *Cell Commun. Signal.* **12,** 64 (2014).

213. Di Vizio, D. *et al.* Large Oncosomes in Human Prostate Cancer Tissues and in the Circulation of Mice with Metastatic Disease. *Am. J. Pathol.* **181,** 1573–1584 (2012).

214. Hood, J., San, R. & Wickline, S. Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis. *Cancer Res.* **71,** 3792–3801 (2011).

215. Janowska-Wieczorek, A., Marquez-Curtis, L., Wysoczynski, M. & Ratajczak, M. Enhancing effect of platelet-derived microvesicles on the invasive potential of breast cancer cells. *Transfusion* **46,** 1199–1209 (2006).

216. Arslan, F. *et al.* Mesenchymal stem cell-derived exosomes increase ATP levels, decrease oxidative stress and activate PI3K/Akt pathway to enhance myocardial viability and prevent adverse remodeling after myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res.* **10,** 301–312 (2013).

217. Riches, A., Campbell, E., Borger, E. & Powis, S. Regulation of exosome release from mammary epithelial and breast cancer cells - a new regulatory pathway. *Eur. J. Cancer* **50,** 1025–1034 (2014).

218. Cazzoli, R., Buttitta, F., Di Nicola, M, Malatesta, S., Marchetti, A., Rom, W. & Pass, H. microRNAs derived from circulating exosomes as noninvasive biomarkers for screening and diagnosing lung cancer. *J. Thorac. Oncol.* **8,** 1156–1162 (2013).

219. Smalley, D., Sheman, N., Nelson, K. & Theodorescu, D. Isolation and identification of potential urinary microparticle biomarkers of bladder cancer. *J. Proteome Res.* **7,** 2088–2096 (2008).

220. Nilsson, J., Skog, J., Nordstrand, A., Baranov, V., Mincheva-Nilsson, L., Breakefield, X. & Widmark, A. Prostate cancer-derived urine exosomes: a novel approach to biomarkers for prostate cancer. *Br. J. Cancer* **100,** 1603–1607 (2009).

221. Brady, J. *et al.* A Preliminary Proteomic Investigation of Circulating Exosomes and Discovery of Biomarkers Associated with the Progression of Osteosarcoma in a Clinical Model of Spontaneous Disease. *Transl. Oncol.* **11,** 1137–1146 (2018).

222. Taylor, D. & Gercel-Taylor, C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* **110,** 13–21 (2008).

223. Runz, S. *et al.* Malignant ascites-derived exosomes of ovarian carcinoma patients contain CD24 and EpCAM. *Gynecol. Oncol.* **107,** 563–571 (2007).

224. Beckham, C. *et al.* Bladder cancer exosomes contain EDIL-3/Del1 and facilitate cancer progression. *J. Urol.* **192,** 583–592 (2014).

225. Berrondo, C. *et al.* Expression of the Long Non-Coding RNA HOTAIR Correlates with Disease Progression in Bladder Cancer and Is Contained in Bladder Cancer Patient Urinary Exosomes. *PloS One* **11,** e0147236 (2016).

226. Zitvogel, L. *et al.* Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat. Med.* **4,** 594–600 (1998).

227. Damo, M., Wilson, D., Simeoni, E. & Hubbell, J. TLR-3 stimulation improves anti-tumor immunity elicited by dendritic cell exosome-based vaccines in a murine model of melanoma. *Sci. Rep.* **5,** (2015).

228. Lee, E. *et al.* Therapeutic effects of autologous tumor-derived nanovesicles on melanoma growth and metastasis. *PloS One* **7,** e33330 (2012).

229. Vader, P., Mol, E., Pasterkamp, G. & Schiffelers, R. Extracellular vesicles for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **106,** 148–156 (2016).

230. Fuhrmann, G., Serio, A., Mazo, M., Nair, R. & Stevens, M. Active loading into extracellular vesicles significantly improves the cellular uptake and photodynamic effect of porphyrins. *J. Control Release.* **205,** 35–44 (2015).

231. Lee, J. *et al.* Liposome-based engineering of cells to package hydrophobic compounds in membrane vesicles for tumor penetration. *Nano Lett.* **15,** 2938–2944 (2015).

232. Pascucci, L. *et al.* Paclitaxel is incorporated by mesenchymal stromal cells and released in exosomes that inhibit in vitro tumor growth: a new approach for drug delivery. *J. Control. Release.* **192,** 262–270 (2014).

233. Jang, S. *et al.* Bioinspired exosome-mimetic nanovesicles for targeted delivery of chemotherapeutics to malignant tumors. *ACS Nano* **7,** 7698–7710 (2013).

234. Mizrak, A. *et al.* Genetically engineered microvesicles carrying suicide mRNA/protein inhibit schwannoma tumor growth. *Mol. Ther.* **21,** 101–108 (2013).

235. Sun, D. *et al.* A novel nanoparticle drug delivery system: the anti-inflammatory activity of curcumin is enhanced when encapsulated in exosomes. *Mol. Ther.* **18,** 1606–1614 (2010).

236. Saari, H., Lázaro-Ibáñez, E., Viitala, T., Vuorimaa-Laukkanen, E., Siljander, P. & Yliperttula, M. Microvesicle- and exosome-mediated drug delivery enhances the cytotoxicity of Paclitaxel in autologous prostate cancer cells. *J. Control. Release.* **220,** 727–737 (2015).

237. Lamichhane, T. & Jay, S. Production of Extracellular Vesicles Loaded with Therapeutic Cargo. *Methods Mol. Biol.* **1831,** 37–47 (2018).

238. Yang, T. *et al.* Exosome delivered anticancer drugs across the blood-brain barrier for brain cancer therapy in Danio rerio. *Pharm. Res.* **32,** 2003–2014 (2015).

239. Alvarez-Erviti, L., Seow, Y., Yin, H., Betts, C., Lakhal, S. & Wood, M. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat. Biotechnol.* **29,** 341–345 (2011).

240. Kooijmans, S. *et al.* Electroporation-induced siRNA precipitation obscures the efficiency of siRNA loading into extracellular vesicles. *J. Control. Release.* **172,** 229–238 (2013).

241. Haney, M. *et al.* Exosomes as Drug Delivery Vehicles for Parkinson's Disease Therapy. *J. Control. Release.* **207,** 18–30 (2015).

242. Lamichhane, T. *et al.* Oncogene Knockdown via Active Loading of Small RNAs into Extracellular Vesicles by Sonication. *Cell. Mol. Bioeng.* **9,** 315–324 (2016).

243. Bosch, S. *et al.* Trehalose prevents aggregation of exosomes and cryodamage. *Sci. Rep.* **6,** 36162 (2016).

244. Bei, Y. *et al.* Extracellular Vesicles in Cardiovascular Theranostics. *Theranostics* **7,** 4168–4182 (2017).

245. Verma, M., Lam, T., Hebert, E. & Divi, R. Extracellular vesicles: potential applications in cancer diagnosis, prognosis, and epidemiology. *BMC Clin. Pathol.* **15,** 1–9 (2015).

246. Zhang, Y. *et al.* Microvesicle-mediated delivery of transforming growth factor β1 siRNA for the suppression of tumor growth in mice. *Biomaterials* **35,** 4390–4400 (2014).

247. Tian, Y. *et al.* A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy. *Biomaterials* **35,** 2383–2390 (2014).

248. Aspe, J, Diaz Osterman, C., Jutzy, J., Deshields, S., Whang, S & Wall, N. Enhancement of Gemcitabine sensitivity in pancreatic adenocarcinoma by novel exosome-mediated delivery of the Survivin-T34A mutant. *J. Extracell. Vesicles* **3,** (2014).

249. Tang, K. *et al.* Delivery of chemotherapeutic drugs in tumour cell-derived microparticles. *Nat. Commun.* **3,** 1282 (2012).

250. Chang, H. & Yeh, M. Clinical development of liposome-based drugs: formulation, characterization, and therapeutic efficacy. *Int. J. Nanomedicine* **7,** 49–60 (2012).

251. Iessi, E. *et al.* Acridine Orange/exosomes increase the delivery and the effectiveness of Acridine Orange in human melanoma cells: A new prototype for theranostics of tumors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **32,** 648–657 (2017).

252. Silva, A. *et al.* Magnetic and Photoresponsive Theranosomes: Translating Cell-Released Vesicles into Smart Nanovectors for Cancer Therapy. *ACS Nano* **7,** 4954–4966 (2013).

253. Silva, A. *et al.* Combining magnetic nanoparticles with cell derived microvesicles for drug loading and targeting. *Nanomedecine* **11,** 645–655 (2015).

254. Piffoux, M., Silva, A. K. A., Wilhelm, C., Gazeau, F. & Tareste, D. Modification of Extracellular Vesicles by Fusion with Liposomes for the Design of Personalized Biogenic Drug Delivery Systems. *ACS Nano* **12,** 6830–6842 (2018).

255. Weiswald, L., Bellet, D. & Dangles-Marie, V. Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia* **17,** 1–15 (2015).

256. Sutherland, R. Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science* **240,** 177–184 (1988).

257. Perche, F. & Torchilin, V. Cancer cell spheroids as a model to evaluate chemotherapy protocols. *Cancer Biol. Ther.* **13,** 1205–1213 (2012).

258. Madsen, S., Sun, C., Tromberg, B., Cristini, V., De Magalhães, N. & Hirschberg, H. Multicell tumor spheroids in photodynamic therapy. *Lasers Surg Med* **38,** 555–564 (2006).

259. Foster, T., Hartley, D., Nichols, M. & Hilf, R. Fluence rate effects in photodynamic therapy of multicell tumor spheroids. *Cancer Res.* **53,** 1249–1254 (1993).

260. Coutier, S., Mitra, S., Bezdetnaya, L., Parache, R., Georgakoudi, I., Foster, T. & Guillemin, F. Effects of Fluence Rate on Cell Survival and Photobleaching in MetaTetra-(hydroxyphenyl)chlorin-photosensitized Colo 26 Multicell Tumor Spheroids. *Photochem. Photobiol.* **73,** 297–303 (2001).

261. Bressenot, A., Marchal, S., Bezdetnaya, L., Garrier, J., Guillemin, F. & Plénat, F. Assessment of apoptosis by immunohistochemistry to active caspase-3, active caspase-7, or cleaved PARP in monolayer cells and spheroid and subcutaneous xenografts of human carcinoma. *J. Histochem. Cytochem.* **57,** 289–300 (2009).

262. Yakavets, I. *et al.* The alteration of temoporfin distribution in multicellular tumor spheroids by β-cyclodextrins. *Int. J. Pharm.* **529,** 568–575 (2017).

263. Kostarelos, K., Emfietzoglou, D., Papakostas, A., Yang, W., Ballangrud, Ä. & Sgouros, G. Binding and interstitial penetration of liposomes within avascular tumor spheroids. *Int. J. Cancer* **112,** 713–722 (2004).

264. Solomon, M., Lemera, J. & D'Souza, G. Development of an in vitro tumor spheroid culture model amenable to high-throughput testing of potential anticancer nanotherapeutics. *J. Liposome Res.* **26,** 246–260 (2016).

265. Yakavets, I., Yankovsky, I., Bezdetnaya, L. & Zorin, V. Soret band shape indicates mTHPC distribution between β-cyclodextrins and serum proteins. *Dyes Pigments* **137,** 299–306 (2017).

266. Maas, S., Breakefield, X. & Weaver, A. Extracellular Vesicles: Unique Intercellular Delivery Vehicles. *Trends Cell Biol.* **27,** 172–188 (2017).

267. Triesscheijn, M., Ruevekamp, M., Aalders, M., Baas, P. & Stewart, F. A. Comparative Sensitivity of Microvascular Endothelial Cells, Fibroblasts and Tumor Cells after In Vitro Photodynamic Therapy with meso-Tetra-Hydroxyphenyl-Chlorin. *Photochem. Photobiol.* **80,** 236–241 (2004).

268. Gomer, C., Rucker, N. & Murphree, A. Differential cell photosensitivity following porphyrin photodynamic therapy. *Cancer Res.* **48,** 4539–4542 (1988).

269. Batzri, S. & Korn, E. Interaction of phospholipid vesicles with cells. Endocytosis and fusion as alternate mechanisms for the uptake of lipid-soluble and water-soluble molecules. *J. Cell Biol.* **66,** 621–634 (1975).

270. Peng, W., Samplonius, D., de Visscher, S., Roodenburg, J., Helfrich, W. & Witjes, M. Photochemical internalization (PCI)-mediated enhancement of bleomycin cytotoxicity by liposomal mTHPC formulations in human head and neck cancer cells. *Lasers Surg. Med.* **46,** 650–658 (2014).

271. Gaio, E., Scheglmann, D., Reddi, E. & Moret, F. Uptake and photo-toxicity of Foscan®, Foslip® and Fospeg® in multicellular tumor spheroids. *J. Photochem. Photobiol. B* **161,** 244–252 (2016).

272. Wen, S. *et al.* The Biodistribution and Immune Suppressive Effects of Breast Cancer-Derived Exosomes. *Cancer Res.* **76,** 6816–6827 (2016).

273. Morishita, M. *et al.* Quantitative analysis of tissue distribution of the B16BL6-derived exosomes using a streptavidin-lactadherin fusion protein and iodine-125-labeled biotin derivative after intravenous injection in mice. *J. Pharm. Sci.* **104,** 705–713 (2015).

274. Peinado, H. *et al.* Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat. Med.* **18,** 883–891 (2012).

275. Imai, T. *et al.* Macrophage-dependent clearance of systemically administered B16BL6-derived exosomes from the blood circulation in mice. *J. Extracell. Vesicles* **4,** (2015).

276. Takahashi, Y., Nishikawa, M., Shinotsuka, H., Matsui, Y., Ohara, S., Imai, T. & Takakura, Y. Visualization and *in vivo* tracking of the exosomes of murine melanoma B16-BL6 cells in mice after intravenous injection. *J. Biotechnol.* **165,** 77–84 (2013).

277. Hoshino, A. *et al.* Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* **527,** 329–335 (2015).

278. Van der Meel, R., Fens, M., Vader, P., Van Solinge, W., Eniola-Adefeso, O. & Schiffelers, R. Extracellular vesicles as drug delivery systems: Lessons from the liposome field. *J. Control Release.* **195,** 72–85 (2014).

279. Hernández-Caselles, T., Villalaín, J. & Gómez-Fernández, J. Influence of liposome charge and composition on their interaction with human blood serum proteins. *Mol. Cell. Biochem.* **120,** 119–126 (1993).

280. England, C. *et al.* Enhanced penetration into 3D cell culture using two and three layered gold nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* **8,** 3603–3617 (2013).

281. England, C., Huang, J., James, K., Zhang, G., Gobin, A. & Frieboes, H. Detection of Phosphatidylcholine-Coated Gold Nanoparticles in Orthotopic Pancreatic Adenocarcinoma using Hyperspectral Imaging. *PloS One* **10,** e0129172 (2015).

282. Bala, S. *et al.* Biodistribution and function of extracellular miRNA-155 in mice. *Sci. Rep.* **5,** 10721 (2015).

Production scientifique

Revue internationale avec comité de lecture

Millard M, Yakavets I, Piffoux M, Brun A, Gazeau F, Guigner JM, Jasnieswki J, Lassalle HP, Wilhelm C, Bezdetanaya L. "mTHPC-loaded extracellular vesicles outperform liposomal and free mTHPC formulations by an increased stability, drug delivery efficiency and cytotoxic effect in tridimensional model of tumors". 2018, *Drug delivery (en presse)*

Millard M, Yakavets I, Zorin V, Kulmukhamedova A, Marchal S, Bezdetanaya L. "Drug delivery to solid tumors: The predictive value of the multicellular tumor spheroid model for nanomedecine screening". 2017, *Int J Nanomedecine,* 12, 7993-8007.

Yakavets I, Yankovski I, **Millard M**, Lamy L, Lassalle HP, Wiehe A, Zorin V, Bezdetnaya L. "The alteration of temoporfin distribution in multicellular tumor spheroids by β-cyclodextrins". 2017, *Int J Pharm*, 529, 568-575.

Marchal S, El Hor A, **Millard M**, Gillon V, Bezdetnaya L. "Anticancer drug delivery: An uptake on clinically applied nanotherapeutics". 2015, *Drugs*, 75, 1601-1611.

Communications internationales

- Présentations orales

Millard M, Yakavets I, Piffoux M, Brun A, Gazeau F, Wilhelm C, Lassalle HP, Bezdetnaya L. "Natural nanocarriers-based mTHPC for the photodynamic therapy". 2018, International conference of Nanomedecine and Nanobiotechnologies, Rome, Italy.

Millard M, Yakavets I, Lassalle HP, Zorin V, **Bezdetnaya L**. "Nanoparticle-based mTHPC delivery in the photodynamic therapy of cancer". 2018, 5th International conference laser optics 2018, St-Petersbourg, Russia

Millard M, Marchal S, Kulmukhamedova A, Piffoux M, Gazeau F, Silva A, Wilhelm C, Bezdetnaya L. "Influence of mTHPC nanovectorisation by extracellular vesicles on the photodynamic therapy efficacy". 2017, 4th Annual Meeting SFNano 2017, Bordeaux, France.

Millard M, Yakavets I, Marchal S, Lassalle HP, Bezdetnaya B. "Influence of mTHPC liposomal distribution in multicellular spheroid on the photodynamic therapy efficacy". 2016, Congress of the French and Italian Photochemists and photobiologists, Bari, Italy.

- Présentations poster

Millard M, **Yakavets I**, Lassalle HP, Piffoux M, Gazeau F, Brun A, Bezdetnaya L. "mTHPC-loaded extracellular vesicles outperform liposomal mTHPC by an increased stability and photocytotoxicity effect". 2018, 7th congress of Fluorescence diagnosis and Photodynamic therapy, Moscou, Russia.

Millard M, Marchal S, Bezdetnaya L. “Benefit of using a tridimensional cell model to evaluate the cytotoxicity of two photoactivable molecule formulations”. 2017, DocSciLor 4ème edition, Nancy, France.

Communications nationales

- Présentations orales

Millard M, Marchal S, Piffoux M, Silva A, Bezdetanaya L. “Intérêt des microvésicules de mTHPC pour la thérapie photodynamique". 2017, 1ère journée scientifique du pôle scientifique Biologie, Médecine, Santé, Vandœuvre-lès-Nancy, France.

Millard M, Marchal S, Lassalle HP, Hupont S, Dumas D, Bezdetanaya L. "Utilisation du sphéroïde pour étudier l’influence de la diffusion de la mTHPC liposomale sur l’efficacité photodynamique". 2016, 3ème journée d’échanges sur la recherche en cancérologie en Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

Millard M, Marchal S, Bezdetnaya L. "Influence de la nanovectorisation de la mTHPC par des microvésicules dans le sphéroïde sur l’efficacité de la thérapie photodynamique". 2016, Journée de l’école doctorale BioSE, Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

Résumé

La thérapie photodynamique (PDT) est un traitement alternatif à la chirurgie en oncologie utilisant un photosensibilisateur (PS), la lumière visible et l'oxygène moléculaire. La méta-tétra(hydroxyphényl)chlorine (mTHPC) est l'un des PS de deuxième génération les plus utilisés en clinique en raison de son absorption dans le rouge lointain et d'un rendement quantique en $^1O_2$ élevé. De par sa nature hydrophobe, la mTHPC est partiellement agrégée dans la circulation sanguine diminuant sa biodistribution. Dans le but d'améliorer la sélectivité tumorale de la mTHPC, différentes stratégies de vectorisation ont été développées. La formulation liposomale de mTHPC non PEGylée (Foslip®) améliore la biodistribution ainsi que les propriétés pharmacocinétiques de la mTHPC. Cependant, une rapide destruction des liposomes en circulation ainsi qu'une rapide libération de la mTHPC sont des inconvénients majeurs. Une alternative possible est l'utilisation de vésicules extracellulaires (VE). Dérivées des cellules, les VE possèdent une stabilité naturelle dans la circulation sanguine et une capacité à transporter et délivrer leur contenu de manière spécifique aux cellules cancéreuses. Cette vectorisation est intéressante en PDT en raison d'une importante capacité d'encapsulation des porphyrines.
Le but de cette étude était d'évaluer l'intérêt des VE en tant que nanovecteur de la mTHPC dans divers modèles précliniques comparé au Foslip®.
Contrairement au Foslip®, l'intégrité membranaire des VE est conservée en présence de 20% de plasma. *In vitro*, les mTHPC-VE ont montré une internalisation cellulaire par un mécanisme actif d'endocytose. Dans un modèle cellulaire en 3D de sphéroïdes multicellulaires, les mTHPC-VE ont permis d'accroitre l'accumulation cellulaire, la diffusion au sein de ce modèle ainsi que l'efficacité PDT. *In vivo*, les mTHPC-VE apparaissent plus efficace au niveau PDT avec un retard de croissance tumorale significativement augmenté.
En conclusion, l'intégration de la mTHPC au sein des VE améliore l'efficacité PDT dans les différents modèles d'étude. Le suivi des mTHPC-VE à l'aide d'un traceur radioactif chez la souris ainsi que l'étude du ciblage de la vascularisation tumorale seront étudiés dans la suite du travail.

Mots clés : Thérapie photodynamique, mTHPC, vésicules extracellulaires, nanovectorisation, sphéroïdes multicellulaires

Abstract

Photodynamic therapy (PDT) is an alternative treatment to surgery in oncology using photosensitizer (PS), light and oxygen. Meta-tetra(hydroxylphenyl)chlorin (mTHPC) is one of the most used PS in clinics due to its high absorption in the deep red and high $^1O_2$ quantum yield. In order to improve the mTHPC tumor selectivity different attempts of nanovectorisation were conducted. Non-PEGylated liposomal mTHPC (Foslip®) increase biodistribution and pharmacokinetic properties. However, the rapid liposome destruction during circulation and rapid mTHPC release are obvious shortcomings. Alternatively, mTHPC vectorization could be realized by extracellular vesicles (EVs). Derived from the cell, EVs possess a natural stability in bloodstream and ability to transport and deliver cargo molecules into cancer cells. This formulation is interesting for PDT due to the ability to encapsulate porphyrins.
The aim of the present study was to determine the interest of EVs as mTHPC nanocarriers in various preclinical models compared to Foslip®.
In contrast to Foslip®, membrane integrity of mTHPC-EVs was conserved in 20% of plasma. *In vitro*, mTHPC-EVs showed cellular internalization by an active endocytosis mechanism. In a 3D model of spheroids, mTHPC-EVs have improved cellular uptake, better diffusion inside spheroid and increased PDT efficacy. *In vivo*, mTHPC-EVs appeared to be more potent in terms of PDT efficacy, with a tumor growth delay significantly higher.
In conclusion, integration of mTHPC in EVs improves PDT efficacy in various preclinical models. The tracking of mTHPC-EVs using a radioactive tracer in xenografted rodents as well as the study of vascularization targeting will be studied in the next step of this work.

Keywords : Photodynamic therapy, mTHPC, extracellular vesicles, nanovectorization, multicellular spheroids