

**THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Soutenue publiquement le 17 octobre 2022
Par Mme BOIDIN Léa**

**Évaluation *in vivo* de l'impact anti-tumoral et immuno-stimulant
d'une Thérapie Photodynamique innovante ciblant le Récepteur Alpha
aux Folates (FR α) dans un modèle murin humanisé (SCID-Hu) de
carcinose péritonéale ovarienne**

Membres du jury :

Président : **Professeur Delphine ALLORGE,**
Professeur des Universités, Faculté de
Pharmacie, Lille, Praticien Hospitalier,
CHRU, Lille

Directeur, conseiller de thèse : **Professeur Nadira DELHEM,**
Professeur des Universités,
Faculté de Sciences et Technologiques, Lille

Assesseur(s) : **Professeur Christophe CARNOY,**
Professeur des Universités, Faculté de
Pharmacie, Lille

Docteur Alexandre QUILBE,
PharmD, PhD
Expert Scientifique Régional (Amgen)

Docteur Stephane GIRAUD,
Directeur scientifique de C3D (Centre de
Découverte et de Développement du
médicament) et de la plateforme 3DONCO
(Organoïdes), Centre de Recherche en
Cancérologie de Lyon (CRCL), Lyon

Faculté de Pharmacie de Lille
3 Rue du Professeur Laguesse – 59000 Lille
03 20 96 40 40
<https://pharmacie.univ-lille.fr>

Université de Lille

Président
Premier Vice-président
Vice-présidente Formation
Vice-président Recherche
Vice-présidente Réseaux internationaux et européens
Vice-président Ressources humaines
Directrice Générale des Services

Régis BORDET
Etienne PEYRAT
Christel BEAUCOURT
Olivier COLOT
Kathleen O'CONNOR
Jérôme FONCEL
Marie-Dominique SAVINA

UFR3S

Doyen
Premier Vice-Doyen
Vice-Doyen Recherche
Vice-Doyen Finances et Patrimoine
Vice-Doyen Coordination pluriprofessionnelle et Formations sanitaires
Vice-Doyen RH, SI et Qualité
Vice-Doyenne Formation tout au long de la vie
Vice-Doyen Territoires-Partenariats
Vice-Doyenne Vie de Campus
Vice-Doyen International et Communication
Vice-Doyen étudiant

Dominique LACROIX
Guillaume PENEL
Éric BOULANGER
Damien CUNY
Sébastien D'HARANCY
Hervé HUBERT
Caroline LANIER
Thomas MORGENROTH
Claire PINÇON
Vincent SOBANSKI
Dorian QUINZAIN

Faculté de Pharmacie

Doyen
Premier Assesseur et Assesseur en charge des études
Assesseur aux Ressources et Personnels
Assesseur à la Santé et à l'Accompagnement
Assesseur à la Vie de la Faculté
Responsable des Services
Représentant étudiant

Delphine ALLORGE
Benjamin BERTIN
Stéphanie DELBAERE
Anne GARAT
Emmanuelle LIPKA
Cyrille PORTA
Honoré GUISE

Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers (PU-PH)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie et Santé publique	81
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie	82
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81
M.	DINE	Thierry	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie	82
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie - Virologie	82
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	ODOU	Pascal	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	POULAIN	Stéphanie	Hématologie	82
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	STAELS	Bart	Biologie cellulaire	82

Professeurs des Universités (PU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Biophysique - RMN	85
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle	85
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie	87
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	CHAVATTE	Philippe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences végétales et fongiques	87
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques	87
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Biophysique - RMN	85
Mme	DEPREZ	Rebecca	Chimie thérapeutique	86
M.	DEPREZ	Benoît	Chimie bioinorganique	85
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques	87

M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie	86
M.	ELATI	Mohamed	Biomathématiques	27
M.	FOLIGNÉ	Benoît	Bactériologie - Virologie	87
Mme	FOULON	Catherine	Chimie analytique	85
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie et Santé publique	86
M.	GOOSSENS	Jean-François	Chimie analytique	85
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie	86
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique	86
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques	26
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie cellulaire	87
Mme	LESTRELIN	Réjane	Biologie cellulaire	87
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie physique	85
M.	MILLET	Régis	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	MUHR-TAILLEUX	Anne	Biochimie	87
Mme	PERROY	Anne-Catherine	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	ROMOND	Marie-Bénédicte	Bactériologie - Virologie	87
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie	86
M.	SERGHERAERT	Éric	Droit et Economie pharmaceutique	86
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie industrielle	85
M.	WILLAND	Nicolas	Chimie organique	86

Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers (MCU-PH)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	BLONDIAUX	Nicolas	Bactériologie - Virologie	82
Mme	DEMARET	Julie	Immunologie	82
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie et Santé publique	81
Mme	GENAY	Stéphanie	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81
M.	LANNOY	Damien	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80

Mme	ODOU	Marie-Françoise	Bactériologie - Virologie	82
-----	------	-----------------	---------------------------	----

Maitres de Conférences des Universités (MCU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	AGOURIDAS	Laurence	Chimie thérapeutique	85
Mme	ALIOUAT	Cécile-Marie	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	ANTHÉRIEU	Sébastien	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie	87
M.	BANTUBUNGI-BLUM	Kadiombo	Biologie cellulaire	87
Mme	BARTHELEMY	Christine	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	85
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie - Virologie	87
M.	BELARBI	Karim-Ali	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	BERTHET	Jérôme	Biophysique - RMN	85
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie	87
M.	BOCHU	Christophe	Biophysique - RMN	85
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie	86
M.	BOSC	Damien	Chimie thérapeutique	86
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie	87
Mme	CARON-HOUDE	Sandrine	Biologie cellulaire	87
Mme	CARRIÉ	Hélène	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	CHARTON	Julie	Chimie organique	86
M.	CHEVALIER	Dany	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	DANEL	Cécile	Chimie analytique	85
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques	85
M.	DHIFLI	Wajdi	Biomathématiques	27
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire	87
M.	EL BAKALI	Jamal	Chimie thérapeutique	86

M.	FARCE	Amaury	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	FLIPO	Marion	Chimie organique	86
M.	FURMAN	Christophe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie	87
Mme	GOOSSENS	Laurence	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie	87
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques	26
Mme	HAMOUDI-BEN YELLES	Chérifa-Mounira	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie	86
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie	87
M.	KAMBIA KPAKPAGA	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	KARROUT	Younes	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie	87
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie analytique	85
Mme	LEHMANN	Hélène	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	LELEU	Natascha	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie analytique	85
Mme	LOINGEVILLE	Florence	Biomathématiques	26
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie	86
M.	MOREAU	Pierre-Arthur	Sciences végétales et fongiques	87
M.	MORGENROTH	Thomas	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques	85
M.	PIVA	Frank	Biochimie	85
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie et Santé publique	86
M.	POURCET	Benoît	Biochimie	87

M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques / Innovations pédagogiques	85
Mme	RAVEZ	Séverine	Chimie thérapeutique	86
Mme	RIVIÈRE	Céline	Pharmacognosie	86
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie	86
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie	87
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie - Virologie	87
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie	87
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Chimie organique	86
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques	87
M.	YOUS	Saïd	Chimie thérapeutique	86
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques	85

Professeurs certifiés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement
Mme	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	HUGES	Dominique	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeurs Associés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	DAO PHAN	Haï Pascal	Chimie thérapeutique	86
M.	DHANANI	Alban	Droit et Economie pharmaceutique	86

Maîtres de Conférences Associés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques	85
M.	DUFOSSEZ	François	Biomathématiques	85
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	85
M.	GILLOT	François	Droit et Economie pharmaceutique	86

M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	MITOUMBA	Fabrice	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	86
M.	PELLETIER	Franck	Droit et Economie pharmaceutique	86
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques	85

Assistants Hospitalo-Universitaire (AHU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	CUVELIER	Élodie	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	GRZYCH	Guillaume	Biochimie	82
Mme	LENSKI	Marie	Toxicologie et Santé publique	81
Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81

Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	GEORGE	Fanny	Bactériologie - Virologie / Immunologie	87
Mme	N'GUESSAN	Cécilia	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	RUEZ	Richard	Hématologie	87
M.	SAIED	Tarak	Biophysique - RMN	85
M.	SIEROCKI	Pierre	Chimie bioinorganique	85

Enseignant contractuel

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement
M.	MARTIN MENA	Anthony	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière

Faculté de Pharmacie de Lille

3 Rue du Professeur Laguesse – 59000 Lille
03 20 96 40 40
<https://pharmacie.univ-lille.fr>

L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.

À mes parents,
À mes sœurs,
À Claire,

Remerciements

Aux membres du jury,

Madame le Doyen Delphine Allorge,

Je suis honorée que vous ayez accepté de présider ce jury de Thèse et je tiens à vous en remercier. Veuillez trouver dans ce travail l'expression de mon profond respect.

Madame le Professeur Nadira Delhem,

Je tiens à vous exprimer ma profonde gratitude, tant votre soutien et votre bienveillance sont considérables. Je vous remercie aujourd'hui pour m'avoir accordé votre confiance dans ce projet. Merci pour votre temps et votre patience. Merci pour toute l'aide que vous m'avez apporté lors de la rédaction de ce manuscrit. J'espère être à la hauteur de vos attentes, que vous êtes fière de ce travail et que vous le serez du travail à venir.

Monsieur le Professeur Christophe Carnoy,

Veuillez accepter mes plus sincères remerciements pour avoir accepté de juger cette thèse. Je vous suis très reconnaissante de l'intérêt que vous avez bien voulu témoigner à ce sujet, par votre présence et j'espère que vous l'apprécierez.

Monsieur le Docteur Stéphane Giraud,

Je tiens à vous remercier chaleureusement pour m'avoir fait le grand plaisir d'accepter de juger cette thèse. Je garderai un excellent souvenir de mon premier stage en recherche à vos côtés au cours duquel j'ai énormément appris. Je souhaite à tous les futurs étudiants d'être encadré par quelqu'un comme vous au long de leur parcours. J'espère de tout cœur que vous apprécierez cette thèse.

Monsieur le Docteur Alexandre Quilbe,

Je suis très touchée que vous ayez accepté de siéger dans ce jury. Merci d'avoir pris de votre temps pour faire le déplacement. Je vous suis très reconnaissante d'avoir pris de mes nouvelles régulièrement et pour m'avoir conseillée au cours de cette période que vous connaissez bien. Sachez que votre parcours professionnel est pour moi un exemple.

Aux collaborateurs,

Je tiens à remercier le **Docteur Céline Frochot** avec qui j'ai le plaisir d'échanger et de travailler sur ce projet. Merci pour ton enthousiasme, ta gentillesse et ton dynamisme.

Aux membres de l'Unité,

Nadira, merci de m'avoir offert l'opportunité d'intégrer votre unité en me confiant ce projet formidable. Merci pour vos conseils et votre bienveillance. Merci de donner autant de votre personne pour chacun de vos étudiants. Merci de partager au quotidien votre expérience afin de nous faire progresser. Merci pour tout !

Olivier, merci pour ton encadrement, ton soutien, ta gentillesse et tes conseils avisés. Tu es toujours prêt à échanger, partager, discuter dans la bonne humeur et c'est une chance. Merci pour tes conseils tout au long de la rédaction de cette thèse.

Martha, quel bonheur de t'avoir rencontrée ! Tu es une personne intègre, sensible, courageuse, qui a des valeurs, souriante et qui trouvera toujours les mots pour te rassurer. Tu as été pour moi durant ces quelques mois, une maman, une amie, une collègue. Une vraie source d'inspiration ! Merci de m'avoir fait confiance pour continuer à porter ce projet après ton départ. Ce travail c'est aussi le tien, j'espère que tu seras fière de l'histoire racontée dans ce manuscrit. Je te souhaite le meilleur pour tes projets à venir tant personnels que professionnels !

Camille, mon alliée, mon amie, ma partenaire de filtration de plaque. Tu es pour moi une amie extraordinaire, d'un soutien sans faille. Nous voilà presque à mi-chemin d'une belle aventure que nous traversons ensemble, et je suis très heureuse de la partager avec toi. J'ai beaucoup de chance de t'avoir rencontrée... Merci de m'avoir écouté parler de cette thèse durant des heures, merci pour tes nombreux conseils et tout ce que tu m'apportes au quotidien. Sache que tu pourras toujours compter sur moi !

Anthony, Guillaume, Clément... le trio café ; Anthony, ta force et ta détermination sont remarquables. Tu es toujours prêt à m'apporter ton aide à n'importe quel moment de la journée (tout comme tu es d'ailleurs prêt à aller boire une bière... à n'importe quel moment de la journée) !! Je suis très heureuse d'avoir rencontré un ami comme toi. Tu ne peux qu'être fière de la personne que tu es devenue et du travail que tu t'apprêtes à présenter d'ici quelques mois. Je te souhaite d'ailleurs bon courage pour la rédaction ! **Guillaume**, ton intérêt et ton implication pour l'ensemble des projets du laboratoire sont plus qu'admirables. Merci de partager sans réserve ta vision des choses et d'être toujours de bons conseils. Merci d'être là pour répondre à mes nombreuses questions dès que tu me vois franchir le pas de la porte. Merci tout simplement pour tout ce que tu apportes à chacun des membres de l'unité. **Clément**, merci pour ton investissement dans le laboratoire et ta bonne humeur. C'est une chance et un plaisir de travailler avec toi ! **À vous 3**, merci d'être toujours présent lors de mon transfert de western blot !

Bertrand, merci pour ton accompagnement et ton encadrement qui me sont d'une aide précieuse. Je te remercie pour l'aide que tu as apporté durant toutes les manip de cette thèse. Merci pour la tolérance et la compréhension dont tu fais preuve dès que j'ai une conta.... Courage encore 2 ans à tenir...

Anne Sophie, merci pour ta disponibilité et ton extrême gentillesse. Je suis très heureuse d'intégrer OncoLille afin d'apprendre à te connaître davantage. Merci pour tes nombreux conseils durant la relecture de cette thèse qui m'ont été d'une aide précieuse.

À mes proches,

Mes parents, pour tout ce que vous m'apportez au quotidien. Maman, merci pour tes encouragements, ton écoute, tes conseils et ton réconfort durant toutes ces années d'études. Papa, merci d'être présent et me soutenir dans tout ce que j'entreprends. Maman, Papa, tout simplement merci d'avoir cru en moi, j'espère que vous serez fière de votre dernière fille.

Mes sœurs, pour tous les moments que l'on partage ensemble qui font de moi une petite sœur comblée. Claire, merci d'être une grande sœur aimante qui veille sur nous. Manon et Louise, merci pour vos conseils et votre réconfort durant ces années d'études que vous avez également traversées.

Mes grands-parents, pour chaque bon moment que l'on passe ensemble en famille.

Ma belle-famille et Mo, pour votre bonne humeur au quotidien. Votre présence et votre soutien comptent beaucoup pour moi.

Léa et Cloé, pour votre présence dans les bons comme dans les mauvais moments, pour votre soutien et votre amitié inconditionnelle. C'est une vraie chance de vous avoir à mes côtés depuis toutes ces années et c'est même l'une de mes plus grandes fiertés. Merci pour tous ces moments de rires aux éclats qui sont pour moi de vraies bouffées d'oxygène. Merci d'avoir toujours soutenu et réconforté votre bab's un peu stressé. Merci d'être vous et de croire en moi !

Mes pharmameufs, pour tous les moments inoubliables passés ensemble et les moments dont on ne se souvient plus C'est un réel bonheur d'avoir rencontré une telle équipe au cours de mes études. Merci d'avoir supporté votre glouton ronchon durant toutes ces années (et de le supporter encore). Les études se terminent mais une nouvelle vie commence pour nous, toujours ensemble !

Claire, pour ta présence à mes côtés, pour ton soutien indéfectible et pour avoir survécu à toutes mes crises de stress et de découragement. Partager ma vie avec toi est une chance immense et c'est ce qui me rend la plus heureuse. Ce parcours que l'on a en commun n'est pas toujours facile, il y a des hauts, des bas mais surtout des hauts tellement magnifiques ! Tu es là aujourd'hui pour clôturer ce chapitre avec moi et la semaine prochaine dans ce même amphi c'est également ton avenir qui s'écrit et j'en suis déjà tellement fière ! J'ai hâte de voir ce que donnera cette suite à tes côtés !

SOMMAIRE

Introduction - Données générales.....	21
I. Le cancer de l’ovaire	22
A. Epidémiologie	22
B. Facteurs de risques.....	23
C. Classification du cancer de l’ovaire	24
D. Diagnostic.....	26
E. Origine du cancer d’origine épithéliale de l’ovaire et évolution vers la carcinose péritonéale ovarienne	26
F. Prise en charge.....	30
1. Chirurgie	31
2. Chimiothérapie.....	32
3. Thérapie ciblée.....	33
i. <i>Bevacizumab</i>	33
ii. <i>PARPi</i>	33
II. Proposition d’une nouvelle stratégie thérapeutique : La Thérapie Photodynamique.....	35
A. Historique.....	35
B. Principe photophysique de la PDT	36
C. Mort des cellules cancéreuses en PDT	40
1. Toxicité directe	41
i. <i>Morts cellulaires conventionnelles</i>	41
ii. <i>Morts cellulaires non conventionnelles</i>	43
2. Toxicité indirecte	46
D. Les photosensibilisateurs	50
1. PS de 1 ^{ère} génération	51
2. PS de 2 ^{ème} génération	52
3. PS de 3 ^{ème} génération	55
E. Proposition de la PDT dans la prise en charge de la carcinose péritonéale.....	56
III. Le récepteur au folate une cible spécifique	59
A. L’acide folique	59
1. Définition	59
2. Apports nutritionnels.....	59
3. Structure chimique	60
B. Le transport des folates.....	61
1. Le transporteur de folates réduits (RFC).....	62
2. Le transporteur de folates couplés aux protons (PCFT).....	62
3. Le récepteur à l’acide folique (FR)	63
C. Implication de FR dans le développement du cancer	64
D. Nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant FR α	67
IV. Proposition d’un candidat médicament : PS de 3^{ème} génération couplé à l’acide folique	69
Expérimentation – Matériels & Méthodes.....	72
I. In vitro.....	73
A. Lignées cellulaires	73
B. Analyse transcriptomique.....	73
C. Western – Blot	74
D. Cytométrie de Flux.....	75
E. Immunofluorescence	76
F. Compétition avec acide folique.....	76
G. Protocole de PDT et évaluation de la viabilité cellulaire.....	77
II. In Vivo.....	77

A.	Lignée Cellulaire utilisée pour le développement du modèle murin	77
1.	Transfection de la Luciférase	78
2.	Protocole de PDT pour la lignée OVCAR3-Luc	78
B.	Modèle murin	79
1.	Protocole de PDT <i>in vivo</i>	79
2.	Isolement des PBMCs de donneurs sains.....	80
3.	Cytométrie de flux	80
4.	ELISA multiplex	80
III.	Analyse Statistique	81
Résultats		82
I.	In vitro	83
A.	Expression de la cible FRα	83
B.	Spécificité du PS^{AF} pour la cible	84
1.	Compétition avec l'acide folique	84
2.	Internalisation du PS ^{AF} en fonction de l'expression de FR α	85
C.	Sensibilité des lignées à la PDT	86
II.	In vivo	87
A.	Validation de l'expression de la luciférase	87
B.	Sensibilité de la lignée OVCAR3-Luc à la PDT	88
C.	Mise en place du modèle de souris SCID de carcinose péritonéale ovarienne	88
D.	Évaluation de la distribution du PS^{AF}	89
E.	Détermination des paramètres d'illumination	90
F.	Efficacité de la PDT et impact sur le système immunitaire dans un modèle de souris SCID	92
1.	Souris SCID - Non reconstituées	92
i.	<i>Évaluation de l'efficacité de la PDT</i>	92
ii.	<i>Évaluation de la sécrétion de cytokines après la PDT</i>	92
2.	Souris SCID - Reconstituées par l'injection de PBMC humaines.....	93
i.	<i>Évaluation de l'efficacité de la PDT</i>	93
ii.	<i>Évaluation des populations lymphocytaires induites</i>	94
iii.	<i>Évaluation de la sécrétion de cytokines après PDT</i>	96
Discussion		98
Conclusion générale - Perspectives		109

INDEX DES FIGURES

Figure 1: Incidence et mortalité selon le type de cancer chez la femme en 2020, tous âges confondus dans le monde.....	22
Figure 2: Incidence du cancer de l'ovaire dans le monde en 2020, tous âges confondus	23
Figure 3: Classification du cancer de l'ovaire.....	24
Figure 4: Structure du péritoine	27
Figure 5: Carcinose péritonéale	28
Figure 6: Développement des métastases péritonéales d'origine ovarienne	30
Figure 7: Principe des 2 composantes de la PDT	37
Figure 8: Diagramme de Jablonski	38
Figure 9: Réaction photochimique de type I.....	39
Figure 10: Réaction photochimique de type II.....	39
Figure 11: Relation entre le temps de demi- vie, la réactivité et le potentiel de diffusion des ERO.....	40
Figure 12: Effets des Espèces Réactives de l'Oxygène produites à la suite des réactions photochimiques : mort des cellules cancéreuses, dommages vasculaires, réaction inflammatoire et stimulation du système immunitaire	41
Figure 13: Induction d'une réaction inflammatoire locale par la thérapie photodynamique.....	48
Figure 14 : Profondeur de pénétration dans la peau des ondes lumineuses.....	50
Figure 15 : Molécules dérivées du noyau porphyrinique.....	51
Figure 16 : Structure du Porfimer sodium (Photofrin®).....	52
Figure 17: Synthèse du mTHPC, (Foscan®) à partir du mTHPP.....	53
Figure 18: Structure de la benzoporphyrine (Verteporfin, Visudyne®).....	54
Figure 19: Structure du 5-ALA (gauche) et de la PpIX (droite).....	55
Figure 20: Design des photosensibilisateurs de 3 ^{ème} génération : a) ciblage actif ; b) ciblage passif.....	56
Figure 21: Structure de l'acide folique (p-ABA, acide para-aminobenzoïque).....	60
Figure 22: Cycle du folate.....	61
Figure 23: Transport du folate dans les cellules via le transporteur de folates réduits (Reduced Folate Carrier - RFC), le transporteur de folates couplé aux protons (Proton Coupled Receptor - PCFT) et le récepteur de l'acide folique (Folate Receptor - FR)	62
Figure 24: Structure moléculaire de FR α liant l'acide folique.....	64
Figure 25: Voies d'internalisation du folate et sa participation au développement du cancer	65
Figure 26: ARN de FR α selon le type de cancer	66
Figure 27: Nombre d'articles publiés entre 2000 et 2021 portant sur FR α	67
Figure 28: Différentes possibilités de ciblage de FR α	69
Figure 29: structure du Pyro-PEG-FA	70
Figure 30: Analyse génique et protéique de l'expression de FR α par les cellules du cancer de l'ovaire OVCAR3 et SKOV3 et de fibrosarcome HT1080 (contrôle négatif).....	83
Figure 31: Évaluation de la spécificité du PS ^{AF} pour FR α sur les lignées OVCAR3, SKOV3 et HT1080.	84
Figure 32: Évaluation de l'internalisation du PS ^{AF} par les lignées OVCAR3, SKOV3 et HT1080.....	85
Figure 33: Évaluation de la sensibilité des lignées à la PDT traitées avec différentes concentrations et différentes doses de lumière.....	86
Figure 34: Validation de l'expression de la luciférase : vecteur pGEM-luc Numéro X65316	87
Figure 35: Évaluation de la viabilité cellulaire de la lignée OVCAR3-Luc 1h, 24h, 48h et 72h post-PDT	88
Figure 36: Développement du modèle de carcinose péritonéale ovarienne chez des souris SCID	89
Figure 37: Évaluation de la distribution du PS ^{AF} au niveau des différents organes dans le modèle de souris SCID par évaluation de l'intensité de fluorescence du PS ^{AF}	90
Figure 38: Détermination des paramètres d'illumination	91
Figure 39 : Évaluation de la régression tumorale après PDT sur un modèle de souris SCID de carcinose péritonéale d'origine ovarienne humaine.....	92
Figure 40: Évaluation de la sécrétion de cytokines après la PDT dans un modèle de souris SCID de carcinose péritonéale d'origine ovarienne humaine	93
Figure 41: Évaluation de la régression tumorale après PDT sur un modèle de souris SCID de carcinose péritonéale d'origine ovarienne humaine reconstituées par l'injection de PBMCs humaines	94
Figure 42: Évaluation de la réponse immune après PDT dans un modèle de souris SCID de carcinose péritonéale d'origine ovarienne humaine, reconstituées ou non par l'injection de PBMCs humaines.	95
Figure 43: Évaluation de la libération de cytokines après PDT dans un modèle de souris SCID de carcinose péritonéale d'origine ovarienne humaine, reconstituées ou non par l'injection de PBMCs humaines	96

INDEX DES TABLES

Tableau 1: Taux de survie du cancer de l'ovaire selon le stade et le type de tumeur	25
Tableau 2: Synthèse de l'ensemble des photosensibilisateurs ayant obtenu une Autorisation de Mise sur le Marché dans le traitement du cancer	56
Tableau 3: Synthèse de l'ensemble des essais cliniques utilisant la PDT dans la carcinose péritonéale d'origine ovarienne	58
Tableau 4: Liste des primers utilisés pour la RTqPCR	74

GLOSSAIRE

Fluence : Exprimée en J/cm^2 ($1J = 1Ws$). Il s'agit de l'énergie lumineuse (en Joules) délivrée par unité de surface (en cm^2). La fluence dépend donc de la puissance délivrée par la source lumineuse (en Watts), et de la durée d'exposition (en seconde).

Puissance : Quantité d'énergie par unité de temps fournie par un système à un autre. La puissance correspond donc à un débit d'énergie. Une puissance s'exprime généralement en Watts, i.e., en Joules par seconde.

Irradiance : Puissance d'un rayonnement électromagnétique frappant par unité de surface. Dans le système international d'unités, elle s'exprime en Watts par mètre carré (W/m^2 ou $W \cdot m^{-2}$).

LISTE DES ABREVIATIONS

A

AC: Anticorps
ADCC : Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
ADN: Acide DesoxyRibonucléique
ADNc : Acide DesoxyRibonucléique Complémentaire
AF : Acide Folique
AFP : Acide Folique couplé au Pyrophosphoribide
AIF : Apoptose Inducing Factor
AMM: Autorisation de mise sur le marché
ATP : Adénosine TriPhosphate
ARN : Acide Ribonucléique
AUC: Area Under the Curve

B

BPF : Bonnes pratiques de fabrications
BPL: Bonne pratiques de laboratoires
BRCA: BReast Cancer Antigen
BRCAmut : BReast Cancer Antigen Mutated

C

CA125 : Cancer Antigen 125
CAF : Cancer Associated Fibroblast
CDs: Cellules Dendritiques
CDC : Complement Dependent Cytotoxicity
CE50 : Concentration Efficace 50
CI: Confidence Interval

D

DHE : Dihématoporphyrine Ethers
DHF : Acide dihydrofolique
DMLA: Dégénérescence Maculaire liée à l'âge
DAMPs: Damage Associated Molecular Patterns

E

EMA: European Medicines Agency
EOC : Epithelial Ovarian Cancer
ERO: Espèces Réactives de l'Oxygène
ESGO: European Society of Gynaecological Oncology
ESMO: European Society for Medical Oncology

F

FDA : Food and Drug Administration
FIGO : Fédération Internationale des Gynécologues et Obstétriciens
FR : Folate Receptor

G

GPI : Glycophosphatidylinositol
GPX4: Glutathione peroxidase 4
GSH: Glutathion réduit

H

HIPEC: Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy
HGSOC : High Grade Serous Ovarian Cancer
HMGB1: High Mobility Group Box 1
Hp: Hématoporphyrine
HpD: Dérivés d'Hématoporphyrine
HR: Hazard Ratio
HR: Homologous Recombination
HRD: Homologous Recombination Deficiency
HSP: Heat Shock Protein

I

IFN γ : Interferon γ
IL: Interleukine
IP: Intraperitonéale
IV: Intraveineuse

M

MCI: Mort Cellulaire Immunogène
mTHPP : méso-tetra(hydroxyphenyl) porphyrine
mTHPC: méso-tetra(hydroxyphenyl) chlorine
MIP-2 : Macrophage Inflammatory Proteins-2

N

NK: Natural Killer
NAD $^{+}$: Nicotinamide Adénine Dinucléotide

O

OS : Overall Survival

P

PARP: poly(ADP-ribose) polymérase

PARPi : poly(ADP-ribose) polymérase
inhibitor

PCFT: Proton Coupled Folate Transporter

PDD : Thérapie Photodiagnostique

PDT: Thérapie Photodynamique

PFS : Progression-Free Survival

PNN : Polynucléaire Neutrophile

PpIX : Protoporphyrine IX

PRRs : Pattern Recognition Receptors

PS : Photosensibilisateur

PS^{AF} : Photosensibilisateur couplé à l'Acide
Folique

R

RFC : Reduced Folate Carrier

T

TCR : T Cell Receptor

TEM: Transition-Épithélio-Mésenchymateuse

THF : Tetrahydrofolate

TDLN : Tumor-Draining Lymph Nodes

TNF α : Tumor Necrosis Factor

V

VEGF-A : Vascular Growth Factor – Type A

AVANT-PROPOS

La première partie de ce manuscrit sera consacrée à la description de la physiopathologie du cancer de l’ovaire ainsi que sa prise en charge actuelle. Cette partie nous conduira à l’établissement d’un constat que ce cancer reste aujourd’hui une impasse thérapeutique considérant son évolution péritonéale. Ainsi, la prise en charge de la carcinose péritonéale d’origine ovarienne nécessite le développement de nouveaux médicaments conçus pour cibler et détruire les cellules tumorales résiduelles sans endommager les tissus sains.

Dans ce contexte et en réponse à ce besoin, ce travail de thèse est consacré à la proposition d’une nouvelle stratégie thérapeutique, la thérapie photodynamique (PDT) nécessitant l’utilisation d’un photosensibilisateur (PS) de longueur d’onde spécifique. Nous verrons comment et pourquoi cette nouvelle thérapie semble être un candidat idéal afin d’améliorer le pronostic des patientes.

Enfin, dans une dernière partie, je vous présenterai un travail original d’évaluation de l’efficacité de cette nouvelle stratégie thérapeutique utilisant un PS de 3^{ème} génération dans un modèle *in vitro* cellulaire de cancer ovarien ainsi qu’un modèle murin humanisé de carcinose péritonéale d’origine ovarienne.

Partie I :

Introduction - Données générales

I. Le cancer de l’ovaire

A. Epidémiologie

Le cancer est un problème majeur de santé publique. Il constitue en France la première cause de mortalité chez l’Homme devant les maladies cardiovasculaires. Aujourd’hui, un homme sur cinq et une femme sur six dans le monde développeront un cancer au cours de leur vie^[1]. Bien qu’il soit connu et décrit depuis l’Antiquité, le cancer reste une maladie difficile à traiter devant laquelle les médecins sont parfois contraints de constater leur impuissance. De nombreux travaux sont donc constamment conduits afin d’identifier de nouvelles thérapies capables de contrer ce mal qui ronge de plus en plus notre société. Le cancer de l’ovaire conserve une réputation redoutable parmi tous les cancers confondus puisqu’il est le 8^{ème} cancer le plus fréquent chez la femme (Figure 1, « Incidence »). À la différence du cancer du sein, il demeure relativement peu courant mais est en revanche un cancer d’une extrême gravité puisqu’il est le 7^{ème} cancer le plus meurtrier chez la femme ce qui en fait la 2^{ème} cause de mortalité par cancer gynécologique (derrière celui du col de l’utérus)^[2] (Figure 1, « Mortality »).

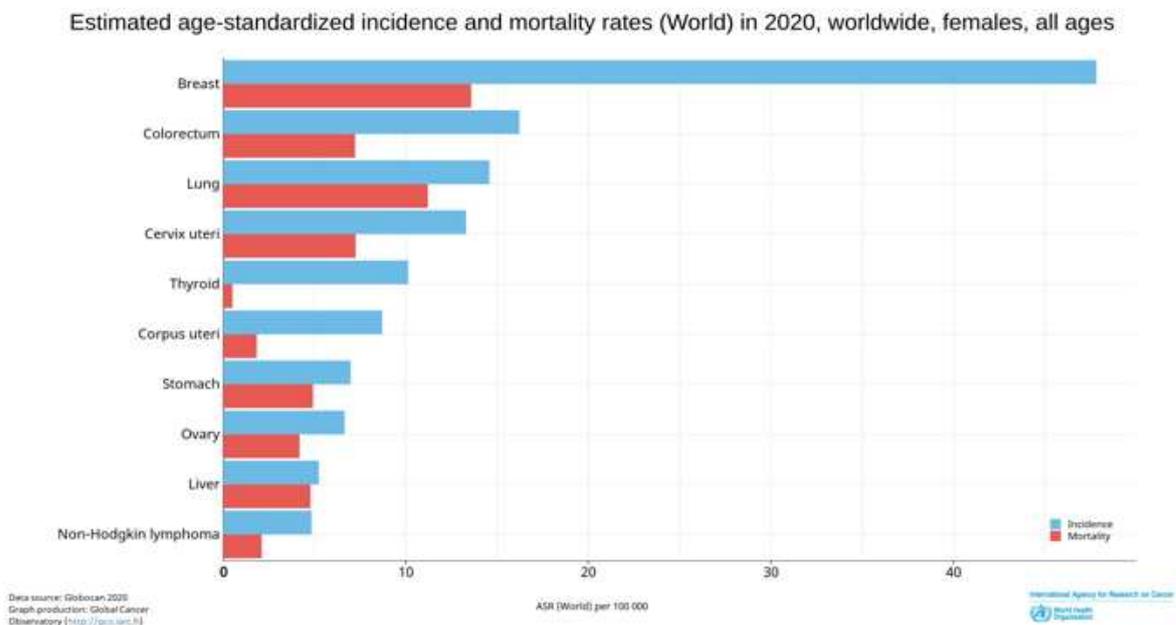


Figure 1: Incidence (en bleu) et mortalité (en rouge) selon le type de cancer chez la femme en 2020, tous âges confondus dans le monde (source : d’après Globocan – données de l’OMS 2020)

Sur 313 959 nouveaux cas de cancer de l’ovaire diagnostiqués en 2020 dans le monde, 207 252 femmes ont perdu la vie^[3]. La fréquence de ce cancer est également variable selon les régions du monde ainsi que selon l’origine ethnique (Figure 2). Le cancer de l’ovaire semble

présenter une forte incidence dans les zones industrialisées telles que l'Europe et l'Amérique du Nord. Cependant, il est bien plus mortel dans les populations ayant un accès précaire au système de santé (e.g., Afrique, Asie).

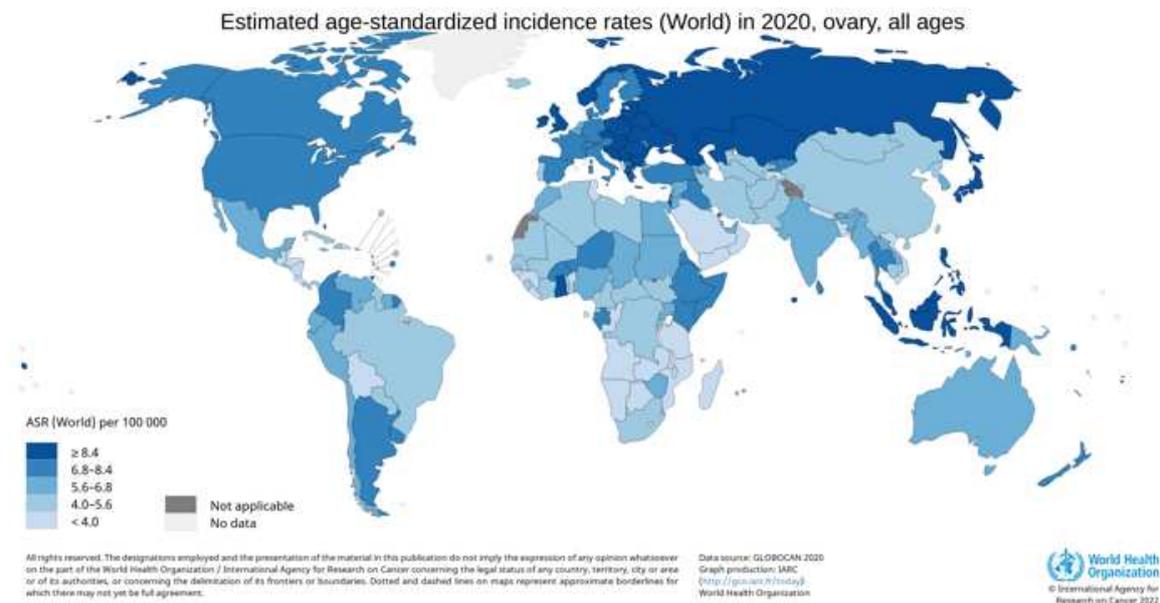


Figure 2: Incidence du cancer de l'ovaire dans le monde en 2020, tous âges confondus (source : d'après Globocan – données de l'OMS 2020)

B. Facteurs de risques

Plusieurs facteurs de risque ont été identifiés. Ils peuvent être d'ordre génétique (e.g., mutation BRCA1 / BRCA2, antécédents familiaux), démographique (e.g., l'âge) ou encore gynécologique (e.g., ménopause, nulliparité, infertilité, endométriose)^[4]. Au contraire des facteurs hormonaux tel que la multiparité, la gravidité ou encore la contraception ont été identifiés comme protecteur de l'apparition de ce cancer^[5]. L'alimentation, l'activité physique ainsi que la qualité de vie ont quant à eux été récemment décrits comme des facteurs de prédispositions. *M. Hada et al*, ont notamment observé que l'augmentation des métabolites d'acides gras pouvaient augmenter le risque d'apparition de ce cancer^[6]. Même si sa survenue reste sporadique dans la grande majorité des cas il est important de souligner que les antécédents familiaux ainsi que les mutations d'ordre génétique restent les facteurs de risque principaux. En effet, 15 à 25% des patientes diagnostiquées d'un cancer de l'ovaire sont atteintes de la mutation des gènes BRCA1 ou 2 (BRCAmut). Cependant, plusieurs études ont montré que les patientes BRCAmut vivront plus longtemps et répondront mieux à la chimiothérapie^[7].

C. Classification du cancer de l’ovaire

L’une des particularités de ce cancer repose sur ces divers sous-types histologiques qui diffèrent par leurs facteurs de risques, leur composition moléculaire, leurs modalités de traitement ainsi que leurs origines tissulaires^[8]. Ces origines tissulaires peuvent provenir : des cellules épithéliales (90% des cas diagnostiqués) ; des cellules stromales (5 à 6% des cas diagnostiqués) ; des cellules germinales (2 à 3% des cas diagnostiqués)^[9]. Cette origine tissulaire est également dépendante de l’âge de la patiente. Par exemple, le cancer d’origine épithéliale sera plutôt retrouvé chez la femme ménopausée contrairement à celui d’origine germinale plus fréquent chez les adolescentes ou encore au cancer d’origine stromale pouvant atteindre les femmes de tout âge^[8]. Le cancer d’origine épithéliale s’avère être le cancer de l’ovaire le plus agressif ; 97% d’entre eux sont dits non mucineux, les 3% restant sont dits mucineux (Figure 3). Les carcinomes non mucineux peuvent à leur tour être divisés/classifiés en carcinomes séreux, carcinomes endométrioïdes, carcinomes à cellules claires et enfin carcinomes d’origine non spécifiée représentant respectivement 70%, 10%, 15% et 5% des carcinomes non mucineux^[4].

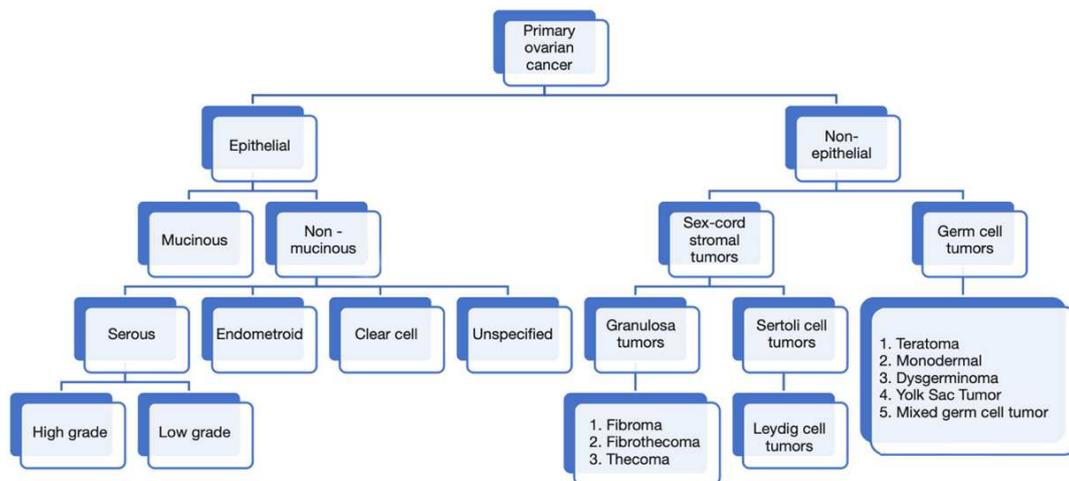


Figure 3: Classification du cancer de l’ovaire^[10]

Les différents stades du cancer de l’ovaire ont été énumérés par la Fédération Internationale des Gynécologues et Obstétriciens (FIGO) et dernièrement actualisés en 2014. Quatre stades ont été définis allant du confinement de la tumeur aux ovaires (stade I) jusqu’à l’extension de métastases au-delà du péritoine (stade IV) (Tableau 1).

Stage	International Federation of Gynecology and Obstetrics 2014 stage definitions	Five-year survival by tumor type (%)		
		Invasive epithelial	Stromal	Germ cell
I	Tumor limited to one or both ovaries Subcategories of stage I (A to C) are based on whether tumor is present in one or both ovaries, whether the ovarian capsule is intact, and whether there are malignant cells on the ovarian surface or in peritoneal washings or ascites.	92	95	96
II	Tumor involves one or both ovaries with pelvic extension Subcategories of stage II (A to C) are based on whether extension is into the uterus and/or fallopian tubes, to other pelvic tissues, and whether there are malignant cells in peritoneal washings or ascites.	73 to 78	78	78
III	Tumor involves one or both ovaries with metastasis outside the pelvis and/or regional lymph node metastasis Subcategories of stage III (A to C) are based on whether affected nodes are retroperitoneal, the extent of peritoneal metastases, and involvement of the spleen or liver.	39 to 59	65	65
IV	Distant metastases other than peritoneal metastases Subcategories of stage IV (A and B) are based on the presence of a pleural effusion and/or involvement of the liver, spleen, and lymph nodes outside the abdominal cavity.	17 to 28	35	35

Tableau 1: Taux de survie du cancer de l'ovaire selon le stade et le type de tumeur^[11]

Le cancer de l'ovaire d'origine épithéliale a longtemps été décrit comme le « tueur silencieux » en raison du caractère asymptomatique de la maladie dans les stades précoces. En effet, la plupart des symptômes sont plutôt de nature courante et non spécifique de sorte qu'ils ne soient pas souvent reconnus par les femmes et les médecins et apparaissent lorsque la maladie est déjà à un stade avancé. Il peut s'agir de douleurs abdominales et pelviennes, de troubles digestifs (e.g., constipation, diarrhée), d'une augmentation de la fréquence urinaire, de saignements vaginaux anormaux, de douleurs au niveau des organes génitaux, d'une perte de poids, de ballonnements abdominaux ou encore de fatigue^[12]. À titre d'exemple, sur une cohorte de 1725 patientes diagnostiquées d'un cancer de l'ovaire (dont 70% atteintes d'un stade III ou IV de la FIGO), 95% d'entre elles ont présenté des symptômes juste avant le diagnostic. Les symptômes les plus retrouvés étaient des douleurs pelviennes ou abdominales, de la fatigue ainsi que des troubles digestifs ou urinaires. De manière surprenante, les symptômes gynécologiques étaient les moins fréquents^[13]. La non-spécificité de ces symptômes qui peuvent être confondus avec ceux d'autres maladies bénignes telles que des pathologies gastrointestinales, génito-urinaires ou encore gynécologiques rend donc difficile leur attribution au cancer de l'ovaire et entraîne alors un retard de diagnostic dont l'âge médian de découverte est de 65 ans. En effet, 70% des nouveaux cas sont diagnostiqués à un stade avancé du cancer^[14] ; stade III ou IV de la FIGO correspondant à l'envahissement de la cavité péritonéale par des métastases ce qui rend leur pronostic sombre.

D. Diagnostic

En plus du caractère asymptomatique de la maladie dans les stades précoces, le retard de diagnostic du cancer de l'ovaire d'origine épithéliale est accentué par l'absence de méthodes de détections spécifiques et sensibles. L'évaluation diagnostic doit être guidée dans un premier temps par l'ensemble des symptômes que présente la patiente. Puis une classification des éventuels facteurs de risque ou de prédisposition ainsi que des antécédents familiaux et gynécologiques de la patiente devra être établie^[11]. Cet historique sera complété par un examen physique complet incluant un examen abdominal, la palpation des aires ganglionnaires et des touchers pelviens afin d'évaluer la présence ou non de masses pelviennes / abdominales et d'adénopathies. Cependant, cet examen physique présente une précision limitée, puisque la présence d'une masse peut passer inaperçue chez les patientes souffrant d'obésité ou encore peut être associée à une autre origine que le cancer (e.g., abcès, diverticule, kyste)^[15]. C'est pourquoi le bilan diagnostique est renforcé par une ultrasonographie transvaginale permettant d'analyser la morphologie de l'ovaire et sa vascularisation ainsi que la présence d'ascite. De plus, une numération de la formule sanguine ainsi que le dosage de biomarqueurs sont également demandés. L'antigène du cancer (CA) 125 est le plus couramment dosé dans le cancer de l'ovaire d'origine épithéliale. Cependant sa valeur diagnostic dépend du type de cancer et du stade de la maladie^[11]. En effet, 80% des patientes à un stade avancé présenteront une élévation de CA-125 alors que 50% des femmes atteintes d'un stade précoce seront concernées. De plus, ces taux peuvent varier également dans d'autres situations pathologiques non malignes (e.g., endométriose, maladie inflammatoire pelvienne) ou encore dans des situations physiologiques naturelles (e.g., ménopause, femme enceinte)^[16]. Enfin, c'est un marqueur non spécifique puisqu'il peut aussi être retrouvé anormalement élevé dans d'autres cancers tels que celui du pancréas^[17], de la vessie^[18], du sein^[19] ou du poumon métastatique^[20]. Le taux de CA-125 de la patiente doit donc être analysé avec précaution et se doit d'être associé à l'ensemble du tableau clinique de la patiente.

E. Origine du cancer d'origine épithéliale de l'ovaire et évolution vers la carcinose péritonéale ovarienne

Les cancers d'origine épithéliale (EOCs « Epithelial ovarian cancer ») représentent la majorité des cancers ovariens. Le carcinome séreux de l'ovaire de haut grade (HGSOC « High Grade Serous Ovarian Cancer ») en est la tumeur la plus courante puisqu'il représente près de

75% de tous les EOCs^[21]. Comme discuté dans le paragraphe précédent, il n'existe actuellement aucune méthode robuste pour une détection précoce de ce cancer. Par conséquent, la majorité des femmes diagnostiquées sont déjà atteinte d'un stade III ou IV c'est-à-dire lorsque le cancer s'est déjà métastasé dans d'autres tissus, telle que la cavité péritonéale^[2]. Le péritoine est un organe séreux d'origine mésodermique présentant à la fois des caractéristiques mésenchymateuses et épithéliales. Il est constitué d'une partie pariétale recouvrant la partie antérieure et postérieure de l'abdomen ainsi que les cavités pelviennes et d'une partie viscérale recouvrant les organes intra-abdominaux. Sa structure est divisée en 3 couches (Figure 4):

- **Le mésothélium** : une monocouche de cellules mésothéliales aplaties qui peuvent être de type squameuses ou cubiques se différenciant par leur ultrastructure. Les cellules squameuses contiennent peu de mitochondries, un appareil de golgi peu développé ainsi que peu de réticulum endoplasmique rugueux contrairement aux cellules cuboïdes qui en contiennent abondamment. Le côté luminal de ce mésothélium est recouvert par un tapis de microvillosités afin d'en augmenter la surface d'échange.
- **Une membrane basale** : située sous le mésothélium, c'est un mince réseau laminaire contenant du collagène, des protéoglycanes et des glycoprotéines lui conférant ainsi le rôle de barrière physique empêchant le passage de macromolécules dans le submésothélium.
- **Le submésothélium** : il est composé d'un vaste réseau de matrice extracellulaire, de vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi que différents types cellulaires (e.g., fibroblastes, macrophages et mastocytes).

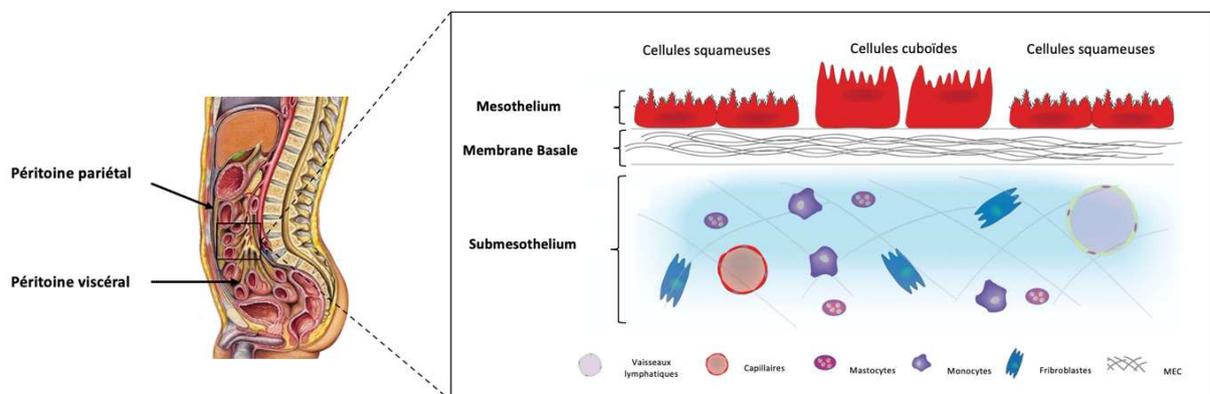


Figure 4: Structure du péritoine (d'après L. Lemoine et al.,^[22] et Larousse) (MEC, Matrice Extra Cellulaire)

Le péritoine présente diverses fonctions dont la principale est de réguler l'homéostasie intrapéritonéale de la cavité abdominale par l'échange de molécules et de fluides notamment grâce aux microvillosités présentes à la surface apicale des cellules mésothéliales. Avec sa surface glissante et non adhésive il constitue également la première ligne de défense anti-infectieuse. Enfin, il assure des fonctions de contrôle de l'inflammation et de réparation tissulaire. Plusieurs tumeurs malignes d'origine gastro-intestinale ou gynécologique ont le potentiel de se disséminer au sein de la cavité péritonéale, ce qui est souvent associé à une progression de la maladie et un mauvais pronostic. Cette dissémination est caractérisée par l'existence de petits dépôts tumoraux blanchâtres au sein de la cavité viscérale et péritonéale, la maladie évoluant alors en carcinose péritonéale^[23]. Cette condition est généralement retrouvée dans les EOC dont les stades III et IV énumérés par la FIGO correspondent à l'envahissement de cette séreuse par des métastases (Figure 5).

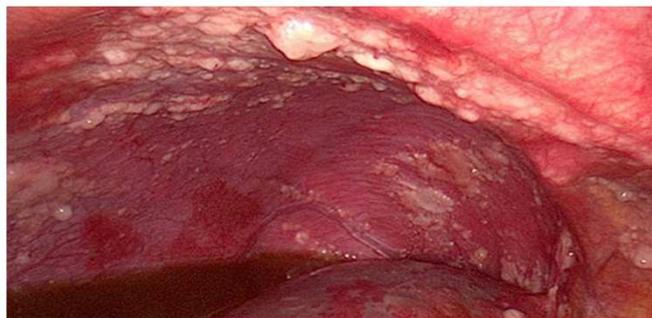


Figure 5: Carcinose péritonéale (Source : Centre Oscar Lambret)

Le rôle du péritoine dans le développement de ces métastases a été étudié et décrit par *S. Paget* qui fut le premier à introduire en 1889 la théorie du « *seed* » and « *soil* » (les semences et le sol)^[24]. Il soutient alors que la répartition des métastases (la semence) n'est pas faite de manière aléatoire, et que ces dernières ne peuvent croître que dans un environnement qui leur est propice (le sol). En d'autres termes, la dissémination métastatique d'un cancer dépend de sa compatibilité avec un sol plus ou moins fertile. Dans le cadre du développement de la carcinose péritonéale d'origine ovarienne, cette notion implique que le péritoine représente le sol fertile au développement des métastases du cancer de l'ovaire. Cette théorie suggère alors une interaction étroite entre le péritoine et les cellules cancéreuses qu'il est nécessaire de comprendre afin de développer des stratégies thérapeutiques adéquates.

Le fait que 90% des cas de cancers de l'ovaire soient d'origine épithéliale, place la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) au centre de la progression du cancer au niveau

du péritoine. En effet, les cellules du cancer de l'ovaire épithélial de polarité apicale-basolatérale sont attachées entre elles par des jonctions intercellulaires. Durant l'oncogenèse, ce processus d'adhésion est perturbé par des changements génétiques et épigénétiques favorisant le détachement des cellules cancéreuses de leur site d'origine et leur entrée en TEM leur permettant d'acquérir un phénotype d'invasion tumorale. Ce phénotype est caractérisé par un switch d'expression des cadhérines (diminution de l'expression de l'E-cadhérine en faveur de l'augmentation de l'expression de la P-cadhérine) (Figure 6.1). En effet, le marqueur principal de cette TEM est la perte d'expression de l'E-cadhérine. La diminution de son expression a été constatée dans 60% des cas du cancer de l'ovaire et s'avère être un facteur pronostic de résistance au traitement puisque *B.P Miše et al.*, ont montré dans une étude rétrospective que l'expression positive de l'E-cadhérine était associée de manière statistiquement significative à une meilleure réponse à la chimiothérapie à base de platine ($p < 0,001$) et à une sensibilité au platine ($p < 0,001$) chez les patientes atteintes d'un HGSOE. *D. Dian et al.*, l'ont également associée à un meilleur taux de survie^[25] tandis que *EY Cho et al.*, ont montré que la diminution de son expression était associée à l'apparition de métastases au niveau du péritoine^[26]. L'E-cadhérine est donc l'une des molécules les plus importantes dans l'adhésion cellulaire ayant comme rôle physiologique de supprimer la mobilité des cellules cancéreuses, leur invasion et le développement de métastases. À contrario, une augmentation des cadhérines favorisant la mobilité, l'invasion et l'angiogenèse telles que les cadhérines N et P a été corrélée à la progression du cancer^[27]. Ce switch de cadhérines entraîne le détachement des cellules cancéreuses de leur site d'origine et leur migration au sein du fluide péritonéal par la formation de clusters via des interactions intégrine – fibronectine empêchant ainsi leur apoptose à travers l'activation de la voie des kinases Akt et l'inhibition de l'activité des caspases-3 (Figure 6.2). Les cellules cancéreuses vont ainsi migrer passivement au sein du fluide péritonéal et adhérer aux cellules mésothéliales du péritoine par l'intermédiaire d'interaction intégrine-dépendante et non-intégrine dépendante (Figure 6.3). Une fois que les cellules auront pénétré au sein de la couche mésothéliale, elles vont se lier à des composants de la matrice extracellulaire facilitant alors la production de médiateurs inflammatoires (TNF α « Tumor Necrosis Factor α », IFN γ « Interferon », IL-1 β « Interleukine 1 β » et IL-6 « Interleukine 6 ») renforçant l'adhésion aux cellules mésothéliales par la stimulation de l'expression de la fibronectine. (Figure 6.4) Le recrutement de cellules inflammatoires contribue à la progression du cancer via la production de protéases, de facteurs angiogéniques, de facteurs de croissance et de cytokines immunosuppressives favorisant la suppression de la réponse immunitaire anti-tumorale (Figure 6.5). Enfin, afin de développer un micro-

environnement favorable à la survie tumorale et à l'invasion, de nombreuses études ont montré que les cellules mésothéliales, par le biais de la TEM, pouvaient être reprogrammées en fibroblastes associés au cancer (CAF) capables de remodeler la matrice extracellulaire via la sécrétion de cytokines, de facteurs de croissance et de protéases favorisant la progression des métastases^[28,29] (Figure 6.6).

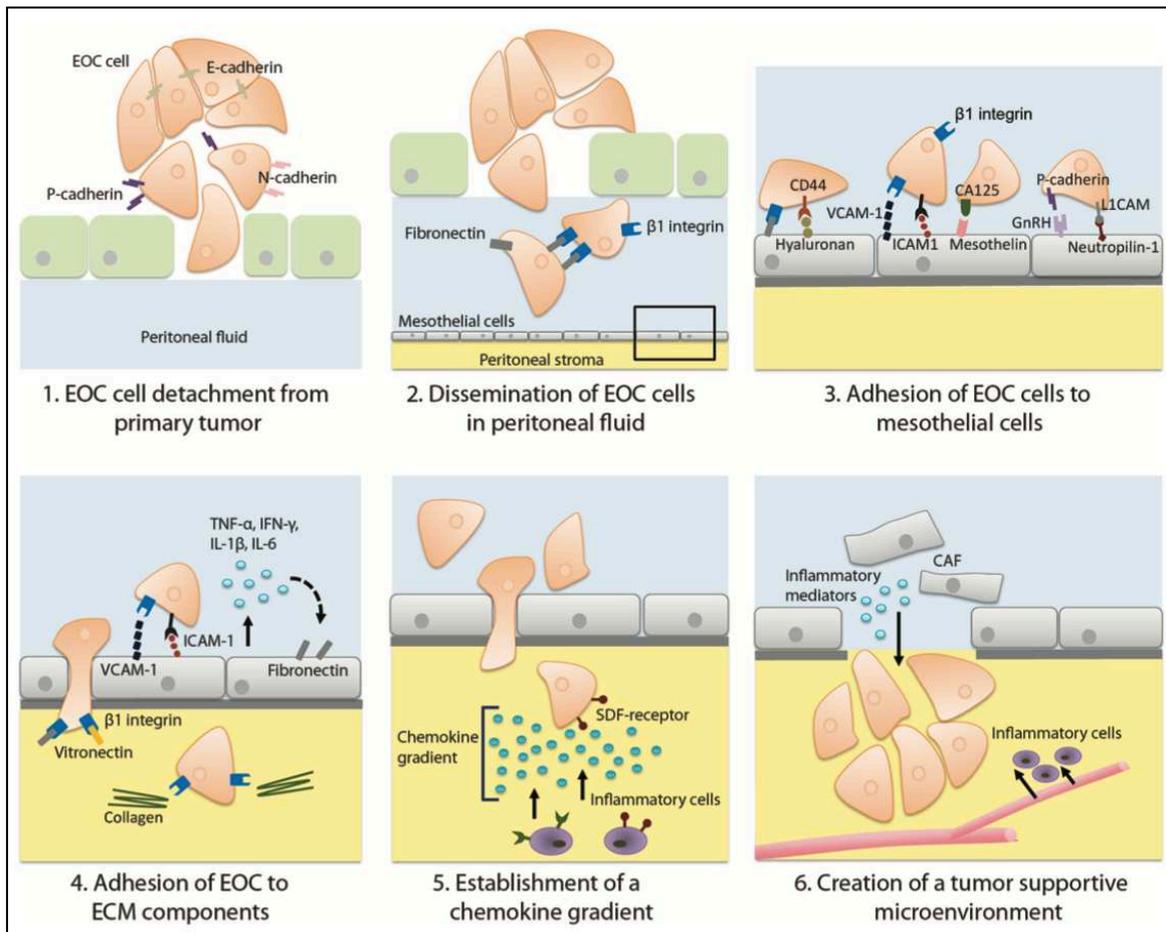


Figure 6: Développement des métastases péritonéales d'origine ovarienne^[30] (EOC, epithelial ovarian cancer; EMT, epithelial-to-mesenchymal transition; ECM, extracellular matrix; E-cadherin, epithelial cadherin; N-cadherin, neural cadherin; P-cadherin, platelet cadherin; VEGF, vascular endothelial growth factor; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule; ICAM-1, intercellular cell adhesion molecule, CA125, Cancer Antigen 125; GnRH, Gonadotropin-releasing hormone; L1CAM, L1 cell adhesion molecule, TNF- α , tissue necrosis factor- α ; IFN- γ , interferon- γ ; IL-1 β , interleukin-1 β ; IL-6, interleukin-6; SDF, stromal-derived factor; CAF, cancer-associated fibroblasts)

F. Prise en charge

Le choix de la stratégie thérapeutique est orienté en fonction du stade de la maladie. Malgré les avancées majeures dans le traitement du cancer ovarien d'origine épithéliale, il demeure une maladie difficile à traiter. 70 à 80% des patientes atteintes d'un stade III ou IV

rechutent dans les 5 ans suivant l'initiation du traitement standard. Ce traitement repose sur une chirurgie de cytoréduction et une chimiothérapie adjuvante à base de sels de platine (e.g., cisplatine, carboplatine) et taxanes (e.g paclitaxel et docetaxel) associée à une maintenance par inhibiteur de poly(ADP-ribose) polymérase (= PARPi pour «poly(ADP-ribose) polymérase inhibitor) (e.g., olaparib, niraparib)^[31]. La séquence des traitements dépend principalement de la localisation initiale des lésions et de leur résécabilité. Dans le cas où la totalité des lésions peuvent être réséquées, on propose une chirurgie de cytoréduction suivie d'une chimiothérapie adjuvante. En cas de lésions non résécables, plusieurs études ont montré qu'initier le traitement par une chimiothérapie néoadjuvante dans l'objectif de rendre possible un geste chirurgical secondaire était une option valide pour ce type de patient^[32,33].

1. Chirurgie

Le résidu tumoral postopératoire est l'élément clinique le plus pertinent puisqu'il est admis que le facteur principal de réduction des récurrences est l'absence de résidu tumoral en fin d'intervention^[34]. L'évaluation de la qualité de la chirurgie et son impact sur la survie sans progression (PFS) et le taux de survie global (OS) ont été évalués dans diverses études. L'essai Clinique DESKTOP^[35] a montré lors d'une étude rétrospective multicentrique sur un total de 267 patientes que les patientes traitées par une chirurgie de cytoréduction complète présentaient de manière significative une amélioration de la PFS et de l'OS (médiane OS, 45.2 mois vs 19.7 mois pour les patientes présentant des résidus > 10 mm avec $p < 0,0001$). Une analyse prospective multicentrique^[36] sur 3126 patientes réparties en 3 groupes : résection complète (groupe A), résidus entre 1 et 10 mm (groupe B) et résidus > 1 cm (groupe C) a quant à elle montré une amélioration de la PFS et de l'OS chez les patientes du groupe A comparé aux groupes B et C (avec $p < 0,0001$). *A. Elattar & al.*, ont étudié dans une étude rétrospective^[37] l'impact de la taille du résidu tumoral sur la survie. Il a été décrit que l'absence de résidu tumoral visible permettait de prolonger significativement l'OS et la PFS. Lorsque le résidu tumoral était < 1 cm la survie était significativement allongée par rapport au groupe > 1 cm (HR 1.36, 95% CI 1.10 à 1.68). Ces multiples données mettent en lumière l'existence d'une corrélation entre la taille du résidu tumoral à la fin de l'intervention et le taux de survie faisant de l'acte chirurgical un facteur déterminant dans la prise en charge du cancer de l'ovaire. Ainsi sur la base de ces nombreuses études, L'ESGO (European Society of Gynaecological Oncology) a défini plusieurs critères afin de guider le chirurgien lors de l'intervention et ainsi garantir la qualité de l'exérèse. Une chirurgie de cytoréduction dite

« optimale » sera donc considérée comme complète en cas d'absence de résidus tumoraux macroscopique à la fin de l'intervention^[38].

2. Chimiothérapie

La chirurgie de cytoréduction fait partie intégrante du traitement de première ligne du cancer de l'ovaire. Cependant, malgré une résection macroscopiquement complète, la majorité des patientes récidivent. C'est pourquoi, l'application d'une chimiothérapie après la chirurgie de cytoréduction est nécessaire afin d'améliorer la survie des patientes. Le traitement systémique de première ligne associe le paclitaxel à (175 mg/m²) au carboplatine (AUC > 5 ou 6) toutes les 3 semaines pour un minimum de 6 cycles. Le carboplatine/paclitaxel est à privilégier au cisplatine/paclitaxel en raison de son meilleur profil de toxicité et de ses effets indésirables moins importants pour un même taux de réponse^[39,40]. Ces agents chimiothérapeutiques sont administrés par voie intraveineuse (IV), intrapéritonéale (IP) ou les deux (IV/IP) en fonction de la zone à traiter. L'IP est à privilégier dans le cadre d'une atteinte péritonéale puisqu'elle est administrée à la suite de la chirurgie directement dans la cavité péritonéale permettant l'obtention d'une concentration plus importante du médicament au niveau de la tumeur, améliorant ainsi son efficacité. De plus, le carboplatine en IP est généralement mieux toléré par les patientes atteintes d'un stade avancé plutôt qu'une utilisation en IV^[41]. Cependant cette concentration est limitée par le nombre de couches cellulaires à traverser. Afin d'améliorer l'efficacité de la chimiothérapie, l'ajout d'une hyperthermie (HIPEC = chimiothérapie hyperthermique intrapéritoneale) telle qu'utilisée dans le traitement standard du pseudomyxomas péritonéal^[42] ainsi que dans le mésothélium péritonéal^[43] a fait l'objet de nombreuses études dans la carcinose péritonéale d'origine ovarienne. L'efficacité de cette association a d'ailleurs été démontrée *in vitro* et *in vivo* cependant la preuve de son efficacité clinique reste encore incertaine^[44]. C'est pourquoi, en raison du manque de preuve d'efficacité, des difficultés techniques que cette voie requière en plus de sa toxicité importante, l'HIPEC n'est toujours pas proposée comme traitement standard et reste une option pouvant être discutée par les équipes de soins dans le cadre d'essais cliniques (Recommandation 14.2 ; 17.3, 2019)^[38].

3. Thérapie ciblée

i. Bevacizumab

Le bevacizumab (Avastin®) est un anticorps monoclonal humanisé ciblant le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire de type A (=VEGF-A pour Vascular Growth Factor type A »). Cette thérapie ciblée anti-angiogénique a connu un développement important dans la prise en charge du cancer de l'ovaire ce qui lui a valu un enregistrement en 2011 en association avec le carboplatine-paclitaxel en 1^{ère} ligne de traitement des stades avancés. Le bénéfice de l'ajout de cet antiangiogénique a été démontré dans deux études de phase III randomisées (GOG 218 et ICON 7) : l'addition du bevacizumab au carboplatine et paclitaxel suivi d'une maintenance par bevacizumab seul a montré une amélioration significative de la PFS (14.1 versus 10.3 mois pour l'étude GOG218 avec HR = 0.72 et $p < 0.001$ & 19.0 versus 17.3 mois pour l'étude ICON7 avec HR = 0.81 et $p = 0.004$)^[45]. L'étude ICON 7, a également montré une amélioration de l'OS en plus de la PFS pour le sous-groupe des malades à plus haut risque (36.6 versus 28.8 mois avec HR = 0.64 et $p = 0.002$)^[46]. Ces résultats ont ainsi fait de l'association carboplatine - paclitaxel - bévacizumab suivie d'une maintenance par bévacizumab, comme étant une association à envisager en 1^{ère} ligne des cancers de stade III à IV (Recommandation 12.1, 2019)^[38].

ii. PARPi

Les PARPi sont une nouvelle classe de médicaments impliqués dans la réparation de l'Acide DesoxyRibonucléique (ADN). En situation physiologique, les cassures simples brins sont réparées par les enzymes poly(ADP-Ribose) polymérase qui peuvent être de type 1 ou de type 2 (PARP-1 et PARP-2). L'inhibition de PARP conduit à une accumulation de cassures simple brin, provoquant l'effondrement des fourches de réplication et l'accumulation de cassures double brin, qui sont généralement réparées par des enzymes de recombinaison homologue (=HR pour Homologous Recombination). Cependant, il peut exister des mécanismes de réparation HR déficients notamment en raison d'une mutation sur les gènes BRCA1 et BRCA2. Le rationnel de l'utilisation des inhibiteurs de PARP dans le cancer de l'ovaire repose donc sur la forte incidence de cette mutation. En effet, 70% des cancers de l'ovaire d'origine épithéliale présentent la mutation des gènes BRCA1 et 2 qui peut être d'origine germinale ou somatique dans respectivement 15% et 7% des cas^[47]. La présence de cette mutation peut conférer le phénotype HRD (=HRD pour Homologous Recombination Deficiency) et rend les patientes très sensibles aux PARPi en raison de l'accumulation de

cassures à l'ADN non réparées conduisant à la mort cellulaire également appelée "létalité synthétique". C'est pourquoi, historiquement, la prescription des PARPi dans le cancer de l'ovaire en 1^{ère} ligne d'entretien concernait uniquement les patientes répondantes au platine et présentant ce phénotype HRD (notamment la mutation BRCA). Très récemment, les résultats d'une méta-analyse publiée par l'ESMO (European Society for Medical Oncology) ont montré qu'une maintenance par PARPi résultait en une amélioration significative de la PFS indépendamment de la mutation BRCA et du phénotype HRD des patientes, comparé au placebo (20,4 versus 14,9 mois avec HR = 0,67, et $p < 0,001$). Cependant, l'analyse des sous-groupes a montré que ce bénéfice pouvait varier en fonction de ces statuts ; le bénéfice étant maximal dans le sous-groupe BRCAmut (45,7 versus 17,7 mois avec HR = 0,45 et $p < 0,001$) suivi du sous-groupe HRD positif - BRCAmut (34,7 versus 17,9 mois avec HR = 0,45 et $p < 0,001$) et du sous-groupe HRD positif - non BRCAmut (22,3 versus 13,1 mois avec HR = 0,47 et $P < 0,001$) avec un manque de bénéfice significatif ayant été observé dans le sous-groupe HRD négatif (15,0 versus 11,3 mois, avec HR = 0,90 et $p = 0,75$). Ainsi, en raison du manque de bénéfice chez les patientes HRD négative associé à la toxicité du traitement, l'ESMO recommande l'utilisation des PARPi comme standard de traitement d'entretien (après un traitement standard de première ligne) chez les patientes présentant la mutation BRCA et/ou HRD positives^[48].

Conclusion partie I : La prise en charge du cancer de l'ovaire s'est améliorée ces dernières années. L'addition d'inhibiteurs de PARP et d'anti-angiogéniques aux traitements conventionnels a permis d'augmenter significativement la PFS de ces patientes. Cependant, malgré les avancées majeures dans la prise en charge de ce cancer, 70% des patientes en rémission font une rechute dans les 18 mois^[49]. P. Amate et al., ont montré dans une étude rétrospective que le péritoine était le site de récurrence privilégié puisque 75% des rechutes à des stades avancés se font au niveau du péritoine^[50]. Ainsi, l'existence de cette maladie résiduelle péritonéale représente le problème majeur de cette pathologie qu'il est nécessaire de contrôler en développant de nouvelles stratégies thérapeutiques à diffusion intra-péritonéale. Pour répondre à ce besoin, la thérapie photodynamique pourrait être une alternative pertinente.

II. Proposition d'une nouvelle stratégie thérapeutique : La Thérapie Photodynamique

A. Historique

La thérapie photodynamique (PDT) à visée anticancéreuse est une innovation thérapeutique originale et prometteuse qui vise à détruire les cellules tumorales tout en préservant le tissu sain environnant. La PDT repose sur l'activation de molécules photosensibilisantes (Photosensibilisateur, PS) par une lumière de longueur d'onde spécifique, en présence d'oxygène disponible naturellement dans l'environnement intracellulaire. La combinaison de ces trois éléments permet d'initier une réaction photochimique générant la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) cytotoxiques induisant la destruction des cellules tumorales.

L'effet thérapeutique de la lumière est connu et décrit depuis l'Antiquité. Les chinois et les Égyptiens utilisaient déjà les propriétés curatives de la lumière solaire combinées à des substances naturelles tels que les furocoumarines (psoralène) pour traiter certaines affections cutanées de type vitiligo, psoriasis et cancer^[51]. Cependant, « l'effet photodynamique » reposant sur l'action combinée d'une molécule photoactivable, de la lumière et de l'oxygène a été décrit pour la première fois au début du XX^e siècle par un étudiant en médecine, *Oscar Raab*. L'élève du *Pr H. Von Tappeiner* découvre que l'incubation de microorganismes, le *paramecium caudatum*, avec certains colorants (acridine) provoquaient la mort de ces microorganismes en cas d'exposition à la lumière^[52]. Cette mort n'était pas constatée lorsque les microorganismes étaient maintenus dans le noir. Peu de temps après, le *Pr H. Von Tappeiner* utilise cette découverte pour traiter les cancers de la peau par exposition lumineuse après application topique d'éosine. Le Professeur et son élève décrivent alors pour la première fois le phénomène « d'action photodynamique »^[53]. La notion de photosensibilisateur a ensuite été décrite au milieu du XX^e siècle. *W. Hausmann* a ainsi démontré l'effet phototoxique des porphyrines sur des souris après leur avoir injecté de l'hématoporphyrine (Hp)^[54]. Puis *F. Meyer-Betz* réalisa le premier essai clinique chez l'homme^[55] en s'injectant lui-même 200 mg d'hématoporphyrine. Il constata un gonflement ainsi qu'une douleur aux niveaux des zones qu'il avait exposé à la lumière. Les études se sont ensuite succédées pour laisser place à l'air moderne de la PDT vers les années 1960 grâce au développement de dérivés de l'hématoporphyrine (HpD) par *S. Schwartz*^[56]. *R. Lipson* et *E.J Baldes* ont ensuite décrit le potentiel photodiagnostic de l'HpD en constatant son accumulation au sein de la tumeur par émission de fluorescence^[57]. Puis en 1976, le premier essai clinique utilisant

l'HpD^[58] chez des patientes atteintes d'un cancer de la vessie résistant à la chimiothérapie et la radiothérapie a permis de mettre en évidence une diminution de la taille de la tumeur ainsi qu'une nécrose au niveau de la zone illuminée. À partir des années 1990, les photosensibilisateurs vont être produits à plus grande échelle et commercialisés. Le Photofrin® (HpD purifié) a été le premier à recevoir une AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) au Canada en 1993 dans le traitement du cancer de la vessie, puis en Hollande, au Japon, aux USA et enfin en France en 1996. Après cette première commercialisation, l'utilisation de la PDT fut répandue à plus grande échelle à travers le monde occidental avec la mise sur le marché de nombreuses molécules au début des années 2000 telles que Visudyne®, le Levulan®, le Metvix® et le Foscan®.

B. Principe photophysique de la PDT

L'utilisation de la PDT en clinique repose sur 2 principes distincts :^[59]

- **La thérapie photodynamique (PDT) :** l'injection du PS au patient suivi de son activation par une lumière de longueur d'onde appropriée va induire des réactions photochimiques oxydatives aboutissant à la destruction des cellules tumorales suite à la génération d'espèces réactives de l'oxygène.
- **La thérapie photodiagnostique (PDD) :** l'émission de fluorescence du PS suite à son excitation par une lumière de longueur d'onde spécifique permet de détecter avec précision les lésions néoplasiques. Cette identification spécifique des cellules cancéreuses permet de guider le chirurgien lors d'une résection tumorale.

Ainsi, c'est la longueur d'onde à laquelle sera excité le PS qui privilégiera soit un effet PDT ou un effet PDD. C'est pourquoi, il est possible d'induire ces effets en utilisant un seul PS (Figure 7).

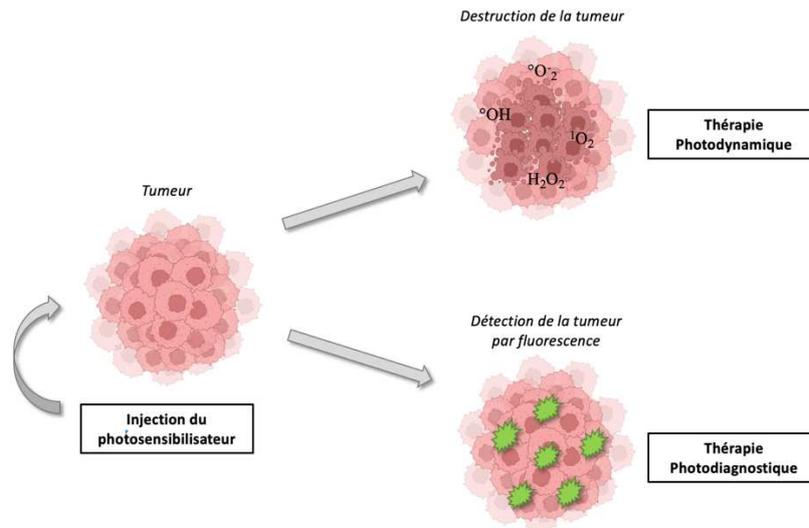


Figure 7: Principe des 2 composantes de la PDT

Les transitions et phénomènes d'émission de lumière associés à ces deux phénomènes sont illustrés par le diagramme de Jablonski (Figure 8). Lors de son illumination par une lumière de longueur d'onde spécifique, la molécule de PS a la capacité d'absorber un photon. Cette absorption, qui constitue une transition radiative (i.e., une transformation qui se fait avec l'intervention d'un photon), se traduit par le passage du PS de son état fondamental, S_0 , à un état excité S_1 , S_2 , S_{+n} . Dans cet état excité instable, la molécule de PS retourne à son plus bas niveau d'énergie de l'état excité, S_1 , par conversions internes. Ces conversions correspondent à des transitions non radiatives (i.e., à des transformations qui se font sans l'intervention de photons) et sont provoquées par des rotations ou vibrations de la molécule. Elles sont très rapides et durent environ entre 10^{-13} et 10^{-12} secondes. Une fois dans son état excité, S_1 , le PS peut revenir à l'état fondamental de deux différentes manières.

- i. Soit, il libère son surplus d'énergie par l'émission d'un photon dit de fluorescence et retourne à l'état fondamental par une transition radiative. Cette propriété du PS à émettre de la fluorescence peut être utilisée pour le photodiagnostic des tumeurs (effet PDD).
- ii. Soit, il retourne à l'état fondamental après être passé par un état intermédiaire dit état triplet, T_1 . Ce passage à l'état triplet est obtenu par des transitions non radiatives appelées conversions inter-systèmes (CIS). Ces conversions inter-système étant plus lentes que les conversions internes, la molécule de PS à l'état triplet a une durée de vie plus longue. Une fois à l'état triplet, la molécule de PS peut revenir à l'état fondamental par émission de phosphorescence, appelée également

« transition interdite » puisqu'elle se produit entre des états de multiplicité différentes. La longue demi-vie de la molécule de PS à l'état triplet lui donne la possibilité d'intervenir dans deux types de réactions photochimiques lui permettant également de retourner à l'état fondamental. Ces réactions dites de type I et de type II, peuvent se produire simultanément^[60] et induisent des cascades de réactions à l'origine de l'effet de thérapie photodynamique et donc de la destruction de la tumeur (effet PDT).

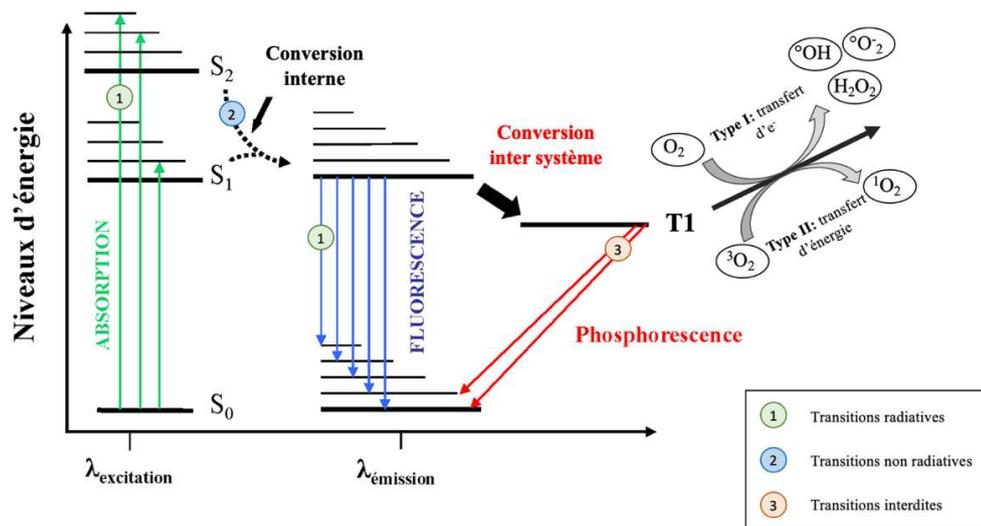


Figure 8 : Diagramme de Jablonski (D'après T. Schweizer et al, 2020)

La réaction photochimique de type I implique la participation du PS à un processus de transfert d'électrons ou d'un atome d'hydrogène à des substrats biologiques environnants (S) pour former des radicaux et des ions radicalaires libres (Figure 9, étape 1). Les anions radicalaires formés du PS ou du substrat ($PS^{\bullet-}$ et $S^{\bullet-}$) produits à l'issue de l'étape 1 peuvent interagir avec l'oxygène moléculaire pour former l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) (Figure 9, étape 2). À son tour, l'anion superoxyde peut interagir avec d'autres substrats ou agir comme précurseur d'autres ERO telles que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle ($^{\bullet}OH$) (Figure 9, étape 3). Ces différentes ERO formées au cours de la réaction photochimique de type I sont de puissants agents oxydants pour une grande variété de biomolécules (e.g., cholestérol, acides aminés) provoquant ainsi d'important dommages oxydatifs.

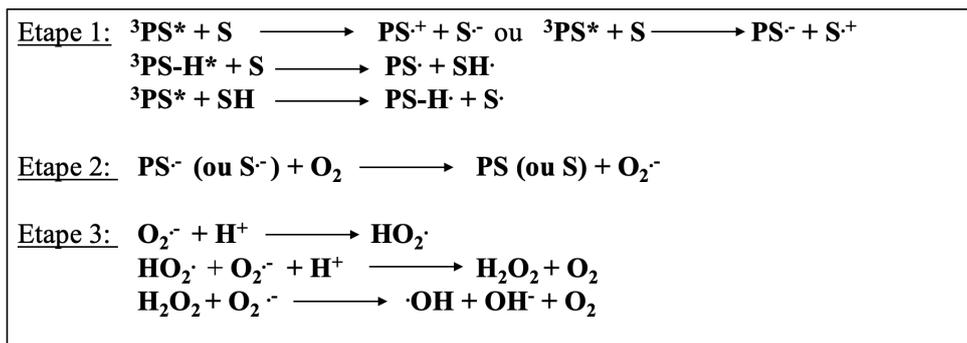


Figure 9: Réaction photochimique de type I

La réaction photochimique de type II implique, quant à elle, le transfert de l'énergie du PS à l'état de triplet vers l'oxygène moléculaire (${}^3\text{O}_2$) induisant le retour du PS à son état fondamental et la formation d'une espèce particulièrement réactive de l'oxygène, l'oxygène singulet (${}^1\text{O}_2$) (Figure 10). De par sa forte réactivité, l'oxygène singulet est capable d'interagir avec de nombreuses biomolécules de l'environnement intracellulaire (e.g protéines, lipides et acides aminés) provoquant des dommages oxydatifs important aboutissant à la mort cellulaire.

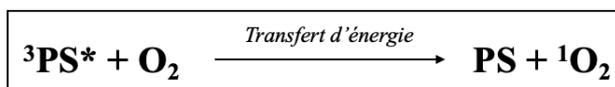


Figure 10: Réaction photochimique de type II

L'oxygène singulet fait partie de la classe des ERO cependant il diffère de ces dernières par de nombreux points. Contrairement aux autres ERO qui peuvent être produites lors de processus physiologiques normaux par des enzymes (e.g., monoamine oxydase, NADPH oxydase) ou lors de réactions inflammatoires par les polynucléaires neutrophiles (PNN) et macrophages, l'oxygène singulet est uniquement produit lorsqu'un PS endogène ou exogène absorbe une lumière de longueur d'onde appropriée à son excitation. Une autre différence est que ces ERO sont produites de manière physiologique et sont capables de s'inter convertir entre eux contrairement à ${}^1\text{O}_2$ qui ne peut réagir avec d'autres ERO^[61]. Enfin, une fois que l'oxygène singulet est retourné à son état fondamental il perd sa réactivité tandis que les autres ERO restent réactives jusqu'à leur interaction avec d'autres biomolécules ou leur destruction définitive par des enzymes antioxydantes. Ainsi, le temps de demi-vie de ces autres ERO va dépendre de l'activité des enzymes antioxydantes environnantes. En ce sens, certaines ERO sont très réactives vis-à-vis de certaines molécules et de ce fait ont un temps de demi-vie très court (e.g., $\cdot\text{OH}$) limitant ainsi leur diffusion^[62] tandis que d'autres

vont réagir de manière plus lente entraînant leur diffusion jusqu'à en dehors de la cellule (e.g., H_2O_2)^[63]. L'oxygène singulet, quant à lui, présente un temps de demi-vie très court (4 μs) ce qui limite sa diffusion à seulement 10 à 55 nm conduisant à un effet cytotoxique strictement local de la PDT^[61]. Ainsi, c'est la durée de vie de l'ERO qui va limiter sa distance de diffusion dans les cellules. En d'autres termes, la réaction directe et rapide des ERO sera limitée à un petit volume subcellulaire tel que le site où il a été généré et induira ainsi la destruction ciblée du tissu tumoral tout en préservant le tissu sain (à condition que le PS ne soit situé qu'au sein des lésions) (Figure 11).

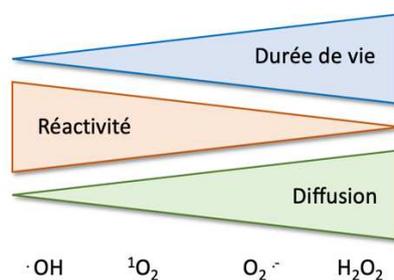


Figure 11: Relation entre le temps de demi-vie, la réactivité et le potentiel de diffusion des ERO (D'après Robert W. Redmond)^[61]

C. Mort des cellules cancéreuses en PDT

Bien que le stress oxydatif induit par la PDT puisse avoir un impact sur de nombreux événements impliqués dans la signalisation cellulaire et moléculaire, la résultante principale de ce stress est d'induire la mort des cellules cancéreuses. Nous savons aujourd'hui que le stress oxydatif conduit à différents mécanismes de mort cellulaire dit de cytotoxicité « directe » ou « indirecte ». La balance vers l'un ou l'autre de ces mécanismes sera déterminée par les propriétés physicochimiques et la localisation cellulaire du PS, la longueur d'onde utilisée, la dose de lumière apportée ainsi que la concentration en oxygène^[64]. Ainsi, les dommages directs de la PDT impliquent la mort des cellules cancéreuses par différents mécanismes de morts cellulaires conventionnelles (e.g., apoptose, nécrose, autophagie) et non conventionnelles (e.g., nécroptose, ferroptose, pyroptose, catastrophe mitotique, parthanatos). Le mécanisme indirect repose sur l'altération du réseau vasculaire de la tumeur conduisant à une ischémie tumorale déprivant la tumeur d'oxygène et de nutriment. Enfin, la mort des cellules contribuera à la stimulation du microenvironnement tumoral par le recrutement de

médiateurs inflammatoires et de cellules de l'immunité innée laissant place à l'établissement d'une réponse immunitaire anti-tumorale (Figure 12).

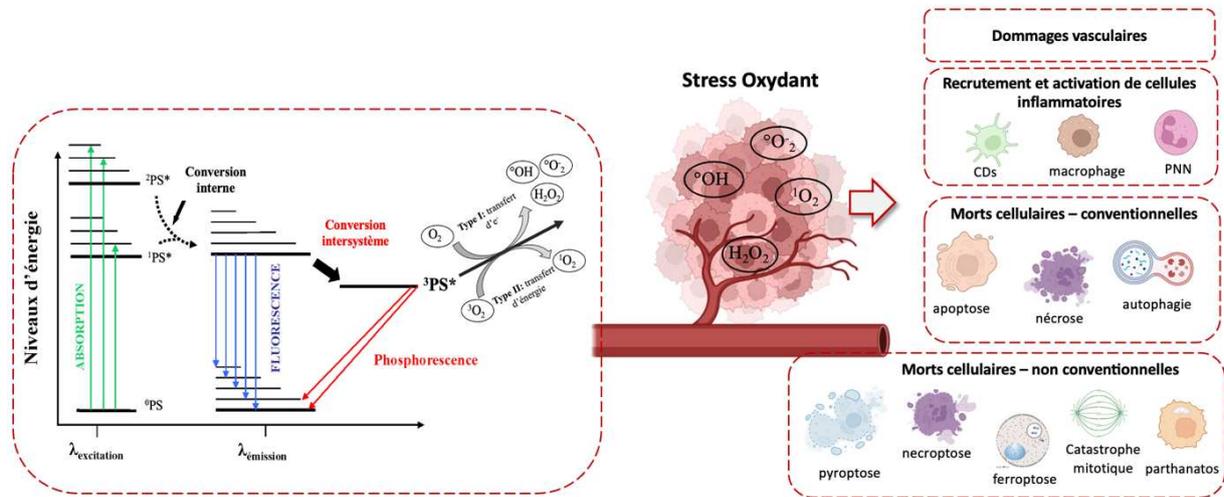


Figure 12: Effets des Espèces Réactives de l'Oxygène produites à la suite des réactions photochimiques : mort des cellules cancéreuses, dommages vasculaires, réaction inflammatoire et stimulation du système immunitaire (CDs ; Cellules Dendritiques ; PNN, Polynucléaires Neutrophiles ; PS, Photosensibilisateur)

1. Toxicité directe

L'étude du type de mort cellulaire induit par la PDT a fait l'objet de nombreuses études ces dernières années. La mort cellulaire a longtemps été classée en trois catégories dites de « morts cellulaires conventionnelles » à savoir : apoptose, nécrose et autophagie. Cependant, après la découverte ces dernières décennies d'autres modalités de mort cellulaires dites « non conventionnelles » il est devenu clair que la PDT est également capable selon la modulation de divers paramètres, de les déclencher.

i. Morts cellulaires conventionnelles

L'apoptose : L'apoptose est un mécanisme de mort programmée régulée par 2 voies principales : l'une dite intrinsèque (ou mitochondriale), l'autre dite extrinsèque (ou voie des récepteurs de morts). La voie intrinsèque résulte de la perturbation de nombreux évènements intracellulaires tel que des dommages à l'ADN ou au niveau du réticulum endoplasmique ainsi qu'une déstabilisation du potentiel de membrane mitochondrial. Ces évènements conduisent à l'activation d'une cascade de caspases exécutrices procédant au démantèlement de la cellule. La voie extrinsèque intervient lorsque des récepteurs à la surface cellulaire détectent des

perturbations de l'environnement extracellulaire. Suite au recrutement de molécules adaptatrices, s'ensuit l'activation de la caspase 8 puis le clivage de caspases effectrices. L'association de ce mécanisme de mort à la PDT a été décrit pour la première fois en 1991^[65]. Il est maintenant admis, que la voie apoptotique sera prépondérante avec une faible concentration de PS ainsi qu'une dose de lumière faible. La localisation subcellulaire du PS est également un facteur déterminant puisqu'il a été montré que l'accumulation de PS au sein de la mitochondrie, le lysosome ou encore le réticulum conduisait à l'apoptose après illumination^[64].

La nécrose : La nécrose est un mécanisme de mort cellulaire rapide, prématuré survenant de manière non programmée. Elle se produit lorsque la cellule subit une agression aigüe et intense qu'elle soit physique ou chimique. Elle s'accompagne d'une perte de l'intégrité membranaire entraînant un afflux d'eau et d'ions à l'intérieur de la cellule et le gonflement des organites ce qui conduit à l'éclatement de la cellule. Contrairement aux autres types de mort cellulaires, elle ne nécessite pas de synthèse protéique, d'énergie ou de régulation par des voies de signalisation. Dans l'usage de la PDT, la nécrose peut survenir après l'administration d'une dose subtoxique de PS ainsi que des doses d'illumination importante^[66]. Elle peut également être induite dans le cas du tropisme d'un PS pour la membrane plasmique. En effet, des études ont montré qu'un temps d'incubation court avec le PS (1 à 3h) pouvait favoriser son accumulation au niveau de la membrane plasmique et induisait une mort de type nécrotique tandis qu'une plus longue période (24h) entraînerait son accumulation au niveau des organelles en faveur d'une mort apoptotique^[67,68].

L'autophagie : L'autophagie est un mécanisme physiologique de protection et de recyclage d'éléments cellulaires. Ce processus de mort aboutit à la formation d'une vésicule membranaire appelée autophagosome permettant d'engloutir le matériel endommagé. Sa fusion avec le lysosome pour former l'autolysosome permet la digestion de ces débris grâce aux hydrolases lysosomales contenues initialement dans le lysosome ainsi que leur éventuel recyclage. En général, l'apoptose et la nécrose sont les principaux mécanismes de mort mis en œuvre après la PDT, l'autophagie quant à elle pourrait être une arme à double tranchant en fonction du type de PS utilisé et du type cellulaire. En effet, l'autophagie peut être considérée comme cytoprotectrice si elle est utilisée par les cellules comme dernière tentative pour faire face au stress oxydatif et survivre. En effet, les organites photoendommagés vont être

séquestrés par l'autophagosome afin d'être recyclés^[69]. En revanche, dans le cas où la cytotoxicité induite par la PDT est optimale, l'autophagie peut induire la mort des cellules^[70].

ii. Morts cellulaires non conventionnelles

Catastrophe mitotique : La catastrophe mitotique est une modalité de mort cellulaire déclenchée par une mitose aberrante entraînant une mauvaise ségrégation des chromosomes et un échec de la division cellulaire. La Catastrophe mitotique a été définie par le comité de nomenclature sur la mort cellulaire (2018) comme étant un mécanisme onco-suppresseur régulé qui empêche la prolifération et/ou la survie des cellules ne pouvant pas terminer leur mitose en raison de dommages importants à l'ADN, d'une machinerie mitotique défectueuse et/ou d'une défaillance des points de contrôle mitotiques^[71]. Morphologiquement, cette mort cellulaire est caractérisée par des changements nucléaires spécifiques (e.g., multinucléation, micronucléation, macronucléation). Ce type de mort cellulaire dépend principalement de la localisation du PS lorsqu'il se situe à proximité immédiate des microtubules. La perturbation de l'organisation des microtubules conduit à l'épuisement de protéines centrosomales telles que AuroraA, ninein, TOG et TACC3 entraînant la formation de fuseaux aberrants et orientera les cellules vers une mort cellulaire de type apoptotique « like »^[72]. Il est important de noter que des cellules peuvent résister à ce type de mort durant la PDT entraînant ainsi la formation des cellules aneuploïdes posant un risque d'instabilité génomique ce qui augmente par conséquent l'agressivité de la tumeur et sa résistance aux thérapies. Cependant, il a été décrit que cette résistance pourrait être outrepassée via l'ajustement des concentrations du PS et des doses d'irradiation^[73,74]. C'est pourquoi, il sera nécessaire d'approfondir nos connaissances dans l'induction de ce mécanisme de mort afin de mieux appréhender le mécanisme d'action de la PDT.

Pyroptose : La pyroptose est un mécanisme de mort régulé de type inflammatoire récemment approuvé par la Nomenclature du comité de mort cellulaire^[71]. Ce type de mort peut avoir les caractéristiques de l'apoptose dans les stades précoces puisqu'elle est accompagnée d'une fragmentation de l'ADN et d'une condensation de la chromatine mais également de la nécrose, suite à la libération de molécules inflammatoires. La pyroptose est associée à l'activation d'une ou plusieurs caspases, telle que la caspase 1 dans l'inflammasome NLRP3 (NLRP3 pour « NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3 »). La voie de la signalisation de la caspase 1 conduit à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoire IL-1 β et IL-18^[75]. Il est important de souligner que le mécanisme d'action de la PDT repose sur

l'induction d'une inflammation aigüe liée à la production de cytokines pro-inflammatoires au niveau du site endommagé (cf partie Toxicité indirecte). Ainsi, l'association de ce type de mort à l'inflammation aigüe induite par la PDT peut être à l'origine d'une inflammation non contrôlée évoluant vers une réponse systémique nocive. D'autant plus qu'une étude a montré que la neutralisation de l'IL-1 β via l'inhibition de la caspase 1 dont l'objectif était de réduire l'inflammation avait diminué l'efficacité de la PDT^[76]. Ainsi il sera nécessaire d'étudier les doses de lumière et les concentrations de PS permettant de contrôler et d'équilibrer les réseaux de cytokines régulant à la hausse le système immunitaire.

Parthanatos : forme régulée de mort cellulaire induite par l'hyperactivation de la PARP1 qui intervient dans les mécanismes de réparation de dommages à l'ADN. L'activation de PARP1 peut être initiée par différents stimulus telle que l'irradiation Ultraviolet, les agents alkylants ou encore la génération d'ERO. Cependant sa suractivation entraîne l'épuisement de Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NAD⁺) cellulaire à l'origine d'une déplétion en ATP progressive aboutissant à l'effondrement énergétique de la cellule^[77]. Ce processus de mort cellulaire est accompagné d'une dépolarisation mitochondriale contribuant à la libération de la forme tronquée du facteur induisant l'apoptose (AIF). L'interaction de ce facteur avec le facteur inhibiteur de la migration des macrophages (MIF) et sa migration au noyau induit la fragmentation de l'ADN et le déclenchement de la mort cellulaire^[78]. La seule évidence de l'induction de ce type de mort par la PDT a été donné par *J. Sorian et al.*,^[79]. Cette étude a comparé la différence d'efficacité de la PDT utilisant le sel de sodium de la meso-tetrakis (4-carboxyphényl) porphyrine (Na-H₂TCPP) et son dérivé de zinc entre une lignée cellulaire épithéliale de cancer du sein humain (SKBR-3) et une lignée de cellules saines épithéliales (MCF-10A). Il s'avère que les caractéristiques de la mort parthanatos (formation de pont nucléaire accompagné de la translocation de AIF de la mitochondrie au noyau) ont uniquement été retrouvées sur la lignée saine alors que la lignée tumorale était morte par nécrose et apoptose. De plus, l'ajout de PARPi permettait de restaurer la viabilité des cellules saines alors que cela n'avait aucun impact sur la viabilité des cellules tumorales. Il a alors été suggéré que ce type de mort était médié en cas de dommages à l'ADN et d'hyperactivation de PARP en raison d'une augmentation importante d'ERO et d'une localisation nucléaire du PS. En ce sens, l'inhibition de la parthanatos par les PARPi pourrait être utilisée en PDT afin de limiter les effets indésirables aux cellules saines.

Nécroptose : La Nécroptose est une forme régulée de mort cellulaire caractérisée par des perturbations de l'homéostasie intra et extracellulaire. Cette perturbation est dépendante de l'activité des protéines kinase 1 et 3 interagissant avec leur récepteurs respectifs de sérine/thréonine-protéine kinase 1 et 3 (RIPK1 et RIPK3) et du recrutement ultérieur de la protéine de type domaine de kinase de lignée mixte (MLKL)^[75]. La nécroptose est caractérisée par un gonflement de la cellule, une condensation de la chromatique et une perméabilisation de la membrane plasmique puis le relargage du contenu intracellulaire vers l'espace extracellulaire. Le type de tumeur ainsi que la concentration du PS sont des facteurs déterminants dans l'induction ou non d'une nécroptose. À titre d'exemple, des études *in vitro* évaluant l'efficacité de la PDT utilisant l'hiporfin ont montré que sur 3 lignées cellulaires d'ostéosarcomes (DLM-8, 143B et HOS) une seule présentait une augmentation de l'expression de RIPK1 pouvant être bloquée par la necrostatine-1, un fait caractéristique de la nécroptose^[80]. Une autre étude a montré qu'un traitement par talaporfin-PDT sur des cellules de glioblastome humain (T98G) avec une faible concentration de PS induisait la nécroptose contrairement à l'utilisation d'une concentration importante ^[81].

Ferroptose : Enfin, la ferroptose est une forme régulée de mort cellulaire résultant de l'accumulation incontrôlée de lipides peroxydés au niveau des membranes cellulaires. La mort des cellules est provoquée par la perméabilisation de la membrane plasmique entraînant le gonflement de la cellule puis sa rupture. Contrairement à l'apoptose, la ferroptose se déroule sans induction de la perméabilisation de la membrane externe des mitochondries, il n'est donc pas observé de libération du cytochrome C ou d'activation des caspases^[75]. Sur le plan biochimique, la ferroptose est initiée par une peroxydation lipidique excessive contrôlée à l'état physiologique par la Glutathione Peroxidase 4 (GPX4). L'activité de l'antiporteur cystine/glutamate (xc-) permet de fournir un apport en cystine (précurseur plasmatique de la cystéine) dans la cellule, un acide aminé nécessaire à la synthèse du glutathion (GSH) en échange de glutamate. Le blocage du système xc- entraîne une déplétion intracellulaire en cystéine, conduisant à l'épuisement des stocks intracellulaires de GSH. La GPX4 est une sélénoprotéine qui utilise le GSH afin de détoxifier les peroxydes lipidiques membranaires (réduction des lipides peroxydés en leur alcool correspondant)^[82]. À cet égard, l'inhibition de cette protéine entraîne une accumulation massive de lipides oxydés conduisant à la mort cellulaire. Ainsi, des composés capables de bloquer le transporteur xc- ou d'inhiber la GPX4 sont susceptibles d'induire la ferroptose. Une autre caractéristique de la ferroptose est l'augmentation du pool de fer libre. Ainsi, la réaction de Fenton entre l'H₂O₂ issu des

réactions photochimiques de la PDT et l'ion ferrique (Fe^{2+}) pourrait produire de l' O_2 de manière soutenue. Or, l'efficacité de la PDT repose sur la concentration en oxygène du milieu environnant^[83]. Ainsi la combinaison de la ferroptose à la PDT permettrait d'en améliorer son efficacité grâce à la réaction de Fenton qui apporterait de l' O_2 moléculaire de façon continue^[84].

2. Toxicité indirecte

Domages vasculaires : Le flux sanguin est le moyen d'apporter aux tumeurs l'oxygène et les nutriments indispensables à leur survie. Ainsi, la destruction tumorale peut être potentialisée par l'altération du réseau vasculaire qui alimente la tumeur. L'association de ce mécanisme d'action à la PDT fut rapporté pour la première fois en 1963^[85]. L'équipe de *Star et al.*, mit en évidence grâce au modèle de la chambre intravitale chez des rats porteurs de tumeurs mammaires traitées par HpD-PDT une vasoconstriction initiale des vaisseaux tumoraux suivie de réponses diverses tel qu'un arrêt de flux sanguin, la survenue d'hémorragies et la formation d'agrégats plaquettaires^[86]. Ce mécanisme s'explique par le fait que les ERO vont générer des dommages irréversibles dans les cellules endothéliales et au niveau de la membrane basale vasculaire ce qui va entraîner la libération de molécules vasoactives et augmenter la perméabilité vasculaire et la constriction des vaisseaux. S'ensuit, la formation d'un thrombus conduisant à l'ischémie de la tumeur. Afin d'utiliser cette approche, il a été montré que l'irradiation laser doit être effectuée peu de temps après l'administration du PS afin que ce dernier se trouve localisé dans le compartiment vasculaire au moment de l'illumination^[87]. À titre d'exemple, le Visudyne® est utilisé dans le traitement des néovascularisations choroïdienne chez les adultes atteints de la Dégénérescence Maculaire liée à l'âge (DMLA). L'illumination est effectuée seulement 10 min après l'injection intravitréenne du PS pour une durée de 83 secondes.

Réaction inflammatoire locale et réponse immunitaire anti-tumorale : Le système immunitaire inné constitue la première ligne de défense en cas d'agression par un agent pathogène. Ce système est composé de lymphocytes Natural Killers (NK), de monocytes / macrophages, de granulocytes et de cellules dendritiques (CDs). Son activation est indispensable à l'orientation vers une réponse immune adaptative dite spécifique. Il a ainsi été démontré que la PDT était capable d'induire l'activation d'une réponse immunitaire innée suite à un stimulus inflammatoire dont l'objectif est de contenir et éliminer les débris et de restaurer l'homéostasie à la suite des dommages oxydatifs (Figure 13). En effet, le stress

oxydatif post-PDT induit la libération de métabolites de l'acide arachidonique (e.g., prostaglandines, leucotriènes, thromboxane), l'augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (e.g., MIP2, IL-6, TNF α , IL-1 β) et l'activation du système du complément^[88]. Ces signaux d'inflammation aïgue post-PDT ainsi que la perméabilisation du réseau vasculaire permettent l'afflux et l'infiltration de polynucléaires neutrophiles, mastocytes, monocytes/macrophages au niveau du site endommagé (Figure 13)^[89]. Les macrophages sont des acteurs de l'immunité innée, leur fonction principale est d'éliminer les cellules tumorales par la sécrétion de molécules cytotoxiques (e.g., TNF α) ou par phagocytose suite à leur activation par des signaux de dangers (e.g., HSP 70 pour « Heat Shock Protein) libérés par les cellules tumorales endommagées. De plus, leur capacité à agir comme des cellules présentatrices d'antigènes en font des cellules auxiliaires très importantes pour l'activation de l'immunité adaptative^[90]. Cette réponse inflammatoire est également caractérisée par un afflux massif de PNN au sein de la tumeur grâce à la contraction des cellules endothéliales permettant leur adhésion à la matrice sous endothéliale via les récepteurs à intégrine $\beta 2$ ^[91]. Le recrutement de cette population cellulaire dans le cadre de la PDT a été décrit par *SO. Gollnick et al.*, puisqu'il a été démontré que l'augmentation de chimiokines inflammatoires telles que MIP-2 et de molécules d'adhésions telle que l'E-sélectine post-PDT favorisait leur recrutement au niveau du site endommagé^[92]. La PDT permet également le recrutement de PNN dans les ganglions lymphatiques drainant la tumeur (TDLN) afin de présenter les antigènes tumoraux aux lymphocytes CD8⁺ (Figure 13)^[93]. Il a d'ailleurs été montré qu'une déplétion en PNN chez la souris induisait une difficulté à développer une réponse CD8⁺ efficace^[92]. À la lumière de ces résultats, les PNN ont un rôle clé dans l'établissement de la réponse anti-tumorale après PDT en favorisant la prolifération et la survie des lymphocytes CD8⁺. Enfin, le rôle des lymphocytes NK a également été étudié. *Gollnick et al.*, ont rapporté que le contrôle de la maladie à distance médié par les CD8⁺ était amélioré en présence de ces cellules^[94]. Ces données suggèrent alors que les cellules NK étaient capables de renforcer l'immunité anti-tumorale médiée par la PDT.

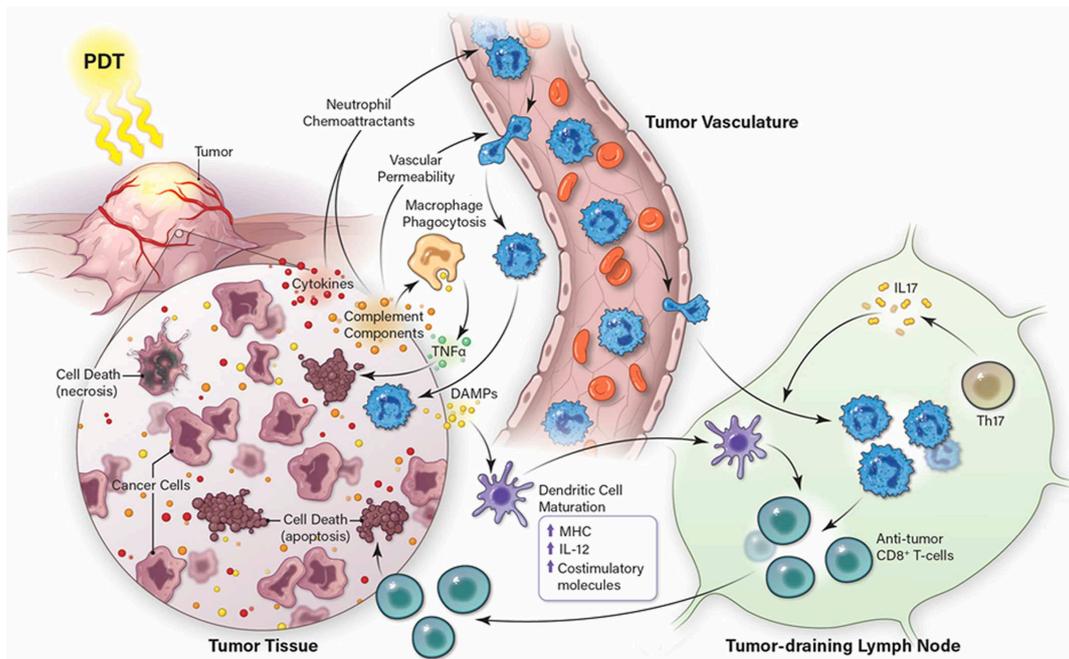


Figure 13: Induction d'une réaction inflammatoire locale par la thérapie photodynamique^[88] ($TNF\alpha$, Tumor Necrosis Factor α ; DAMPs, Damage Associated Molecular Pattern; MHC, Major Histocompatibility Complex; IL-12, Interleukin 12; IL17, Interleukin 17; Th17, T helper 17 cell)

De nos jours, la thérapie anti-cancéreuse idéale ne se résume plus uniquement à l'éradication des cellules tumorales mais également à la capacité d'induire une mort cellulaire immunogène (MCI). Le concept de MCI est défini comme un type de mort cellulaire capable de stimuler efficacement la réponse immunitaire contre des néoantigènes tumoraux produits par les cellules mourantes / mortes permettant de générer une mémoire immunitaire anti-tumorale sur le long terme. Il est maintenant admis que la MCI peut être initiée par différents stimuli tels que les agents anticancéreux (e.g., anthracyclines (doxorubicine), l'oxaliplatine, le mitoxantrone et le bortezomib), les virus oncolytiques, la radiothérapie et plus récemment la thérapie photodynamique^[95]. Plus précisément, l'induction de la mort des cellules cancéreuses par les différents types de morts présentés précédemment procure à la PDT un effet immunogène suite à la libération/la relocalisation ou l'exposition à la membrane de signaux de dangers ou DAMPs (Damage Associated Molecular Pattern). Un large spectre de DAMPs a été associé à la PDT : les protéines de choc thermique ou HSP (Heat Shock Protein), la calréticuline (CRT), la protéine associée à la chromatine ou HMGB1 (High Mobility Group Box 1) et l'Adénosine Triphosphate (ATP)^[96]. Ces DAMPs sont libérés par les cellules endommagées / mortes et vont favoriser le recrutement de cellules présentatrices d'antigène, grâce à leur reconnaissance par les PRRs (Pattern Recognition Receptors) exprimés sur ces cellules immunitaires. Ces cellules font le lien entre le système immunitaire

innée et adaptatif, leur fonction principale étant la présentation d'antigènes aux lymphocytes naïfs. L'environnement pro-inflammatoire post-PDT ainsi que la reconnaissance de ces DAMPs induit la maturation des CD_s à l'origine immature et leur migration au niveau des nœuds lymphoïdes afin de présenter aux lymphocytes naïfs un peptide antigénique tumorale. Des études ont montré que l'incubation de CD_s avec des milieux conditionnés de cellules tumorales préalablement traitées à la PDT induisait la maturation des CD_s. De plus, T. *Kushibiki et al.*, ont montré que la PDT favorisait la sécrétion de cytokines IL-1 α , IL-1 β et IL-6 par ces cellules ainsi que la diminution de TNF α renforçant ainsi la réponse immunitaire^[97]. Cette présentation antigénique aux lymphocytes naïfs conduit à l'activation de différentes populations lymphocytaires telles que : les lymphocytes CD4 helper, les lymphocytes CD8+ cytotoxiques et les lymphocytes B initiant ainsi la réponse immune anti-tumorale adaptative^[98]. L'activation lymphocytaire conjointement à la présentation des antigènes tumoraux par les CD_s est un processus qui nécessite 3 signaux. Dans un premier temps, la reconnaissance du complexe antigène / CMH porté par la cellule dendritique par le complexe Récepteur des lymphocytes T (TCR)/ CD3 porté par le lymphocyte T (signal 1). S'ensuit un signal de co-stimulation par l'interaction du CD28-CD80/86 porté respectivement par le Lymphocyte T et la CD (signal 2). Enfin, un stimulus cytokinique composé d'IL-4, IL-2 et IL-12 (signal 3) induit la prolifération des Lymphocytes T en favorisant la sécrétion d'IL-2 et de TNF α . La réponse immunitaire adaptative est classifiée en deux types dit à médiation cellulaire ou à médiation humorale. L'immunité à médiation cellulaire est décrite comme la voie majeure de l'immunité anti-tumorale. Cette réponse est caractérisée par la production d'IFN γ , TNF α et IL-2 et oriente vers une activation de la réponse cellulaire cytotoxique via les lymphocytes T CD8+ (réponse Th1). La sécrétion d'IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 et TGF β stimule la prolifération et l'activation des lymphocytes B et oriente vers une réponse dite à médiation humorale (réponse Th2). Cette immunité promeut la production d'anticorps spécifiques des antigènes tumoraux par les lymphocytes B capables d'induire la destruction des cellules tumorales par un mécanisme de cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps ou ADCC (Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity). L'implication de l'immunité adaptative dans le mécanisme d'action PDT a été démontré pour la première fois par l'équipe de *G. Canti et al.* Cette équipe a montré qu'un groupe de souris immunodéprimées traitées et guéries du fibrosarcome par la PDT ne résistait pas à une nouvelle agression par des cellules tumorales de la même origine. À l'inverse, le groupe de souris immunocompétentes était capable de contrôler la réapparition de la maladie si les cellules tumorales étaient de la même origine mais pas lorsqu'elles étaient d'une origine

différente. Ces résultats ont démontré pour la première fois que la PDT induit l'activation de l'immunité antitumorale adaptative et donc la mise en place d'une mémoire immunitaire spécifique de la tumeur^[99].

D. Les photosensibilisateurs

L'utilisation de la PDT évolue depuis plusieurs années, son champ thérapeutique s'élargit et de nouveaux PS voient le jour afin d'améliorer l'efficacité de ce traitement. Pour cela et afin de pouvoir envisager une application clinique, un photosensibilisateur doit répondre à plusieurs caractéristiques^[100,101]: **i)** Présenter un caractère amphiphile facilitant son transport vers sa cible à travers la circulation sanguine, **ii)** Offrir la possibilité d'être administré selon plusieurs voies (e.g., topique, orale, IV), **iii)** Présenter une absorption spectrale dans le rouge jusqu'à l'IR (650 à 800), qui sont les longueurs d'onde associées à une pénétration tissulaire de la lumière importante (Figure 14), **iv)** Disposer d'un état de triplet stable ainsi que d'un rendement quantique en oxygène singulet important, **v)** Être associé à une non-toxicité en l'absence de lumière, **vi)** Avoir une clairance rapide limitant tout effet indésirable de photosensibilité, **vii)** être sélectif afin de limiter l'atteinte aux tissus sains.

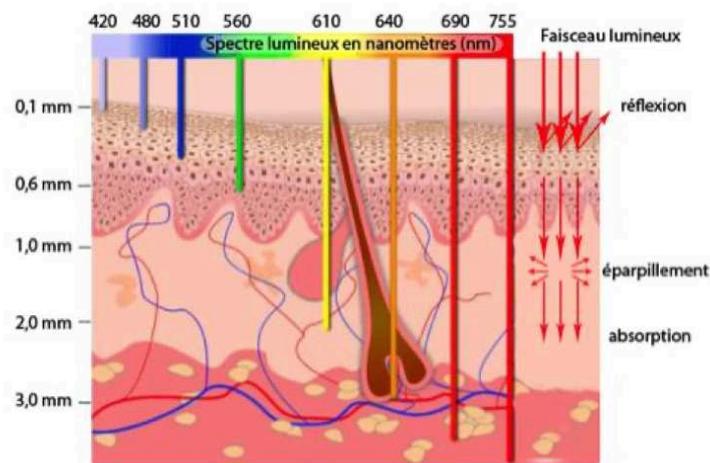


Figure 14 : Profondeur de pénétration dans la peau des ondes lumineuses (source : *La lumière contre le cancer / Réflexions – Université de Liège*)

Afin d'aboutir à un tel PS, plusieurs générations de PS se sont succédées ayant toutes pour objectif d'améliorer la génération précédente.

1. PS de 1^{ère} génération

La 1^{ère} génération de PS est représentée par une classe importante : les porphyrines (du grec « *porphura* » signifiant « *pourpre* »). Les porphyrines sont retrouvées dans tous les organismes vivants (aussi bien végétales qu'animales) et sont localisées principalement dans les cellules et les organes responsables de la production d'énergie, du métabolisme et des transports. Ainsi la combinaison du noyau porphyrinique au fer constitue l'hème, à l'ion Mg^{2+} constitue la chlorophylle et la combinaison du noyau porphyrinique au cobalt à la vitamine B12.

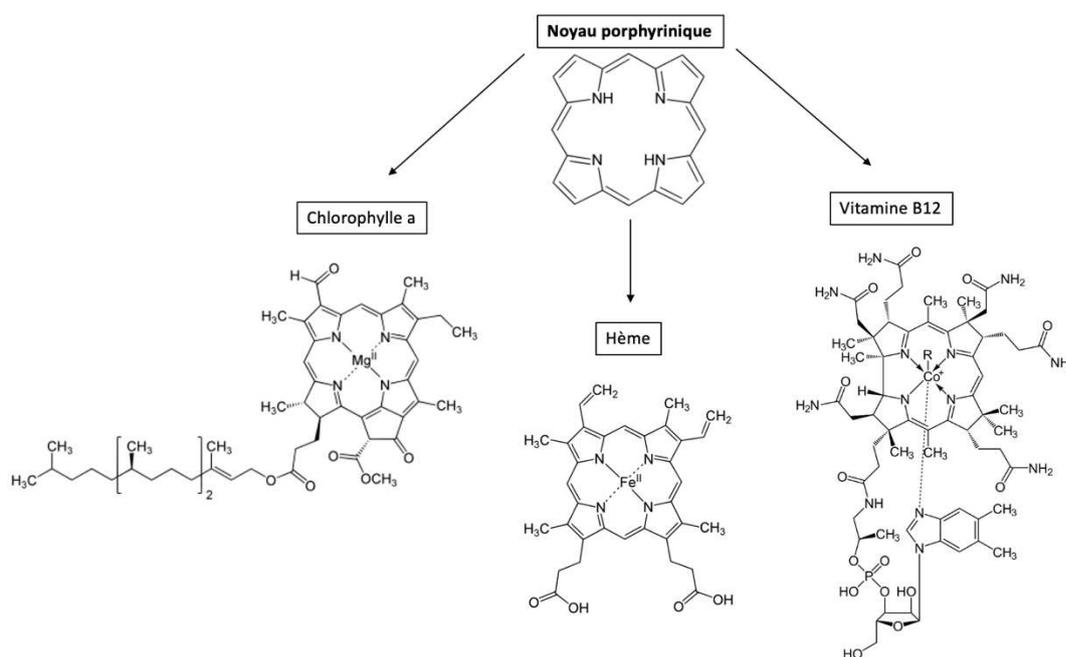


Figure 15 : Molécules dérivées du noyau porphyrinique

Comme il a été décrit précédemment, l'Hématoporphyrine (Hp), mélange complexe de porphyrines, a été la première porphyrine utilisée en tant que PS. Sa purification ainsi que quelques modifications chimiques ont conduit à la synthèse de l'HpD, un mélange de porphyrines solubles permettant d'améliorer la sélectivité et de diminuer les problèmes de photosensibilité observés avec l'Hp. Plus tard, le Photofrin® ou « porfimère sodique » composé de dimères de porphyrines et d'oligomères isolés à partir de l'HpD fut le premier PS à obtenir son AMM par la Food and Drug Administration (FDA) en 1993 au Canada dans le traitement des cancers de la vessie^[102].

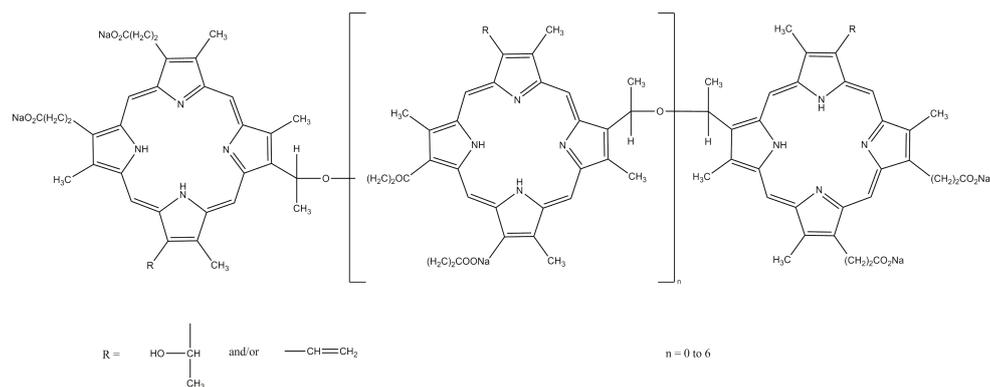


Figure 16 : Structure du Porfimer sodium (Photofrin®)

Bien que le Photofrin® présente une phototoxicité élevée et qu'il ait été utilisé dans le traitement de nombreux cancers, il présente certaines limites^[103]: **i)** Une hydrophobicité importante, **ii)** Une pureté chimique médiocre (mélange de plus de 60 molécules), **iii)** Une élimination lente responsable d'une photosensibilisation générale de longue durée jusqu'à 2 à 3 mois après le traitement, **iv)** une longueur d'onde d'absorption dans le rouge (630 nm) parfois insuffisante pour traiter les tumeurs profondes. Cette longueur d'onde d'activation chevauche également le spectre d'absorption de chromophores endogènes tel que l'oxyhémoglobine pouvant être à l'origine d'interférences avec la photoactivation du photofrin®.

Le Photofrin® reste cependant aujourd'hui indiqué dans le traitement des rechutes des cancers bronchiques non à petites cellules ou du cancer de l'oesophage ayant fait l'objet d'un traitement locorégional antérieur.

2. PS de 2^{ème} génération

Cette nouvelle classe de PS dite de 2^{ème} génération est arrivée afin de pallier aux inconvénients des porphyrines et du Photofrin® en particulier. Différentes modifications chimiques apportées à la structure tétrapyrrolique des porphyrines ont permis d'améliorer : **i)** La pureté, **ii)** La qualité du traitement puisque les longueurs d'ondes requises pour activer les PS de 2nde génération, comprises entre 600 et 800 nm, permettent une pénétration de la lumière dans les tissus plus importante et donc un traitement plus en profondeur, **iii)** La clairance limitant les problèmes de photosensibilisation cutanée, **iv)** La spécificité pour les cellules cancéreuses, **v)** L'augmentation du rendement quantique de formation d'oxygène singulet^[104]. À titre d'exemple, seront illustrés dans la partie ci-dessous, les PS de 2nde génération les plus utilisés.

- **Temoporfin, Foscan® :**

Le Foscan® est aujourd'hui commercialisé par la société Biolitec AG (Lena, Allemagne) qui racheta en Avril 2002 la société à l'origine de son développement, Scotia, (UK, Ltd). L'European Medicines Agency (EMA) délivra son AMM en 2001 dans « le traitement palliatif des carcinomes épidermoïdes avancés de la tête et du cou après échec des traitements antérieurs et chez les patients qui ne peuvent pas être traités par radiothérapie, chirurgie ou chimiothérapie systémique. », tandis que la FDA l'avait refusée en 2000.

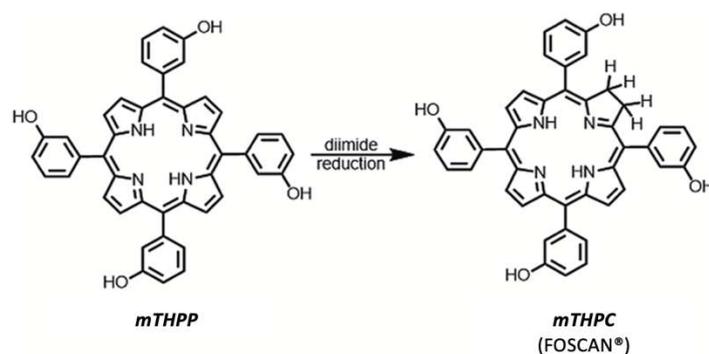


Figure 17: Synthèse du mTHPC, (Foscan®) à partir du mTHPP ^[105]

Le méso-tetra(hydroxyphényl)porphyrine (mTHPP) fut découvert en 1980 par *Bonnett et al.*, et présente une meilleure sélectivité tumorale comparé à l'HpD^[106]. Cependant sa faible absorption dans le rouge ne confère aucun avantage à utiliser cette molécule plutôt que le Photofrin®. Afin d'améliorer ses capacités d'absorption un analogue chloré de cet hydroxyphénylporphyrine a été synthétisé via une réduction diimide (Figure 17). Cette réduction conféra à cette nouvelle molécule un pic d'absorption plus intense dans le rouge à l'origine d'une meilleure pénétration tissulaire. Le méso-tetra(hydroxyphényl)chlorine (mTHPC ou Foscan®) répond alors aux propriétés attendues d'un PS de seconde génération :

- i)** un composé pur,
- ii)** une accumulation préférentielle dans le tissu tumoral,
- iii)** une absorption maximale à 650 nm ce qui signifie une pénétration plus importante,
- iv)** une utilisation de faibles doses, plus faibles que l'HpD, pour avoir un effet,
- v)** une durée de photosensibilisation moins longue que celle utilisée pour les PS de 1^{ère} génération, mais qui reste cependant importante (seulement 71% du Foscan® est éliminé après 30 jours) ^[107].

- **Verteporfin, Visudyne®:**

Le Verteporfin, (Visudyne®, Novartis AG, Basel, Switzerland) a été le premier PS utilisé comme traitement de première intention de la forme humide de la DMLA et de la néovascularisation choroïdienne secondaire à la myopie. Sa mise sur le marché fut autorisée en 2000 au Canada, aux Etats-Unis et dans l'Union Européenne. Ce dérivé benzoporhyrinique est synthétisé à partir de la protoporphyrine IX (PpIX) et présente plusieurs avantages : **i)** C'est une chlorure chimiquement stable, **ii)** sa pénétration tissulaire est 50% plus élevée qu'avec le Photofrin®, **iii)** son temps de demie vie de 5 à 6h lui permet d'être rapidement éliminé (par voie hépatique en 24h), limitant ainsi les problèmes de photosensibilité, **iv)** un pic d'absorption entre 680 et 695 nm ^{[104][108]}.

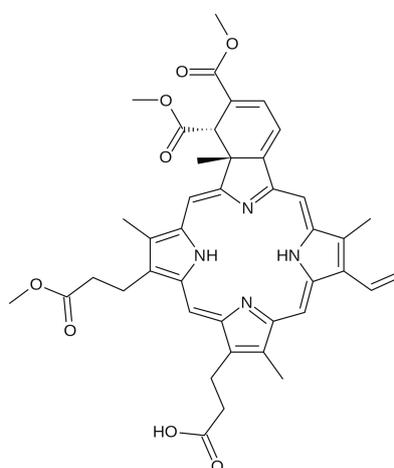


Figure 18: Structure de la benzoporphyrine (Verteporfin, Visudyne®)

Son mécanisme d'action caractéristique repose sur l'induction de photodommages au niveau de l'endothélium vasculaire suite à l'accumulation du PS au niveau des vaisseaux. L'endommagement de l'endothélium vasculaire suite à l'action photodynamique entraîne le relargage de facteur pro-coagulants et vasoactifs (e.g., leucotriène, thromboxane) responsables de l'agrégation des plaquettes, de la formation de caillot de fibrine entraînant une vasoconstriction et l'obstruction des néovaisseaux à l'origine de la DMLA. Plusieurs effets indésirables peuvent être retrouvés avec ce traitement tels qu'une hypercholestérolémie, une hypersensibilité, une diminution de l'acuité visuelle, une dyspnée, une réaction au site d'injection et des maux de tête c'est pourquoi il ne constitue plus le traitement de première intention mais peut être utilisé en cas de contre-indication ou de non-réponse aux anti-VEGF.

- **5-ALA, Levulan®, Gliolan®, Metvix®, Ameluz®, Alacare®:**

L'acide 5-aminolévulinique (5-ALA) est un précurseur biochimique naturel impliqué dans la biosynthèse de l'hème. Il peut être métabolisé en protoporphyrine IX (PpIX) qui est le dernier intermédiaire de cette voie de biosynthèse et qui est photoactivable. Cependant, les concentrations en PpIX requises pour la photosensibilisation ne sont jamais atteintes en situation physiologique. C'est pourquoi, l'administration de 5-ALA exogène peut induire une accumulation de PpIX plus importante que les concentrations physiologiques et ainsi induire un effet photodynamique à la suite d'une illumination. La spécificité du PS PpIX pour les cellules cancéreuses repose sur la capacité de la ferrochelatase à convertir cette PpIX en hème. En effet, cette capacité de conversion est plus lente chez les cellules cancéreuses. Ainsi lors d'un apport exogène en 5-ALA les cellules cancéreuses accumuleront plus de PpIX que les cellules saines limitant ainsi l'effet de la PDT aux cellules tumorales uniquement^[109].

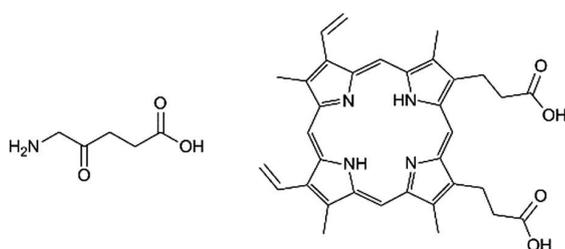


Figure 19: Structure du 5-ALA (gauche) et de la PpIX (droite)

La PpIX possède plusieurs pics d'absorption : un pic d'absorption maximal à 410 nm ainsi que quatre autres plus petits à 510, 540, 580 et 635 nm permettant ainsi différentes utilisations de sources lumineuses. Le principal avantage du 5-ALA est la possibilité d'une application topique. C'est pourquoi, il a été approuvé en 1999 dans le traitement topique des kératoses actiniques du visage et du cuir chevelu et également dans le traitement de cancers de la peau non mélaniques. Enfin, sa dégradation rapide permet de limiter les problèmes de photosensibilité du patient.

3. PS de 3^{ème} génération

Malgré les efforts menés dans le développement des PS de 2nde génération, il demeure des points à améliorer. Ces PS de 2nde génération présentent généralement une faible sélectivité tumorale en plus de leur manque de solubilité et de leur élimination lente. D'autant plus que, l'un des enjeux majeurs en cancérologie est le développement de nouveaux médicaments qui vont agir sélectivement sur les cellules tumorales tout en épargnant le tissu

sain. C'est pourquoi, les PS dits de 3^{ème} génération sont en cours de développement afin de répondre à ce besoin thérapeutique donc l'objectif est de réaliser une thérapie photodynamique dite ciblée.



Figure 20: Design des photosensibilisateurs de 3^{ème} génération : a) ciblage actif ; b) ciblage passif [105]

Pour cela, certains PS de 2nde génération ont été modifiés afin d'améliorer leur sélectivité pour les cellules néoplasiques de manière active grâce à la conjugaison d'entité chimiques au PS (e.g anticorps, carbohydrates, acides aminés, peptides) ou de manière passive par la vectorisation ou encapsulation (e.g liposomes, micelles, nanoparticules)^[105] (Figure 20). Cependant aucun PS de 3^{ème} génération n'a obtenu d'AMM à l'heure d'aujourd'hui dans le traitement du cancer (Tableau 2).

Photosensibilisateur	Nom commercial	Génération	Longueur d'onde d'excitation (nm)	Indication
Porfimère sodique	Photofrin®	1 ^{ère}	632	Cancer de l'œsophage Cancers bronchiques non à petites cellules (AMM en France en 1996)
Meso-tétra(hydroxyphényl) chlorine (mTHPC) ou Témoporfine	Foscan®	2 ^{ème}	652	Carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou (AMM Européenne en 2001)
Acide 5-Amino-lévulinique (5-ALA)	Levulan®	2 ^{ème}	632	Kératose actinique Cancer de la peau non mélanique (approuvé par la FDA en 1999)
Méthyl aminolevulinate	Metvixia®	2 ^{ème}	635	Kératoses actiniques fines et non pigmentées Carcinomes basocellulaires superficiels primitifs du visage et du cuir chevelu (AMM Européenne en 2000)

Tableau 2: Synthèse de l'ensemble des photosensibilisateurs ayant obtenu une Autorisation de Mise sur le Marché dans le traitement du cancer

E. Proposition de la PDT dans la prise en charge de la carcinose péritonéale

En plus de la destruction ciblée des métastases par la formation d'ERO et de son potentiel immunostimulant, l'intérêt potentiel de la PDT dans le traitement des carcinoses péritonéales ovarienne repose sur d'autres avantages : **i)** l'absence d'effets indésirables et toxiques notables de ce traitement, **ii)** Son indication dans le traitement des lésions

superficielles de surface étendue (champs de cancérisation) telle que la kératose actinique. Les métastases microscopiques du cancer de l'ovaire étant disséminées au sein de toute la surface péritonéale qui est de l'ordre de 0,5 à 2m² (équivalent de la surface corporelle)^[110], un traitement par PDT semble adapté pour ce type de pathologie diffuse, **iii**) l'administration du PS en amont de la chirurgie de cytoréduction permettrait de réaliser « une chirurgie guidée par la fluorescence (PDD)» et ainsi de détecter les lésions invisibles à l'œil nu devant faire l'objet d'une exérèse, **iv**) à la suite de quoi la PDT pourrait être appliquée afin de détruire les métastases microscopiques résiduelles.

Ainsi, plusieurs essais cliniques ont été entrepris afin de tester l'efficacité de la PDT utilisant divers photosensibilisateurs dans le traitement des carcinomes péritonéaux ovariens. Ces études ont permis de démontrer la faisabilité de la PDT dans le traitement de la carcinome péritonéale. En 1991, débute un premier essai de phase I^[111] dont l'objectif était d'évaluer la tolérance de la PDT utilisant un PS de 1^{ère} génération, le dihematoporphyrin éthers (DHE) chez des patientes atteintes d'une carcinome péritonéale principalement d'origine ovarienne (13 patientes sur 23). Le PS utilisé était injecté en IV (48 à 72h avant la chirurgie) à une dose de 1,5 à 3 mg/kg. Une illumination à une longueur d'onde de 630 nm a été délivrée sur toute la surface péritonéale avec une dose de 0,2 à 3,9 J/cm² (suivant une stratégie d'escalade de dose) (Tableau 3). Le dispositif d'illumination utilisé était une fibre optique à tir direct pour les intestins et le mésentère tandis que l'illumination des autres parties (e.g., diaphragme, viscère, bourse omentale, et pelvis) se faisait à l'aide d'une baguette lumineuse. 6 patients sont restés cliniquement exempts de la maladie jusqu'à 18 mois, et 5 patients ont présenté des complications liées au traitement (faible sélectivité du PS et pénétration de la lumière).

En 1993, un nouvel essai clinique de phase I^[112] a été mis en œuvre aux Etats-Unis utilisant à nouveau le DHE dans la carcinome péritonéale d'origine ovarienne. 44 patientes ont été incluses dans l'étude dont 39 ont reçu une PDT après la chirurgie. Le DHE était administré en IV entre 48h et 72h avant la chirurgie selon une escalade de dose de 1,5 à 2,5 mg/kg. Une longueur d'onde de 630 nm avec une dose 2,8 – 3 J/cm² a été initialement choisie. Cependant à la suite d'œdèmes intestinaux et des perforations digestives, les auteurs ont illuminé par la suite avec une longueur d'onde moins pénétrante de 514 nm au niveau de l'intestin et du mésentère. La PDT intrapéritonéale a été complétée par de potentiels boosts pour les zones à haut risque, de lumière verte (dose de 5 à 7,5 J/cm² j/cm², 515 nm) et de

lumière rouge (dose 15 J/cm², 630 nm) (Tableau 3). Malgré le fait que cette étude ait démontré la faisabilité d'une PDT pour cette indication la limite de cette étude repose sur sa toxicité digestive notable. En effet plusieurs patientes ont présenté une perforation gastrique (n=1) ou intestinale (n=3) ainsi qu'une fistule digestive (n=1). Parmi les autres complications rapportées comme étant liées à la PDT, les auteurs ont également indiqué des épanchements pleuraux (n=23) ainsi que des thrombocytopenies de sévérité modérée.

En 2006, dans un essai de phase II^[113] utilisant les doses tolérées définies dans l'essai de phase I présenté ci-dessus, le Photofrin® a été administré en IV (2,5mg/kg) 48h avant l'opération chez des patients présentant une carcinose péritonéale d'origines diverses. 100 patients ont été inclus dont 33 avec une carcinose d'origine ovarienne. L'illumination était réalisée à une longueur d'onde de 532 nm à l'aide d'une fibre optique pour le petit intestin, le mésentère et le colon (dose : 2,5 J/cm²) tandis que le reste de la cavité péritonéale était illuminée, avec une baguette lumineuse, à une longueur d'onde de 630 nm et à une fluence variant de 5 J/cm² à 10 J/cm² en fonction des organes traités (Tableau 3). L'abdomen était préalablement rempli d'une solution diffusante d'intralipides. Après 6 mois, 3 des 33 patientes étaient en réponse complète. L'un des effets indésirables majeur associé à la PDT a été le « syndrome de fuite capillaire » post-opératoire nécessitant une réanimation volémique. La médiane de survie était de 21 mois pour le groupe cancer de l'ovaire.

Publication	Type d'étude	PS	Longueur d'onde	Dose	Dispositif d'illumination
<i>Sindelar et al, 1991</i>	Phase I Carcinose péritonéale (1/2 d'origine ovarienne)	DHE Inj IV 1,5 à 3 mg/kg 48-72h avant la chirurgie	630 nm	0,2 à 3 J/cm²	Baguette lumineuse + fibre optique pour les intestins et le mésentère + solution intralipide
<i>Delaney et al, 1993</i>	Phase I Carcinose Péritonéale d'origine ovarienne	DHE Inj IV 1,5 à 2,5 mg/kg 48-72h avant la chirurgie	630 nm 515 nm (mésentère et intestin)	3 J/cm² + boost 15 J/cm² (630nm) 5 à 7,5 J/cm² (515 nm)	Baguette lumineuse + fibre optique pour les intestins et le mésentère + solution intralipide
<i>Hahn et al, 2006</i>	Phase II Carcinose péritonéale (1/3 d'origine ovarienne)	Photofrin® Inj IV 2,5 mg/kg 48 avant la chirurgie	Mésentère, Intestin grêle et colon: 515 nm avec 2,5 J/cm² + fibre optique Le reste de la cavité: 630 nm avec 5 J/cm² à 10 J/cm² selon les organes + baguette lumineuse + solution d'intralipide		

Tableau 3: Synthèse de l'ensemble des essais cliniques ayant évalué l'efficacité de la Thérapie Photodynamique dans la carcinose péritonéale d'origine ovarienne

Conclusion partie II : À la lumière de ces résultats, la pertinence de l'utilisation de la PDT dans le traitement de la carcinose péritonéale, réalisée à la suite de la chirurgie de

cytoréduction, semble tout à fait démontrée. Cependant la mauvaise tolérance de la PDT ajoutée à une absence de réponse complète significative nous a conduits à nous interroger sur la spécificité du PS pour sa cible. C'est pourquoi l'utilisation de la PDT utilisant un PS de 3^{ème} génération semblerait être une approche pertinente. Pour cela il est nécessaire d'identifier un marqueur pouvant être surexprimé par les cellules cancéreuses ovariennes. Le récepteur au folate (FR), qui est surexprimé dans les cancers ovariens, pourrait faire partie des cibles permettant un adressage spécifique du photosensibilisateur au sein de la tumeur.

III. Le récepteur au folate une cible spécifique

A. L'acide folique

1. Définition

L'acide folique (folate, vitamine B9) est une vitamine hydrosoluble, précurseur métabolique d'une coenzyme, le tétrahydrofolate (THF) qui joue un rôle essentiel dans la synthèse des bases nucléiques (puriques et pyrimidiques) constituant les acides nucléiques (ADN et ARN) du matériel génétique et dans le métabolisme des acides aminés (constituant des protéines). Il contribue également à la croissance et à la division cellulaire, à la réparation du matériel génétique et à la méthylation de l'ADN lui conférant un rôle important pour la régulation épigénomique^[114]. L'acide folique peut être retrouvé de manière naturelle ou synthétique. Il faut alors différencier l'acide folique du folate. Le terme "acide folique" réfère à la forme oxydée synthétique du composé que l'on retrouve dans les compléments alimentaires. Tandis que le terme « folate », correspond à la forme ionique de l'acide folique et fait référence au THF que l'on retrouve naturellement dans les aliments^[115].

2. Apports nutritionnels

L'apport en folate est exclusivement alimentaire, notre organisme est incapable de synthétiser du folate puisque les cellules de mammifères ne possèdent pas les enzymes nécessaires à sa biosynthèse. Les aliments les plus riches en Vitamine B9 sont principalement les légumes à feuilles vertes (e.g., épinards, salade, endive, choux, poireaux, petits pois). On en retrouve également dans les fromages, les œufs, le foie ainsi que les levures alimentaires. L'apport nutritionnel recommandé est de 300 à 400 µg/jour chez l'adulte et 600 µg/jour chez

la femme enceinte^[116]. Plusieurs facteurs peuvent être à l'origine d'une déficience en folate ; malabsorption (e.g., à cause de l'alcoolisme), un apport nécessaire plus important pendant la grossesse, les médicaments (e.g., antifolates). La conséquence la plus courante de cette déficience est l'anémie mégaloblastique et peut également favoriser l'apparition de nombreuses pathologies si la carence s'aggrave (e.g., maladies cardiovasculaires, cancer, dysfonctions cognitives)^[117].

3. Structure chimique

Sous son nom chimique d'acide ptéroylmonoglutamique, l'acide folique est constitué d'un noyau ptérine, d'un acide para-aminobenzoïque (p-ABA), et d'une molécule d'acide glutamique (Figure 21).

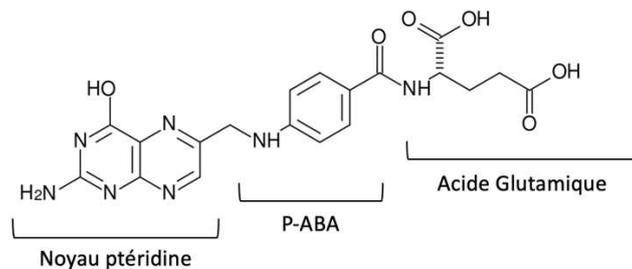


Figure 21: Structure de l'acide folique (p-ABA, acide para-aminobenzoïque)

Sous cette forme, il ne correspond ni à la forme alimentaire ni à la forme active dans l'organisme. Afin de jouer un rôle métabolique actif, l'acide folique doit être transformé en acide dihydrofolique (DHF) puis en THF via la Dihydrofolate réductase (DHFR) (Figure 22). C'est sous cette forme que les folates peuvent exercer leur action de coenzymes dans de nombreuses réactions de transfert d'unités monocarbonées dont la synthèse *de novo* des bases puriques et pyrimidiques.

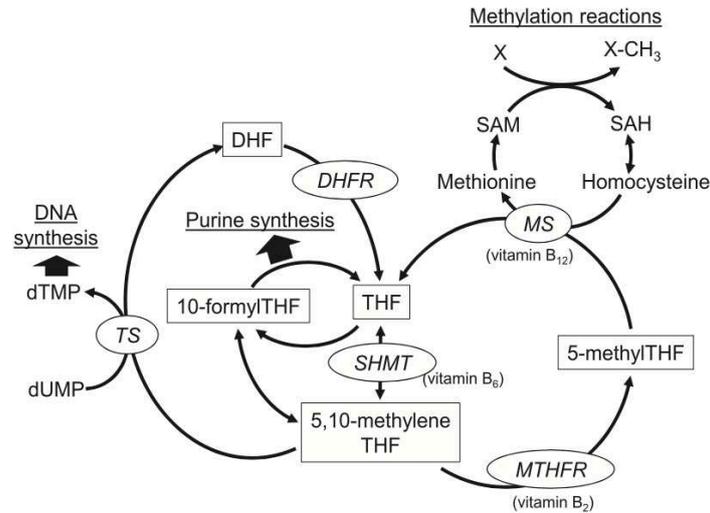


Figure 22: Cycle du folate (DHF, dihydrofolate ; DHFR, dihydrofolate reductase ; MS, methionine synthase ; MTHFR, méthylène tétrahydrofolate reductase, SAH, S-adenosyl homocystéine ; SAM, S-adenosyl méthionine ; SHMT, sérine hydroxyméthyltransférase ; THF, tétrahydrofolate ; TS, Thymidylate synthase ; X, substrats pour la méthylation)^[117]

B. Le transport des folates

L'acide folique est une molécule hydrophile anionique ne pouvant diffuser de manière passive à travers la membrane plasmique des cellules. Son internalisation dépend ainsi de 3 systèmes de transport (Figure 23) : le transporteur de folates réduits (RFC, « Reduced Folate Carrier »), le transporteur de folates couplés aux protons (PCFT, « Proton Coupled Folate Transporter ») et les récepteurs de l'acide folique (FR, « Folate Receptor »). Le RFC et le PCFT ne seront décrits que brièvement étant donné qu'ils ne font pas l'objet de ce travail.

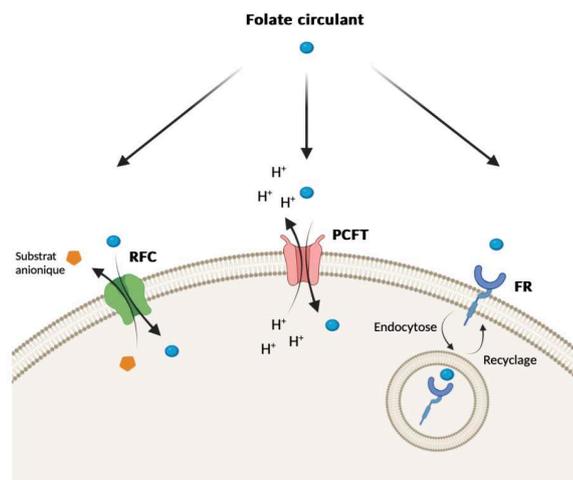


Figure 23: Transport du folate dans les cellules via le transporteur de folates réduits (*Reduced Folate Carrier - RFC*), le transporteur de folates couplé aux protons (*Proton Coupled Receptor - PCFT*) et le récepteur de l'acide folique (*Folate Receptor - FR*)

1. Le transporteur de folates réduits (RFC)

Le transporteur RFC est le premier transporteur de folates à avoir été identifié^[118]. Il constitue la principale voie d'absorption du folate alimentaire permettant sa distribution aux tissus à partir de la circulation systémique. Il est exprimé de manière ubiquitaire chez l'humain que ce soit dans les tissus sains ou les tissus cancéreux faisant de lui l'acteur majoritaire du transport des folates chez les mammifères. C'est un transporteur de type antiport qui couple l'influx de folates à un efflux de substrat anioniques (Figure 23). L'utilisation du gradient de concentration transmembranaire de phosphates anioniques fortement concentrés dans les cellules permet le transport de folates contre leur gradient de concentration. L'activité du transporteur est maximale à pH neutre et décroît au fur et à mesure que le pH diminue. Comme son nom l'indique, il possède une haute affinité pour les folates réduits tel que le THF, le N5-méthylTHF, le N5-formylTHF ($K_m = 2 \text{ à } 7 \text{ } \mu\text{M}$) ainsi que pour certains antifolates tel que le Méthotrexate comparativement aux folates oxydés tel que l'acide folique ($K_m = 200 \text{ à } 400 \text{ } \mu\text{M}$)^[119].

2. Le transporteur de folates couplés aux protons (PCFT)

Le PCFT fut le dernier transporteur de folate à être décrit en 2006 par *A. Qiu et al.* En effet, jusqu'à récemment, le transport des folates dans les cellules été attribué à deux types de transporteurs de haute affinité pour le folate réduit, le transporteur de folate réduit et les récepteurs de folate. Cependant, il y avait des divergences entre les propriétés de ces transporteurs et les caractéristiques du transport des folates dans de nombreux tissus, notamment au niveau de l'absorption intestinale des folates où réside un pH acide. En effet, la particularité de ce transporteur est une activité optimale lorsque le pH est acide (compris entre 5 et 5,5) et diminue rapidement à mesure que le pH augmente. Sa forte expression au niveau du duodénum et du jéjunum fait de lui le transporteur majoritaire de l'absorption intestinale des folates provenant de l'alimentation^[120]. Il est également fortement exprimé au niveau des reins mais le rôle qu'il pourrait y jouer reste encore à élucider. C'est un transporteur de type symport qui permet l'entrée de folates et de protons au sein des cellules intestinales par diffusion facilitée. Deux protons sont cotransportés pour chaque molécule de folate internalisée. Ainsi cette internalisation s'accompagne d'une acidification du milieu

intracellulaire. Contrairement au RFC, le PCFT possède des affinités équivalentes pour les folates réduits et pour les folates oxydés ($K_m = 0,5 \text{ à } 1 \mu\text{M}$)^[119].

3. Le récepteur à l'acide folique (FR)

Enfin, le folate peut être transporté par un dernier type de transporteur qui sont les récepteurs à l'acide folique. Cette famille de récepteur, aussi appelés FBP pour « Folates Binding Protein » est composé de quatre membres de protéines glycopeptidiques (FR α , FR β , FR γ et FR δ) qui permettent l'internalisation par endocytose des folates à pH neutre ou acide^[121]. C'est un type de récepteur de haute affinité tant pour les folates réduits que pour les folates oxydés ($K_m < 1\text{nM}$). Ces protéines partagent une homologie de séquence entre 68 et 79%, leur poids moléculaire varie entre 38 et 45 kDa et leur taille entre 220 et 243 acides aminés. Ils présentent deux (pour FR β) ou trois (pour FR α et FR γ) sites de N-glycosylation qui semble jouer un rôle important dans l'expression du récepteur à la surface des cellules^[122]. FR α , FR β et FR δ possèdent des extrémités carboxyles hydrophobes contenant un signal qui permet l'ancrage d'un motif GPI (Glycophosphatidylinositol) à la membrane. Le FR γ est quant à lui, une protéine constitutivement sécrétée en raison de l'absence de ce signal efficient qui permet l'ancrage GPI^[123]. Les FR diffèrent du RFC et du PCFT par le fait qu'ils ne sont pas exprimés de manière ubiquitaire et ne sont que présent sur une population restreinte de cellules. En effet, leur expression tissulaire sera différente en fonction du type d'isoforme exprimé. L'isoforme FR β est un marqueur de différenciation de l'hématopoïèse. Son expression augmente également lors de l'activation des monocytes / macrophages^[124]. FR γ est principalement sécrété par les tissus hématopoïétiques^[123]. L'isoforme FR δ n'a été que récemment identifiée et semble être exprimée par les lymphocytes T régulateurs et aurait donc une fonction dans la régulation du système immunitaire^[125]. À l'état physiologique l'isoforme FR α est exprimée exclusivement à la surface apicale des cellules épithéliales (e.g., utérus, placenta, plexus choroïde, poumon, rein) lui conférant un contact direct avec le folate circulant.

Au niveau de sa structure moléculaire, FR α est une protéine de structure globulaire stabilisée par huit liaisons disulfures. Ce récepteur contient une poche de liaison ouverte au folate composée de résidus conservés entre tous les sous-types de récepteurs. Il est constitué de 4 longues hélices α (α_1 , α_2 , α_3 , α_6), de 2 courtes hélices α (α_4 , α_5) et 4 brins courts β (β_1

à $\beta 4$). Le domaine central du récepteur est constitué des hélices $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ et $\alpha 5$ reliées entre elles par 4 ponts disulfures (Figure 24a). Sa poche de liaison destinée au folate est formée des hélices $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$ dans le dos ; de la boucle amino-terminale et des brins courts $\beta 1$ et $\beta 2$ en bas ; des hélices $\alpha 1$ - $\alpha 2$ et $\alpha 3$ - $\alpha 4$ à gauche et en haut et $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\beta 4$ et $\beta 3$ à droite (Figure 24a,b). L'acide folique est amarré à l'intérieur de la poche de liaison via sa fraction ptéroate chargée négativement, tandis que les deux groupes carboxyles chargés négativement du fragment glutamate sont exposés à l'extérieur de la poche (Figure 24c). Ainsi, l'exposition du glutamate en dehors de la poche permet la conjugaison de l'acide folique à des médicaments sans en affecter sa liaison à FR α .

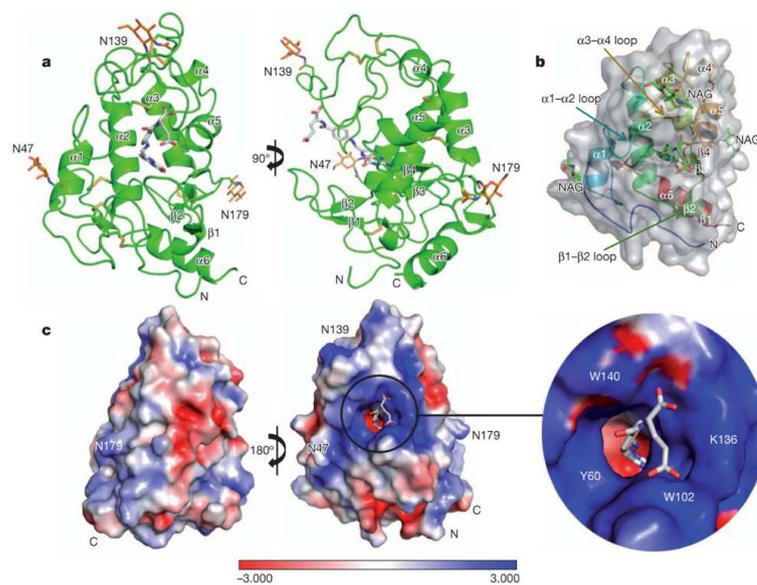


Figure 24: Structure moléculaire de FR α liant l'acide folique. a) 2 vues du complexe avec FR α en vert, l'acide folique en gris et les liaisons disulfures représentées par des bâtons jaunes. Les extrémités N et C-terminales sont également représentées. b) Diagramme en ruban du complexe avec l'acide folique en vert à la surface du récepteur. c) Surface de distribution de charge de FR α avec en vue rapprochée de l'entrée de la poche de liaison du ligand. Les atomes de carbone sont colorés en gris, les atomes d'azote en bleu et les atomes d'oxygène en rouge. La barre de code couleur (en bas) montre une échelle électrostatique de -3 à +3 eV.^[126]

C. Implication de FR dans le développement du cancer

FR α est un transporteur qui internalise le folate au travers d'un processus d'endocytose médiée par des « rafts » lipidiques non classique appelé phénomène de potocytose. Le folate sous forme active (5-methyl THF), après fixation à son récepteur, est internalisé par un processus d'endocytose indépendant de la clathrine^[127]. Cette internalisation implique des structures appelées cavéoles (= petites invaginations membranaires) qui une fois intériorisées

dans le cytoplasme vont former des endosomes précoces qui subissent une acidification puis une fusion avec des lysosomes^[128] (Figure 25). Le 5-methyl THF est ensuite dissocié de son récepteur et une fois dans le cytoplasme est modifié par ajout de résidus d'acide glutamique (polyglutamates) afin de rentrer dans le cycle des folates et ainsi contribuer à la synthèse du matériel génétique. Quant au FR α , sa libération après le processus d'endocytose peut lui permettre d'être transloqué au noyau et d'agir comme facteur de transcription^[129] (Figure 25).

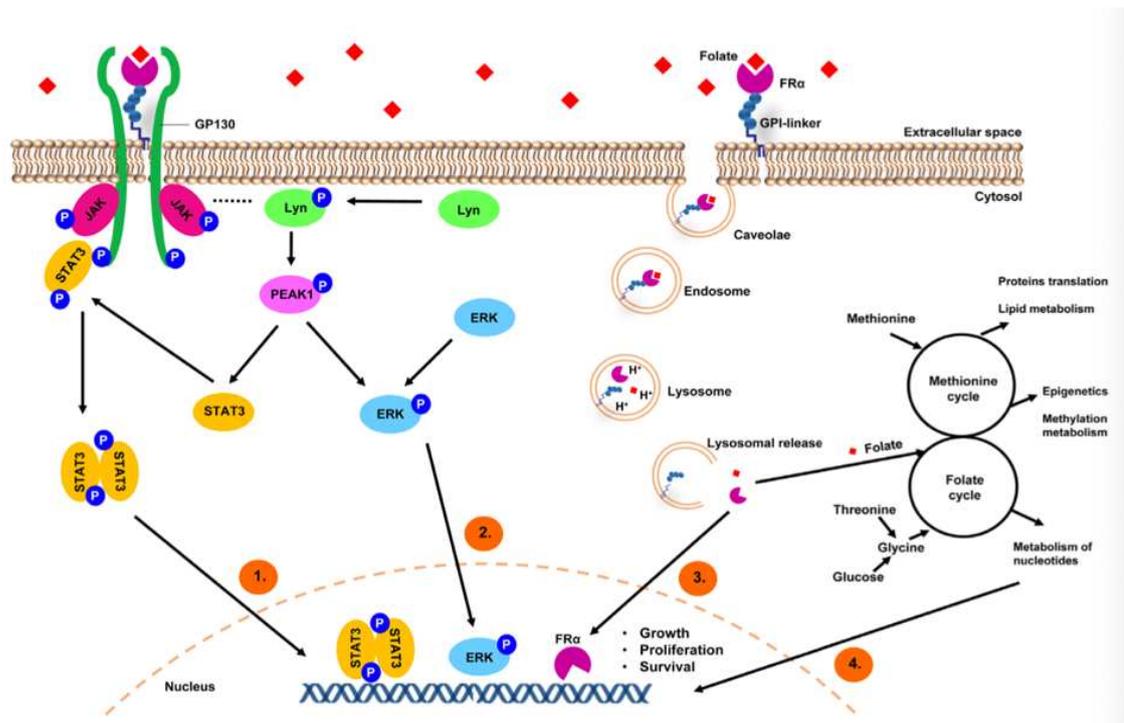


Figure 25: Voies d'internalisation du folate et sa participation au développement du cancer^[130] (JAK ; Just Another Kinase, STAT3, Signal Transducer and Activator of Transcription 3 ; PEAK1, Pseudopodium Enriched Atypical kinase 1 ; ERK, Extracellular signal-Regulated Kinase ; FR α , Folate Receptor α , GPI, GlycosylPhosphatidylinositol, GP130, Glycoprotein 130)

En situation pathologique notamment dans le cadre du cancer, FR α peut être surexprimé et recouvre alors la totalité de la surface de la cellule épithéliale^[131]. Cette surexpression est à l'origine d'une absorption excessive de folate soutenant alors la prolifération des cellules cancéreuses et la réparation des dommages à l'ADN grâce à son entrée dans le cycle des folates. FR α peut également être impliqué dans la régulation de gènes favorisant la croissance et la survie des cellules malignes par son action en tant que facteur de transcription. Enfin, il a été montré que FR α contribuait au développement du cancer par la régulation de réseaux de signalisation intracellulaire. La surexpression de FR α a été associée à une signalisation accrue de la voie STAT3 via un processus dépendant de JAK médié par le corécepteur GP130 (Figure 25). Enfin, FR α peut former un complexe macromoléculaire avec la tyrosine Kinase

LYN, qui régule la phosphorylation de PEAK1 impliqué dans l'activation de la voie STAT3 et ERK (Figure 25) toutes deux ayant un rôle dans la différenciation, la survie, la prolifération et l'angiogenèse^[80,132].

La surexpression de FR α a été étudiée en fonction du type de cancer et apparait en Figure 26. Cette isoforme se retrouve surexprimée notamment dans les cancers d'origine épithéliale tels que le cancer du sein, de la plèvre, du poumon, du col de l'utérus, du rein, de la vessie et de manière très importante dans le cancer de l'ovaire^[133].

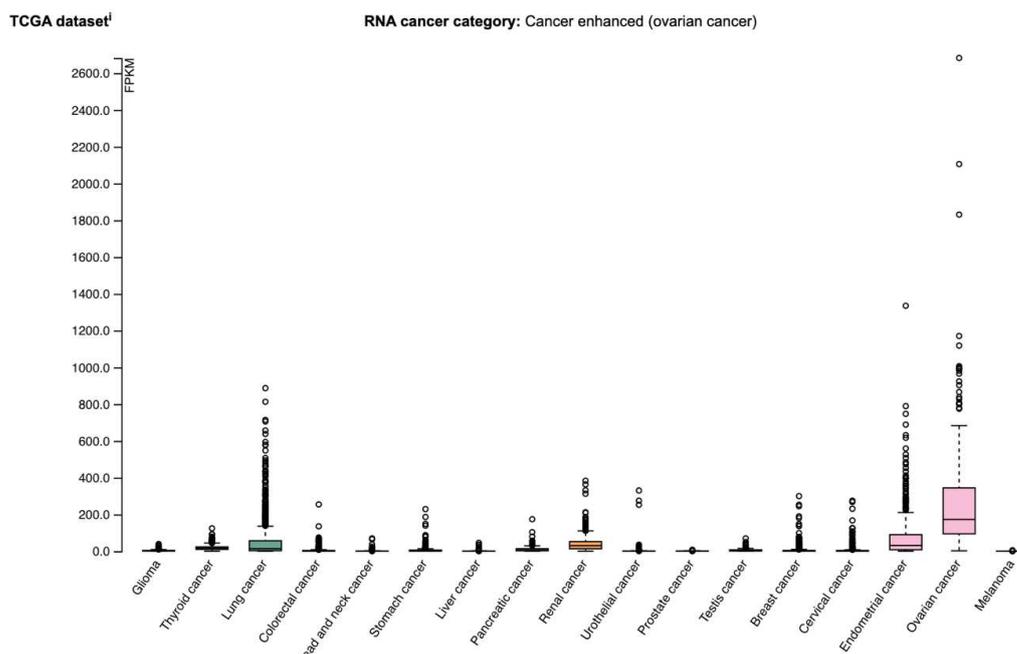


Figure 26: ARN de FR α selon le type de cancer (source : human protein atlas)

En effet, FR α est surexprimé dans 80% des cas de cancers ovariens d'origine épithéliale, en particulier les carcinomes séreux. Dans une étude, *M.A Crane* et al., ont analysé l'expression de FR α à partir d'une base de données contenant 361 échantillons de tissus de cancer de l'ovaire. Il en est ressorti que 81,8% des carcinomes séreux surexprimaient FR α contre seulement 39,9% des carcinomes mucineux ($p < 0,001$)^[134]. Cette même étude a montré que le taux d'expression de FR α ne variait pas de manière significative après la chimiothérapie suggérant alors que ce traitement ne permet pas d'atténuer son niveau d'expression. De plus, son taux d'expression a été corrélé au grade de la tumeur et donc aux taux de survie globale^[14] ainsi qu'à la réponse au traitement puisque la forte expression de FR α dans les tissus a été associée à une plus faible réponse aux agents chimiothérapeutiques^[135] ($p = 0.021$). De plus, une étude très récente a montré que

l'expression de FR α était retrouvée chez 75% des patientes présentant des métastases microscopiques à l'issue de la chirurgie de cytoréduction macroscopiquement complète^[136].

Les multiples implications de FR α dans le développement des cellules cancéreuses associée à sa surexpression font de lui une cible prometteuse dans le développement de nouvelles approches thérapeutiques ciblant FR α . Entre 2016 et 2021, 120 publications étudiant ce récepteur ont été éditées soit une moyenne de 24 / an contre une moyenne de 11 / an entre 2010 et 2015.

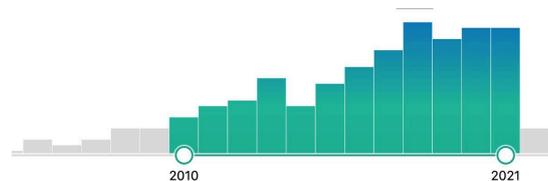


Figure 27: Nombre d'articles publiés entre 2000 et 2021 portant sur FR α (source : statistiques pubmed consulté le 17 Septembre 2022)

D. Nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant FR α

Cet engouement de la communauté scientifique est un bon indicateur de l'intérêt qui lui est porté. De nombreuses possibilités de thérapies ciblant FR α ont ainsi vu le jour (Figure 28):

Internalisation d'une macromolécule via ce récepteur: Tel un « cheval de Troie » l'utilisation d'un agent cytotoxique (e.g., vintafolide ou EC145) couplé au folate permet sa libération dans l'endosome de la cellule tumorale conduisant à l'inhibition de la division cellulaire et à l'induction de la mort des cellules cancéreuses^[137–139]. L'utilisation de ce composé dans un essai de phase I a montré un profil de sécurité acceptable ; Constipation, nausée, fatigue étant les effets indésirables les plus observés. De plus, une réponse partielle a été observée chez une patiente et un contrôle de la maladie a été constaté chez 6 patientes sur 16 au total^[140].

Vaccination ciblant FR α : L'injection autologue de cellules dendritiques contenant de l'ARNm codant FR α à une patiente présentant un cancer de l'ovaire métastatique a montré une régression de 50% des métastases du nœud lymphatique 16 mois après la dernière injection de vaccin. Les concentrations de CA-125 ont également diminué dès la 4^{ème} semaine après l'injection^[141].

CAR-T cells : Un essai de phase I utilisant un traitement par CAR-T dirigé contre FR α a présenté des résultats peu encourageants en plus d'une toxicité importante^[142]. Cependant, l'étude expérimentale de *Zheng Liang et al* de 2021 utilisant un CAR-T en tandem dirigé à la fois contre FR α et la mesotheline a montré une augmentation de la sécrétion de l'IL-12 comparé au contrôle favorisant ainsi l'activation des lymphocytes T cytotoxiques et des lymphocytes NK. Les résultats *in vivo* ont montré une persistance de l'activité anti tumorale par l'augmentation de l'infiltration des cellules T comparé au contrôle^[143].

Anticorps monoclonaux : L'utilisation d'Anticorps monoclonaux humanisés capables de cibler FR α à la surface des cellules malignes permet l'établissement d'une activité anti-tumorale. Le blocage de la signalisation sous-jacente par l'anticorps entraîne d'une part la mort de la cellule tumorale et d'autre part l'infiltration des cellules immunitaires effectrices ou acteurs du complément. À titre d'exemple, le farletuzumab (MORab003) est un anticorps humanisé IgG1 spécifique de l'isoforme FR α . *In vitro*, il entraîne la destruction des cellules tumorales par des mécanismes ADCC et CDC (Cytotoxicité dépendante du complément) et inhibe également la croissance de tumeur xenogreffée chez des souris *nude*^[144]. À la suite de ces résultats encourageants, un essai clinique de phase I a démontré un profil de toxicité acceptable^[145] et sa combinaison à la chimiothérapie a montré dans un essai de phase II l'absence de toxicité additive^[146]. L'essai de phase III chez des patientes sensibles au platine a montré que le farletuzumab en association avec du carboplatine + taxane améliorait la PFS mais uniquement chez certaines patientes ayant reçu des doses plus élevées^[147].

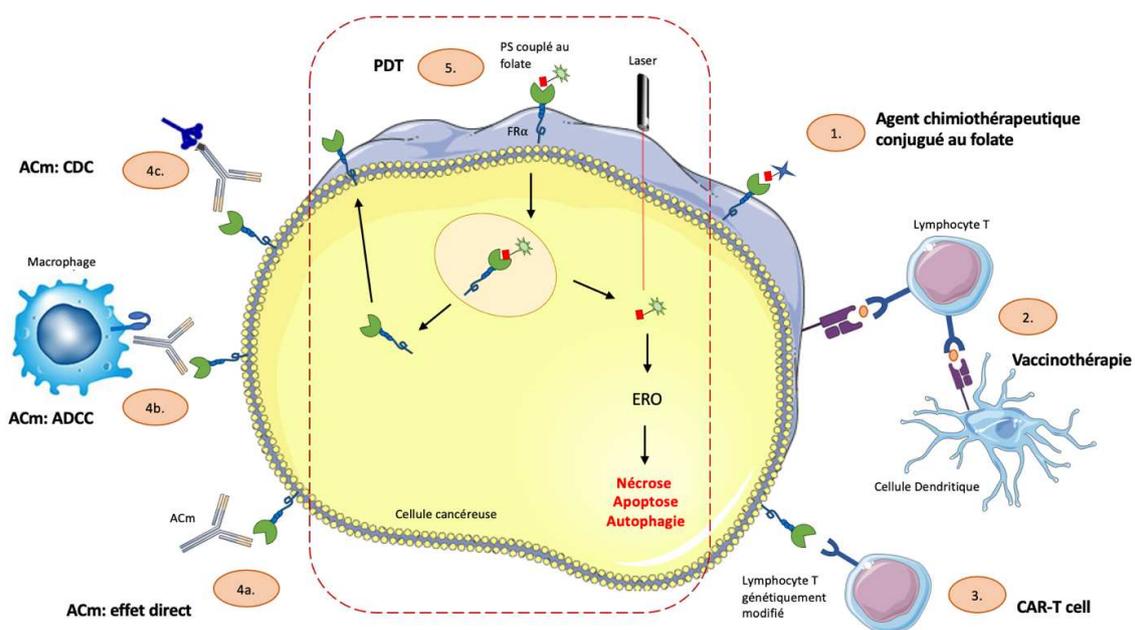


Figure 28: Différentes possibilités de ciblage de FR α (ADCC, Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps ; CDC, Cytotoxicité dépendante du complément ; ACm, Anticorps monoclonaux ; PS, photosensibilisateur ; ERO, espèces réactives de l'oxygène) (D'après A. Cheung et al)

Malgré ces nombreuses possibilités de ciblage de FR α , aucune n'a encore obtenu une autorisation de mise sur le marché. Il est donc toujours nécessaire d'identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques afin d'améliorer le pronostic des patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire métastatique.

Conclusion partie III : L'utilisation de la thérapie photodynamique utilisant un photosensibilisateur de 3^{ème} génération couplé au folate permettrait de cibler les cellules cancéreuses ovariennes qui surexpriment FR α et serait donc une approche pertinente (Figure 28). L'acide folique possède de nombreuses qualités permettant d'assurer l'adressage d'une molécule telle qu'ici un PS [131]: i) il possède une forte affinité pour le récepteur FR α , ii) il est de petite taille lui conférant de meilleures propriétés pharmacocinétiques, iii) il est peu onéreux et facilement disponible, iv) la conjugaison d'un composé à l'acide folique est relativement simple et nécessite peu d'étapes de synthèse, v) l'adressage vers un récepteur surexprimé par le tissu cancéreux permet de réduire l'atteinte des tissus sains et par conséquent améliore les paramètres de spécificité, vi) l'incorporation par endocytose permet une bonne diffusion de l'agent au sein de la cellule, vi) enfin la surexpression de ce récepteur par de nombreux cancers permet d'envisager l'extension de cette thérapeutique à d'autres pathologies. Dans ce contexte, nous souhaitons proposer le développement d'un nouveau PS de 3^{ème} génération permettant la destruction prophylactique des lésions microscopiques afin d'améliorer le pronostic des patientes.

IV. Proposition d'un candidat médicament : PS de 3^{ème} génération couplé à l'acide folique

Afin de proposer la PDT comme nouvelle stratégie thérapeutique dans le traitement du cancer de l'ovaire, de nouveaux PS utilisant l'adressage par le folate ont ainsi été développés ces dernières années. R. Scheinder et al. ont synthétisé un photosensibilisateur comprenant un motif triphénylporphyrinyl conjugué à l'acide folique (TPP-FA)^[148]. La spécificité de ce PS pour les métastases péritonéales de cancers épithéliaux de l'ovaire sur modèle animal a été

démontrée par notre laboratoire^[115]. Toutefois ce PS présentait d'une part une fluorescence très faible *in vivo* empêchant sa détection par les dispositifs médicaux ainsi qu'une faible stabilité. *Y. Hyun et al.*, ont quant à eux développé un photosensibilisateur comprenant un motif phéophorbide-a conjugué avec l'acide folique *via* un bras espaceur de type polyéthylène glycol (Pheo-PEG-FA)^[149]. Toutefois, ce photosensibilisateur présentait également une fluorescence modérée. **Ainsi, il existe aujourd'hui un réel besoin de développer de nouveaux PS présentant à la fois une bonne efficacité thérapeutique, un ciblage spécifique des métastases péritonéales pour ne pas altérer les tissus sains, une fluorescence suffisante afin de visualiser ces lésions au moyen de dispositifs médicaux (fluoroguidage) et peu d'étapes de synthèse.**

Devant cette problématique, un nouveau PS couplé à l'acide folique comprenant un motif pyrophéophorbide-a conjugué à l'acide folique *via* un bras espaceur de type polyéthylène glycol (Pyro-PEG-FA ou PS^{AF}) (Figure 29) a fait l'objet d'un brevet publié en 2019 par l'unité ONCOTHAÏ et leurs collaborateurs (Dr Céline Frochot, laboratoire Réaction et Génie des Procédés, Nancy).

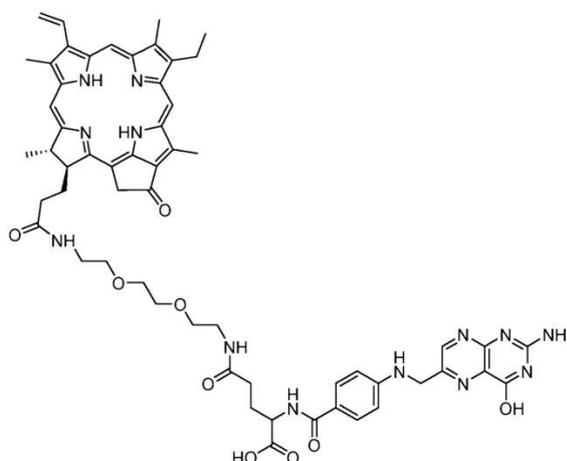


Figure 29: structure du Pyro-PEG-FA

Ce composé comprend plusieurs avantages par rapport à ces prédécesseurs : **i)** Le motif pyrophéophorbide-a qui est un intermédiaire de la dégradation de la chlorophylle permet d'apporter au composé une fluorescence satisfaisante pour visualiser les lésions par rapport aux conjugués proches structurellement décrits ci-dessus ainsi qu'une bonne stabilité à la lumière, **ii)** Le motif acide folique permet de cibler spécifiquement les récepteurs de l'acide folique, **iii)** Sa synthèse est un procédé simple qui ne nécessite que trois étapes le tout avec

des rendements très satisfaisant et supérieurs à ceux obtenus par le procédé mettant en œuvre le composé de *Hyun et al.* Ce composé est donc plus avantageux et est en adéquation avec une application industrielle, **iv)** Il présente également une absorption supérieure à ce composé en particulier avec un coefficient d'extinction molaire 1,5 fois supérieur (35 306 vs 22 870 L.mol⁻¹.cm⁻¹) et possède une longueur d'onde d'excitation dans le rouge (672 nm). **Avec des propriétés physiques améliorées par rapport à ces prédécesseurs, le PS^{AF} semble être le candidat idéal.**

Son efficacité a été testée *in vitro* sur des cultures cellulaires de cancer de l'ovaire humain SKOV3 et OVCAR3. C'est ainsi que l'analyse transcriptomique a montré que ces 2 lignées expriment préférentiellement l'isoforme FR α et ont permis de valider l'efficacité du nouveau PS^{AF} en montrant que la PDT induit la mort des cellules tumorales ovariennes avec un effet très rapide, puisque 90% des cellules tumorales sont mortes avec une faible irradiance (1 mW/cm²). De plus, les résultats ont montré que les cellules OVCAR3 soumises à la PDT sont capables d'activer les cellules lymphocytaires T CD4⁺ et T CD8⁺ puisqu'il a été observé une augmentation de marqueurs d'activations précoces et tardifs CD69⁺, CTLA4⁺, CCR7⁺, CD30⁺, CD25⁺ et HLADR⁺. Les résultats obtenus ont également montré une diminution de la production des cytokines pro-inflammatoires (IL-6) et de la cytokine immunosuppressive (TGF- β) ainsi qu'une augmentation de cytokines favorables à la survie, à la prolifération et à l'activation des cellules immunitaires (IL-2 et l'IFN- γ). **L'ensemble de ces résultats qui font l'objet d'une publication^[150] a permis de montrer que les cellules tumorales ovariennes soumises à la PDT favorisaient la voie Th1 contribuant à l'activation d'une réponse immunitaire effective sans activer les voies inflammatoires et régulatrices.**

Objectif : Afin de confirmer et de renforcer l'ensemble des résultats obtenus *in vitro* suggérant un potentiel effet néo-adjuvant anti-tumorale de la PDT, l'objectif de cette thèse sera d'évaluer *in vivo* l'impact anti-tumorale et immuno-stimulant d'une Thérapie Photodynamique innovante ciblant FR α dans un modèle murin humanisé (SCID-Hu) de carcinose péritonéale ovarienne.

Partie II :

Expérimentation – Matériels & Méthodes

I. In vitro

A. Lignées cellulaires

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons utilisé plusieurs lignées cellulaires provenant de l'American Type Culture Collection (ATCC).

- **La lignée OVCAR3** : lignée cellulaire humaine d'adénocarcinome ovarien, décrite comme surexprimant FR α
- **La lignée SKOV3** : lignée cellulaire humaine d'adénocarcinome ovarien (ascite), décrite comme surexprimant FR α
- **La lignée HT1080** : lignée cellulaire humaine de fibrosarcome, décrite comme sous exprimant FR α servant de contrôle négatif de l'expression du récepteur.

Les cellules SKOV3 sont cultivées dans 50% DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium ; Gibco, ThermoFischer, Waltham, USA) et 50% F-12 (Ham's F-12 Nutrient Mix, Gibco, ThermoFischer, Waltham, USA), les cellules OVCAR3 dans du RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute ; Gibco, ThermoFischer, Waltham, USA) et les cellules HT1080 dans du MEM (Minimum Essential Medium ; Gibco, ThermoFischer, Waltham, USA). Les milieux de culture sont supplémentés par 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (Gibco, ThermoFischer, Waltham, USA) et 1% de pénicilline – streptomycine (Gibco, ThermoFischer, Waltham, USA).

B. Analyse transcriptomique

L'expression génique de FR α sur les 3 lignées cellulaires a été analysée par RT-qPCR. Extraction d'ARN : L'extraction de l'ARN total des cellules SKOV3, OVCAR3 et HT1080 a été réalisée avec le kit d'extraction RNeasy mini kit (QIAGEN, Hilden, Allemagne). 3 millions de cellules SKOV3, OVCAR3 et HT1080 ont été homogénéisées dans 1ml de Trizol (Invitrogen, Waltham, USA) pendant tout une nuit à -80°C, puis 200 μ L de chloroforme ont été ajoutés. Après 15 sec d'agitation, les échantillons ont été incubés 2 à 3 min à température ambiante puis centrifugés à 12000g pendant 15 min à 4°C. La phase aqueuse supérieure incolore est récupérée et l'ARN total est précipité dans 500 μ L d'isopropanol (10 min à -80°C). Après centrifugation (12000g, 15 min, 4°C) le culot d'ARN total est solubilisé dans 500 μ L d'éthanol à 75%. Après une nouvelle centrifugation (7500g, 15 min, 4°C), le culot a été solubilisé dans 50 μ L d'eau sans RNase. L'ARN a ensuite été quantifié par spectrométrie avec le NanodropTM 2000c (ThermoFischer, Waltham, USA).

RTqPCR : Le kit de Transcriptase Reverse Superscript II a été utilisé pour la RT (GIBCO BRL, Invitrogen, Waltham, USA). L'ADNc a été synthétisé à partir de 2 µg/µL d'ARN total. La RT-PCR a été réalisée selon les instructions du fournisseur utilisant le MESA GREEN 2X qPCR MasterMix Plus pour SYBR258 Assay (Eurogentec, Seraing, Belgique) et une plaque 96 puits pour qPCR (Sarstedt, Nümbrecht, Allemagne). Les transcrits ont été amplifiés et quantifiés par le système de détection de séquence Mx3005PTM (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). La réaction a été réalisée à partir d'ADNc à une concentration équivalente à 10 ng d'ARN / µL de mélange réactionnel. Tous les primers ont été utilisés à la concentration de 400 nM dans 20 µL de réaction. L'intensité de fluorescence a été mesurée à la fin de chaque cycle d'élongation. L'expression quantitative d'un gène a été interprétée en utilisant la méthode Δ CT. L'expression des gènes est donnée en « CT » (Cycle Threshold) puis normalisée par la moyenne des 3 gènes de ménages = HKG1 (β -actine) ; HKG2 (GADPH) ; HKG3 (HPRT) donnant le Δ CT^[151].

Primers	
FOLR1	5'-AGGTGCCATCTCTCCACAGT 5'-GAGGACAAGTTGCATGAGCA
β-actine	5'-CACGGCATCGTCACCAACT 5'-AGCCACACGCAGCTCATTG
GAPDH	5'-GCCAAGGTCATCCATGACAACCTTGG 5'-CCTGCTTACCACCTTCTTGATGTC
HPRT	5'-CCCTGGCGTCGTGATTAG 5'-ATGGCCTCCCATCTCCTT

Tableau 4: Liste des primers utilisés pour la RTqPCR

C. Western – Blot

L'expression protéique de FR α sur les 3 lignées cellulaires a été analysée par western blot. L'extraction protéique des cellules SKOV3, OVCAR3 et HT1080 (4 millions de cellules/extrait) a été réalisée à l'aide de 1 µL de PIC (Inhibiteur de Protéases ; Merck, Darmstadt, Allemagne) pour 399 µL de RIPA (Tampon de Lyse ; ThermoFischer, Waltham, USA). Le lysat est ensuite centrifugé à 15 000 tours par minute à 4°C pendant 15 min. Le surnageant est récolté et la concentration en protéines est déterminée par l'utilisation du réactif Bio-Rad (BIO-RAD, Marnes la Coquette, France). La séparation des protéines est réalisée par électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du laurylsulfate de sodium ou SDS-PAGE (NuPAGE™ 4 to 12%, Bis-Tris, 1.5 mm, Mini Protein Gel, 10-well ; Invitrogen, Waltham, USA) dans du tampon MOPS 1X (tampon 20X - MOPS SDS Running buffer ; Euromedex, Souffelweyersheim, France). L'extrait protéique

contenant 20 µg de protéine est mélangé avec un tampon de charge 4X et Red 10X et est déposé dans chaque puits (qsp 45 µL eau MQ). Les protéines ont été chauffées 10 min à 70°C. Après l'électrophorèse, les protéines sont transférées par transfert sandwich sur une membrane de polyvinylidene fluoride (Immobilon® - PVDF membrane - 0.45 µm pore size ; ThermoFischer, Waltham, USA) qui est bloquée après le transfert par un tampon de blocage contenant de la caséine à 2 g/L durant 2h et 30 min à température ambiante. La membrane est ensuite coupée chaque partie correspondante est incubée avec l'anticorps (Ac)- anti FRα (Polyclonal antibody - Rabbit IgG ; Invitrogen, ThermoFischer, Waltham, USA) ou l'Ac-anti cyclophiline B (Rabbit IgG ; Cell signaling Technology, Danvers, USA) dilué au 1000^{ème} dans le tampon de blocage une nuit à 4°C selon les recommandations du fournisseur. Le lendemain, après 3 lavages au PBS-Tween 0,05% chaque membrane est incubée avec un Ac secondaire (Anti Rabbit IgG - NA934V ; Merck, Darmstadt, Allemagne) dilué au 10 000^{ème} durant 2h dans le tampon de blocage. Après plusieurs lavages au PBS, la révélation des protéines se fait avec 400 µL de luminol ECL + 400 µL d'ECL peroxyde (Supersignal®West Pico Trial Kit ou Supersignal®West Dura Trial Kit, Supersignal®West ou Femto Trial Kit, ThermoFischer, Waltham, USA) et la lecture se fait au FujiFilm LAS-3000 Luminescent Image Analyzer (logiciel ImageLab).

D. Cytométrie de Flux

L'expression membranaire de FRα a été analysée par cytométrie en flux sur les lignées OVCAR3, SKOV3 et HT1080. Pour déterminer cette expression, nous avons utilisé un anticorps anti-FRα-PE (clone LK26 ; BioLegend, San Diego, USA) et son isotype control IgG2a – PE (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Allemagne). 1 culot cellulaire de 1 million de cellules / lignées a été repris dans 300 µL de PBS + EDTA. Les échantillons sont incubés pendant 10min à 4°C avec 10 µL du réactif FCR-block (Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Germany) permettant de bloquer le récepteur au fragment cristallisable du récepteur aux IgG (FCR). La préparation cellulaire a ensuite été répartie en 3 tubes : 1 tube contenant 2 µL (selon les recommandations du fournisseur) de l'anticorps anti-FRα- PE (= tube marqué) ; 1 tube contenant 2 µL d'isotype control IgG2a – PE (selon les recommandations du fournisseur (= tube isotype) servant de contrôle ; 1 tube contenant uniquement la préparation cellulaire (= tube non marqué). Les cellules sont incubées 30 min à 4°C puis centrifugées. Le surnageant est ensuite récupéré et jeté et le culot cellulaire est repris dans 300 µL de PBS + EDTA. Enfin, les échantillons sont analysés par cytométrie de flux (cytomètre Attune NxT, ThermoFischer,

Waltham, USA). Les résultats sont analysés via le logiciel Flow Jo software (Applied Cytometry, Dinnington, UK). Les résultats sont exprimés en delta de MFI (median of fluorescence intensity) = MFI (marqué) – MFI (isotype).

E. Immunofluorescence

200 000 cellules OVCAR3, 100 000 cellules HT1080 et 80 000 cellules SKOV3 ont été ensemencées dans des plaques 6 puits contenant une lamelle. 24h après ensemencement, les cellules sont incubées avec 9 μM de PS^{AF}. Le lendemain, le milieu est retiré et les cellules sont incubées avec du paraformaldehyde 4% sur glace (ThermoFischer, Waltham, USA) pendant 10 min à température ambiante après un lavage au PBS (Gibco, ThermoFischer, Waltham, USA). Après 3 rinçages au PBS, les sites non spécifiques sont ensuite saturés avec un mélange de PBS contenant 1,2% de gélatine, 0.2 M de glycine et 0,05% de Tween 20 pendant 30 min. Après rinçage, l'anticorps primaire anti- FR α (Polyclonal antibody, Rabbit IgG, Invitrogen, Waltham, USA) est incubé à 4°C toute la nuit. Le lendemain après 3 rinçages au PBS l'anticorps secondaire (Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG ; Invitrogen, Waltham, USA) dirigé contre l'AC anti-FR α est ajouté pendant 1h30 à température ambiante et dans l'obscurité. Enfin, après plusieurs rinçages au PBS, les noyaux sont marqués avec du DAPI (Invitrogen, Waltham, USA) dilué au 1/250^{ème}. Le montage lame sur lamelle est effectué à l'aide du moviol. Les acquisitions sont réalisées sur le logiciel ZEN à l'aide du microscope confocal multiphoton Leica SP8 objectif 25x eau / 0,95 (Leica Microsystems, Allemagne). Les analyses d'images et la semi-quantification du signal ont été réalisées à l'aide du logiciel Fiji.

F. Compétition avec acide folique

Afin d'évaluer la spécificité du PS^{AF} pour FR α , 500 000 cellules / puits OVCAR3, SKOV3 et HT1080 ont été ensemencées dans une plaque 12 puits contenant une lamelle. Le lendemain, le milieu de culture a été retiré et les cellules ont été incubées en présence de 4 mM d'Acide Folique (en excès). A différents temps après l'ajout de l'acide folique (2h, 6h, 10h et 24h), les cellules ont été incubées avec 9 μM de PS^{AF}. Les plaques ont ensuite été placées en atmosphère humide dans un incubateur à 37°C et 5% de CO₂ pendant 24h. Puis, le milieu est retiré et les cellules ont été incubées avec du paraformaldehyde 4% sur glace (ThermoFischer, Waltham, USA) pendant 10 min à température ambiante après un lavage au PBS (Gibco, ThermoFischer, Waltham, USA). Enfin, après plusieurs rinçages, les noyaux

sont marqués avec du DAPI (Invitrogen, Waltham, USA) dilué au 1/250^{ème}. Les acquisitions ont été réalisées sur le logiciel ZEN à l'aide du microscope confocal multiphoton Leica SP8 objectif 25x eau / 0,95 (Leica Microsystems, Allemagne). Une semi-quantification du signal a été réalisée à l'aide du logiciel Fiji.

G. Protocole de PDT et évaluation de la viabilité cellulaire

Le laser utilisé est un prototype développé spécifiquement par le laboratoire OncoThai et permet d'illuminer chaque 4 plaques de puits de manière simultanée et homogène à 672 nm^[152]. Pour réaliser les expériences 4 conditions ont été utilisées : des cellules tumorales non traitées (NT), des cellules mises en contact avec le PS mais sans illumination (+PS), des cellules illuminées uniquement (+illu) et des cellules soumises à la PDT (PDT). Afin de déterminer la sensibilité des lignées à la PDT, 2 paramètres ont été pris en compte, la concentration en PS^{AF} et le temps d'illumination. Les cellules sontensemencées dans des plaques 96 puits à raison de 4000 cellules / puits au J1. Le lendemain, les cellules sont incubées avec différentes concentrations de PS^{AF} (9 µM ; 4,5 µM ; 1,8 µM ; 0,9 µM ; 0,45 µM ; 0,18 µM ; 0,09 µM). 24h après, le milieu contenant le PS^{AF} est remplacé par du milieu frais après 1 lavage au PBS (Gibco, ThermoFischer, Waltham, USA) et les cellules sont soumises à la PDT selon différents temps d'illumination (5 min, 15 min, 20 min) à 1 mW/cm² (672 nm). 24h après le traitement des cellules selon le protocole de thérapie photodynamique, 100 µL / puits de la solution CelltiterGlo® 2D sont ajoutés, à température ambiante. Les plaques sont protégées de la lumière pendant 10 min après l'ajout du réactif puis la bioluminescence est évaluée en utilisant le lecteur de plaque multimode CLARIOstar Plus (BMG Labtech, Champs sur Marne, France).

II. In Vivo

A. Lignée Cellulaire utilisée pour le développement du modèle murin

Dans le cadre de ce projet, nous avons utilisé une lignée cellulaire OVCAR3 précédemment décrite provenant de l'American Type Culture Collection (ATCC) que nous avons transfectée avec la Luciférase (OVCAR3-Luc) afin de pouvoir suivre en temps réel par imagerie l'évolution de la tumeur après injection des cellules tumorales aux souris. Les cellules OVCAR3-Luc sont cultivées dans du milieu RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute ; Gibco, ThermoFischer) avec un passage mensuel avec la Neomycine (Sigma

Aldrich, Saint Louis, USA) à 10 µg / mL. Les cellules sont cultivées en incubateur thermostaté à 37 °C, en présence de 5% CO₂ dans une atmosphère humide à 95%.

1. Transfection de la Luciférase

Les cellules OVCAR3-Luc ont été transfectées par sélection du plasmide Luc du vecteur de contrôle pGL3 (Promega, Leiden, Pays-Bas). 24h avant la transfection, 2*10⁵ cellules sont cultivées dans 500 µL de milieu de culture sans antibiotiques. L'ADN est dilué dans 50 µL de milieu RPMI en l'absence de sérum. La lipofectamine 2000 est diluée (ADN (µg): Lipofectamine 2000 (µL) ratios de 1:0.5 à 1:5) dans 50 µL de Milieu Opti-MEM I et incubée pendant 5 min. Lors de l'incubation, les deux solutions sont mélangées et incubées pendant 20 min à température ambiante. Le mélange est ensuite ajouté à 100 µL de complexe dans chaque puits contenant les cellules. Puis, les cellules sont cultivées en incubateur thermostaté à 37 °C, en présence de 5% CO₂ dans une atmosphère humide à 95% pendant 48h. La lignée OVCAR3-Luc est cultivée avec le même milieu que la lignée OVCAR3 à l'exception d'un passage mensuel avec la Neomycine (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) à 10 µg / mL. Les cellules sont cultivées en incubateur thermostaté à 37 °C, en présence de 5% CO₂ dans une atmosphère humide à 95%.

Afin d'évaluer l'expression de la luciférase, les cellules ont été lysées 24h après la transfection et l'expression du gène de la Luciférase a été quantifiée à l'aide d'un kit commercial (Promega, Cergy, Pontoise, France) et d'un luminomètre. Les résultats sont exprimés en unité de lumière relative (RLU) intégrées sur 10 sec par mg de Lysat de protéine cellulaire (RLU / mg de protéine).

2. Protocole de PDT pour la lignée OVCAR3-Luc

Le laser utilisé est le même que décrit précédemment et le protocole identique. Pour réaliser les expériences 4 conditions ont été utilisées : des cellules tumorales non traitées (NT), des cellules mises en contact avec le PS mais sans illumination (+PS), des cellules illuminées uniquement (+illu) et des cellules soumises à la PDT (PDT). Les cellules OVCAR3-Luc sontensemencées dans des plaques 96 puits à raison de 2000 cellules / puits au J1. Le lendemain, les cellules sont incubées avec 9 µM de PS^{AF}. 24h après le milieu contenant le PS^{AF} est remplacé par du milieu frais après 1 lavage au PBS (Gibco, ThermoFischer, Waltham, USA) et les cellules sont soumises à la PDT durant 60 min à 1mW/cm² (672 nm). 1h, 24h, 48h et 72h après le traitement des cellules selon le protocole de thérapie

photodynamique, 100 μL / puits de la solution CelltiterGlo® 2D sont ajoutés, à température ambiante. Les plaques sont protégées de la lumière pendant 10 min après l'ajout du réactif puis la bioluminescence est évaluée en utilisant le lecteur de plaque multimode CLARIOstar Plus (BMG Labtech, Champigny Sur Marne, France).

B. Modèle murin

Les expérimentations animales ont été menées conformément au comité d'éthique local de l'institut Pasteur de Lille avec l'autorisation requise du conseil d'éthique national (numéro d'agrément 2019041015585930). Toutes les souris femelles étaient âgées de 6 à 8 semaines et maintenues dans des cages pressurisées et ventilées individuellement avec un régime alimentaire régulier pour souris contenant 10% de graisse animale. Une splénectomie a été réalisée sur des souris anesthésiées avant l'injection de cellules cancéreuses. 7 jours après la splénectomie, 1×10^6 cellules OCAR3-Luc ont été inoculées par voie intrapéritonéale en 4 points chez les souris immunodéficientes. La croissance tumorale a été supervisée par bioluminescence, en utilisant une injection intrapéritonéale de 100 μL de D-Luciférine (30 mg/mL, Perkin Elmer, Waltham, USA), au lecteur IVIS LUMINA XR (Caliper LifeSciences, Hopkinton, USA). Les données ont été analysées sous le logiciel Living Image 4.1 (CaliperLife Sciences, Hopkinton, MA, USA).

1. Protocole de PDT *in vivo*

Pour les expériences *in vivo*, nous avons utilisé le protocole de Thérapie Photodynamique rapporté par *Quilbé et al.*,^[153]. De la même manière que pour l'*in vitro*, les souris ont été divisées en 4 groupes : non traitées, PS seul, lumière seule, PDT. Pour la condition PS^{AF} seul et PDT, 100 μL d'une solution de PS^{AF} à 1 mg/mL dilué dans du PBS a été injecté en intrapéritonéale, 24h avant l'illumination. Le dispositif d'illumination utilisé est un dispositif développé spécialement par le laboratoire. Les paramètres utilisés sont une longueur d'onde de 672 nm et une fluence de 32,4 J/cm². Deux Irradiances ont été testées : 3,6 mW/cm² et 12 mW/cm² ainsi que 2 protocoles d'illumination afin de tester l'impact du fractionnement : 15 min d'illumination suivies de 10 min de pause (x3) ou 1 min d'illumination suivie de 2 min de pause (x45). Soit une durée totale de 45 min d'illumination. Afin d'apprécier l'évolution de la tumeur, les souris ont été exposées à un système d'imagerie par Bioluminescence. Les images ont ensuite été analysées par le système Living Image 4.1 software (CaliperLife Sciences, Hopkinton, MA, USA).

2. Isolement des PBMCs de donneurs sains

Des échantillons de sang humain ont été prélevés chez des donneurs sains après obtention d'un consentement éclairé, conformément à l'avis du Conseil d'examen institutionnel de l'institut de Biologie de Lille (DC-2013-1919). Les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) ont été isolées par centrifugation en gradient de densité en utilisant un milieu de séparation des lymphocytes (Eurobio, Les Ullis, France) et des tubes leucosep de 50 mL (Greiner Bio One, Courtaboeuf, France). 15 souris splénectomisées ont été reconstituées au 38^{ème} jour suivant l'inoculation des cellules OVCAR3-Luc par injection intrapéritonéale de 40×10^6 PBMCs.

3. Cytométrie de flux

Une semaine et 30 jours après l'injection des PBMCs, l'immunophenotypage cellulaire a été effectué en cytométrie en Flux utilisant l'Attune NxT (ThermoFisher, France). Après leur récolte, 5×10^5 PBMC ont été reprises dans 100 μ L de PBS -/- (Gibco, ThermoFischer, Waltham, USA). Les récepteurs FRC ont été bloqués avec le réactif FCR-block (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Allemagne) pendant 15min à 4°C. Un contrôle de viabilité a été réalisé en ajoutant du FVS 700 (BD life Sciences, Haryana Undia) pendant 10 min à température ambiante. Les cellules sont ensuite marquées pendant 30 min à 4°C dans l'obscurité avec les AC conjugués adéquats : CD14-PE ; CD11c-APC, CD3-PECy7, CD4-Vioblue, CD8-VioGreen, CD19-FITC, CD335-APC (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Allemagne). Pour chaque condition, un contrôle non marqué et l'isotype contrôle approprié a été utilisé afin de régler le signal positif. Les données médianes d'intensité de fluorescence (MFI) ont été analysées avec le logiciel FlowJo (Treetar Incorporation, Ashland, USA). Les résultats ont été exprimés sous forme de valeurs normalisées par rapport à l'isotype.

4. ELISA multiplex

Les plaques ont été préparées selon les instructions du fabricant. Chaque plaque a été bloquée avec un tampon de lavage pendant 10 min. Les billes ont été distribuées dans chaque puits suivi de 2 lavages. La gamme d'étalonnage a été générée par reconstitution du mix standard de cytokine humaine de haute sensibilité selon le protocole du fabricant avec des dilutions en série au 1:5 pour une plage de concentration de 0,13 à 400 pg/mL. Les échantillons de sérum de souris ainsi que le mix standard d'étalonnage ont été incubés avec les billes pendant une nuit à 4°C sous agitation. Le lendemain, les billes ont été lavées puis

incubées avec un anticorps de détection à température ambiante pendant 1 heure puis avec de la streptavidine pendant 30 min. Enfin, les billes ont à nouveau été lavées 2 fois et remises en suspension dans le fluide d'entraînement Luminex MagPix®. La plaque est ensuite analysée par le lecteur de plaque Luminex MagPix® (Merck, Darmstadt, Allemagne). Les valeurs brutes ont été ajustées par rapport à la courbe standard ($R^2 > 0,8$) afin de calculer la concentration de chaque cytokine en pg/mL.

III. Analyse Statistique

Toutes les données ont été analysées par l'utilisation du logiciel de statistique GraphPad Prism pour Windows 3.0.1 (GraphPad, San Diego, USA). Les p -values sont bilatérales avec $p < 0,05$ (*) considéré comme significatif et $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****) comme très significatif.

Partie III :

Résultats

I. In vitro

A. Expression de la cible FR α

Dans un premier temps, nous avons confirmé par RT-qPCR l'expression génique de FR α sur les 3 lignées cellulaires, ainsi que son expression protéique par western blot et cytométrie en flux.

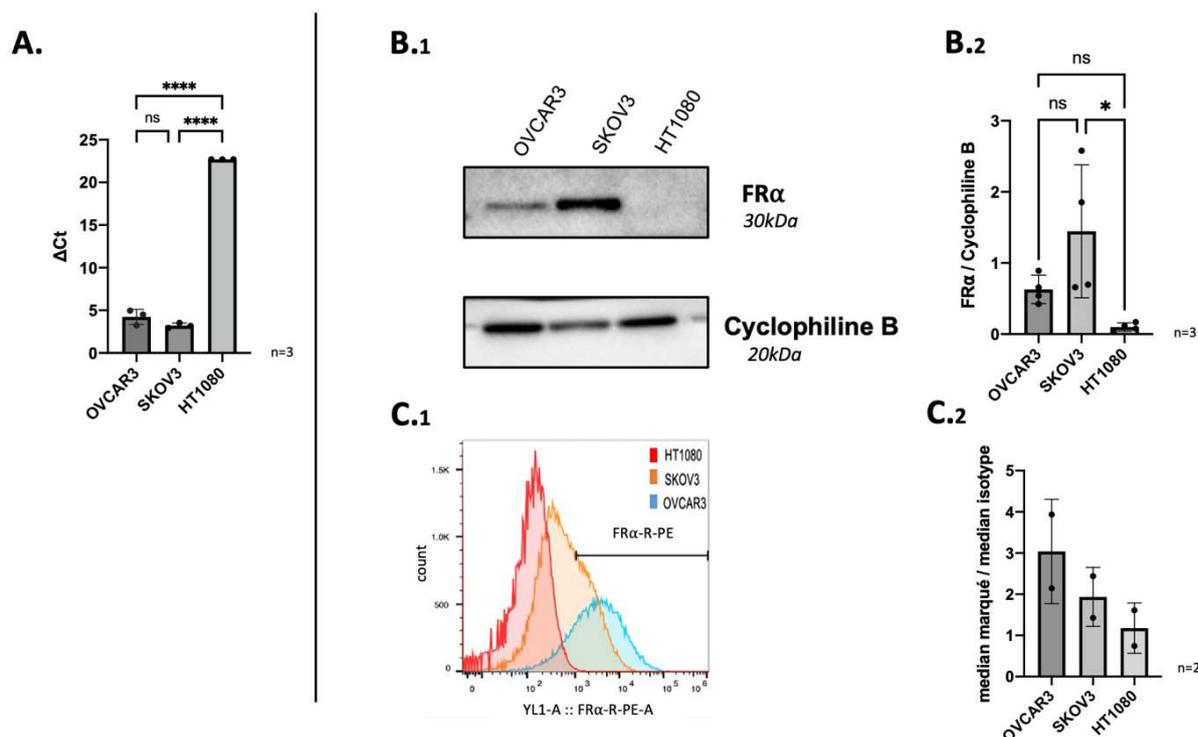


Figure 30: Analyse génique et protéique de l'expression de FR α par les cellules du cancer de l'ovaire OVCAR3 et SKOV3 et de fibrosarcome HT1080 (contrôle négatif). (A) Expression génique de FR α par RT-qPCR exprimé en $\Delta Ct = \text{moyenne Ct gène d'intérêt} - \text{moyenne Ct gène de ménage}$. ANOVA à 1 facteur (**** $p < 0.0001$), moyennes +/- SD de 3 expériences indépendantes (n=3). (B) Expression protéique de FR α par western Blot. (B.1) Image représentative de 3 expériences indépendantes, (B.2) Semi-quantification du signal de 3 expériences indépendantes. ANOVA à 1 facteur (* $p < 0,05$), les données présentées sont les moyennes des ratio FR α /Cyclophiline B +/- SD de 3 expériences indépendantes (n=3) (C) Expression protéique membranaire de FR α par cytométrie en flux. (C.1) Image représentative de 2 expériences indépendantes (C.2) Histogramme représentant les moyennes de MFI (Median Fluorescence Intensity) +/- SD de 2 expériences indépendantes (n=2).

L'analyse des transcrits a montré que les lignées de cellules tumorales ovariennes (SKOV3, OVCAR3) exprimaient préférentiellement l'isoforme FR α (Figure 30A). Il n'existe cependant pas de différence significative entre les OVCAR3 et les SKOV3. Comme attendu, nous retrouvons une très faible expression génique de FR α pour la lignée HT1080. Les analyses par Western-Blot (Figure 30B) montrent une expression protéique totale plus importante pour la lignée SKOV3. En revanche, l'analyse de l'expression membranaire par cytométrie en flux (Figure 30C) montrent une expression protéique plus importante pour les

OVCAR3 par rapport aux SKOV3. Cette analyse montre une absence d'expression protéique pour la lignée HT1080.

B. Spécificité du PS^{AF} pour la cible

1. Compétition avec l'acide folique

La spécificité du PS^{AF} a été évaluée par une expérience de compétition avec de l'acide folique dont les résultats sont présentés en figure 31.

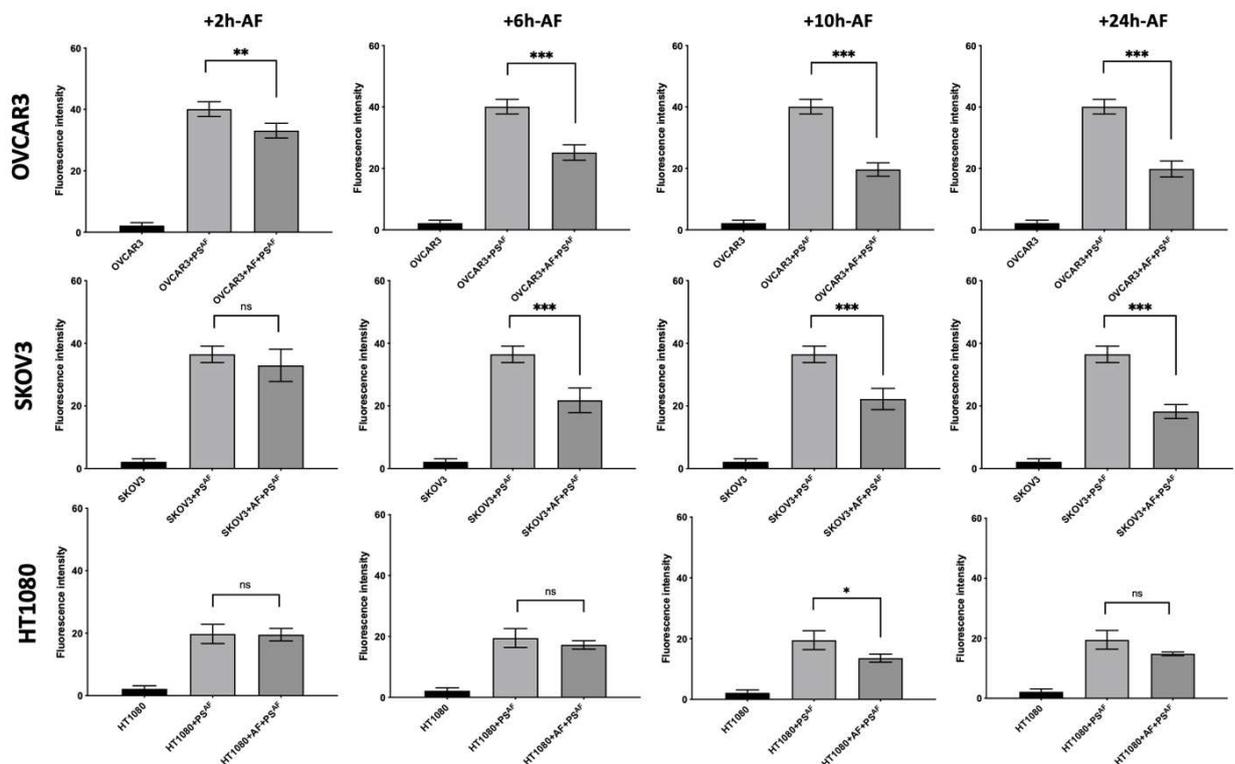


Figure 31: Évaluation de la spécificité du PS^{AF} pour FR α sur les lignées OVCAR3, SKOV3 et HT1080. (PS^{AF} = Acide folique couplé au pyrophosphorbide ; AF = Acide Folique). ANOVA à 1 facteur (** $p < 0,001$, * $p < 0,05$), les données présentées sont les moyennes \pm SD de semi-quantification de plusieurs champs ($n=3$).

Tout d'abord, nous pouvons observer que plus la cinétique d'incubation avec l'acide folique augmente, plus l'intensité de fluorescence du PS^{AF} diminue. Pour la lignée OVCAR3, nous pouvons apprécier une diminution de l'intensité de fluorescence dès 2 heures d'incubation. Celle-ci diminue au fur et à mesure que le temps d'incubation avec l'acide folique augmente. Pour la lignée SKOV3, nous pouvons constater que l'intensité de fluorescence est significativement plus faible à partir de 6h d'incubation. Pour HT1080, nous pouvons tout d'abord constater que l'intensité de fluorescence dans la condition

HT1080+PS^{AF} est deux fois moins importante que celle observée avec les OVCAR3 et SKOV3 (20 pour HT1080 vs 40 pour OVCAR3 et SKOV3). De plus, nous constatons certes une diminution de l'intensité de fluorescence à 10h d'incubation cependant celle-ci reste très faible et n'est pas retrouvée avec 24h d'incubation avec l'acide folique.

2. Internalisation du PS^{AF} en fonction de l'expression de FR α

Par la suite, nous avons souhaité analyser la quantité de PS^{AF} internalisé par rapport à l'expression du récepteur. Les résultats sont présentés en figure 32.

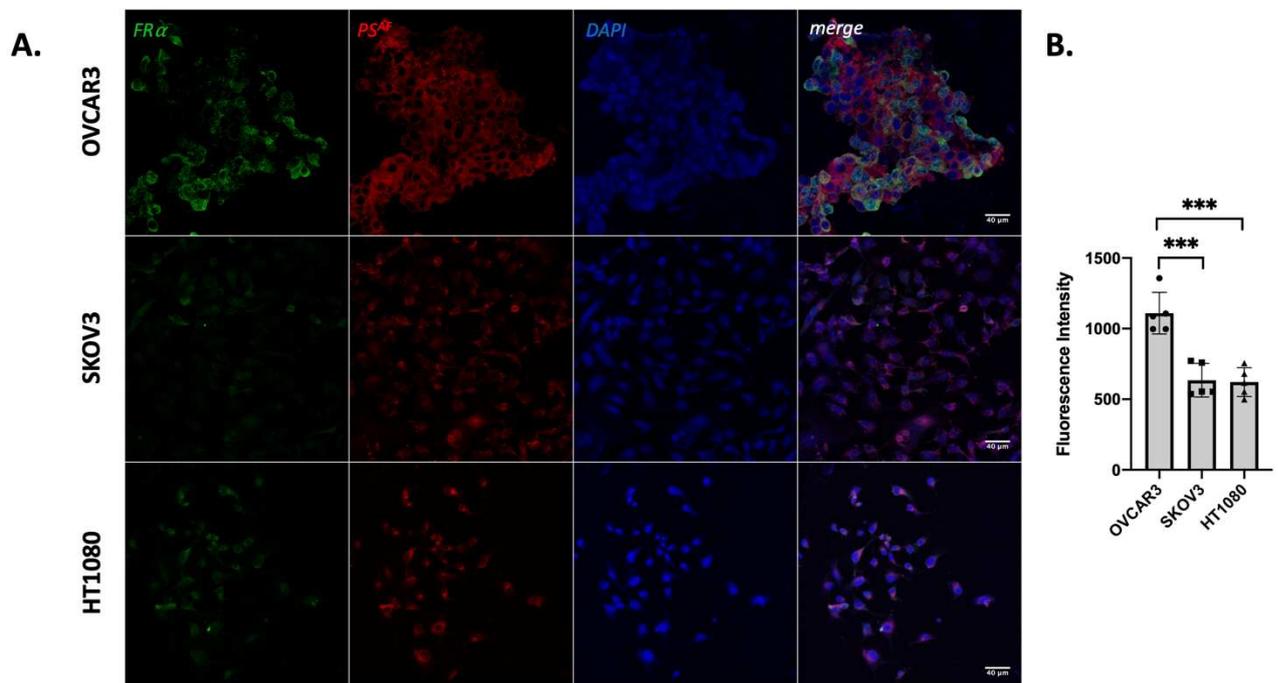


Figure 32: Évaluation de l'internalisation du PS^{AF} par les lignées OVCAR3, SKOV3 et HT1080. (A) mise en évidence de l'internalisation du PS^{AF} et marquage de FR α par immunofluorescence. (B) Semi – quantification de l'intensité de fluorescence du PS^{AF}. ANOVA à 1 facteur (***) $p < 0,001$, les données présentées sont les moyennes \pm SD de semi-quantification de plusieurs champs ($n=5$) exprimées en intensité de fluorescence.

Nous pouvons constater un marquage de FR α très intense pour la lignée OVCAR3 alors que celui-ci est moins important pour les lignées SKOV3 et HT1080. En ce sens, l'internalisation du PS^{AF} est également significativement plus importante pour cette lignée qui surexprime FR α .

C. Sensibilité des lignées à la PDT

Afin de déterminer si l'activité du PS^{AF} est fonction de l'expression de FR α , les 3 lignées cellulaires ont été soumises à différentes concentrations de PS^{AF} (9 μ M - 4,5 μ M - 1,8 μ M - 0,9 μ M - 0,45 μ M - 0,18 μ M et 0,09 μ M) avec différents temps d'illumination (5 min, 15 min et 20 min), puis un test de viabilité cellulaire a été réalisé 24h après la PDT. La figure 33 ci-dessous représente les résultats obtenus pour les lignées OVCAR3, SKOV3 et HT1080.

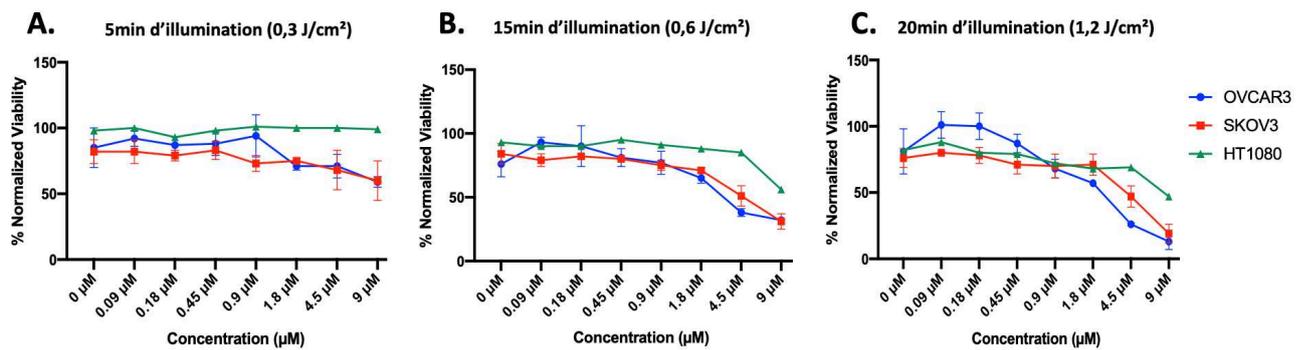


Figure 33: Évaluation de la sensibilité des lignées à la PDT traitées avec différentes concentrations et différentes doses de lumière. (A) Viabilité des cellules ayant été illuminées avec une dose de 0,3 J/cm^2 . (B) Viabilité des cellules ayant été illuminées avec une dose de 0,6 J/cm^2 . (C) Viabilité des cellules ayant été illuminées avec une dose de 1,2 J/cm^2 . Les données présentées sont les moyennes normalisées par rapport au contrôle non traité de triplicats techniques \pm SD ($n=1$) et exprimées en pourcentage de viabilité.

Avec 5 min d'illumination, nous pouvons constater une absence de sensibilité de la lignée HT1080 par rapport aux lignées OVCAR3 et SKOV3, la viabilité des cellules HT1080 étant de 100% peu importe les concentrations utilisées. En revanche, pour la lignée OVCAR3 et SKOV3 nous pouvons constater une légère diminution de la viabilité à partir de 0,9 μ M et qui s'accroît légèrement au fur et à mesure que la concentration augmente.

Avec 15 min d'illumination, il est difficile de constater une différence d'efficacité entre les lignées entre 0 et 0,45 μ M. Cependant à partir de 0,45 μ M nous constatons un effet dose pour les lignées OVCAR3 et SKOV3 plus important que celui retrouvé avec 5min d'illumination. En revanche une diminution franche de la viabilité des HT1080 n'est constatée qu'entre 4,5 μ M et 9 μ M. Malgré cet effet dose tardif, nous constatons qu'à la plus forte concentration 56% des cellules HT1080 sont toujours viables soit une viabilité 2 fois plus importante que les OVCAR3 et SKOV3 qui est respectivement de 32 et 31%.

Enfin, avec 20 min d'illumination nous constatons un effet dose dès 0,09 μM pour la lignée OVCAR3 tandis que celui-ci semble plus tardif pour la lignée SKOV3. De la même manière qu'avec 15 min d'illumination, nous retrouvons une sensibilité moins importante pour la lignée HT1080 puisqu'à nouveau à la concentration la plus forte 47% des cellules HT1080 sont toujours viables alors qu'il ne reste que 13% de cellules OVCAR3 viables et 19% de cellules SKOV3.

À la lumière de ces résultats nous pouvons constater un effet dose dépendant de la concentration du PS^{AF} , du temps d'illumination ou de la dose de lumière ainsi que de l'expression de $\text{FR}\alpha$.

II. *In vivo*

A. Validation de l'expression de la luciférase

L'expression de la luciférase dans les cellules OVCAR3 transfectées a été évaluée par la mesure de la luminescence après l'ajout de 10 μM de luciférine par rapport au contrôle cellules OVCAR3 non transfectées (Figure 34).

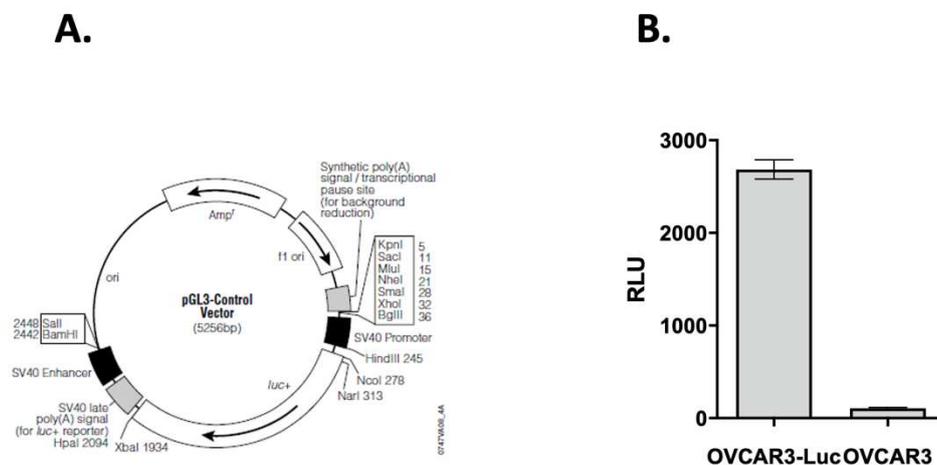


Figure 34: Validation de l'expression de la luciférase : vecteur pGEM-luc Numéro X65316. (A) Plasmide Luc transféré dans la lignée cellulaire OVCAR3. (B) Luminescence émise par la lignée cellulaire OVCAR3-Luc comparée à la lignée OVCAR3 contrôle. Les données présentées sont les moyennes \pm SD de exprimés en unité de lumière relative (RLU) ($n=1$).

Nous pouvons observer chez les cellules témoins OVCAR3 non transfectées un signal très faible (environ 10 RLU). À contrario de la lignée OVCAR3-Luc qui après l'ajout de 10 μM de luciférine montre une importante augmentation de la RLU (environ 3000 RLU). (Figure 33B)

B. Sensibilité de la lignée OVCAR3-Luc à la PDT

La sensibilité à la mort induite par la thérapie photodynamique sur la lignée OVCAR3-Luc a été évaluée par la mesure du métabolisme mitochondrial. Les résultats sont présentés dans la figure ci-dessous.

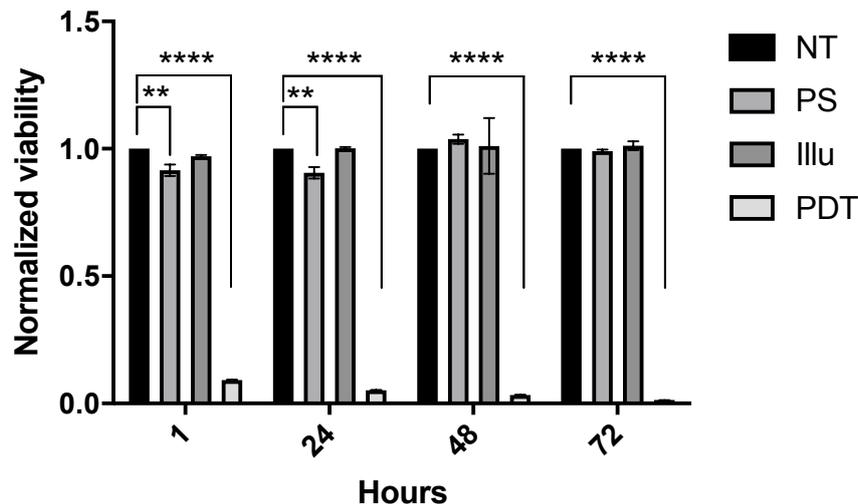


Figure 35: *Évaluation de la viabilité cellulaire de la lignée OVCAR3-Luc 1h, 24h, 48h et 72h post-PDT. Les cellules ont été traitées ou non avec 9 μ M de PS et/ou 60 min d'illumination ($3,7 \text{ J/cm}^2$, 1 mW/cm^2) avec NT : non traité, PS : PS seul, illu : illumination seule, PDT : illumination en présence du PS. ANOVA à 2 facteur (** $p < 0,01$ et **** $p < 0,0001$), moyennes +/- SD de 3 expériences indépendantes normalisées par rapport à la condition NT ($n=3$).*

Nous pouvons observer une diminution très importante et significative de la viabilité cellulaire pour le groupe PDT dès 1h post-illumination comparée au groupe NT (9% de cellules viables restantes dans la condition PDT). Cette diminution est d'autant plus importante 72h après le traitement où 99% des cellules OVCAR3-Luc sont mortes. À contrario, nous pouvons noter l'absence de modification de la viabilité des cellules tumorales non-traitées, soumises uniquement au PS ou à l'illumination hormis pour la condition PS seul à 1h et 24h. En effet, un léger impact sur la viabilité des cellules est constaté mais celui-ci n'est pas retrouvé à 48 et 72h après la PDT.

C. Mise en place du modèle de souris SCID de carcinose péritonéale ovarienne

Les cellules OVCAR3-Luc ont été injectées en intrapéritonéale chez les souris SCID. L'évaluation de la croissance tumorale a été évaluée par Bioluminescence et les résultats sont présentés en Figure 36.

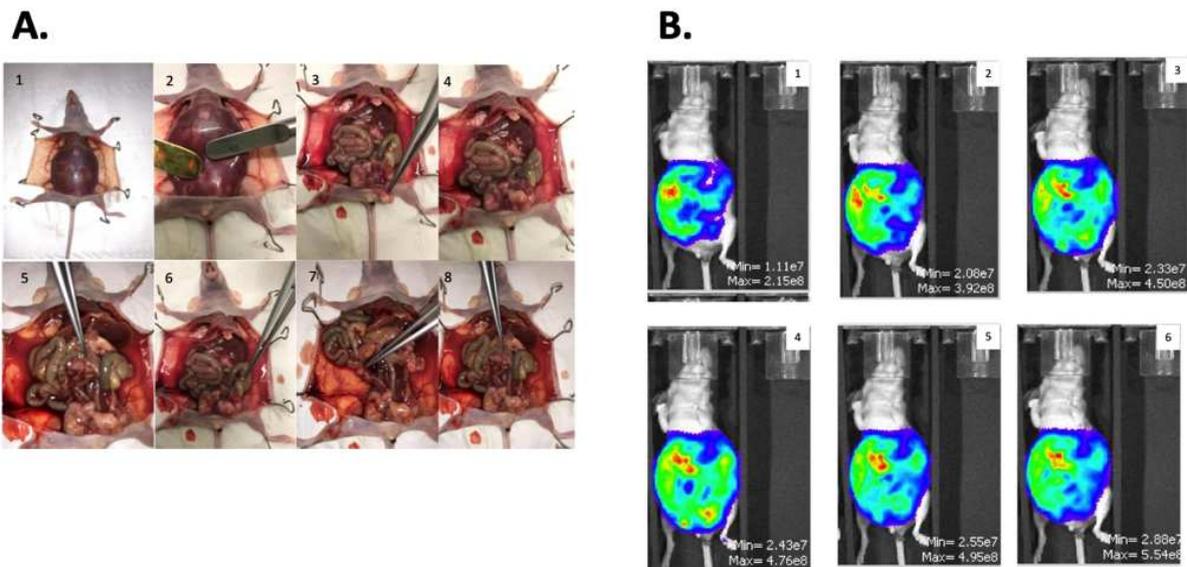


Figure 36: Développement du modèle de carcinose péritonéale ovarienne chez des souris SCID. (A) L'injection de la lignée OVCAR3-Luc aux souris résulte en une croissance tumorale 38 jours après l'injection. (B) Évaluation de la croissance tumorale après l'injection de D-Luciferine à l'IVIS® Lumina XR.

Un mois après l'injection, nous avons constaté la présence d'ascite (Figure 36A - 1,2) ainsi que l'invasion de métastases au niveau du diaphragme, de la cavité abdominale et de l'omentum. D'autres nodules $< 0,5 \text{ cm}^3$ ont également été retrouvés au niveau du mésentère (figure 35A – 3,4,5). L'ascite était de la couleur du sang et nous avons retrouvé la présence d'agrégats tumoraux distincts au sein de ce liquide. Le développement de la tumeur a été évalué par mesure de la bioluminescence (Figure 36B).

D. Évaluation de la distribution du PS^{AF}

L'accumulation du PS^{AF} au sein des différents organes a été évaluée par la quantification du signal de fluorescence émis par le PS^{AF} à 4h, 6h et 24h après l'injection. (Figure 37 ci-dessous).

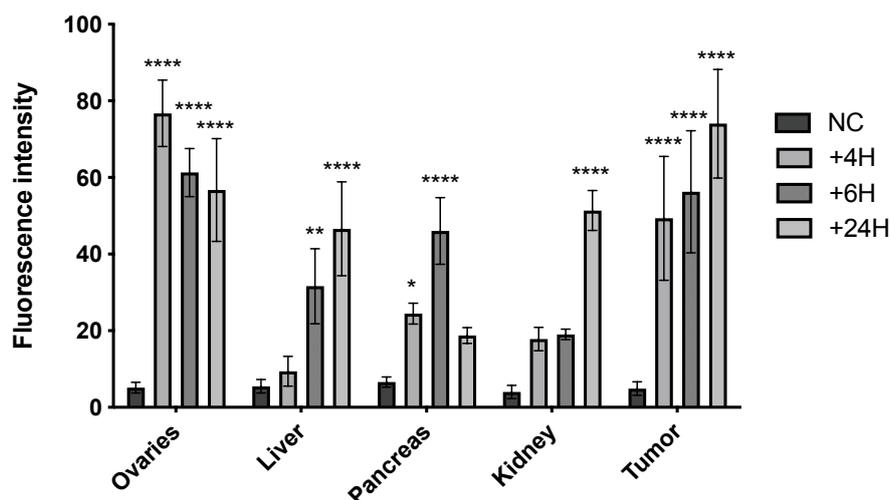


Figure 37: Évaluation de la distribution du PS^{AF} au niveau des différents organes dans le modèle de souris SCID par évaluation de l'intensité de fluorescence du PS^{AF} . ANOVA à 2 facteurs (**** $p < 0,0001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$., moyennes +/- SD de semi-quantification de plusieurs champs ($n=3$) exprimées en intensité de fluorescence évalué 4h, 6h et 24h après l'injection du PS^{AF} . NC : Contrôle Négatif sans PS^{AF} .

Nous retrouvons au niveau des ovaires et des tumeurs, une intensité de signal déjà très intense et significative dès la 4^{ème} heure après l'injection et qui le reste jusqu'à 24h. Pour le foie et le rein, nous pouvons observer une intensité faible 4 et 6h après l'injection puis qui augmente de manière significative 24h après l'injection. Enfin, pour le pancréas l'intensité de fluorescence est importante 6h après l'administration mais diminue de 50% 24h après.

E. Détermination des paramètres d'illumination

Afin de déterminer les paramètres d'illumination optimaux, 2 paramètres d'illumination ont été étudiés : le temps d'illumination ainsi que l'irradiance. Les résultats sont présentés dans la figure ci-dessous.

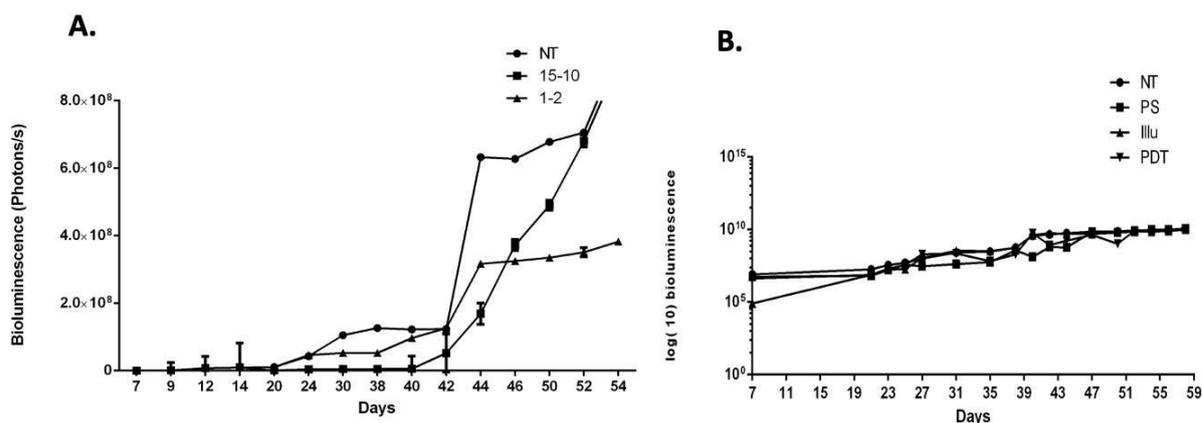


Figure 38: Détermination des paramètres d'illumination. (A) Les souris ont été soumises à 2 protocoles d'illumination fractionné : 1min d'illumination suivie de 2 min de pause (1-2) VS 15 min d'illumination suivies de 10min de pause (15-10) à 12 mW/cm². L'efficacité du protocole a été évaluée durant 54 jours par quantification de la bioluminescence (n=2). (B) Les souris ont été soumises à un protocole d'illumination fractionné déterminé par la figure A: 1min d'illumination suivie de 2min de pause à 3,7 mW / cm² avec NT : non traité, PS : photosensibilisateur seul, illu : lumière seule, PDT : illumination en présence du PS. L'illumination a été réalisée au 38^{ème} jour après l'injection des cellules OVCAR3-Luc. L'efficacité du protocole a été évaluée durant 59 jours par quantification de la bioluminescence (n=2).

Avec une irradiance de 12 mW/cm² et le protocole de 1 min d'illumination suivi de 2 min de pause, une importante diminution de la bioluminescence est observée à partir de 44 jours. Au contraire nous constatons avec le protocole de 15 min d'illumination suivi de 10 min de pause une augmentation de la croissance tumorale qui est d'ailleurs comparable à celle du groupe NT (Figure 38A). Avec une irradiance de 3,2 mW/cm² et un protocole de 1 min d'illumination suivie de 2 min de pause nous ne constatons pas de diminution de la croissance tumorale dans la condition PDT (Figure 38B). De plus, la bioluminescence observée est similaire entre les différentes conditions et continue d'augmenter avec le temps.

Pour conclure, les expériences suivantes ont été réalisées avec les paramètres de PDT suivants :

- Illumination fractionnée de 45 min : **1 min ON / 2 min OFF**
- Irradiance : **12 mW/cm²**
- Fluence : **32,4 J/cm²**
- Laser : **672 nm**

F. Efficacité de la PDT et impact sur le système immunitaire dans un modèle de souris SCID

1. Souris SCID - Non reconstituées

i. Évaluation de l'efficacité de la PDT

Avec le protocole établi dans le point E ci-dessus nous avons évalué l'efficacité de la PDT sur un modèle de souris SCID de carcinose péritonéale ovarienne humaine, non reconstituées par l'injection de PBMC humaines.

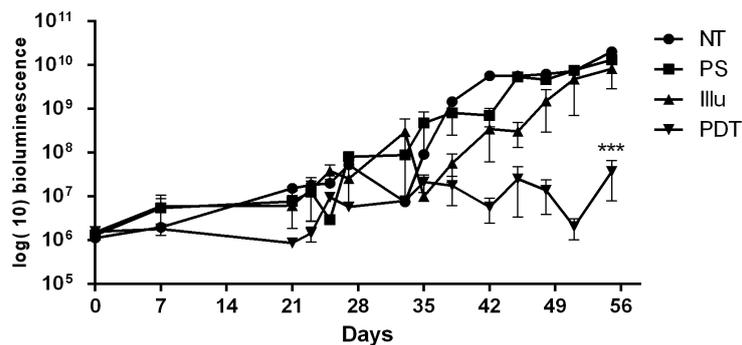


Figure 39 : Évaluation de la régression tumorale après PDT sur un modèle de souris SCID de carcinose péritonéale d'origine ovarienne humaine. Les souris ont été soumises à un protocole d'illumination fractionné : 1 min d'illumination suivie de 2 min de à 12 mWcm² - 45 répétitions avec NT : non traité, PS : photosensibilisateur seul, illu : lumière seule, PDT : illumination en présence du PS. L'illumination a été réalisée au 38^{ème} jour après l'injection des cellules OVCAR3-Luc. L'efficacité du protocole a été évaluée durant 56 jours par quantification de la bioluminescence. ANOVA à 2 facteurs (***) $p < 0,001$, moyennes +/- SD (n=3).

Après avoir illuminé les souris au 38^{ème} jour après l'injection des cellules OVCAR3-Luc, nous avons pu constater une diminution significative de la bioluminescence à partir du 43^{ème} jour dans la condition PDT soit 5 jours après l'illumination. Au contraire, dans les autres conditions, la bioluminescence observée est similaire et continue d'augmenter dans le temps.

ii. Évaluation de la sécrétion de cytokines après la PDT

Afin d'évaluer la libération de cytokines, du sang a été prélevé sur les souris 72h après le traitement. Nous avons réalisé un ELISA sur le sérum du sang des 4 groupes de souris PDT, illu, PS et NT dont les résultats sont présentés en figure 40.

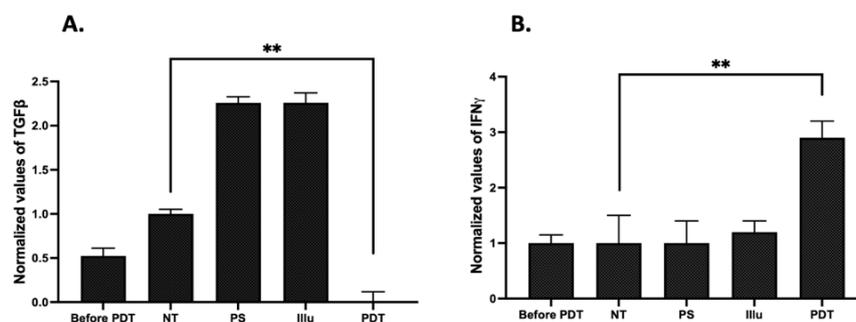


Figure 40: *Évaluation de la sécrétion de cytokines après la PDT dans un modèle de souris SCID de carcinose péritonéale d'origine ovarienne humaine. Un test ELISA a été réalisé sur le sérum des souris prélevé 72h post-traitement. (A) Transforming Growth Factor (TGFβ), (B) Interféron γ (IFNγ). NT : non traité, PS : photosensibilisateur seul, illu : lumière seule, PDT : illumination en présence du PS, before PDT : sang prélevé avant le traitement. ANOVA à 1 facteur (**p < 0,01), les données présentées sont les moyennes normalisées par rapport au groupe NT +/- SD (n=3).*

Nous pouvons constater une diminution significative de la production de TGFβ dans la condition PDT par rapport au groupe NT tandis que dans les autres conditions (PS et illu) nous constatons une augmentation de la sécrétion de cette cytokine (Figure 40A). À contrario, nous pouvons observer une augmentation significative de la sécrétion d'IFNγ dans la condition PDT par rapport à la condition NT (Figure 40B). Cette augmentation n'est d'ailleurs pas constatée dans les groupes PS et illu.

2. Souris SCID - Reconstituées par l'injection de PBMC humaines

i. Évaluation de l'efficacité de la PDT

Afin d'évaluer l'interaction de la PDT avec le système immunitaire nous avons reconstitué ce système chez les souris SCID par l'injection de PBMC humaines. La reconstitution est effectuée au 38^{ème} jour suivant l'injection des cellules tumorales et la PDT est réalisée 7 jours après la reconstitution soit au 44^{ème} jour.

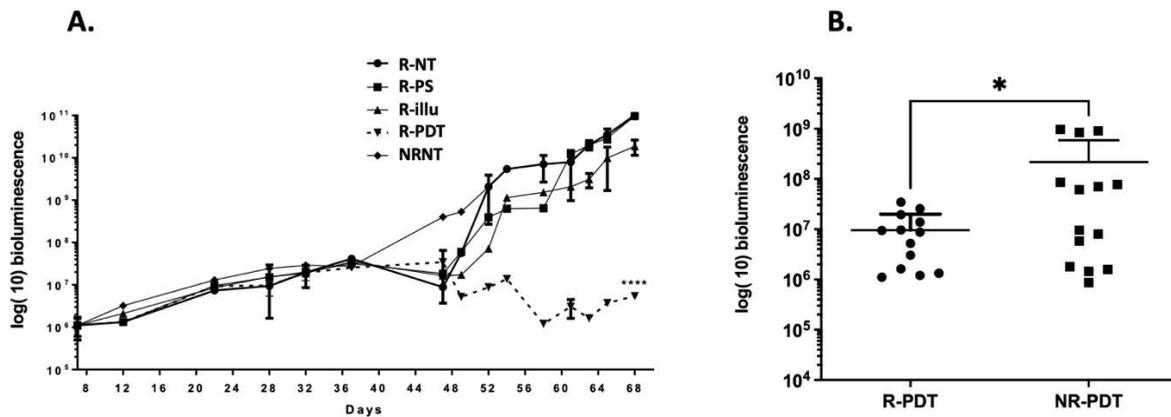


Figure 41: *Évaluation de la régression tumorale après PDT sur un modèle de souris SCID de carcinose péritonéale d'origine ovarienne reconstituées par l'injection de PBMCs humaines.* (A) Les souris ont été soumises à un protocole d'illumination fractionné : 1min d'illumination suivie de 2 min de pause – 45 répétitions à 12 mWcm² avec R-NT : reconstituée non traitée, R-PS : reconstituée avec photosensibilisateur seul, R-illu : reconstituée avec lumière seule, R-PDT : reconstituée avec illumination en présence du PS, NRNT : non reconstituée non traitée. L'illumination a été réalisée au 44^{ème} jour après l'injection des cellules OVCAR3-Luc soit 7 jours après la reconstitution. L'efficacité du protocole a été évaluée durant 68 jours par quantification de la bioluminescence. ANOVA à 2 facteur (****p < 0,0001), moyennes +/- SD (n=3) (B) Évaluation de la progression globale de la tumeur tout au long de l'expérience. Les résultats sont exprimés en bioluminescence log(10). Un test statistique de Mann Whitney a été réalisé afin de comparer les deux conditions (*p < 0,05).

Tout d'abord nous pouvons constater tout de suite après la reconstitution du système immunitaire (jour 38), une légère diminution de la bioluminescence dans les groupes de souris R-NT ; R-PS ; R-illu ; R-PDT comparée au groupe de souris non reconstituées (NRNT). Cependant cette diminution disparaît au fur et à mesure du temps (10 jours après la reconstitution / jour 48) (Figure 41A). De plus, lorsque les souris sont reconstituées et soumises à la PDT (R-PDT) (figure 41A) nous remarquons une diminution significative de la bioluminescence comparée aux autres groupes : R-NT ; R-PS ; R-illu et NTNR. De plus, cette diminution semble prolongée dans le temps (jusqu'à 68 jours). Enfin, cette diminution de la bioluminescence semble plus importante en condition PDT chez les souris reconstituées (R-PDT) que chez les souris non reconstituées (NR-PDT) (figure 41B).

ii. *Évaluation des populations lymphocytaires induites*

Enfin, nous avons évalué l'impact de la PDT sur les populations immunitaires au 7^{ème} et au 30^{ème} jour après la PDT. Les résultats sont présentés en figure 42.

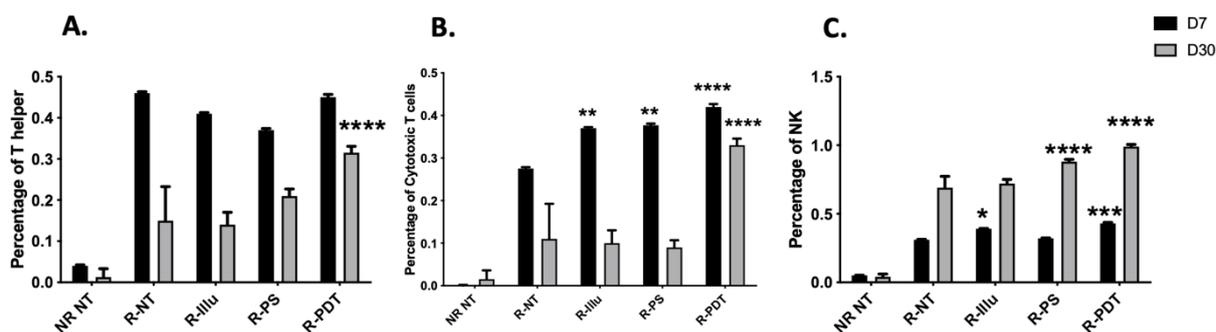


Figure 42: Évaluation de la réponse immune après PDT dans un modèle de souris SCID de carcinose péritonéale d'origine ovarienne humaine, reconstituées ou non par l'injection de PBMCs humaines. Le sang des souris reconstituées ou non reconstituées a été prélevé au 7^{ème} jour et au 30^{ème} jour (D7 et D30) après la PDT et la population immunitaire a été évaluée. (A) Cellules T auxiliaires (B) cellules T cytotoxiques, (C) Cellules Natural Killer. R-NT : reconstituée non traitée, R-PS : reconstituée avec photosensibilisateur seul, R-illu : reconstituée avec lumière seule, R-PDT : reconstituée avec illumination en présence du PS, NRNT : non reconstituée non traitée. ANOVA à 2 facteur (**** $p < 0,0001$) ($n=3$). L'analyse statistique a été réalisée par comparaison au groupe R-NT.

Nous constatons une proportion importante et similaire de lymphocytes T helper dans toutes les conditions des souris reconstituées au 7^{ème} jour. Cependant cette proportion tend à diminuer au 30^{ème} jour. Même si nous constatons cette diminution également dans la condition R-PDT, la prévalence de LT helper dans la condition R-PDT demeure significativement plus importante que la condition R-NT contrairement aux conditions R-illu et R-PS (Figure 42A).

De plus, la prévalence de lymphocytes cytotoxiques en condition R-PDT, R-PS et R-illu est significativement plus importante au 7^{ème} jour après la PDT que le groupe R-NT. Même si cette prévalence semble diminuer entre le 7^{ème} et le 30^{ème} jour après la PDT dans l'ensemble des conditions, celui-ci reste significativement plus importante dans la condition R-PDT que le groupe R-NT comparé aux autres conditions (R-PS et R-illu) où la différence significative n'est plus appréciée (Figure 42B).

Enfin, au 7^{ème} jour après la PDT, nous pouvons constater une légère augmentation de la proportion de lymphocytes NK, significative, dans la condition R-illu et très significative dans la condition R-PDT. À la différence des lymphocytes helper et cytotoxiques, la proportion de NK semble augmenter dans le temps. Même si cette augmentation (au 30^{ème} jour) est également constatée dans les groupes contrôles des souris reconstituées, celle-ci demeure plus importante dans le groupe R-PDT et R-PS (Figure 42C).

iii. Évaluation de la sécrétion de cytokines après PDT

La sécrétion de plusieurs cytokines a également été investiguée et reportée en figure 43.

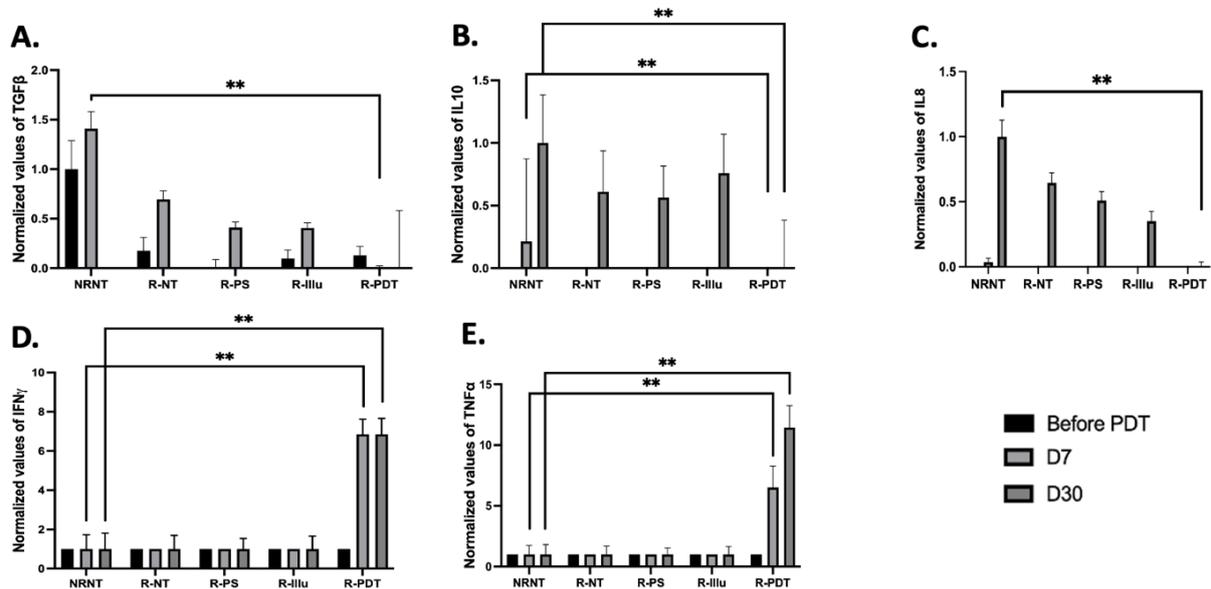


Figure 43: Evaluation de la libération de cytokines après PDT dans un modèle de souris SCID de carcinose péritonéale d'origine ovarienne humaine, reconstituées ou non par l'injection de PBMCs humaines. Le sang des souris reconstituées ou non reconstituées a été prélevé avant la PDT (before PDT), au 7^{ème} jour et au 30^{ème} jour (D7 et D30) après la PDT et la sécrétion de cytokines a été évaluée après avoir récupéré le sérum. (A) Transforming Growth factor (TGFβ), (B) Interleukine 10 (IL-10), (C) Interleukine 8 (IL-8), (D) Interferon γ (IFNγ), (E) Tumor Necrosis Factor α (TNFα). R-NT : reconstituée non traitée, R-PS : reconstituée avec photosensibilisateur seul, R-illu : reconstituée avec lumière seule, R-PDT : reconstituée avec illumination en présence du PS, NRNT : non reconstituée non traitée. ANOVA à 2 facteur (**p < 0,01). Les données présentées sont les moyennes +/- SD normalisées par rapport au groupe NRNT - before PDT pour les cytokines TGFβ, TNFα et IFNγ et par rapport au groupe NRNT-D30 pour les cytokines IL-10 et IL-8 (n=3).

Concernant le TGFβ (figure 43A), nous constatons une diminution importante de sa sécrétion 7 jours après PDT dans les groupes R-NT, R-PS et R-illu comparé au groupe contrôle NRNT. Nous pouvons apprécier qu'aucune détection de cette cytokine n'a été détectée pour la condition R-PDT. Concernant la sécrétion d'IL-10 (figure 43B), nous pouvons constater la présence d'une sécrétion similaire, 30 jours après la PDT, dans les groupes contrôles NRNT, R-NT, R-PS et R-illu. De la même manière que pour le TGFβ, aucune sécrétion n'est détectée dans la condition R-PDT. Concernant la sécrétion d'IL-8 (figure 43C) : celle-ci diminue dans les groupes R-NT, R-PS, R-illu et R-PDT comparée au groupe NRNT 30 jours après la PDT. Nous pouvons remarquer que cette diminution est à nouveau plus accentuée en condition R-PDT 30 jours après PDT par rapport aux groupes contrôles. Au contraire, la sécrétion d'IFNγ est très augmentée 7 et 30 jours après la PDT

dans la condition R-PDT (figure 43D) contrairement aux groupes contrôles ou aucune sécrétion n'a été détectée. Cette sécrétion semble inchangée entre le 7^{ème} et le 30^{ème} jour. Enfin, la sécrétion de TNF α augmente 7 jours après la PDT et est accentuée 30 jours après la PDT dans le groupe R-PDT, à la différence des groupes contrôles ou aucune sécrétion n'a été détectée (figure 43E).

Partie IV :

Discussion

Le pronostic du cancer de l'ovaire reste sombre en raison de son diagnostic tardif. L'addition d'inhibiteur de PARP et des anti-angiogéniques aux thérapies conventionnelles a permis d'augmenter significativement la survie sans progression des patientes. Cependant, malgré les avancées en termes de thérapeutiques, 70% des patientes en rémission font une rechute dans les 18 mois^[49]. *Amate et al.*, ont montré dans une étude rétrospective que le péritoine était le site de récurrence privilégié puisque 75% des rechutes à des stades avancés se font au niveau du péritoine^[50]. Ainsi, l'existence de cette maladie résiduelle péritonéale représente le problème majeur de cette pathologie qu'il est nécessaire de contrôler. Par conséquent, il est primordial de développer un traitement complémentaire à la chimiothérapie et la chirurgie afin de cibler spécifiquement ces métastases péritonéales afin d'améliorer le pronostic de ces patientes.

En ce sens, la thérapie photodynamique s'avère être une stratégie pertinente pour répondre à ce besoin. En effet, sa combinaison avec d'autres agents conventionnels apporterait plusieurs avantages : **i)** Un effet anti-tumoral synergique, grâce à son action cytotoxique, qui pourrait conduire à la réduction des doses de chimiothérapie limitant ainsi l'immunodépression induite par ce traitement, **ii)** la PDT permettrait également de limiter les effets indésirables des traitements conventionnels et amènerait donc une amélioration de la qualité de vie des patients, enfin **iii)** la PDT induirait la formation d'une immunité anti-tumorale au long terme face à ces traitements parfois immunosuppresseurs^[154]. Dans le cadre de ce projet, le laboratoire OncoThai a développé en collaboration avec le laboratoire Réaction et Génie des procédés (Dr Céline Frochot) un nouveau photosensibilisateur, proche structurellement parlant de celui développé par *Hyun et al.*,^[149] le pyrophéophorbide-a couplé à l'acide folique afin de cibler spécifiquement les métastases surexprimant FR α . Ce nouveau PS^{AF} a fait l'objet d'un brevet publié en 2019 (brevet WO/2019/016397). Contrairement à ces prédécesseurs, l'évaluation de la PDT utilisant ce nouveau PS a permis de mettre en évidence plusieurs avantages répondant aux propriétés d'un PS idéal décrites par *H. Abrahamse et MR. Hamblin*^[100] à savoir : **i)** un composé pur, **ii)** une fluorescence suffisante (pour envisager une chirurgie par fluoroguidage), **iii)** peu d'étapes de synthèse (3 étapes), **iv)** un spectre d'absorption compris entre 600 et 800 nm et **v)** une bonne stabilité au stockage.

Par ailleurs ce PS^{AF} répond aux propriétés recherchées en termes de thérapeutique, **i)** un ciblage spécifique, **ii)** une efficacité démontrée *in vitro* puisqu'il a été montré que 95% des cellules cancéreuses OVCAR3 et SKOV3 surexprimant FR α étaient mortes après 1 heure

d'illumination^[150]. Cependant, cette étude manque d'un contrôle négatif de sous-expression du récepteur au folate afin de pouvoir apprécier la sélectivité du PS^{AF}. En effet, il est primordial d'assurer l'efficacité de cette thérapie sur les cellules tumorales surexprimant FR α limitant ainsi les dommages aux tissus sains qui n'expriment que faiblement ce récepteur. De plus, le modèle de culture cellulaire 2D souffre d'une grande simplification. En effet, une culture en monocouche sur du plastique ou du verre ne permet pas de refléter la complexité, l'architecture tumorale, ainsi que les interactions entre les différents types de cellules et entre les cellules et leur microenvironnement ce qui peut influencer l'évaluation et la réponse au traitement^[155]. En effet, bien que les approches de la culture 2D soient largement utilisées et indispensables dans l'étude du comportement cellulaire et moléculaire dans un état physiologique ou physiopathologique, elles restent primitives et simples par rapport à la complexité des approches *in vivo*.

Dans ce contexte, l'objectif de cette étude était dans un premier temps d'évaluer la sélectivité d'une PDT utilisant un nouveau photosensibilisateur couplé au folate dans un modèle *in vitro* de cancer ovarien ainsi que son efficacité et son impact sur le système immunitaire dans un modèle de souris SCID humanisées de carcinose péritonéale d'origine ovarienne.

Dans un premier temps, afin de compléter les travaux publiés en 2020 par notre laboratoire, nous avons étudié la sélectivité de notre PS^{AF}. Pour cela, nous avons ajouté à notre panel d'étude, une lignée cellulaire de fibrosarcome décrite comme sous-exprimant FR α . Nous avons d'abord confirmé par RT-qPCR l'expression génique de FR α sur les 3 lignées cellulaires, ainsi que son expression protéique par western blot et cytométrie en flux. Cette analyse a montré que l'expression des transcrits est parfaitement corrélée à l'expression protéique de FR α sur les lignées OVCAR3, SKOV3 et HT1080, suggérant que ce récepteur n'est pas sujet à des modifications transcriptionnelles / traductionnelles sur ces lignées. Ainsi, l'absence d'expression du récepteur sur la lignée HT1080 nous a confirmé l'intérêt d'utiliser cette lignée comme contrôle négatif d'expression du récepteur dans l'objectif de comparer l'efficacité de la PDT-PS^{AF} en fonction de l'expression de FR α .

De plus, l'acide folique pouvant être transporté par 3 types de récepteurs (e.g., FR ; PCFT ; RFC), nous avons étudié la spécificité de notre PS^{AF} pour FR α sur-exprimé par les cellules cancéreuses *à contrario* des récepteurs RFC et PCFT exprimés de manière ubiquitaire. C'est pourquoi nous souhaitons que notre PS^{AF} soit uniquement internalisé par le

FR α afin de cibler spécifiquement les cellules cancéreuses ovariennes. Pour cela nous avons cultivé les 3 lignées cellulaires avec un excès d'acide folique durant différents temps afin de saturer les récepteurs aux folates. Si l'internalisation de notre PS^{AF} passe uniquement par le récepteur de l'acide folique, nous devrions observer une diminution de l'intensité de fluorescence au fur et à mesure que le temps d'incubation avec l'acide folique augmente. Comme attendu, les résultats ont montré une diminution de l'intensité de fluorescence et ceci de façon significative pour les lignées OVCAR3 et SKOV3. Par ailleurs, une intensité de fluorescence 2 fois moins importante pour la lignée HT1080 et qui ne varie pas nous confirme que notre PS cible préférentiellement les cellules qui surexpriment FR α .

Par ailleurs et de façon très intéressante, une fluorescence correctement détectable du PS^{AF}, par des dispositifs médicaux, pourrait permettre de réaliser une chirurgie de cytoréduction par fluoroguidage dans le traitement de la carcinose péritonéale. En effet, l'exposition de la cavité péritonéale à la longueur d'excitation du PS^{AF} permettrait de distinguer le tissu tumoral du tissu sain (effet PDD), améliorant la qualité de l'intervention de cytoréduction. Ainsi, grâce aux propriétés fluorescentes du PS^{AF}, nous avons validé son internalisation par microscopie confocale. Pour cela, après avoir incubé nos cellules avec le PS^{AF}, nous avons marqué FR α par immunofluorescence en supposant que l'internalisation du PS devrait être plus importante sur les lignées qui surexpriment FR α . Par immunofluorescence, FR α semble être plus particulièrement présent à la membrane des cellules OVCAR3, une localisation compatible avec leur fonction de récepteur membranaire. En revanche, avec les mêmes paramètres d'analyse, une plus faible expression est détectée pour les lignées SKOV3 et HT1080. Ce qui est en accord avec les résultats obtenus par analyse de l'expression protéique membranaire par cytométrie en flux. Les résultats obtenus ont montré une internalisation du PS^{AF} significativement plus importante pour la lignée OVCAR3 qui sur-expriment FR α . Ces résultats suggèrent donc que l'utilisation du PS^{AF} pourrait améliorer la qualité de l'intervention de cytoréduction grâce à ses propriétés de fluorescence (effet PDD) et sa capacité à cibler les métastases résiduelles surexprimant FR α et non pas le tissu sain. À la suite de l'intervention chirurgicale, l'objectif serait d'illuminer la cavité abdominale afin d'obtenir un effet PDT et d'éliminer les métastases résiduelles microscopiques. Avant d'envisager l'utilisation de la PDT chez les patientes, la prochaine interrogation a été de savoir si l'expression de FR α pouvait également influencer l'efficacité de la PDT.

Afin de confirmer l'hypothèse que l'efficacité de la PDT sera plus importante sur les lignées qui sur-expriment FR α , nous avons évalué la viabilité cellulaire après PDT sur les cellules OVCAR3, SKOV3 et HT1080 à différentes doses de lumière, ainsi qu'à différentes concentrations de PS^{AF}. La potentielle sensibilité à la mort induite par la thérapie photodynamique en fonction de l'expression de la cible a été évaluée par la mesure du métabolisme mitochondrial. De façon très intéressante, un effet dose dépendant de la concentration et du temps d'illumination a été constaté sur les 3 lignées, cependant l'intensité de cet effet semble différer en fonction de la lignée. En effet, avec 5 min d'illumination nous retrouvons une diminution de la viabilité proportionnelle à la concentration du PS^{AF} des cellules OVCAR3 et SKOV3 à partir de 0,9 μ M tandis qu'aucune modification n'est constatée sur la lignée HT1080. Il en est de même avec 15 min d'illumination où la concentration à laquelle 50% des cellules OVCAR3 sont mortes (EC50) est de 3,2 μ M, tandis qu'elle est de 4,5 μ M pour les cellules SKOV3 et 9 μ M pour la lignée HT1080. Cette EC50 diminue davantage pour la lignée OVCAR3 après 20 min d'illumination et reste plus stable pour les lignées SKOV3 et HT1080. Ainsi, les résultats de cette expérience ont permis de mettre en exergue une sensibilité accrue de la lignée OVCAR3 à la PDT-PS^{AF} et montrer, pour la première fois, un effet de la PDT proportionnel au niveau d'expression de FR α . Ce résultat confirme ainsi la sélectivité du PS^{AF} pour sa cible : plus l'expression de FR α est importante, plus la concentration de PS^{AF} nécessaire pour induire la mort des cellules sera faible. Néanmoins, ces résultats devront être réitérés afin de valider leur force statistique.

Cependant, d'après ces résultats préliminaires, nous pouvons constater un effet de la PDT sur la lignée HT1080 malgré l'absence d'expression protéique détectée en western-blot et cytométrie en flux. Un certain nombre d'études ont suggéré que FR α avait un rôle clé dans la régulation et la croissance des cellules cancéreuses. *Boshnjaku et al.*, ont rapporté qu'après son internalisation, il pouvait être transloqué au noyau et agir comme un facteur de transcription afin de réguler l'expression de gènes ayant un rôle clé dans le développement et la croissance des cellules cancéreuses. De plus, dans l'absolu, toutes les cellules expriment ce récepteur puisqu'il est indispensable à la survie cellulaire. Ainsi, la lignée HT1080 exprime ce récepteur de manière minimale à tel point que son expression ne soit pas détectée par les techniques utilisées. Ainsi la robustesse de ces résultats ayant pour objectif de démontrer l'innocuité de la PDT pour le tissu sain pourrait être renforcée, dans les prochaines études, par l'utilisation d'un autre contrôle négatif, des cellules saines ovariennes épithéliales qui

n'expriment que faiblement le récepteur FR α : HOSE 6-3 et HOSE 17- tel qu'il a été décrit par *Michelle K. Y. Siu et al.*,^[156].

Par ailleurs, l'efficacité de la PDT s'est retrouvée légèrement moins importante sur la lignée SKOV3, alors qu'une plus forte expression protéique de FR α a été retrouvée sur ces cellules par rapport à la lignée OVCAR3. Or il est important de noter que cette expression a été détectée par western-Blot et donc sur le lysat cellulaire total (protéines intracellulaires et membranaires). Ainsi, il est possible que l'expression protéique membranaire de FR α soit en fait plus faible sur les SKOV3 par rapport à la lignée OVCAR3 comme il a d'ailleurs été montré en cytométrie en flux. Cette faible expression pourrait alors être à l'origine d'une moins bonne internalisation du PS^{AF} (telle qu'il a été montré en microscopie confocale) pouvant se traduire par une moins bonne efficacité de la PDT. En effet, l'efficacité et l'impact de la PDT selon l'expression de sa cible ont été déjà évalués dans un autre cancer. C'est, notamment, ce qu'ont montré *Driehuis E, et al.*, sur des organoïdes dérivés de patients atteints d'un cancer de la tête et du cou présentant un profil d'expression variable de l'EGFR ciblé par un PS ciblant spécifiquement son récepteur. Plus l'expression de l'EGFR était importante, meilleure était l'efficacité de la PDT^[157]. À l'image de cet article, nous estimons que la PDT utilisant le PS couplé au folate agira différemment selon l'expression de ce récepteur par la tumeur de la patiente. En effet, bien que le récepteur au folate soit surexprimé dans les cancers ovariens, son expression peut varier selon le stade de l'avancée du cancer^[158] et le traitement déjà administré à la patiente^[159]. C'est pourquoi, une approche de médecine personnalisée telle que celle décrite par *Driehuis E et al.*, proposant l'utilisation d'organoïdes issus de tumeurs de patientes, permettrait d'évaluer non seulement l'efficacité de ce traitement avant sa mise sur le marché, mais aussi de prédire la réponse aux traitements selon le profil d'expression FR α de la patiente. De plus, le niveau de malignité de la tumeur pourrait également être un facteur déterminant de l'efficacité de la PDT. En effet, il a été montré que la lignée SKOV3 aurait un caractère plus malin que la lignée OVCAR3 en raison de sa capacité à sécréter des exosomes tumoraux contenant des protéines impliquées dans des processus de mort et de survie cellulaire, de migration, de signalisation, de croissance et de prolifération^[160]. À la lumière de cet article, la malignité des cellules tumorales pourrait jouer un rôle dans la détermination des paramètres de la PDT à savoir l'utilisation de doses de lumière plus importante.

Après avoir étudié l'efficacité de la PDT selon l'expression de FR α , nous avons évalué son efficacité dans un modèle de souris SCID humanisé de carcinose péritonéale d'origine ovarienne. Dans un premier temps, nous avons couplé la luciférase à la lignée OVCAR3 (lignée OVCAR3-Luc) afin de pouvoir suivre par imagerie en temps réel, l'évolution de la croissance tumorale. Puis, nous avons vérifié et quantifié l'efficacité de la PDT sur cette lignée, suivant les mêmes paramètres reportés dans l'étude de *Baydoun et al.*, (à savoir 60 min d'illumination, 9 μ M de PS, 1 mW/cm², 672 nm). Comme espéré, sous 60 min d'illumination avec 9 μ M de PS^{AF} nous retrouvons un moins 95% de mortalité, soit une mortalité comparable à celle obtenu avec la lignée OVCAR3. Après avoir vérifié la sensibilité de cette lignée à la PDT, nous avons injecté 1.10⁶ cellules dans la cavité intrapéritonéale des souris SCID. Grâce à l'utilisation des propriétés de bioluminescence de la luciférase, nous avons pu suivre l'évolution du cancer ovarien à diffusion intrapéritonéale. L'injection des cellules OVCAR3-Luc et SKOV3-Luc a déjà été décrite très récemment dans la littérature dans un modèle de souris BALB/c nude^[161]. Contrairement à cet article, nous avons choisi d'injecter une quantité moins importante de cellules tumorales dans l'objectif d'obtenir une croissance lente mais efficace nous permettant de suivre méticuleusement dans le temps l'évolution du cancer, ainsi que l'éventuelle régression après PDT. Comme décrit dans les résultats, au 38^{ème} jour suivant l'injection des cellules OVCAR3-Luc nous avons obtenu une croissance tumorale constante et reproductible entre les souris et proche de la clinique humaine. En effet, la majorité des métastases étaient localisées au niveau du pelvis et de la cavité abdominale, un schéma métastatique courant chez les femmes diagnostiquées d'un stade III de cancer ovarien^[11]. Depuis l'extension des indications de la PDT au cancer, le PS n'est plus administré sous forme topique mais en systémique. C'est pourquoi, même si le PS est correctement solubilisé, sa distribution non spécifique aux tissus sains pourrait être à l'origine d'effets indésirables plus importants. Il est donc nécessaire de développer des PS de 3^{ème} génération afin de cibler de manière active ou passive les cellules néoplasiques limitant ainsi les effets indésirables et améliorant l'efficacité de la PDT^[162]. Dans ce contexte, nous avons évalué la distribution de notre PS de 3^{ème} génération 4h, 6h et 24h après son injection. 24h après l'injection, la fluorescence semble concentrée aux niveaux des tissus tumoraux, des ovaires et des organes métastatiques récurrents dans le cancer de l'ovaire tel que le foie ^[163, 164]. À contrario, le cancer de l'ovaire métastase rarement au niveau du pancréas. Dans notre modèle nous avons certes retrouvé dans le pancréas une fluorescence importante 6h après l'injection, mais celle-ci diminue drastiquement à 24h comparée aux autres organes. De plus,

une concentration importante de notre PS^{AF} retrouvée au niveau du rein 24h après sont injection peut suggérer une élimination rénale de la molécule.

La suite de cette étude consistait à évaluer l'efficacité de la PDT selon 2 protocoles afin de déterminer les paramètres d'illuminations optimum : **i)** l'un alternait 1 min d'illumination et 2 min de pause répété 45 fois, **ii)** l'autre alternait 15 min d'illumination suivi de 10 min de pause répété 3 fois, soit une durée d'illumination totale de 45 min pour les 2 protocoles (le PS était injecté aux souris 24h avant l'illumination). Pour cette étude, nous avons utilisé un dispositif d'illumination spécialement développé par notre laboratoire dont l'efficacité a été démontrée par les travaux de *A. Quilbé*,^[153] Comme attendu, le premier protocole (1min ON / 2 min OFF) a induit une diminution plus accentuée de la bioluminescence. Cette observation est supportée par le besoin en oxygène que nécessite la PDT afin d'induire une efficacité optimale. En effet, malgré les avancées majeures dans l'utilisation de la PDT comme thérapie anti-cancéreuse, un de ses facteurs limitant reste son inefficacité potentielle en cas de tumeur hypoxique où lorsqu'une hypoxie survient en raison de la consommation de l'O₂ moléculaire lors des réactions photochimiques^[165]. Ainsi, lorsque la concentration en oxygène dans le milieu n'est pas suffisamment élevée, la photocytotoxicité peut être réduite voir abolie^[166]. En s'appuyant sur ces données, il a été supposé que la PDT avec un mode d'irradiation pulsé pourrait être plus efficace dans la génération d'oxygène singulet et la réoxygénation des tissus qu'un mode d'illumination continue. Cette stratégie consisterait à irradier la tumeur par intermittence afin de réguler la consommation d'oxygène moléculaire et la formation d'oxygène singulet. Ce phénomène s'explique par le fait qu'une irradiation pulsée permet la ré-oxygénation des tissus entre 2 illuminations ce qui permet d'améliorer l'efficacité de la PDT. Cette théorie a alors fait l'objet de nombreuses études tant *in vitro* qu'*in vivo*. Il a ainsi été démontré à plusieurs reprises qu'un protocole d'illumination fractionné permettait de maintenir un niveau élevé d'oxygène moléculaire augmentant le rendement en oxygène singulet et améliorant ainsi l'efficacité de la PDT comparé à un mode d'illumination en continu^[167,168]. Les données expérimentales de *Klimenko et al.*, ont également confirmé que ce mode d'illumination induisait une mort préférentielle des cellules par apoptose contrairement au mode continu qui induisait une mort cellulaire nécrotique^[168]. De plus, l'irradiance utilisée semble également être un facteur déterminant dans l'efficacité de la PDT puisque nous n'avons constaté aucune diminution de la bioluminescence avec une irradiance de 3,7 mW/cm² comparé à une irradiance de 12 mW/cm². Il a été montré dans un modèle de xénogreffe d'adénocarcinome du colon humain

HT29 soumis à un traitement par mTHPC-PDT que l'utilisation d'une irradiance très importante de l'ordre de 90 à 160 mW/cm² induisait une diminution significative de la pression partielle d'oxygène intra tumorale (pO₂). À contrario, une irradiance plus faible de 5 ou 30 mW/cm² permettait de maintenir la pO₂ à des niveaux comparables à ceux mesurés avant l'illumination^[169]. Une autre étude a également comparé l'efficacité de deux irradiances (20 mW/cm² et 50 mW/cm²) utilisant la 5-ALA-PDT chez des souris SKH1-HR et a montré des résultats plus intéressants avec l'irradiance la plus faible^[170]. En ce sens, l'utilisation d'une irradiance faible de 12 mW/cm² et qui s'avère efficace dans cette étude semble tout à fait en adéquation avec les données de la littérature qui décrivent que l'utilisation d'une irradiance trop importante entraîne une diminution de l'efficacité de la PDT. Il est important de noter qu'aucune étude *in vivo* ne décrit l'utilisation d'une irradiance inférieure à 5 mW/cm² pouvant ainsi expliquer l'inefficacité observée dans notre étude avec une irradiance de 3,7 mW/cm².

Après avoir confirmé l'utilisation de notre protocole d'illumination à savoir : **Illumination fractionnée de 45 min : 1 min ON / 2 min OFF, Irradiance : 12 mW/cm², Fluence : 32,4 J/cm², Laser : 672 nm**, nous avons reconstitué le système immunitaire des souris par l'injection de PBMCs humaines provenant de donneurs sains. Dans ce modèle, nous avons observé une diminution significative de la croissance tumorale dans la condition PDT. Par ailleurs, lorsque l'on compare cette diminution par rapport à celles des souris n'ayant pas été reconstituées, la décroissance est significativement plus importante. Ces résultats confirment les données obtenus dans notre étude *in vitro*^[150] en confortant l'hypothèse selon laquelle l'efficacité de la PDT passe également par l'activation d'une réponse immunitaire anti-tumorale.

En ce sens, l'implication de l'immunité adaptative dans le mécanisme d'action de la PDT a été démontrée pour la première fois par l'équipe de *Canti et al.*. Cette équipe a montré que des souris immunodéprimées traitées et guéries du fibrosarcome par la PDT ne résistaient pas à une nouvelle agression par des cellules tumorales de la même origine. À l'inverse, le groupe de souris immunocompétentes était capable de contrôler la réapparition de la maladie si les cellules tumorales étaient de la même origine, mais pas lorsqu'elles étaient d'une origine différente. Ces résultats ont montré pour la première fois que la PDT induisait l'activation de l'immunité anti-tumorale adaptative et donc la mise en place d'une mémoire immunitaire spécifique de la tumeur sur le long terme^[99]. En fait, l'activation de cette immunité adaptative

passer par la capacité de la PDT à induire une mort cellulaire immunogène (MCI). En effet, Les dommages oxydatifs entraînent une réponse inflammatoire aiguë caractérisée par un afflux des cellules de la réponse innée, une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, la libération de métabolites de l'acide arachidonique (e.g., prostaglandines, leucotriènes, thromboxane), l'activation du système du complément ainsi qu'un relargage des signaux de dangers reconnus par les cellules dendritiques^[88].

C'est pourquoi, nous avons également étudié l'impact de la PDT sur les populations immunitaires. Tout d'abord concernant les cellules de l'immunité innée, nous avons constaté une augmentation des lymphocytes NK. Cette analyse est confortée par les données de la littérature puisqu'il a été décrit à plusieurs reprises qu'un traitement par PDT favorisait l'augmentation de l'expression du ligand du récepteur NKG2D (NKG2DL) sur les cellules tumorales. Cette surexpression rend les cellules tumorales plus sensibles à la cytotoxicité médiée par les NK grâce à sa reconnaissance par le récepteur d'activation des cellules NK, NKG2D. Ces données suggéreraient, ainsi, un rôle possible des cellules NK dans l'augmentation de l'immunité anti-tumorale après PDT^[171,172]. Une hypothèse vérifiée par *Hendrzak et al.*, qui a montré que la déplétion en cellules NK d'un modèle murin entraînait une diminution de l'efficacité de la PDT^[173]. D'autant plus que, contrairement aux lymphocytes NK retrouvés dans le sang des patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire, les NK présents dans l'ascite expriment la molécule PD-1 qui est une caractéristique du développement des processus d'épuisement des lymphocytes. Ainsi, l'augmentation de l'activation de cette population par la PDT permettrait de contrecarrer l'environnement immunosuppresseur régnant dans l'ascite^[174]. De la même manière, nous avons retrouvé une augmentation de la population des lymphocytes CD4⁺ et cytotoxiques CD8⁺ après PDT suggérant la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative anti-tumorale.

De plus, dans notre étude, lorsque les souris n'étaient pas reconstituées nous avons retrouvé une diminution de la sécrétion de la cytokine inflammatoire TGF β et une augmentation de l'IFN γ . Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus dans une précédente étude, dans laquelle le même profil de sécrétion avait été observé après PDT dans un modèle *in vitro*^[150] de cancer de l'ovaire. De manière plus intéressante encore, lorsque les souris ont été reconstituées, plusieurs changements dans l'expression de cytokines ont été observés. La sécrétion de TGF β diminue significativement dans les 7 jours après la PDT comparé aux autres conditions. Concernant les cytokines immunosuppressives IL-8 et IL-10,

leur expression était la plus basse 30 jours après la PDT. Or, ces cytokines ont un rôle défavorable dans le cancer ovarien. En effet, leur concentration sérique a été liée étroitement au stade et au pronostic du cancer de l'ovaire. De plus, la concentration d'IL-8 et l'IL-10 dans le fluide péritonéal a été associée à la progression du cancer et s'avère être un facteur de mauvais pronostic^[175,176]. Il a également été montré que l'IL-8 favorisait la migration, l'invasion et la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules du cancer de l'ovaire^[177] et que l'IL-10 tendait à réduire l'activation des cellules dendritiques impactant ainsi l'activation des lymphocytes T^[178]. Ainsi, la régulation à la baisse de ces cytokines par la PDT permettrait de diminuer le phénotype d'agressivité de la tumeur. Concernant les cytokines IFN γ et TNF α , leur expression était largement augmentée 7 jours après la PDT et a persisté dans le temps puisqu'elle était toujours au même niveau au 30^{ème} jour, une augmentation non observée dans les autres conditions. Ces résultats suggèrent que la PDT est capable de promouvoir la sécrétion de ces cytokines participant à un effet immunoactivateur. En effet, l'IFN γ est une cytokine capable de prévenir le développement des tumeurs^[179] par sa capacité à inhiber l'angiogenèse, à orchestrer l'attraction et la maturation des lymphocytes T CD4+ et CD8+, à promouvoir l'activation de nombreux types cellulaires tels que les monocytes et les cellules NK et à réguler la production des immunoglobulines par les lymphocytes B^[180]. Quant à la cytokine pro-inflammatoire TNF α , elle est sécrétée à l'état physiologique par les macrophages, les cellules stromales et les lymphocytes. Il a été montré que la PDT était capable d'induire une inflammation aigüe caractérisée par la sécrétion de cette cytokine pouvant ainsi promouvoir l'activation des Lymphocytes T et ainsi favoriser une réponse immune adaptative anti-tumorale^[181].

Pour résumé, les résultats obtenus dans le modèle pré-clinique murin de carcinose péritonéale ovarienne montrent que le PDT est capable d'établir un environnement immuno-stimulant favorable à la mise en place d'une réponse adaptative anti-tumorale de type Th1. En effet le protocole de PDT ciblée via l'utilisation d'un PS de 3^{ème} génération couplé à l'acide folique n'est pas uniquement capable d'induire la mort des cellules mais également l'activation d'une réponse immunitaire en faveur d'un effet anti-tumoral.

Partie V :

Conclusion générale - Perspectives

En s'appuyant sur les données de la littérature ainsi que sur les résultats de nos études antérieures *in vitro* et *in vivo*, la PDT semble être une thérapie très prometteuse pouvant apporter un avantage significatif dans la prise en charge de la carcinose péritonéale d'origine ovarienne. Nous avons montré que cette thérapie était capable d'induire localement la destruction directe des cellules malignes de manière spécifique grâce à l'utilisation d'un PS de 3^{ème} génération couplé à l'acide folique. De plus, la mort cellulaire immunogénique induite lui confère des propriétés immunomodulatrices pouvant favoriser une réponse immunitaire anti-tumorale lui garantissant une efficacité sur le long terme. Cependant, il est important de réfléchir aux défis que doit continuer de relever cette thérapie afin de trouver sa place dans le traitement de la carcinose péritonéale.

Nous avons apporté la preuve de concept que ce PS de 3^{ème} génération était capable d'induire une diminution significative de la taille de la tumeur sur un modèle murin humanisé ainsi qu'une modulation favorable de l'environnement immunitaire vers une réponse immune adaptative anti-tumorale. Cependant, le PS utilisé est un lot synthétisé aux normes : bonnes pratiques de laboratoires (BPL). C'est pourquoi, ce PS^{AF} est actuellement en cours de synthèse selon les bonnes pratiques de fabrications (BPF) afin de pouvoir envisager un essai clinique. La suite de cette étude consistera dans un premier temps à confirmer l'efficacité du lot aux normes BPF comparée à celle du lot aux normes BPL. Pour cela nous évaluerons à nouveau *in vitro* et *in vivo* l'efficacité de ce nouveau PS aux normes BPF ainsi que son impact sur le système immunitaire. Nous nous intéresserons également aux effets indésirables potentiels de cette molécule en réalisant des études de toxicité ainsi que des études de pharmacocinétique et de pharmacodynamie afin de pouvoir envisager un essai clinique. Nous réaliserons également une étude permettant de comparer l'administration en IP du PS *vs* administration en IV puisque la voie IV sera normalement la voie d'administration privilégiée chez l'humain. À plus long terme, si l'étude préclinique s'avère concluante, la faisabilité, la sécurité et l'efficacité de la PDT pour le traitement de la carcinose péritonéale d'origine ovarienne sera évaluée lors d'une étude clinique pilote.

Les premières applications cliniques de la PDT pour le traitement de la carcinose péritonéale d'origine ovarienne présentées précédemment ont été menées dans les années 1990 avec pour objectifs principaux d'étudier la faisabilité et la sécurité d'une telle procédure. Ces études décrivent l'utilisation de deux dispositifs d'illumination : **i)** le premier consiste en une fibre optique à tir direct permettant l'illumination du mésentère et de l'intestin alors que

ii) le second consiste en une baguette lumineuse visant à illuminer l'ensemble des autres régions. L'utilisation de cette baguette, composée d'une fibre diffusante introduite dans un tube endotrachéal, impliquait le remplissage préalable de la cavité abdominale par une émulsion lipidique permettant une meilleure diffusion de la lumière. Bien que les résultats aient permis de démontrer la faisabilité de la PDT pour le traitement de la carcinose péritonéale d'origine ovarienne, aucune amélioration significative du contrôle de la maladie n'a été mise en exergue avec une morbidité importante dans les suites opératoires. Le manque de sélectivité du PS utilisé pour les cellules tumorales a été considéré comme étant à l'origine de ces complications. Le manque d'efficacité de la PDT lui a, également, été en partie imputé. Ainsi, notre PS breveté de 3^{ème} génération couplé à l'acide folique, permet aujourd'hui de reconsidérer avec pertinence la réalisation de la PDT intrapéritonéale sous réserve toutefois de disposer d'un dispositif d'illumination adapté. C'est pourquoi, notre laboratoire travaille activement sur le développement d'un dispositif permettant d'illuminer la cavité péritonéale afin de garantir la réalisation d'une PDT optimale en pratique clinique. Pour cela, 4 dispositifs d'illumination candidats ont été sélectionnés et font actuellement l'objet d'une étude comparative : **i)** un dispositif à base de textiles lumineux, **ii)** un dispositif composé d'une baguette lumineuse, **iii)** un dispositif hybride composé des textiles lumineux et de la baguette lumineuse, **iv)** un dispositif complémentaire composé d'un scialytique de salle d'opération.

Afin de pouvoir quantifier les doses de lumière délivrées au sein de la cavité abdomino-pelvienne et ainsi déterminer le dispositif d'illumination optimal, un fantôme de cavité péritonéale a été développé. Ce fantôme a été conçu sur la base de moulages sur corps humain et de mesures sur images scanner de patientes traitées pour cette pathologie. Les critères de performance retenus pour l'évaluation d'un tel dispositif d'illumination comprennent d'une part la dose de lumière moyenne délivrée par le dispositif au sein de la cavité abdomino-pelvienne et d'autre part le coefficient de variation des doses de lumière délivrées au sein de cette même cavité. Le dispositif le plus performant devra allier une dose de lumière moyenne élevée (garantissant l'atteinte de la cible) à un faible coefficient de variation (traduisant l'homogénéité de la lumière délivrée). Par la suite, l'identification du dispositif d'illumination le plus adapté à la PDT intrapéritonéale fera l'objet d'une étude préclinique de faisabilité sur le modèle porcin dont l'objectif sera d'évaluer la faisabilité et la sécurité de la procédure de PDT intrapéritonéale. Cette démonstration pourrait par ailleurs aboutir au dépôt d'un brevet puisqu'aucun dispositif d'illumination dédié n'est actuellement disponible sur le marché.

Enfin, bien que les stratégies thérapeutiques dirigées contre FR α ont été étudiées dans de nombreux cancers, les scientifiques qui conçoivent ces nouveaux composés ne portent que peu d'intérêt au problème de la dégradation de l'acide folique. Généralement, les études de dégradation de cette molécule décrites dans la littérature ne prennent en compte que quelques critères : pH ; température ; lumière ; oxygène. Or, la revue de 2016 publiée par *Amirah Mohd Gazzali et al*, regroupant la description de tous ces paramètres^[182] a mis en lumière que les deux liens labiles de l'acide folique (*l'amine de l'acide para-aminobenzoïque relié au carbone 5 du noyau ptérine et l'amide reliant l'acide para-aminobenzoïque à l'acide glutamique*) peuvent être impliqués dans la dégradation de la molécule. Ainsi, l'intégration du problème de la dégradation des acides foliques dans le développement de nouveaux composés ciblant FR α est cruciale. En ce sens, la conception de nouveaux analogues de l'acide folique ciblant FR α assurant une stabilité durable pourrait résoudre ce problème. C'est pourquoi le PS^{AF} pourrait faire l'objet d'une amélioration via un couplage à un analogue d'acide folique plus stable. Dans ce contexte, la suite de cette étude consistera à « designer » et synthétiser de nouveaux analogues de l'acide folique dans l'objectif d'améliorer la stabilité comparée à celle de l'acide folique commercialisé. De la même manière qu'il a été réalisé avec le PS^{AF}, ces analogues d'acides foliques seront couplés au pyrophosphorobide et leur efficacité ainsi que leurs propriétés immunostimulantes seront testées afin d'évaluer leur utilisation potentielle dans le traitement de la carcinose péritonéale d'origine ovarienne. Par ailleurs, il est connu que le récepteur au folate est surexprimé dans environ 40% des tumeurs solides, en particulier dans les cancers d'origine épithéliale. À terme, il pourrait donc être envisagé d'élargir la PDT utilisant ce nouveau photosensibilisateur couplé à un analogue de l'acide folique à d'autres types de tumeurs surexprimant le récepteur au folate (cancer du pancréas, carcinome hépatocellulaire, cancer du poumon).

En conclusion, l'ensemble de ces travaux de recherche devraient permettre d'entrouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques dans un cancer qui est à l'heure actuelle en impasse thérapeutique.

BIBLIOGRAPHIE

1. Organisation Mondiale de la Santé. Dernières données mondiales sur le cancer : le fardeau du cancer atteint 18,1 millions de nouveaux cas et 9,6 millions de décès par cancer en 2018. Communiqué de presse 2018;(263):3.
2. Lheureux S, Braunstein M, Oza AM. Epithelial ovarian cancer: Evolution of management in the era of precision medicine. *CA Cancer J Clin* 2019;69(4):280-304.
3. Cancer today [Internet]. Global Cancer Observatory2022 [cité 2022 sept 13];Available from: <http://gco.iarc.fr/today/home>
4. Momenimovahed Z, Tiznobaik A, Taheri S, Salehiniya H. Ovarian cancer in the world: epidemiology and risk factors. *Int J Womens Health* 2019;11:287-99.
5. Temkin SM, Bergstrom J, Samimi G, Minasian L. Ovarian Cancer Prevention in High-risk Women. *Clin Obstet Gynecol* 2017;60(4):738-57.
6. Hada M, Edin ML, Hartge P, Lih FB, Wentzensen N, Zeldin DC, et al. Prediagnostic Serum Levels of Fatty Acid Metabolites and Risk of Ovarian Cancer in the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2019;28(1):189-97.
7. Neff RT, Senter L, Salani R. BRCA mutation in ovarian cancer: testing, implications and treatment considerations. *Ther Adv Med Oncol* 2017;9(8):519-31.
8. Matulonis UA, Sood AK, Fallowfield L, Howitt BE, Sehouli J, Karlan BY. Ovarian cancer. *Nat Rev Dis Primers* 2016;2:16061.
9. Reid BM, Permeth JB, Sellers TA. Epidemiology of ovarian cancer: a review. *Cancer Biol Med* 2017;14(1):9-32.
10. Gaona-Luviano P, Medina-Gaona LA, Magaña-Pérez K. Epidemiology of ovarian cancer. *Chin Clin Oncol* 2020;9(4):47.
11. Doubeni CA, Doubeni AR, Myers AE. Diagnosis and Management of Ovarian Cancer. *Am Fam Physician* 2016;93(11):937-44.
12. Hamilton W, Peters TJ, Bankhead C, Sharp D. Risk of ovarian cancer in women with symptoms in primary care: population based case-control study. *BMJ* 2009;339:b2998.
13. Goff BA, Mandel L, Muntz HG, Melancon CH. Ovarian carcinoma diagnosis. *Cancer* 2000;89(10):2068-75.
14. Cortez AJ, Tudrej P, Kujawa KA, Lisowska KM. Advances in ovarian cancer therapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 2018;81(1):17-38.
15. Liu JH, Zanotti KM. Management of the adnexal mass. *Obstet Gynecol* 2011;117(6):1413-28.
16. Giampaolino P, Foreste V, Della Corte L, Di Filippo C, Iorio G, Bifulco G. Role of biomarkers for early detection of ovarian cancer recurrence. *Gland Surg* 2020;9(4):1102-11.
17. Chang JC, Kundranda M. Novel Diagnostic and Predictive Biomarkers in Pancreatic Adenocarcinoma. *Int J Mol Sci* 2017;18(3):667.
18. Manvar AM, Wallen EM, Pruthi RS, Nielsen ME. Prognostic value of CA 125 in transitional cell carcinoma of the bladder. *Expert Rev Anticancer Ther* 2010;10(12):1877-81.
19. Laffont A, Goussot V, Berriolo-Riedinger A, Riedinger JM. [CA 125 assay in the extension assessment of newly diagnosed breast cancers: why and how?]. *Ann Biol Clin (Paris)* 2018;76(5):553-61.

20. Li B, Yuan Q, Zou YT, Su T, Lin Q, Zhang YQ, et al. CA-125, CA-153, and CYFRA21-1 as clinical indicators in male lung cancer with ocular metastasis. *J Cancer* 2020;11(10):2730-6.
21. Kroeger PT, Drapkin R. Pathogenesis and heterogeneity of ovarian cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2017;29(1):26-34.
22. Lemoine L, Sugarbaker P, Van der Speeten K. Pathophysiology of colorectal peritoneal carcinomatosis: Role of the peritoneum. *World J Gastroenterol* 2016;22(34):7692-707.
23. Coccolini F, Gheza F, Lotti M, Virzi S, Iusco D, Ghermandi C, et al. Peritoneal carcinomatosis. *World J Gastroenterol* 2013;19(41):6979-94.
24. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev* 1989;8(2):98-101.
25. Dian D, Brüning A, Mylonas I. E-cadherin as a prognostic marker in human serous carcinomas of the ovary: an immunohistochemical analysis. *Arch Gynecol Obstet* 2011;284(2):437-43.
26. Cho EY, Choi Y, Chae SW, Sohn JH, Ahn GH. Immunohistochemical study of the expression of adhesion molecules in ovarian serous neoplasms. *Pathol Int* 2006;56(2):62-70.
27. Patel IS, Madan P, Getsios S, Bertrand MA, MacCalman CD. Cadherin switching in ovarian cancer progression. *Int J Cancer* 2003;106(2):172-7.
28. Sandoval P, Jiménez-Heffernan JA, Rynne-Vidal Á, Pérez-Lozano ML, Gilsanz Á, Ruiz-Carpio V, et al. Carcinoma-associated fibroblasts derive from mesothelial cells via mesothelial-to-mesenchymal transition in peritoneal metastasis. *The Journal of Pathology* 2013;231(4):517-31.
29. Rynne-Vidal A, Jiménez-Heffernan JA, Fernández-Chacón C, López-Cabrera M, Sandoval P. The Mesothelial Origin of Carcinoma Associated-Fibroblasts in Peritoneal Metastasis. *Cancers (Basel)* 2015;7(4):1994-2011.
30. van Baal JOAM, van Noorden CJF, Nieuwland R, Van de Vijver KK, Sturk A, van Driel WJ, et al. Development of Peritoneal Carcinomatosis in Epithelial Ovarian Cancer: A Review. *J Histochem Cytochem* 2018;66(2):67-83.
31. Pignata S, Pisano C, Di Napoli M, Cecere SC, Tambaro R, Attademo L. Treatment of recurrent epithelial ovarian cancer. *Cancer* 2019;125 Suppl 24:4609-15.
32. Vergote I, Tropé CG, Amant F, Kristensen GB, Ehlen T, Johnson N, et al. Neoadjuvant chemotherapy or primary surgery in stage IIIC or IV ovarian cancer. *N Engl J Med* 2010;363(10):943-53.
33. Kehoe S, Hook J, Nankivell M, Jayson GC, Kitchener H, Lopes T, et al. Primary chemotherapy versus primary surgery for newly diagnosed advanced ovarian cancer (CHORUS): an open-label, randomised, controlled, non-inferiority trial. *Lancet* 2015;386(9990):249-57.
34. Sørensen SM, Schnack TH, Høgdall C. Impact of residual disease on overall survival in women with Federation of Gynecology and Obstetrics stage IIIB-IIIC vs stage IV epithelial ovarian cancer after primary surgery. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2019;98(1):34-43.
35. Harter P, du Bois A, Hahmann M, Hasenburg A, Burges A, Loibl S, et al. Surgery in recurrent ovarian cancer: the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie (AGO) DESKTOP OVAR trial. *Ann Surg Oncol* 2006;13(12):1702-10.
36. du Bois A, Reuss A, Pujade-Lauraine E, Harter P, Ray-Coquard I, Pfisterer J. Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: a combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials: by the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Studiengruppe Ovarialkarzinom (AGO-OVAR) and the Groupe d'Investigateurs Nationaux Pour les Etudes des Cancers de l'Ovaire (GINECO). *Cancer* 2009;115(6):1234-44.

37. Elattar A, Bryant A, Winter-Roach BA, Hatem M, Naik R. Optimal primary surgical treatment for advanced epithelial ovarian cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2011;(8):CD007565.
38. Colombo N, Sessa C, du Bois A, Ledermann J, McCluggage WG, McNeish I, et al. ESMO-ESGO consensus conference recommendations on ovarian cancer: pathology and molecular biology, early and advanced stages, borderline tumours and recurrent disease†. *Ann Oncol* 2019;30(5):672-705.
39. Högberg T, Glimelius B, Nygren P, SBU-group. Swedish Council of Technology Assessment in Health Care. A systematic overview of chemotherapy effects in ovarian cancer. *Acta Oncol* 2001;40(2-3):340-60.
40. Neijt JP, Engelholm SA, Tuxen MK, Sorensen PG, Hansen M, Sessa C, et al. Exploratory phase III study of paclitaxel and cisplatin versus paclitaxel and carboplatin in advanced ovarian cancer. *J Clin Oncol* 2000;18(17):3084-92.
41. Chandra A, Pius C, Nabeel M, Nair M, Vishwanatha JK, Ahmad S, et al. Ovarian cancer: Current status and strategies for improving therapeutic outcomes. *Cancer Med* 2019;8(16):7018-31.
42. Chua TC, Moran BJ, Sugarbaker PH, Levine EA, Glehen O, Gilly FN, et al. Early- and long-term outcome data of patients with pseudomyxoma peritonei from appendiceal origin treated by a strategy of cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy. *J Clin Oncol* 2012;30(20):2449-56.
43. Yan TD, Deraco M, Baratti D, Kusamura S, Elias D, Glehen O, et al. Cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy for malignant peritoneal mesothelioma: multi-institutional experience. *J Clin Oncol* 2009;27(36):6237-42.
44. Vergote I, Harter P, Chiva L. Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy does not improve survival in advanced ovarian cancer. *Cancer* 2019;125 Suppl 24:4594-7.
45. Burger RA, Fleming GF, Mannel RS, Greer BE, Liang SX. Incorporation of Bevacizumab in the Primary Treatment of Ovarian Cancer. *The New England Journal of Medicine* 2011;11.
46. Perren TJ, Swart AM, Pfisterer J, Ledermann JA, Pujade-Lauraine E, Kristensen G, et al. A phase 3 trial of bevacizumab in ovarian cancer. *N Engl J Med* 2011;365(26):2484-96.
47. Della Pepa C, Tonini G, Pisano C, Di Napoli M, Cecere SC, Tambaro R, et al. Ovarian cancer standard of care: are there real alternatives? *Chin J Cancer* 2015;34(1):17-27.
48. Gulia S, Kannan S, Ghosh J, Rath S, Maheshwari A, Gupta S. Maintenance therapy with a poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor in patients with newly diagnosed advanced epithelial ovarian cancer: individual patient data and trial-level meta-analysis. *ESMO Open* 2022;7(5):100558.
49. Medina-Castro JM, Ruiz-DeLeón A. Role of hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in ovarian cancer. *Chin Clin Oncol* 2020;9(4):44.
50. Amate P, Huchon C, Dessapt AL, Bensaid C, Medioni J, Le Frère Belda MA, et al. Ovarian cancer: sites of recurrence. *Int J Gynecol Cancer* 2013;23(9):1590-6.
51. Fitzpatrick TB, Pathak MA. Historical aspects of methoxsalen and other furocoumarins. *J Invest Dermatol* 1959;32(2, Part 2):229-31.
52. Raab O. Über die Wirkung, fluorescirender Stoffe auf infusorien. *Z Biol* 1900;39:524-46.
53. Tappeiner H v, Jodlbauer A. Die sensibilisierende Wirkung fluorescierender Substanzen; gesammelte Untersuchungen über die photodynamische Erscheinung., Leipzig: Vogel; 1907.
54. Hausmann, W. Die sensibilisierende Wirkung des Hematoporphyrins. *Biochem. Zeitung* 1911;30:276-316.
55. Meyer-Betz F. Untersuchungen über die biologische photodynamische Wirkung des Hematoporphyrins und anderer Derivative des Blut und Galenafarbstoffs. *Dtsch Arch Klin* 1913;112:476-503.

56. Schwartz S. Some relationships of porphyrins, X-rays and tumors. *Univ Minn Med Bull* 1955;27:7,8.
57. Lipson RL, Baldes EJ, Olsen AM. Hematoporphyrin derivative: a new aid for endoscopic detection of malignant disease. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1961;42:623-9.
58. Kelly JF, Snell ME. Hematoporphyrin derivative: a possible aid in the diagnosis and therapy of carcinoma of the bladder. *J Urol* 1976;115(2):150-1.
59. Naidoo C, Kruger CA, Abrahamse H. Simultaneous Photodiagnosis and Photodynamic Treatment of Metastatic Melanoma. *Molecules* 2019;24(17):3153.
60. Ding H, Yu H, Dong Y, Tian R, Huang G, Boothman DA, et al. Photoactivation Switch from Type II to Type I Reactions by Electron-Rich Micelles for Improved Photodynamic Therapy of Cancer Cells Under Hypoxia. *J Control Release* 2011;156(3):276-80.
61. Redmond RW, Kochevar IE. Spatially resolved cellular responses to singlet oxygen. *Photochem Photobiol* 2006;82(5):1178-86.
62. Roots R, Okada S. Estimation of life times and diffusion distances of radicals involved in x-ray-induced DNA strand breaks of killing of mammalian cells. *Radiat Res* 1975;64(2):306-20.
63. Panus PC, Radi R, Chumley PH, Lillard RH, Freeman BA. Detection of H₂O₂ release from vascular endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 1993;14(2):217-23.
64. Robertson CA, Evans DH, Abrahamse H. Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *J Photochem Photobiol B* 2009;96(1):1-8.
65. Agarwal ML, Clay ME, Harvey EJ, Evans HH, Antunez AR, Oleinick NL. Photodynamic therapy induces rapid cell death by apoptosis in L5178Y mouse lymphoma cells. *Cancer Res* 1991;51(21):5993-6.
66. Luo W, Liu RS, Zhu JG, Li YC, Liu HC. Subcellular location and photodynamic therapeutic effect of chlorin e6 in the human tongue squamous cell cancer Tca8113 cell line. *Oncol Lett* 2015;9(2):551-6.
67. Dellinger M. Apoptosis or necrosis following Photofrin photosensitization: influence of the incubation protocol. *Photochem Photobiol* 1996;64(1):182-7.
68. Hsieh YJ, Wu CC, Chang CJ, Yu JS. Subcellular localization of Photofrin determines the death phenotype of human epidermoid carcinoma A431 cells triggered by photodynamic therapy: when plasma membranes are the main targets. *J Cell Physiol* 2003;194(3):363-75.
69. Martins WK, Belotto R, Silva MN, Grasso D, Suriani MD, Lavor TS, et al. Autophagy Regulation and Photodynamic Therapy: Insights to Improve Outcomes of Cancer Treatment. *Front Oncol* 2020;10:610472.
70. Mokoena DR, George BP, Abrahamse H. Photodynamic Therapy Induced Cell Death Mechanisms in Breast Cancer. *Int J Mol Sci* 2021;22(19):10506.
71. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ* 2018;25(3):486-541.
72. Kimura M, Yoshioka T, Saio M, Banno Y, Nagaoka H, Okano Y. Mitotic catastrophe and cell death induced by depletion of centrosomal proteins. *Cell Death Dis* 2013;4:e603.
73. Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene* 2004;23(16):2825-37.
74. Erenpreisa J, Cragg MS. Mitotic death: a mechanism of survival? A review. *Cancer Cell Int* 2001;1(1):1.
75. Mishchenko T, Balalaeva I, Gorokhova A, Vedunova M, Krysko DV. Which cell death modality wins the contest for photodynamic therapy of cancer? *Cell Death Dis* 2022;13(5):455.

76. Nie S, Wang X, Wang H. NLRP3 Inflammasome Mediated Interleukin-1 β Production in Cancer-Associated Fibroblast Contributes to ALA-PDT for Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Manag Res* 2019;11:10257-67.
77. Zhang D, Hu X, Li J, Liu J, Baks-Te Bulte L, Wiersma M, et al. DNA damage-induced PARP1 activation confers cardiomyocyte dysfunction through NAD⁺ depletion in experimental atrial fibrillation. *Nat Commun* 2019;10(1):1307.
78. Wang Y, An R, Umanah GK, Park H, Nambiar K, Eacker SM, et al. A nuclease that mediates cell death induced by DNA damage and poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Science* 2016;354(6308):aad6872.
79. Soriano J, Mora-Espí I, Alea-Reyes ME, Pérez-García L, Barrios L, Ibáñez E, et al. Cell Death Mechanisms in Tumoral and Non-Tumoral Human Cell Lines Triggered by Photodynamic Treatments: Apoptosis, Necrosis and Parthanatos. *Sci Rep* 2017;7:41340.
80. Sun Y, Liu WZ, Liu T, Feng X, Yang N, Zhou HF. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. *J Recept Signal Transduct Res* 2015;35(6):600-4.
81. Miki Y, Akimoto J, Moritake K, Hironaka C, Fujiwara Y. Photodynamic therapy using talaporfin sodium induces concentration-dependent programmed necroptosis in human glioblastoma T98G cells. *Lasers Med Sci* 2015;30(6):1739-45.
82. Birsen R, Grignano E, Chapuis N, Bouscary D. Ferroptose et cancer. *médecine/sciences* 2021;37(8-9):726-34.
83. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbelik M, et al. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst* 1998;90(12):889-905.
84. Zhu T, Shi L, Yu C, Dong Y, Qiu F, Shen L, et al. Ferroptosis Promotes Photodynamic Therapy: Supramolecular Photosensitizer-Inducer Nanodrug for Enhanced Cancer Treatment. *Theranostics* 2019;9(11):3293-307.
85. Castellani A, Pace GP, Concioli M. Photodynamic effect of haematoporphyrin on blood microcirculation. *J Pathol Bacteriol* 1963;86:99-102.
86. Star WM, Marijnissen HP, van den Berg-Blok AE, Versteeg JA, Franken KA, Reinhold HS. Destruction of rat mammary tumor and normal tissue microcirculation by hematoporphyrin derivative photoradiation observed in vivo in sandwich observation chambers. *Cancer Res* 1986;46(5):2532-40.
87. Chen B, Pogue BW, Hoopes PJ, Hasan T. Vascular and cellular targeting for photodynamic therapy. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2006;16(4):279-305.
88. Falk-Mahapatra R, Gollnick SO. Photodynamic Therapy and Immunity: An Update. *Photochem Photobiol* 2020;96(3):550-9.
89. Mroz P, Hashmi JT, Huang YY, Lange N, Hamblin MR. Stimulation of anti-tumor immunity by photodynamic therapy. *Expert Rev Clin Immunol* 2011;7(1):75-91.
90. Pan Y, Yu Y, Wang X, Zhang T. Tumor-Associated Macrophages in Tumor Immunity. *Front Immunol* 2020;11:583084.
91. Sluiter W, de Vree WJ, Pietersma A, Koster JF. Prevention of late lumen loss after coronary angioplasty by photodynamic therapy: role of activated neutrophils. *Mol Cell Biochem* 1996;157(1-2):233-8.
92. Kousis PC, Henderson BW, Maier PG, Gollnick SO. Photodynamic therapy enhancement of antitumor immunity is regulated by neutrophils. *Cancer Res* 2007;67(21):10501-10.
93. Brackett CM, Muhitch JB, Evans SS, Gollnick SO. IL-17 promotes neutrophil entry into tumor-draining lymph nodes following induction of sterile inflammation. *J Immunol* 2013;191(8):4348-57.

94. Kabingu E, Vaughan L, Owczarczak B, Ramsey KD, Gollnick SO. CD8⁺ T cell-mediated control of distant tumours following local photodynamic therapy is independent of CD4⁺ T cells and dependent on natural killer cells. *Br J Cancer* 2007;96(12):1839-48.
95. Ahmed A, Tait SWG. Targeting immunogenic cell death in cancer. *Mol Oncol* 2020;14(12):2994-3006.
96. Panzarini E, Inguscio V, Dini L. Immunogenic Cell Death: Can It Be Exploited in PhotoDynamic Therapy for Cancer? *Biomed Res Int* 2013;2013:482160.
97. Kushibiki T, Tajiri T, Tomioka Y, Awazu K. Photodynamic therapy induces interleukin secretion from dendritic cells. *Int J Clin Exp Med* 2010;3(2):110-4.
98. Hwang HS, Shin H, Han J, Na K. Combination of photodynamic therapy (PDT) and anti-tumor immunity in cancer therapy. *J Pharm Investig* 2018;48(2):143-51.
99. Canti GL, Lattuada D, Nicolin A, Taroni P, Valentini G, Cubeddu R. Immunopharmacology studies on photosensitizers used in photodynamic therapy. 1994;2078:268-75.
100. Abrahamse H, Hamblin MR. New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochem J* 2016;473(4):347-64.
101. Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO, et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J Clin* 2011;61(4):250-81.
102. Triesscheijn M, Baas P, Schellens JHM, Stewart FA. Photodynamic Therapy in Oncology. *The Oncologist* 2006;11(9):1034-44.
103. Zhang J, Jiang C, Figueiró Longo JP, Azevedo RB, Zhang H, Muehlmann LA. An updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic therapy. *Acta Pharm Sin B* 2018;8(2):137-46.
104. Baskaran R, Lee J, Yang SG. Clinical development of photodynamic agents and therapeutic applications. *Biomater Res* 2018;22(1):25.
105. Mfouo-Tynga IS, Dias LD, Inada NM, Kurachi C. Features of third generation photosensitizers used in anticancer photodynamic therapy: Review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2021;34:102091.
106. Bonnett R, White RD, Winfield UJ, Berenbaum MC. Hydroporphyrins of the meso-tetra(hydroxyphenyl)porphyrin series as tumour photosensitizers. *Biochem J* 1989;261(1):277-80.
107. Senge MO, Brandt JC. Temoporfin (Foscan®, 5,10,15,20-tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin)--a second-generation photosensitizer. *Photochem Photobiol* 2011;87(6):1240-96.
108. Schmidt-Erfurth U, Hasan T. Mechanisms of action of photodynamic therapy with verteporfin for the treatment of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol* 2000;45(3):195-214.
109. Mahmoudi K, Garvey KL, Bouras A, Cramer G, Stepp H, Jesu Raj JG, et al. 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy for the treatment of high-grade gliomas. *J Neurooncol* 2019;141(3):595-607.
110. Albanese AM, Albanese EF, Miño JH, Gómez E, Gómez M, Zandomeni M, et al. Peritoneal surface area: measurements of 40 structures covered by peritoneum: correlation between total peritoneal surface area and the surface calculated by formulas. *Surg Radiol Anat* 2009;31(5):369-77.
111. Sindelar WF, DeLaney TF, Tochner Z, Thomas GF, Dachoswki LJ, Smith PD, et al. Technique of photodynamic therapy for disseminated intraperitoneal malignant neoplasms. Phase I study. *Arch Surg* 1991;126(3):318-24.
112. Delaney TF, Sindelar WF, Tochner Z, Smith PD, Friauf WS, Thomas G, et al. Phase I study of debulking surgery and photodynamic therapy for disseminated intraperitoneal tumors. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics* 1993;25(3):445-57.

113. Hahn SM, Fraker DL, Mick R, Metz J, Busch TM, Smith D, et al. A phase II trial of intraperitoneal photodynamic therapy for patients with peritoneal carcinomatosis and sarcomatosis. *Clin Cancer Res* 2006;12(8):2517-25.
114. Marchetti C, Palaia I, Giorgini M, De Medici C, Iadarola R, Vertechy L, et al. Targeted drug delivery via folate receptors in recurrent ovarian cancer: a review. *Onco Targets Ther* 2014;7:1223-36.
115. Azaïs H, Schmitt C, Tardivel M, Kerdraon O, Stallivieri A, Frochot C, et al. Assessment of the specificity of a new folate-targeted photosensitizer for peritoneal metastasis of epithelial ovarian cancer to enable intraperitoneal photodynamic therapy. A preclinical study. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2016;13:130-8.
116. Bailey LB, Stover PJ, McNulty H, Fenech MF, Gregory JF, Mills JL, et al. Biomarkers of Nutrition for Development—Folate Review12345. *J Nutr* 2015;145(7):1636S-1680S.
117. Ebara S. Nutritional role of folate. *Congenital Anomalies* 2017;57(5):138-41.
118. Matherly LH, Goldman DI. Membrane transport of folates. *Vitam Horm* 2003;66:403-56.
119. Zhao R, Diop-Bove N, Visentin M, Goldman ID. Mechanisms of membrane transport of folates into cells and across epithelia. *Annu Rev Nutr* 2011;31:177-201.
120. Qiu A, Jansen M, Sakaris A, Min SH, Chattopadhyay S, Tsai E, et al. Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. *Cell* 2006;127(5):917-28.
121. Ledermann JA, Canevari S, Thigpen T. Targeting the folate receptor: diagnostic and therapeutic approaches to personalize cancer treatments. *Ann Oncol* 2015;26(10):2034-43.
122. Elnakat H, Ratnam M. Distribution, functionality and gene regulation of folate receptor isoforms: implications in targeted therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 2004;56(8):1067-84.
123. Shen F, Wu M, Ross JF, Miller D, Ratnam M. Folate receptor type gamma is primarily a secretory protein due to lack of an efficient signal for glycosylphosphatidylinositol modification: protein characterization and cell type specificity. *Biochemistry* 1995;34(16):5660-5.
124. Steinz MM, Ezdoglian A, Khodadust F, Molthoff CFM, Srinivasarao M, Low PS, et al. Folate Receptor Beta for Macrophage Imaging in Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol* 2022;13:819163.
125. Tian Y, Wu G, Xing JC, Tang J, Zhang Y, Huang ZM, et al. A novel splice variant of folate receptor 4 predominantly expressed in regulatory T cells. *BMC Immunol* 2012;13:30.
126. Chen C, Ke J, Zhou XE, Yi W, Brunzelle JS, Li J, et al. Structural basis for molecular recognition of folic acid by folate receptors. *Nature* 2013;500(7463):486-9.
127. Ritter TE, Fajardo O, Matsue H, Anderson RG, Lacey SW. Folate receptors targeted to clathrin-coated pits cannot regulate vitamin uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(9):3824-8.
128. Rothberg KG, Ying YS, Kolhouse JF, Kamen BA, Anderson RG. The glycopospholipid-linked folate receptor internalizes folate without entering the clathrin-coated pit endocytic pathway. *J Cell Biol* 1990;110(3):637-49.
129. Boshnjaku V, Shim KW, Tsurubuchi T, Ichi S, Szany EV, Xi G, et al. Nuclear localization of folate receptor alpha: a new role as a transcription factor. *Sci Rep* 2012;2:980.
130. Cheung A, Bax HJ, Josephs DH, Ilieva KM, Pellizzari G, Opzoomer J, et al. Targeting folate receptor alpha for cancer treatment. *Oncotarget* 2016;7(32):52553-74.
131. Sudimack J, Lee RJ. Targeted drug delivery via the folate receptor. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2000;41(2):147-62.

132. Zou S, Tong Q, Liu B, Huang W, Tian Y, Fu X. Targeting STAT3 in Cancer Immunotherapy. *Mol Cancer* 2020;19:145.
133. Parker N, Turk MJ, Westrick E, Lewis JD, Low PS, Leamon CP. Folate receptor expression in carcinomas and normal tissues determined by a quantitative radioligand binding assay. *Anal Biochem* 2005;338(2):284-93.
134. Crane LMA, Arts HJG, van Oosten M, Low PS, van der Zee AGJ, van Dam GM, et al. The effect of chemotherapy on expression of folate receptor-alpha in ovarian cancer. *Cell Oncol (Dordr)* 2012;35(1):9-18.
135. Chen YL, Chang MC, Huang CY, Chiang YC, Lin HW, Chen CA, et al. Serous ovarian carcinoma patients with high alpha-folate receptor had reducing survival and cytotoxic chemo-response. *Mol Oncol* 2012;6(3):360-9.
136. Moinard M, Augustin J, Carrier M, Da Maia E, Penel A, Belghiti J, et al. Residual Microscopic Peritoneal Metastases after Macroscopic Complete Cytoreductive Surgery for Advanced High-Grade Serous Ovarian Carcinoma: A Target for Folate Receptor Targeted Photodynamic Therapy? *Pharmaceuticals (Basel)* 2022;15(8):1034.
137. Vlahov IR, Santhapuram HKR, Kleindl PJ, Howard SJ, Stanford KM, Leamon CP. Design and regioselective synthesis of a new generation of targeted chemotherapeutics. Part 1: EC145, a folic acid conjugate of desacetylvincristine monohydrazone. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2006;16(19):5093-6.
138. Dosio F, Milla P, Cattel L. EC-145, a folate-targeted Vinca alkaloid conjugate for the potential treatment of folate receptor-expressing cancers. *Curr Opin Investig Drugs* 2010;11(12):1424-33.
139. Pribble P, Edelman MJ. EC145: a novel targeted agent for adenocarcinoma of the lung. *Expert Opin Investig Drugs* 2012;21(5):755-61.
140. Lorusso PM, Edelman MJ, Bever SL, Forman KM, Pilat M, Quinn MF, et al. Phase I study of folate conjugate EC145 (Vintafolide) in patients with refractory solid tumors. *J Clin Oncol* 2012;30(32):4011-6.
141. Hernando JJ, Park TW, Fischer HP, Zivanovic O, Braun M, Pölcher M, et al. Vaccination with dendritic cells transfected with mRNA-encoded folate-receptor- α for relapsed metastatic ovarian cancer. *The Lancet Oncology* 2007;8(5):451-4.
142. Kershaw MH, Westwood JA, Parker LL, Wang G, Eshhar Z, Mavroukakis SA, et al. A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12(20 Pt 1):6106-15.
143. Liang Z, Dong J, Yang N, Li SD, Yang ZY, Huang R, et al. Tandem CAR-T cells targeting FOLR1 and MSLN enhance the antitumor effects in ovarian cancer. *Int J Biol Sci* 2021;17(15):4365-76.
144. Ebel W, Routhier EL, Foley B, Jacob S, McDonough JM, Patel RK, et al. Preclinical evaluation of MORAb-003, a humanized monoclonal antibody antagonizing folate receptor-alpha. *Cancer Immun* 2007;7:6.
145. Kim KH, Jelovac D, Armstrong DK, Schwartz B, Weil SC, Schweizer C, et al. Phase 1b safety study of farletuzumab, carboplatin and pegylated liposomal doxorubicin in patients with platinum-sensitive epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2016;140(2):210-4.
146. Armstrong DK, White AJ, Weil SC, Phillips M, Coleman RL. Farletuzumab (a monoclonal antibody against folate receptor alpha) in relapsed platinum-sensitive ovarian cancer. *Gynecologic Oncology* 2013;129(3):452-8.
147. Vergote IB, Marth C, Coleman RL. Role of the folate receptor in ovarian cancer treatment: evidence, mechanism, and clinical implications. *Cancer Metastasis Rev* 2015;34(1):41-52.

148. Schneider R, Schmitt F, Frochot C, Fort Y, Lourette N, Guillemin F, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of folic acid targeted tetraphenylporphyrin as novel photosensitizers for selective photodynamic therapy. *Bioorg Med Chem* 2005;13(8):2799-808.
149. You H, Yoon HE, Jeong PH, Ko H, Yoon JH, Kim YC. Pheophorbide-a conjugates with cancer-targeting moieties for targeted photodynamic cancer therapy. *Bioorg Med Chem* 2015;23(7):1453-62.
150. Baydoun M, Moralès O, Frochot C, Ludovic C, Leroux B, Thecua E, et al. Photodynamic Therapy Using a New Folate Receptor-Targeted Photosensitizer on Peritoneal Ovarian Cancer Cells Induces the Release of Extracellular Vesicles with Immunoactivating Properties. *J Clin Med* 2020;9(4).
151. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods* 2001;25(4):402-8.
152. Thécuca E, Ziane L, Grolez GP, Fagart A, Kumar A, Leroux B, et al. A Warp-Knitted Light-Emitting Fabric-Based Device for In Vitro Photodynamic Therapy: Description, Characterization, and Application on Human Cancer Cell Lines. *Cancers (Basel)* 2021;13(16):4109.
153. Quilbe A, Moralès O, Baydoun M, Kumar A, Mustapha R, Murakami T, et al. An Efficient Photodynamic Therapy Treatment for Human Pancreatic Adenocarcinoma. *J Clin Med* 2020;9(1):E192.
154. Zhang Q, Li L. Photodynamic combinational therapy in cancer treatment. *J BUON* 2018;23(3):561-7.
155. Nagle PW, Plukker JTM, Muijs CT, van Luijk P, Coppes RP. Patient-derived tumor organoids for prediction of cancer treatment response. *Semin Cancer Biol* 2018;53:258-64.
156. Siu MKY, Kong DSH, Chan HY, Wong ESY, Ip PPC, Jiang L, et al. Paradoxical impact of two folate receptors, FR α and RFC, in ovarian cancer: effect on cell proliferation, invasion and clinical outcome. *PLoS One* 2012;7(11):e47201.
157. Driehuis E, Spelier S, Beltrán Hernández I, de Bree R, M Willems S, Clevers H, et al. Patient-Derived Head and Neck Cancer Organoids Recapitulate EGFR Expression Levels of Respective Tissues and Are Responsive to EGFR-Targeted Photodynamic Therapy. *J Clin Med* 2019;8(11).
158. Ab O, Whiteman KR, Bartle LM, Sun X, Singh R, Tavares D, et al. IMGN853, a Folate Receptor- α (FR α)-Targeting Antibody-Drug Conjugate, Exhibits Potent Targeted Antitumor Activity against FR α -Expressing Tumors. *Mol Cancer Ther* 2015;14(7):1605-13.
159. Liu YL, Filippova OT, Zhou Q, Iasonos A, Chi DS, Zivanovic O, et al. Characteristics and survival of ovarian cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy but not undergoing interval debulking surgery. *J Gynecol Oncol* 2020;31(1):e17.
160. Kobayashi M, Salomon C, Tapia J, Illanes SE, Mitchell MD, Rice GE. Ovarian cancer cell invasiveness is associated with discordant exosomal sequestration of Let-7 miRNA and miR-200. *J Transl Med* 2014;12:4.
161. Rezniczek GA, Buggisch J, Sobilo J, Launay A, Lerondel S, Le Pape A, et al. Establishment of a Mouse Ovarian Cancer and Peritoneal Metastasis Model to Study Intraperitoneal Chemotherapy. *Cancers (Basel)* 2020;12(12):E3818.
162. Ogawara KI, Higaki K. Nanoparticle-Based Photodynamic Therapy: Current Status and Future Application to Improve Outcomes of Cancer Treatment. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2017;65(7):637-41.
163. Muñoz-Galván S, Carnero A. Targeting Cancer Stem Cells to Overcome Therapy Resistance in Ovarian Cancer. *Cells* 2020;9(6):1402.
164. Lengyel E. Ovarian cancer development and metastasis. *Am J Pathol* 2010;177(3):1053-64.
165. Sai DL, Lee J, Nguyen DL, Kim YP. Tailoring photosensitive ROS for advanced photodynamic therapy. *Exp Mol Med* 2021;53(4):495-504.

166. Larue L, Myrzakhmetov B, Ben-Mihoub A, Moussaron A, Thomas N, Arnoux P, et al. Fighting Hypoxia to Improve PDT. *Pharmaceuticals (Basel)* 2019;12(4):163.
167. Curnow A, Haller JC, Bown SG. Oxygen monitoring during 5-aminolaevulinic acid induced photodynamic therapy in normal rat colon. Comparison of continuous and fractionated light regimes. *J Photochem Photobiol B* 2000;58(2-3):149-55.
168. Klimenko VV, Knyazev NA, Moiseenko FV, Rusanov AA, Bogdanov AA, Dubina MV. Pulse mode of laser photodynamic treatment induced cell apoptosis. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2016;13:101-7.
169. Coutier S, Bezdetnaya LN, Foster TH, Parache RM, Guillemin F. Effect of Irradiation Fluence Rate on the Efficacy of Photodynamic Therapy and Tumor Oxygenation in Meta-Tetra (Hydroxyphenyl) Chlorin (mTHPC)-Sensitized HT29 Xenografts in Nude Mice. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2002;158(3):339-45.
170. Middelburg TA, Van Zaane F, De Bruijn HS, Van Der Ploeg-van den Heuvel A, Sterenborg HJCM, Neumann HAM, et al. Fractionated Illumination at Low Fluence Rate Photodynamic Therapy in Mice. *Photochemistry and Photobiology* 2010;86(5):1140-6.
171. Belicha-Villanueva A, Riddell J, Bangia N, Gollnick SO. The effect of photodynamic therapy on tumor cell expression of major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class I-related molecules. *Lasers Surg Med* 2012;44(1):60-8.
172. Park MJ, Bae JH, Chung JS, Kim SH, Kang CD. Induction of NKG2D ligands and increased sensitivity of tumor cells to NK cell-mediated cytotoxicity by hematoporphyrin-based photodynamic therapy. *Immunol Invest* 2011;40(4):367-82.
173. Hendrzak-Henion JA, Knisely TL, Cincotta L, Cincotta E, Cincotta AH. Role of the immune system in mediating the antitumor effect of benzophenothiazine photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 1999;69(5):575-81.
174. Tonetti CR, de Souza-Araújo CN, Yoshida A, da Silva RF, Alves PCM, Mazzola TN, et al. Ovarian Cancer-Associated Ascites Have High Proportions of Cytokine-Responsive CD56bright NK Cells. *Cells* 2021;10(7):1702.
175. Rodrigues ISS, Martins-Filho A, Micheli DC, Lima CA de, Tavares-Murta BM, Murta EFC, et al. IL-6 and IL-8 as Prognostic Factors in Peritoneal Fluid of Ovarian Cancer. *Immunol Invest* 2020;49(5):510-21.
176. Nowak M, Glowacka E, Szpakowski M, Szylo K, Malinowski A, Kulig A, et al. Proinflammatory and immunosuppressive serum, ascites and cyst fluid cytokines in patients with early and advanced ovarian cancer and benign ovarian tumors. *Neuro Endocrinol Lett* 2010;31(3):375-83.
177. Wen J, Zhao Z, Huang L, Wang L, Miao Y, Wu J. IL-8 promotes cell migration through regulating EMT by activating the Wnt/ β -catenin pathway in ovarian cancer. *J Cell Mol Med* 2020;24(2):1588-98.
178. Brencicova E, Jagger AL, Evans HG, Georgouli M, Laios A, Attard Montalto S, et al. Interleukin-10 and prostaglandin E2 have complementary but distinct suppressive effects on Toll-like receptor-mediated dendritic cell activation in ovarian carcinoma. *PLoS One* 2017;12(4):e0175712.
179. Castro F, Cardoso AP, Gonçalves RM, Serre K, Oliveira MJ. Interferon-Gamma at the Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion. *Front Immunol* 2018;9:847.
180. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 2004;75(2):163-89.
181. Brackett CM, Gollnick SO. Photodynamic therapy enhancement of anti-tumor immunity. *Photochem Photobiol Sci* 2011;10(5):649-52.
182. Gazzali AM, Lobry M, Colombeau L, Acherar S, Azaïs H, Mordon S, et al. Stability of folic acid under several parameters. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2016;93:419-30.

Université de Lille
FACULTE DE PHARMACIE DE LILLE
DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
Année Universitaire 2021/2022

Nom : BOIDIN

Prénom : Léa

Titre de la thèse : Évaluation *in vivo* de l'impact anti-tumoral et immuno-stimulant d'une Thérapie Photodynamique innovante ciblant le Récepteur Alpha aux Folate (FR α) dans un modèle murin humanisé (SCID-Hu) de carcinose péritonéale ovarienne

Mots-clés : Thérapie Photodynamique, carcinose péritonéale, acide folique, immunologie

Résumé : Souvent découvert à un stade avancé, le cancer de l'ovaire évolue rapidement en carcinose péritonéale ovarienne correspondant à l'envahissement de la cavité péritonéale par de multiples nodules tumoraux. La thérapie standard repose sur une chirurgie de cytoréduction associée à une chimiothérapie. Cependant, ce traitement n'épargne pas la survenue de récives. Dans ce contexte, il existe un réel besoin d'explorer de nouvelles stratégies thérapeutiques. La thérapie Photodynamique (PDT) qui s'appuie sur l'utilisation de l'O₂, d'un médicament photosensibilisateur et d'une lumière de longueur d'onde spécifique, pourrait s'avérer être une stratégie pertinente en réponse à ce besoin. Dans cette thèse nous verrons dans un premier temps comment et pourquoi la PDT semble une piste pertinente afin d'améliorer le pronostic de ces patientes. Cette partie nous conduira à la proposition d'une nouvelle stratégie innovante, la PDT utilisant un photosensibilisateur de 3^{ème} génération couplé à l'acide folique (brevet WO/2019/016397) afin de cibler spécifiquement les cellules cancéreuses ovariennes. Enfin, dans une dernière partie, sera présenté un travail original évaluant l'efficacité préclinique de ce nouveau photosensibilisateur et son impact sur le système immunitaire dans un modèle *in vitro* de cancer ovarien et dans un modèle murin humanisé de carcinose péritonéale ovarienne.

Membres du jury :

Président :

Professeur Delphine ALLORGE, Professeur des Universités, Faculté de Pharmacie, Lille, Praticien Hospitalier, CHRU, Lille

Directeur, conseiller de thèse :

Professeur Nadira DELHEM, Professeur des Universités, Faculté de Sciences et Technologiques, Lille

Assesseur(s) :

Docteur Christophe CARNOY, Professeur des Universités, Faculté de Pharmacie, Lille

Docteur Alexandre QUILBE, PharmD, PhD
Expert Scientifique Régional (Amgen)

Docteur Stephane GIRAUD, Directeur Scientifique de C3D et de la plateforme 3DONCO, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Lyon