

Année 2019/2020

N°

Thèse

Pour le

DOCTORAT EN MEDECINE

Diplôme d'État

Par

Diane BRESSAND-FALEWEE

Née le 05 mai 1988 à Paris XIVème (75014)

**Amélioration de la délivrance du Nab-paclitaxel par la sonoporation
dans des tumeurs pancréatiques humaines : étude in-vitro et in-vivo.**

Présentée et soutenue publiquement le **11 septembre 2019** devant un jury composé de :

Président du Jury : Professeur Claude LINASSIER, Oncologie Médicale, Faculté de Médecine – Tours

Membres du Jury :

Professeur Gaëlle FROMONT-HANKARD, Anatomie et Cytologie Pathologiques, Faculté de Médecine – Tours

Professeur Driffa MOUSSATA, Hépto-Gastro-Entérologie, Faculté de Médecine – Tours

Professeur Frédéric PATAT, Radiologie diagnostique, Faculté de Médecine – Tours

Docteur Jean-Michel ESCOFFRE, Chargé de Recherche, INSERM U1253 (PhD), Faculté de Médecine – Tours

Directeur de thèse : Professeur Thierry LECOMTE, Hépto-Gastro-Entérologie, Faculté de Médecine – Tours

UNIVERSITE DE TOURS
FACULTE DE MEDECINE DE TOURS

DOYEN
Pr Patrice DIOT

VICE-DOYEN
Pr Henri MARRET

ASSESSEURS
Pr Denis ANGOULVANT, *Pédagogie*
Pr Mathias BUCHLER, *Relations internationales*
Pr Hubert LARDY, *Moyens – relations avec l'Université*
Pr Anne-Marie LEHR-DRYLEWICZ, *Médecine générale*
Pr François MAILLOT, *Formation Médicale Continue*
Pr Patrick VOURC'H, *Recherche*

RESPONSABLE ADMINISTRATIVE
Mme Fanny BOBLETER

DOYENS HONORAIRES
Pr Emile ARON (†) – 1962-1966
Directeur de l'Ecole de Médecine - 1947-1962
Pr Georges DESBUQUOIS (†) - 1966-1972
Pr André GOUAZE - 1972-1994
Pr Jean-Claude ROLLAND – 1994-2004
Pr Dominique PERROTIN – 2004-2014

PROFESSEURS EMERITES

Pr Daniel ALISON
Pr Philippe ARBEILLE
Pr Catherine BARTHELEMY
Pr Christian BONNARD
Pr Philippe BOUGNOUX
Pr Alain CHANTEPIE
Pr Pierre COSNAY
Pr Etienne DANQUECHIN-DORVAL
Pr Loïc DE LA LANDE DE CALAN
Pr Alain GOUDEAU
Pr Noël HUTEN
Pr Olivier LE FLOCH
Pr Yvon LEBRANCHU
Pr Elisabeth LECA
Pr Anne-Marie LEHR-DRYLEWICZ
Pr Gérard LORETTE
Pr Roland QUENTIN
Pr Alain ROBIER
Pr Elie SALIBA

PROFESSEURS HONORAIRES

P. ANTHONIOZ – A. AUDURIER – A. AUTRET – P. BAGROS – P. BARDOS – J.L. BAULIEU – C. BERGER – JC. BESNARD – P. BEUTTER – P. BONNET – M. BROCHIER – P. BURDIN – L. CASTELLANI – B. CHARBONNIER – P. CHOUTET – T. CONSTANS – C. COUET – J.P. FAUCHIER – F. FETISSOF – J. FUSCIARDI – P. GAILLARD – G. GINIES – A. GOUAZE – J.L. GUILMOT – M. JAN – J.P. LAMAGNERE – F. LAMISSE – Y. LANSON – J. LAUGIER – P. LECOMTE – E. LEMARIE – G. LEROY – Y. LHUINTE – M. MARCHAND – C. MAURAGE – C. MERCIER – J. MOLINE – C. MORAIN – J.P. MUH – J. MURAT – H. NIVET – L. POURCELOT – P. RAYNAUD – D. RICHARD-LENOBLE – J.C. ROLLAND – D. ROYERE – A. SAINDELLE – J.J. SANTINI – D. SAUVAGE – D. SIRINELLI – B. TOUMIEUX – J. WEILL

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

ANDRES Christian	Biochimie et biologie moléculaire
ANGOULVANT Denis	Cardiologie
AUPART Michel	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
BABUTY Dominique	Cardiologie
BALLON Nicolas	Psychiatrie ; addictologie
BARILLOT Isabelle	Cancérologie ; radiothérapie
BARON Christophe	Immunologie
BEJAN-ANGOULVANT Théodora	Pharmacologie clinique
BERNARD Anne	Cardiologie
BERNARD Louis	Maladies infectieuses et maladies tropicales
BLANCHARD-LAUMONNIER Emmanuelle	Biologie cellulaire
BLASCO Hélène	Biochimie et biologie moléculaire
BODY Gilles	Gynécologie et obstétrique
BONNET-BRILHAULT Frédérique	Physiologie
BRILHAULT Jean	Chirurgie orthopédique et traumatologique
BRUNEREAU Laurent	Radiologie et imagerie médicale
BRUYERE Franck	Urologie
BUCHLER Matthias	Néphrologie
CALAIS Gilles	Cancérologie, radiothérapie
CAMUS Vincent	Psychiatrie d'adultes
CHANDENIER Jacques	Parasitologie, mycologie
COLOMBAT Philippe	Hématologie, transfusion
CORCIA Philippe	Neurologie
COTTIER Jean-Philippe	Radiologie et imagerie médicale
DE TOFFOL Bertrand	Neurologie
DEQUIN Pierre-François.....	Thérapeutique
DESOUBEUX Guillaume.....	Parasitologie et mycologie
DESTRIEUX Christophe	Anatomie
DIOT Patrice	Pneumologie
DU BOUEXIC de PINIEUX Gonzague	Anatomie & cytologie pathologiques
DUCLUZEAU Pierre-Henri	Endocrinologie, diabétologie, et nutrition
DUMONT Pascal	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
EL HAGE Wissam	Psychiatrie adultes
EHRMANN Stephan	Réanimation
FAUCHIER Laurent	Cardiologie
FAVARD Luc	Chirurgie orthopédique et traumatologique
FOUGERE Bertrand	Gériatrie
FOUQUET Bernard	Médecine physique et de réadaptation
FRANCOIS Patrick	Neurochirurgie
FROMONT-HANKARD Gaëlle	Anatomie & cytologie pathologiques
GAUDY-GRAFFIN Catherine	Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
GOGA Dominique	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
GOUPILLE Philippe	Rhumatologie
GRUEL Yves	Hématologie, transfusion
GUERIF Fabrice	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
GUYETANT Serge	Anatomie et cytologie pathologiques
GYAN Emmanuel	Hématologie, transfusion
HAILLOT Olivier	Urologie
HALIMI Jean-Michel	Thérapeutique
HANKARD Régis.....	Pédiatrie
HERAULT Olivier	Hématologie, transfusion
HERBRETEAU Denis	Radiologie et imagerie médicale
HOURIOUX Christophe	Biologie cellulaire
LABARTHE François	Pédiatrie
LAFFON Marc	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale, médecine d'urgence
LARDY Hubert	Chirurgie infantile
LARIBI Saïd	Médecine d'urgence
LARTIGUE Marie-Frédérique	Bactériologie-virologie
LAURE Boris	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
LECOMTE Thierry	Gastroentérologie, hépatologie
LESCANNE Emmanuel	Oto-rhino-laryngologie
LINASSIER Claude	Cancérologie, radiothérapie
MACHET Laurent	Dermato-vénéréologie
MAILLOT François	Médecine interne

MARRET Henri	Gynécologie-obstétrique
MARUANI Annabel	Dermatologie-vénéréologie
MEREGHETTI Laurent	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
MORINIERE Sylvain	Oto-rhino-laryngologie
MOUSSATA Driffa	Gastro-entérologie
MULLEMAN Denis	Rhumatologie
ODENT Thierry	Chirurgie infantile
OUAISSI Mehdi	Chirurgie digestive
OULDAMER Lobna	Gynécologie-obstétrique
PAGES Jean-Christophe	Biochimie et biologie moléculaire
PAINTAUD Gilles	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
PATAT Frédéric	Biophysique et médecine nucléaire
PERROTIN Dominique	Réanimation médicale, médecine d'urgence
PERROTIN Franck	Gynécologie-obstétrique
PISELLA Pierre-Jean	Ophtalmologie
PLANTIER Laurent	Physiologie
REMERAND Francis	Anesthésiologie et réanimation, médecine d'urgence
ROINGEARD Philippe	Biologie cellulaire
ROSSET Philippe	Chirurgie orthopédique et traumatologique
RUSCH Emmanuel	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
SAINT-MARTIN Pauline	Médecine légale et droit de la santé
SALAME Ephrem	Chirurgie digestive
SAMIMI Mahtab	Dermatologie-vénéréologie
SANTIAGO-RIBEIRO Maria	Biophysique et médecine nucléaire
THOMAS-CASTELNAU Pierre	Pédiatrie
TOUTAIN Annick	Génétique
VAILLANT Loïc	Dermato-vénéréologie
VELUT Stéphane	Anatomie
VOURC'H Patrick	Biochimie et biologie moléculaire
WATIER Hervé	Immunologie

PROFESSEUR DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

LEBEAU Jean-Pierre

PROFESSEURS ASSOCIES

MALLET Donatien	Soins palliatifs
POTIER Alain	Médecine Générale
ROBERT Jean	Médecine Générale

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

BAKHOS David	Physiologie
BARBIER Louise.....	Chirurgie digestive
BERHOUET Julien	Chirurgie orthopédique et traumatologique
BERTRAND Philippe	Biostat., informatique médical et technologies de communication
BRUNAUT Paul	Psychiatrie d'adultes, addictologie
CAILLE Agnès	Biostat., informatique médical et technologies de communication
CLEMENTY Nicolas	Cardiologie
DOMELIER Anne-Sophie	Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
DUFOUR Diane	Biophysique et médecine nucléaire
FAVRAIS Géraldine	Pédiatrie
FOUQUET-BERGEMER Anne-Marie	Anatomie et cytologie pathologiques
GATAULT Philippe	Néphrologie
GOUILLEUX Valérie.....	Immunologie
GUILLON Antoine	Réanimation
GUILLON-GRAMMATICO Leslie	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
HOARAU Cyrille	Immunologie
IVANES Fabrice	Physiologie
LE GUELLEC Chantal	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
MACHET Marie-Christine	Anatomie et cytologie pathologiques
MOREL Baptiste	Radiologie pédiatrique

REROLLE Camille	Médecine légale
ROUMY Jérôme	Biophysique et médecine nucléaire
SAUTENET Bénédicte	Néphrologie
TERNANT David	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
ZEMMOURA Ilyess	Neurochirurgie

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

AGUILLON-HERNANDEZ Nadia	Neurosciences
BOREL Stéphanie	Orthophonie
DIBAO-DINA Clarisse	Médecine Générale
MONJAUZE Cécile	Sciences du langage - orthophonie
PATIENT Romuald.....	Biologie cellulaire
RENOUX-JACQUET Cécile	Médecine Générale

MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES

RUIZ Christophe	Médecine Générale
SAMKO Boris	Médecine Générale

CHERCHEURS INSERM - CNRS - INRA

BOUAKAZ Ayache	Directeur de Recherche INSERM – UMR INSERM 1253
CHALON Sylvie	Directeur de Recherche INSERM – UMR INSERM 1253
COURTY Yves	Chargé de Recherche CNRS – UMR INSERM 1100
DE ROCQUIGNY Hugues	Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1259
ESCOFFRE Jean-Michel	Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1253
GILOT Philippe	Chargé de Recherche INRA – UMR INRA 1282
GOUILLEUX Fabrice	Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 7001
GOMOT Marie	Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 1253
HEUZE-VOURCH Nathalie	Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
KORKMAZ Brice	Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
LAUMONNIER Frédéric	Chargé de Recherche INSERM - UMR INSERM 1253
LE PAPE Alain	Directeur de Recherche CNRS – UMR INSERM 1100
MAZURIER Frédéric	Directeur de Recherche INSERM – UMR CNRS 7001
MEUNIER Jean-Christophe	Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1259
PAGET Christophe	Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
RAOUL William	Chargé de Recherche INSERM – UMR CNRS 7001
SI TAHAR Mustapha	Directeur de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
WARDAK Claire	Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 1253

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

Pour l'Ecole d'Orthophonie

DELORE Claire	Orthophoniste
GOUIN Jean-Marie	Praticien Hospitalier
PERRIER Danièle	Orthophoniste

Pour l'Ecole d'Orthoptie

LALA Emmanuelle	Praticien Hospitalier
MAJZOUB Samuel.....	Praticien Hospitalier

Pour l'Ethique Médicale

BIRMELE Béatrice	Praticien Hospitalier
------------------------	-----------------------

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des Maîtres de cette Faculté,
de mes chers condisciples
et selon la tradition d'Hippocrate,
je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur
et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent,
et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.

Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux
ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira
les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira
pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres,
je rendrai à leurs enfants
l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime
si je suis fidèle à mes promesses.
Que je sois couvert d'opprobre
et méprisé de mes confrères
si j'y manque.

Remerciements

À mes maîtres, professeurs, médecins de compagnonnage auprès de qui je suis devenue docteur.

Aux membres du jury,

À Monsieur le Professeur Claude Linassier, pour m'avoir accueillie pour le DESC d'oncologie médicale, et dans votre service pendant 6 mois. Je tiens à vous témoigner toute ma reconnaissance pour votre accueil, votre gentillesse, votre bienveillance. C'est toujours un plaisir de participer à une de vos visites, alliant compétences, pédagogie et notes d'humour permettant d'avancer plus facilement dans cette spécialité difficile psychologiquement. Merci de me faire l'honneur de présider cette thèse.

À Monsieur le Professeur Thierry Lecomte, pour avoir dirigé cette thèse mais aussi pour votre aide et votre encadrement tout au long de mon internat. Vous m'avez écoutée dès mon premier semestre et vous m'avez proposé plusieurs travaux dont ce sujet de master II que vous m'avez confié. J'espère que vous serez satisfait du résultat. Travailler avec vous fut un plaisir. Merci de vous être toujours rendu disponible et à l'écoute.

À Madame le Professeur Driffa Moussata, pour m'avoir fait découvrir l'endoscopie avancée et les techniques de colorations virtuelles qui vont m'être d'une grande aide au quotidien. Merci d'avoir acceptée d'être dans mon jury de thèse et de juger mon travail.

À Madame le Professeur Gaëlle Fromon-Hankart merci de m'avoir accompagnée pour ce projet de recherche et d'avoir acceptée de faire partie du jury.

À Monsieur le Professeur Frédéric Patat, merci de me faire l'honneur de juger mon travail et d'avoir accepté de faire partie du jury de thèse.

À Monsieur le Docteur Jean-Michel Escoffre, merci pour l'aide précieuse que tu m'as apporté pour ce travail. Merci pour ta disponibilité et ta rigueur scientifique. C'est très précieux d'avoir un voisin comme toi !

À toute l'équipe de l'unité INSERM UMR 1253 iBrain

À Monsieur le Docteur Ayache Bouakaz, merci de m'avoir accueillie dans votre unité et de m'avoir fait confiance. Merci pour vos idées et votre soutien.

À Monsieur le Docteur Anthony Novell qui m'a accompagnée tout au long de ce projet long et fastidieux. Que de journées à l'animalerie et sur la paillasse. Merci pour ton soutien et ta gentillesse.

À mes maîtres :

À Monsieur le Dr Aubourg pour tes topos dédiés aux internes, pour ta gentillesse et ta patience, pour tes chemises à fleurs. Merci pour m'avoir prêté ton congélateur en temps de crise !

A Madame le Dr PICON pour votre enseignement à l'hôpital de jour et votre bienveillance.

À Monsieur le Dr Godart pour m'avoir enseigné la proctologie et la confiance en soi !

A Monsieur le Dr Barbieux pour nous transmettre ta passion !

A Monsieur le Dr D'Alteroche pour tes conseils en hépatologie.

A Monsieur le Dr Gargot pour votre pédagogie. J'ai adoré mon semestre à vos côtés et j'ai bien hâte de venir vous rejoindre.

À toute l'équipe d'hépto-gastro-entérologie du CHU de Tours pour m'avoir supportée pendant ces longues années d'internat, équipes médicales et paramédicales ! A mes chefs de cliniques devenues PH Morgane Caulet et Charlotte Nicolas, à mes cointernes devenus mes CCA : Benjamin et David.

A l'équipe blaisoise que j'ai hâte de retrouver : Bénédicte Halle, Philippe Assor, Tannous Zleik et Roland Benoit.

À mes cointernes : Widad, Benjamin, Julie, Céline, Déborah, Hortense *2, Anais, Dior, Pauline, Anna, Clarisse, Jérémy, Olivia, Eva, Benoit, Fahed, Laura, Mélodie, Romain, Corentin, Thomas, Mélanie, Ludo pour les bons moments passés ensemble.

À l'association CANCEC et à la SNFGE pour son soutien financier pour l'étude.

À mes amis

À l'équipe des pneumogoles qui me font si rire et avec qui je perds 15 ans : Mada, Maud, François (ok, ok radiothérapeute), Marion, Fanny, Camille.

À ma Fanny chérie, quel bonheur de t'avoir rencontrée au cours de la collocation ! Merci pour ton soutien et ta gentillesse.

À ma Julie adorée, ma confidente et amie, ayant toujours mille histoires à raconter, j'ai hâte de te retrouver au quotidien !

À Caroline, pour ce retour en adolescence lorsque l'on se voit.

À mes amis d'enfance : Capucine et Maud, pour votre amitié indéfectible, votre tendresse, vos mots réconfortants, vos relances multiples malgré mes réponses souvent tardives. Ces amitiés sont rares et si précieuses.

A Claire, Benoit, Matti, Colas : quel bonheur de vous avoir découvert en Touraine. Merci pour ces moments partagés.

À ma famille

À Marie Christine, Hervé et Quentin : merci pour votre chaleur, votre simplicité au quotidien, votre soutien et votre amour.

À mes cousins et cousines, à ma marraine, merci de votre présence.

À mon père : qui aurait pu imaginer que tu ne sois pas présent aujourd'hui ? Papa, merci pour ton soutien indéfectible, pour m'avoir appris la persévérance, pour ta curiosité, pour ton amour et ta tendresse. Si je suis médecin aujourd'hui c'est grâce à toi, à tes valeurs et ton soutien. Merci de m'avoir accompagnée Tu me manques.

À ma mère, pour ton courage et ta force de caractère que tu m'as transmise. Pour ta tendresse durant l'enfance et ton ouverture d'esprit. J'aurais aimé partager davantage de choses avec toi. Tu me manques.

À mes sœurs adorées, avec qui je partage les rires et les larmes, merci pour votre présence, votre aide. Que notre complicité ne s'éteigne pas. Je vous aime.

À mes beaux-frères Justin et Antoine et neveux et nièces Loulou, Joséphine, Capucine et Marceau pour les moments partagés ensemble et la candeur des enfants qui nous apporte tant.

À mon mari Geoffroy, pour m'accompagner au quotidien, pour ton soutien, ton enthousiasme, ta tendresse, ta patience, ta générosité, ton amour si grand. M'épanouir à tes côtés est une grande chance. Tes idées de grandeur me donnent parfois le vertige mais tu es toujours là pour me relever, me rassurer et avancer à mes côtés. Tu es mon confident et mon roc. Je t'aime.

À mes deux merveilleux enfants Élise et Ambre, pour votre joie de vivre, vos découvertes, vos rires, votre complicité, votre affection. Grâce à vous je découvre les petits bonheurs de la vie. Chaque instant à vos côtés est un océan de bonheur. Vous êtes la plus grande réussite de ma vie et sans aucun doute la plus belle chose que la vie pouvait m'apporter.

Résumé

Titre : Amélioration de la délivrance du Nab-paclitaxel par la sonoporation sur des tumeurs pancréatiques humaines : étude in-vitro et in-vivo.

Introduction : Malgré les récentes avancées dans la chimiothérapie du cancer du pancréas, le pronostic de ce cancer reste sombre avec une survie globale à 5 ans tous stades confondus de l'ordre de 5 %. La mauvaise biodisponibilité intra-tumorale des chimiothérapies prescrites dans ce cancer, explique en partie ces mauvais résultats. Une technique thérapeutique prometteuse utilisant des microbulles de gaz et des ultrasons dénommée sonoporation s'est développée dans le but d'augmenter la délivrance ciblée intra-tumorale des médicaments.

Matériels et méthodes :

In-vitro : La chimiothérapie par Nab-paclitaxel (NP) à la concentration de 2.5 ng/mL était administrée sur des cellules tumorale BxPC3 en suspension. Les paramètres ultrasonore étaient les suivant : pression 400 kPa, fréquence 1 Mhz, exposition aux ultrasons pendant 30 secondes. Le test de viabilité cellulaire utilisé était le test MTT.

In-vivo : Des souris Balb/c nude ont été inoculées bilatéralement avec 5.10^6 cellules BxPC-3. Les souris étaient randomisées en différents groupes : sérum physiologique, NP 20 mg/kg, NP 20 mg/kg + sonoporation, NP 5mg/kg , NP 5mg/kg + sonoporation.

Résultats : In vitro, la viabilité cellulaire était diminuée avec la sonoporation du NP en comparaison au NP seul $p < 0,01$. In vitro, la croissance tumorale était significativement ralentie dans les groupes sonoporation + NP. Il n'y avait pas de toxicité dans les groupes sonoporation

Conclusion : La sonoporation du NP est une méthode prometteuse pour améliorer l'efficacité thérapeutique du NP dans l'adénocarcinome pancréatique.

Mots clés : Adénocarcinome pancréatique – Nab-paclitaxel – Microbulles – Ultrasons – Sonoporation.

Abstract

Title: Enhancing Nab-paclitaxel delivery using microbubble-assisted ultrasound in a pancreatic cancer model.

The combination of microbubbles (MBs) and ultrasound (US) is an emerging method for non-invasive and targeted enhancement of anticancer drugs uptake. This method showed to increase local drug extravasation in tumor tissue while reducing the systemic adverse effects in various tumor models. The present study aims into evaluating the effectiveness of this approach for Nab-paclitaxel delivery in a pancreatic tumor model. US and MBs of different types in combination with Nab-paclitaxel showed a loss in cell viability of pancreatic cancer cells in comparison with Nab-paclitaxel treatment alone in *in-vitro* scenario. The *in-vivo* data revealed that ultrasound and microbubbles in combination with Nab-paclitaxel induced a significant decrease in tumor volume in subcutaneous pancreatic adenocarcinoma mouse model in comparison to tumors treated with Nab-paclitaxel alone. The post-mortem anatomopathological analyses of tumor tissues partially confirmed these results. In conclusion, this study demonstrates that MB-assisted US is a relevant technology to increase the therapeutic effectiveness of Nab-paclitaxel in a pancreatic cancer model.

Key words: Pancreatic cancer - Nab-paclitaxel – microbubble – ultrasound - sonoporation.

Table des matières

Abréviations.....	14
Partie I : Revue de la littérature.....	15
1– Introduction	15
2 – Sonoporation	16
3 – Mécanismes de la sonoporation.....	17
La cavitation stable.....	18
La cavitation inertielle	19
4 – La sonoporation dans les cancers digestifs	21
Cancer hépatique.....	22
Carcinome hépatocellulaire.....	22
a) Chimiothérapie.....	22
b) Thérapie génique anti tumorale.....	24
c) Diminution de la perfusion tumorale	26
d) Paramètres ultrasonores	28
Métastases hépatiques	28
Cancer pancréatique.....	29
5 – Etudes cliniques.....	31
Etude en cours.....	32
6 – Conclusion	33
Partie II :	34
Enhancing nab paclitaxel delivery using microbubble-assisted ultrasound in a pancreatic cancer model.	34
1 – Abstract.....	35
2 – Introduction	36
3 – Experimental section.....	38
Chemicals and microbubbles	38
Cell culture.....	38
Ultrasound setup	38
Membrane permeabilization to small molecules.....	39

Membrane permeabilization to fluorescent nanoparticles.....	39
In-vitro Nab-paclitaxel delivery.....	40
Cell viability	40
In-vivo Nab-paclitaxel delivery	40
Anatomical ultrasound imaging	41
Quality of mouse life.....	41
Immunohistochemistry	41
Statistical analysis	42
4 – Results.....	42
Nab-paclitaxel delivery in BxPC3 cells	42
Effects of BG8610 and BG8214 MBs on the membrane permeabilization of BxPC3 cells	43
In-vivo Nab-paclitaxel delivery	44
Mouse quality of life	46
5 – Discussion.....	47
6– Conclusion	51
7 – Acknowledgments.....	52
8 – Références bibliographiques.....	52
Références de la partie I.....	52
Références de la partie II.....	58
9–Tableaux et figures.....	66

Abréviations

AFP : Alfafoetoprotéine

CHC : Carcinome Hépatocellulaire

EU : Union européenne

HES : Hématoxyline Eosine Safran

HSVtk : Herpès Simplex Virus tyrosine kinase

IT : Intratumoral

IV : Intra veineux

MB : microbulle

NP : Nab-paclitaxel

PC : cancer pancréatique

PI : Iodure de Propidium

TNCD : Thésaurus National de Cancérologie digestive

US : Ultrasons

Partie 1 Revue de la littérature

1 Introduction

Les cancers représentent actuellement la deuxième cause de décès en Europe avec 3,45 millions de nouveaux cas et 1,75 millions de décès par cancer en 2012¹.

En Europe de l'Ouest (France, Pays-Bas, Danemark, Royaume-Uni), ils sont devenus la première cause de décès devant les maladies cardiovasculaires. En 2013 en France, 567078 décès ont été recensés : 28,8% de tumeurs et 25,1% de maladies circulatoires².

Malgré les progrès médicaux diagnostiques (dépistage de masse) et thérapeutiques (multiples lignes de chimiothérapies, radiothérapie de plus en plus focalisée et perfectionnement des techniques chirurgicales), le nombre de décès augmente chaque année.

Lorsque les tumeurs sont localement avancées ou métastatiques, la chimiothérapie est indispensable. Afin d'atteindre les cellules tumorales profondes, protégées par un environnement péri-tumoral dense avec un stroma fibreux et compact, les doses de chimiothérapie utilisées sont importantes, bien qu'adaptées à la surface corporelle ou au poids du patient³. Les chimiothérapies, dans leur majorité, ne sont pas ciblées uniquement sur les cellules tumorales et ont un effet délétère sur les cellules « saines ». Différentes toxicités secondaires aux traitements peuvent apparaître notamment une toxicité hématologique (anémie et leuco-neutropénie), digestive (diarrhées/vomissements), rénale, neurologique

(paresthésies/ déficit moteur) et cutanée (syndrome mains-pieds, folliculite). La prise en charge thérapeutique optimale tumorale est donc limitée par les effets toxiques secondaires des traitements nécessitant parfois une diminution de doses ou un arrêt des traitements.

2 Sonoporation

Ces dernières années, afin d'améliorer l'efficacité des thérapeutiques anti- tumorales, différents moyens physiques thérapeutiques ont été étudiés comme l'électroporation, le laser et la thérapie magnétique.

Le principe commun de ces méthodes physiques est d'induire une perméabilisation transitoire de la barrière endothéliale et des membranes cellulaires tumorales afin de faciliter l'extravasation des chimiothérapies et l'apport local de chimiothérapie au sein de la tumeur.

Une technique plus récente basée sur le même principe, utilisant des microbulles de gaz mises en mouvement par des ultrasons ^{4,5,6} s'est rapidement développée ^{7,8,9}.

Cette technique nommée sonoporation, consiste à augmenter de façon transitoire la perméabilité des barrières biologiques, notamment la barrière endothéliale et la barrière cellulaire, afin d'améliorer la délivrance locale de médicaments ¹⁰.

La sonoporation a été étudiée avec différentes molécules de chimiothérapie dans divers modèles de cancers (glioblastome, leucémie, cancers digestifs, prostate, sein...). Son bénéfice, comparé à l'administration de la chimiothérapie seule, a été démontré de nombreuses fois, tant in vitro qu'in vivo.

Cette méthode non invasive, facile d'utilisation, peu onéreuse et dénuée d'effets secondaires semble être très prometteuse en oncologie.

Après un premier chapitre sur les mécanismes impliqués dans l'efficacité de la sonoporation, une revue des différentes études s'intéressant à la sonoporation dans les cancers digestifs est présentée.

3 Mécanismes de la sonoporation

La sonoporation est la combinaison d'un agent de contraste ultrasonore (microbulles de gaz) activé par des ultrasons à haute fréquence permettant de modifier la perméabilité membranaire dans le but d'augmenter le passage de molécules d'intérêts (chimiothérapie, transfert de gène).

Les microbulles de gaz utilisées varient dans leur composition membranaire et dans le gaz qu'elles contiennent (perfluorocarbène, hexafluorure de soufre, octofluoropropane ...) Elles sont actuellement très résistantes à la pression artérielle. Les premières bulles contenaient de l'air et une paroi d'albumine ce qui les rendaient solubles dans le sang et ainsi difficilement utilisables pour la sonoporation.^{11,12}

Sous l'effet des ultrasons, la bulle injectée en IV va osciller dans le compartiment endothélial. Son comportement est très variable selon les paramètres ultrasonores utilisés : fréquence, pression et durée d'application des ultrasons.

Le principal phénomène physique impliqué dans la sonoporation est la cavitation acoustique. Cette cavitation acoustique comprend deux types de cavitation selon l'intensité acoustique administrée, ce sont les cavitations stable et inertielle (**Figure 1**).

La cavitation stable

La cavitation stable est le reflet du comportement de la microbulle de gaz sous l'effet d'une faible intensité acoustique. En oscillant, la microbulle de gaz va déformer les cellules situées à son contact, entraînant ainsi une rupture de la membrane cytoplasmique : on parle alors de massages cellulaires¹³. Les déformations cellulaires induites entraîneraient la formation de pores de façon transitoire. Les cellules seraient ainsi perméables à de petites molécules. Il est cependant nécessaire d'avoir un contact étroit entre la microbulle et la cellule afin de visualiser la formation de pores¹⁴.

D'autres mécanismes sont observés dans la cavitation stable, notamment la création de micro-streaming.¹⁵ L'oscillation linéaire des bulles va entraîner de petits flux de courant locaux. Ces flux sont à l'origine d'une contrainte de cisaillement (shear stress) aboutissant à la formation de pores nanométriques^{16,17}.

Wolfrum *et al.*, 2003¹⁸, ont observé que lorsque les paramètres ultrasonores étaient modifiés, notamment lorsque l'amplitude du pic de pression négative augmentait, l'efficacité de la sonoporation était d'autant meilleure. Il en est de même pour la contrainte de cisaillement. Ceci corréle donc l'hypothèse de l'action des contraintes de cisaillement dans la sonoporation.

Lorsque l'amplitude de pression augmente, les microbulles vont alors présenter des oscillations multidirectionnelles, on les appelle oscillations non linéaires. Les microbulles vont se dilater pendant la phase de raréfaction et se rapetisser durant la phase de compression produisant du micro-streaming (**Figure 2**).

Par ailleurs, la sonoporation stimulerait aussi l'endocytose¹⁹.

Ainsi certains auteurs expliquent les effets de la sonoporation par la cavitation stable¹⁴⁻²⁰⁻²¹⁻²².

D'autres équipes expliquent l'efficacité de la sonoporation par la cavitation inertielle¹⁷⁻²³⁻²⁴⁻²⁵⁻

²⁶.

La cavitation inertielle

La cavitation inertielle est un mécanisme mis en œuvre lorsque l'amplitude de pression acoustique augmente fortement. Le diamètre de la microbulle augmente sous l'effet de la pression, jusqu'à doubler et imploser²⁹. Cette implosion va libérer le gaz contenu dans la microbulle et générer de fines bulles de gaz qui vont osciller à leur tour.

Certains auteurs suggèrent que l'implosion des microbulles est à l'origine de la formation de pores cellulaires, par le biais d'une élévation thermique locale, de la création d'ondes de choc et de la production chimique de radicaux libres²⁴⁻²⁸.

D'autres soutiennent l'hypothèse de l'action des nouvelles microbulles de gaz, générées par l'implosion de la bulle, sur les membranes cellulaires par massages cellulaires et force de cisaillement²⁶. Cette hypothèse serait mise en évidence par un délai entre l'activation des ultrasons et la sonoporation.

Enfin pour certaines équipes se sont les microjets créés lors de l'implosion d'une bulle non sphérique au contact des cellules qui sont responsables de la création de pores membranaires²⁴⁻²⁸.

Ces petits jets résultant d'un gradient important de pression à proximité des parois cellulaires, sont capables de perforer la membrane transitoirement²⁴. Les pores ainsi créés permettent le transport de matériel extra cellulaire à l'intérieur de la cellule²¹⁻²⁴.

Comme le soulignent Doinikov et Bouakaz (2010)¹⁷, ces mécanismes sont étroitement liés. L'association des ondes de chocs secondaire à l'implosion de bulles et les microjets généreraient des forces de cisaillements au contact des cellules afin de créer des micropores membranaires. Il est essentiel d'avoir une petite distance microbulles-cellules puisque la sonoporation décroît très vite avec l'augmentation de la distance.

En résumé, les deux principaux mécanismes de la cavitation stable sont les oscillations linéaires et non linéaires et les contraintes de cisaillement induites par le micro-streaming.

Les principaux mécanismes de la cavitation inertielle sont la formation de jets et les ondes de choc induites par l'implosion des bulles.

De plus, il semblerait que les cavitations stables et inertielles entraînent une augmentation du passage paracellulaire des médicaments au niveau des jonctions serrées et transcellulaire via la transcytose endothéliale³⁰⁻³¹⁻³²⁻³³.

Dans un modèle in vitro de barrière endothéliale, Kooiman et al³³ ont montré que la sonoporation induisait une augmentation du passage moléculaire transcellulaire avec une diminution des résistances membranaires de 40% du fait d'une altération transitoire de la membrane endothéliale.

Après une stimulation à basse fréquence, l'intégrité de la barrière endothéliale était retrouvée après 30 minutes in vitro et après 1-4 heures in vivo au niveau de la barrière hémato encéphalique, aux paramètres ultrasonores étudiés³¹⁻³².

Kaddur et al, 2009³³, ont voulu démontrer la formation de pores cellulaires transitoires par la sonoporation. Pour ce faire, ils ont utilisé les cellules Hela-GFP fluorescentes exprimant de façon stable la GFP (green fluorescent protein). La sonoporation (400 kPa, 75% rapport cyclique, exposition de 2 minutes) induisait une diminution de 60% d'intensité de fluorescence cellulaire de la GFP. Cette diminution était attribuée à une libération de GFP secondaire à la sonoporation. Cette libération était transitoire puisque 48h après la sonoporation l'intensité de fluorescence était de nouveau à son taux initial. Ce résultat est donc en faveur d'une formation de pores membranaires transitoires induite par la sonoporation.

4 La sonoporation dans les cancers digestifs

Les cancers digestifs les plus étudiés sont l'adénocarcinome pancréatique, le carcinome hépatocellulaire (CHC) et les métastases hépatiques.

Cancer Hépatique

Carcinome Hépatocellulaire.

L'hépatocarcinome est le 6^{ème} cancer en fréquence et la 3^{ème} cause de décès par cancer dans le monde. Les traitements curatifs sont la chirurgie, la transplantation hépatique et la radiofréquence. En cas de maladie avancée ou métastatique, la chimioembolisation artérielle est un traitement suspensif et lorsqu'elle n'est plus envisageable, la chimiothérapie orale est généralement indiquée.

a) Chimiothérapie

En 2011, Cochran et al³⁵ ont étudié pour la première fois la sonoporation dans l'hépatocarcinome, avec la doxorubicine. La doxorubicine est une chimiothérapie cytotoxique de la famille des anthracyclines indiquée dans le traitement du carcinome hépatocellulaire. Du fait de ses effets secondaires cardiotoxiques (insuffisance cardiaque congestive et arythmie), des stratégies se sont développées pour en améliorer son profil de tolérance. La doxorubicine a été encapsulée dans des liposomes aboutissant à une nouvelle formulation (Doxil®)³⁶, ou bien couplée à des nanoparticules ou à des micelles avant son utilisation intraveineuse³⁷.

Eisenbrey et al,2010³⁸, ont créé des microbulles d'air contenant la doxorubicine. Ces microbulles avaient une paroi d'acide polylactique. La distribution de ces microbulles a été

comparée à une injection de doxorubicine seule et à l'injection de nanoparticules transportant la doxorubicine, dans un modèle orthotopique d'hépatocarcinome chez le rat³⁵. Les paramètres ultrasonores utilisés étaient un index mécanique de 0,4-0,45, une fréquence de répétitions des impulsions de 1000 Hz et une durée d'application de 20 minutes immédiatement après les injections IV de doxorubicine seule ou vectorisée par des nanoparticules lipidiques ou des microbulles.

Les microbulles avaient un diamètre de 1,8 µm de diamètre, sous l'effet des ultrasons elles se fragmentaient en fragments capables de pénétrer la cellule par effet EPR.

Pour rappel, l'effet EPR pour Enhanced Permeability and Retention est le fait que les petites molécules de l'ordre du nanomètre vont s'accumuler davantage au sein des cellules tumorales que dans les cellules saines. Cela s'explique par deux mécanismes : le système vasculaire des tumeurs qui est anarchique, ainsi les espaces entre les cellules endothéliales sont plus importants laissant passer les molécules ; de plus le drainage lymphatique est inefficace, empêchant l'évasion des molécules de la tumeur.

La concentration plasmatique de doxorubicine était 6 fois plus élevée dans le groupe traité par « doxorubicine seule » par rapport au groupe traité par « doxorubicine vectorisée par microbulles » et ce 5-15 minutes après le traitement. La concentration intra tumorale de doxorubicine était significativement plus élevée dans le groupe « doxorubicine vectorisée par microbulles » à la fois à court terme (5-15 minutes après traitement) et aussi à long terme, après 14 jours de traitement. La croissance tumorale était significativement diminuée à 14 jours dans le groupe « doxorubicine vectorisée par microbulles ».

La distribution de la chimiothérapie était limitée à la périphérie tumorale. Les auteurs l'expliquent par la forte pression intra tumorale, le défaut de vascularisation tumorale et la

présence de nombreuses zones nécrotiques empêchant la pénétration des molécules chimiothérapeutiques.

b) Thérapie génique anti-tumorale

Le transfert de gènes s'est récemment développé dans la prise en charge thérapeutique du carcinome hépatocellulaire, notamment avec la notion de gène suicide.

Les gènes suicides sont des gènes responsables d'une mort cellulaire rapide et programmée. Ces gènes sont intéressants puisqu'ils permettraient d'induire la mort cellulaire des cellules tumorales sans affecter les cellules saines. Pour ce faire, les gènes définis comme gènes d'intérêt doivent la plupart du temps être intégrés dans le génome des cellules tumorales.

Par exemple, le virus de l'Herpes contient dans son génome le gène de la thymidine kinase. Contrairement à l'enzyme humaine, l'enzyme thymidine kinase du virus herpes (HSVtk) est sensible à la présence d'un antiviral le ganciclovir. En présence de ganciclovir, l'enzyme virale HSVtk va phosphoryler le ganciclovir en ganciclovir monophosphate qui sera ensuite converti en ganciclovir triphosphate par des kinases endogènes. Après incorporation à l'ADN cellulaire durant la phase S de la mitose, le ganciclovir triphosphate agit en inhibant la synthèse d'ADN et provoque ainsi l'apoptose cellulaire, du fait de l'absence de groupe 3'OH à son extrémité. Ainsi, l'hypothèse soulevée est que l'intégration du gène de la thymidine kinase au génome des cellules tumorales permettrait une auto-destruction des cellules tumorales en présence de ganciclovir.

Afin de transférer des gènes d'intérêt il est nécessaire d'utiliser des vecteurs de transfert. Les vecteurs viraux (rétrovirus, adénovirus, herpes virus) ou bactériens via les plasmides sont

largement utilisés. Cependant ils posent plusieurs problèmes : la taille du gène de transfert est limitée, de plus le risque de mutation et d'infection n'est pas nul. C'est ainsi que d'autres vecteurs, notamment non viraux, ont été développés. Malheureusement l'efficacité de ces vecteurs est modeste.

Du fait de son innocuité et de sa facilité d'utilisation, Zhou *et al.* 2010³⁹ et Sakakima *et al.* 2005⁴⁰ ont étudié la sonoporation en tant que vecteur de gènes dans l'hépatocarcinome.

Zhou *et al.*, 2010³⁹, ont étudié la sonoporation du gène thymidine kinase du virus herpès simplex (HSVtk) dans des hépatocarcinomes sous cutanés murins. Le plasmide HSVtk était fixé à une microbulle à paroi lipidique de 2-4 μm de diamètre. Il était injecté en IV tous les 3 jours. L'injection était suivie par une application ultrasonore pendant 5 minutes (Fréquence 1 MHz, Pression négative 0,25 MPa). Le ganciclovir était ensuite administré en intra-péritonéal 48 heures après l'injection de l'ensemble plasmide-microbulle. L'évaluation par Western Blot montrait que la sonoporation permettait d'améliorer le rendement du transfert de gène dans l'hépatocarcinome.

En 2013, la même équipe a étudié la transfection à la fois du gène HSVtk mais aussi du gène suppresseur de tumeur TIMP3 dans des hépatocarcinomes murins⁴¹. En effet, le gène TIMP3 est inactivé dans beaucoup de tumeurs, notamment dans l'hépatocarcinome. Un promoteur AFP était ajouté au plasmide créé afin de cibler les cellules tumorales, celles-ci exprimant l'alfafoetoprotéine (AFP).

À l'aide d'un marquage par la GFP (green fluorescent protein), les auteurs ont montré qu'*in vitro* les cellules transfectées par HSVtk avaient une croissance cellulaire plus lente que les cellules non transfectées ($p < 0,01$). Il en était de même pour la transfection avec TIMP3

($p < 0,01$). L'inhibition cellulaire était plus importante lorsque les deux gènes HSVtk et TIMP3 étaient transfectés ($p < 0,01$).

In vivo, la croissance tumorale était diminuée par 1,9 par la transfection de chacun des deux gènes. Le bénéfice était plus important dans le groupe de souris transfecté avec les deux gènes : diminution de 3,9 ($p < 0,01$).

Sakakima et al, 2005⁴⁰ ont injecté directement des microbulles (BR14) en intratumoral d'un hépatocarcinome humain (SK-Hep1) implanté chez la souris, avec un plasmide exprimant l'Interféron- β . Une seule séance ultrasonore de 10 minutes était réalisée (Fréquence 1 MHz, Intensité ultrasonore 2 W/cm²). La croissance tumorale était significativement diminuée durant les 6 semaines d'évaluation, comparé au groupe sans sonoporation.

c) Diminution de la perfusion tumorale

Une équipe japonaise Liu et al, 2013⁴², a étudié la sonoporation en association au traitement par injection d'éthanol intra hépatique dans le carcinome hépato cellulaire.

Un des traitements locaux du CHC est l'alcoolisation tumorale. Ce traitement local consiste en l'injection en intratumoral d'alcool afin de diminuer sa taille. Plusieurs séances sont réalisées. Le traitement par éthanol est d'autant plus efficace que la tumeur est faiblement perfusée, la vascularisation entraînant un wash-out plus rapide de l'éthanol corrélé à un effet thérapeutique diminué.

Liu et al, 2013⁴², ont cherché à diminuer la perfusion tumorale afin de maintenir l'alcool au contact des cellules tumorales de façon prolongée pour majorer les effets du traitement. Leur

hypothèse était qu'en créant des pores membranaires au niveau des cellules endothéliales tumorales par la sonoporation, la perfusion tumorale serait diminuée transitoirement. Ainsi l'objectif était de créer une sonoporation après alcoolisation tumorale.

La sonoporation était effectuée par une sonde de 25 mm de diamètre à la fréquence de 9 Hz avec une durée du train ultrasonore de 0,5 ms et une pression négative de 4,3 MPa sur des foies sains de lapin, pendant 5 minutes juste avant l'injection d'éthanol.

La vascularisation hépatique était ensuite mesurée par échographie de contraste.

La vascularisation était ainsi diminuée pendant 60 minutes post traitement, le volume hépatique traité par alcoolisation était ainsi majoré par 10 en comparaison à l'injection d'éthanol seule.

Cependant cette étude a été réalisée uniquement sur foie sain chez le lapin.

Cette approche a été testée chez le rat sur des carcinomes hépato cellulaire sous cutanée, permettant également une diminution transitoire de perfusion tumorale et une augmentation significative de la nécrose tumorale dans le groupe traité par sonoporation avant alcoolisation.

Bien que plusieurs études aient démontré l'efficacité de l'alcoolisation, ce traitement est actuellement supplémente par le traitement par radiofréquence de la tumeur suite à l'étude de Cho⁴³ ayant montré en 2009 une survie sans récive et une survie globale plus longue avec la radiofréquence comparativement à l'alcoolisation seule.

À ce jour aucune étude n'a comparé le traitement par sonoporation à la radiofréquence dans le CHC.

d) Paramètres ultrasonores

Nous pouvons voir dans les différentes études que les paramètres ultrasonores utilisés diffèrent dans chaque équipe. En effet, les paramètres ultrasonores optimaux pour la sonoporation ne sont pas bien définis, il en résulte des bénéfices parfois modestes de la sonoporation.

Métastases hépatiques

Hayashi et al, 2009⁴⁴ ont étudié le transfert de gène par sonoporation (INFbeta) dans des liposomes au sein de métastases hépatiques de cancer colorectal (Colon26) chez la souris. Les paramètres ultrasonores utilisés étaient les suivants : fréquence 1 MHz, durée d'application des ultrasons de 10 minutes. La survie des souris était de 24,6 jours dans le groupe contrôle sans traitement (n = 10), de 42,2 jours dans le groupe traité par liposomes/INFbeta sans sonoporation (n = 10) et de 49,2 jours dans le groupe sonoporation liposome/INFbeta (n = 10).

Dans un second temps, le transfert de gènes était couplé à l'administration de chimiothérapie par cisplatine. Le traitement par cisplatine améliorait la survie à 35,8 jours, le groupe

cisplatine et liposome/INFbeta avait une moyenne de survie de 49,6 jours, tandis que le groupe cisplatine + sonoporation INFbeta avait une survie de 59,8 jours.

Le volume tumoral était de 6.9 ± 3.8 dans le groupe cisplatine seul, de 2.3 ± 1.2 dans le groupe cisplatine + liposome INFbeta et de 1.1 ± 0.8 dans le groupe cisplatine + sonoporation liposome/INFbeta.

La survie des souris était plus longue dans le groupe sonoporation par liposome/INFbeta + cisplatine et la croissance tumorale était inhibée. **(Figure 3)**

Cancer pancréatique

L'incidence de l'adénocarcinome du pancréas augmente chaque année. Entre 1982 et 2012, l'incidence en France a augmentée de 3,6% chez les hommes et de 2,8% chez les femmes (Bouvier et al, Francim). Il est supposé être la deuxième cause de morts par cancer en 2030 (Thésaurus National de Cancérologie Digestive TNCD).

Le développement du cancer du pancréas n'est à ce jour pas bien élucidé même si certains facteurs de risque sont suspectés : tabagisme, obésité, alcool, pancréatite chronique, ethnie, âge.

L'adénocarcinome du pancréas est une tumeur peu vascularisée avec un stroma tumoral dense et fibreux dans laquelle la biodisponibilité de la chimiothérapie est considérée comme faible.

Afin de contourner ce mécanisme de résistance, Rapoport, 2011⁴⁵, a utilisé des nano-émulsions de perfluoropentane, pouvant s'accumuler en intratumoral via l'effet EPR grâce à leur petite taille. Une fois en intratumoral, sous l'effet des ultrasons les nano-émulsions sont

stimulées et s'expandent pour se transformer en microbulles puis fusionnent pour former de larges bulles.

Ces nano-émulsions ont été utilisées dans un modèle murin orthotopique de tumeur pancréatique (cellules MiaPaca-2). Le traitement par nano-émulsions était couplé à de la chimiothérapie cytotoxique intraveineuse par gemcitabine et paclitaxel.

Les auteurs ont montré que les souris du groupe traité par sonoporation avec nano-émulsions et chimiothérapie avaient une diminution significative de leur taille tumorale et du nombre de métastases après 15 jours de traitement, comparativement au groupe traité par chimiothérapies par l'association gemcitabine et paclitaxel seule.

Le traitement était réalisé 2 fois par semaine pendant 2 semaines.

Les paramètres ultrasonores étaient les suivants : sonde non focalisée, fréquence 1 MHz, pression de raréfaction de 0,61 MPa, application pendant 30 secondes.

L'effet de ce traitement était malheureusement suspensif avec une récurrence de la croissance tumorale dans les 6 semaines après l'arrêt thérapeutique. En effet le stroma tumoral pancréatique est fibreux et dense, certaines zones tumorales sont peu perfusées. Ainsi, la chimiothérapie n'est pas administrée de façon homogène en intra-tumoral. Ces zones moins vascularisées reçoivent donc des doses de chimiothérapie plus faibles. Selon les auteurs, ceci pourrait être propice à l'acquisition de résistance par les cellules tumorales avoisinantes.

Kotopoulos et al, 2013⁴⁶, se sont intéressés au même modèle tumoral que précédemment pour étudier la sonoporation avec l'agent de contraste SonoVue et la chimiothérapie par gemcitabine. Les tumeurs pancréatiques étaient situées en orthotopique au niveau des flancs de souris nues (cellules MiaPaca2). Les paramètres ultrasonores étaient un rapport cyclique de 40%, une pression négative de 0,2 MPa et une application des ultrasons pendant 10

minutes, immédiatement après l'injection de SonoVue. Le traitement était administré une fois par semaine pendant 8 semaines.

La croissance tumorale était significativement diminuée dans le groupe ayant eu le traitement par sonoporation + gemcitabine comparé au groupe traité par gemcitabine seule (110 mm³ et 400 mm³ à 10 semaines). (**Figure 4**)

5 Études cliniques

À la suite de l'étude de Kotopoulis *et al*⁴⁶, la même équipe, Dimceviski *et al*, 2016⁴⁷ a testé la sonoporation chez l'humain, dans l'adénocarcinome du pancréas, en association avec la gemcitabine.

Une sonde d'échographie en mode couleur Doppler était utilisée afin d'administrer les ultrasons (Fréquence 1,9 MHz, pression négative 0,41 MPa, durée du train ultrasonore de 3 secondes). Les ultrasons étaient administrés 30 minutes après l'injection IV de la gemcitabine et les microbulles SonoVue étaient réinjectées toutes les 3 minutes en IV.

Le traitement était réalisé toutes les semaines pendant 7 semaines, suivi d'une semaine de pause, puis 3 semaines sur 4.

10 patients ont été inclus. En résultat, les patients du groupe « sonoporation avec la gemcitabine » pouvaient recevoir plus de cycles de chimiothérapie comparativement aux patients du groupe traité par « gemcitabine seule », 13.8 ± 5.6 cycles, versus 8.3 ± 6.0 cycles, $p = 0.008$. La survie moyenne était plus importante dans le groupe sonoporé: 17,6 mois versus 8,9 mois ($p=0,011$) (**Figure 5**). Il n'y avait pas de toxicité majorée dans le groupe sonoporation.

Wang et al, 2018⁴⁸ ont étudié la sonoporation sur des métastases hépatiques de cancers digestifs chez 12 patients. Les microbulles utilisées étaient les SonoVue. La sonoporation était administrée 30 minutes après l'injection de la chimiothérapie. Chaque patient avait son protocole de chimiothérapie, en échec d'une première ligne de traitement. Pour administrer les ultrasons, une sonde diagnostique était utilisée. Les index mécaniques différaient selon le groupe étudié (0,4 à 1). L'objectif de cette étude était la tolérance de la sonoporation chez l'homme. Aucun effet secondaire de grade supérieur à 2 n'était constaté, les effets secondaires étaient en rapport avec le protocole de chimiothérapie, excepté de la fièvre grade 1 chez deux patients.

La progression sans récurrence était de 91 jours.

Etude en cours

Une étude de faisabilité est en cours au CHRU de Tours sur la sonoporation de métastases hépatiques de cancer colorectal PRTK15-TL/SONCHIMIO. L'étude SONCHIMIO consiste à comparer l'effet de la sonoporation sur des métastases hépatiques de cancer colorectal, chez des patients en cours de chimiothérapie par FOLFIRI + bevacizumab. Les patients doivent avoir au minimum deux métastases hépatiques accessibles pour la sonoporation à l'inclusion. Chaque patient inclus est traité par sonoporation pour une métastase ciblée accessible aux ultrasons. Le patient est son propre témoin par comparaison aux métastases non traitées par sonoporation. L'objectif principal est l'évaluation de la réponse objective radiologique à 2

mois. Les objectifs secondaires sont la tolérance, la nécrose de la métastase, la vascularisation métastatique et la pharmacocinétique du bevacizumab.

6 Conclusion

La sonoporation est en plein essor aussi bien pour le transfert de gène que pour la thérapie tumorale dans les cancers digestifs. Elle semble efficace et sans risque. Après plusieurs études in vitro puis pré-clinique sur petit animal, les études cliniques ont vu le jour il y a quelques années sur l'adénocarcinome du pancréas puis sur les métastases hépatiques de cancer digestif. Le nombre de patients inclus est encore limité mais cette thérapeutique semble prometteuse dans un avenir proche.

D'autres études cliniques, notamment de phase II et III sont nécessaires afin de pouvoir proposer ce traitement de façon plus élargie.

La deuxième partie de cette thèse présente l'étude réalisée au sein de l'unité UMR 1253 Ibrain Inserm à l'université de Tours

Partie 2 Revue de la littérature

Enhancing Nab-paclitaxel delivery using microbubble-assisted ultrasound in a pancreatic cancer model

*Diane Bressand^{a,b}, Anthony Novell^a, Alban Girault^b, William Raoul^b, Gaëlle Fromont^c,
Jean-Michel Escoffre^{a,*}, Thierry Lecomte^{b,*}, Ayache Bouakaz^a*

^aUMR 1253, iBrain, Université de Tours, Inserm, Tours, France

^bUniversité de Tours, EA7501 GICC, Team PATCH, CHRU de Tours, Department of
Hepato-gastroenterology and Digestive Cancerology, Tours, France

^cUniversité de Tours, Inserm, UMR 1069, Nutrition, Croissance, Cancer, CHRU de Tours,
Department of Pathological Anatomy and Cytology, Tours, France

AUTHOR CONTRIBUTIONS

*T. Lecomte & A. Bouakaz contributed equally to this work.

RUNNING TITLE

Ultrasound-assisted Nab-paclitaxel delivery.

Corresponding Author

*J-M Escoffre, Ph.D., UMR 1253, iBrain, Université de Tours, Inserm, 10 boulevard Tonnellé, 37032 Tours, France. Tel: +33(0)247366191. *Email address:* jean-michel.escoffre@univ-tours.fr and T. Lecomte., M.D., Université de Tours, EA7501 GICC, Team PATCH, CHRU de Tours, Department of Hepato-gastroenterology and Digestive Cancerology, 10 boulevard Tonnellé, 37032 Tours, France. Tel: +33(0)247366079. *Email address:* thierry.lecomte@univ-tours.fr.

1-Abstract

The combination of microbubbles (MBs) and ultrasound (US) is an emerging method for non-invasive and targeted enhancement of anticancer drugs uptake. This method showed to increase local drug extravasation in tumor tissue while reducing the systemic adverse effects in various tumor models. The present study aims into evaluating the effectiveness of this approach for Nab-paclitaxel delivery in a pancreatic tumor model. US and MBs of different types in combination with Nab-paclitaxel showed a loss in cell viability of pancreatic cancer cells in comparison with Nab-paclitaxel treatment alone in *in-vitro* scenario. The *in-vivo* data revealed that ultrasound and microbubbles in combination with Nab-paclitaxel induced a significant decrease in tumor volume in subcutaneous pancreatic adenocarcinoma mouse model in comparison to tumors treated with Nab-paclitaxel alone. The post-mortem anatomopathological analyses of tumor tissues partially confirmed these results. In conclusion, this study demonstrates that MB-assisted US is a relevant technology to increase the therapeutic effectiveness of Nab-paclitaxel in a pancreatic cancer model.

Keywords: Pancreatic cancer - Nab-paclitaxel – microbubble – ultrasound - sonoporation.

2-Introduction

In the European Union (EU), pancreatic cancer (PC) is the 9th most commonly diagnosed cancer¹ and is currently the 4th main cause of cancer-related decease². Recently, Ferlay *et al.*, reported that more deaths from PC will occur than breast cancer (91,500 versus 91,000 annual deaths)³. By 2025, deceases from PC are predicted to be 25% higher than for breast cancer. PC may become the 3rd main reason of death from cancer after lung and colorectal cancers. For patients diagnosed with PC, the 5-year survival rate is poor (about 3%-15%). Drug resistance, high metastasis occurrence, poor prognosis and tumor relapse contributed to the difficulties in treating PC.

Nab-paclitaxel (injectable formulation of nanoparticle albumin-bound paclitaxel)⁴ in combination with gemcitabine, or 5-fluorouracil/leucovorin in combination with irinotecan plus oxaliplatin (FOLFIRINOX) represents major progresses for the treatment of metastatic PC over gemcitabine alone, providing each ones almost identical disease control and similar survival rates^{5, 6 7}. Furthermore, FOLFIRINOX regimen may be particularly toxic and the adverse events may be more severe compared with those observed with therapy using Nab-paclitaxel plus gemcitabine^{8 9}. Thus, gemcitabine monotherapy or combined with Nab-paclitaxel is the standard care in patients with poor performance status or contraindication to FOLFIRINOX protocol. Efficacy of chemotherapy for PC is far from sufficient and one of the explanations is the tumor microenvironment, which limits both effective drug extravasation and the targeting of cancer cells. Systemic chemotherapies are also associated with major off-target effects because of the non-specificity of these therapies. In this context, the design and the validation of targeted drug delivery systems are needed to increase the intra-tumoral dose of chemotherapeutic agents while reducing side effects to non-tumoral tissues. Such methods

might have a great benefit as neo-adjuvant and/or palliative cares by decreasing tumor burden and hence either facilitate surgical resection or offer symptom relief.

Microbubble-assisted ultrasound (MB-assisted US) is an innovative delivery method of therapeutic compounds, including chemotherapeutic agents, nucleic acids and antibodies¹⁰⁻¹². This approach involves the US activation of gas MBs located close to the biological barriers (*e.g.*, endothelial barriers, cell membrane) to reversibly enhance their permeability (phenomenon also known as sonoporation)¹³. The MB acoustic behavior in the vicinity of biological barriers depends on the acoustic parameters¹⁴. As previously reported, stable and inertial cavitations induced physical phenomena including microstreaming^{15, 16}, shock waves^{17, 18} and microjets^{19, 20}, which might transiently enhance the vascular permeability and the intracellular incorporation of therapeutic compounds through the formation of membrane pores and the activation of para- and trans-cellular pathways^{21, 22}. Thus, MB-assisted US offers great aptitude in improving the therapeutic efficacy of a chemotherapeutics by enhancing their intratumoral (*i.t.*) bioavailability and reducing their systemic side effects on healthy tissues²³.

Few previous preclinical^{24, 25} as well as clinical studies^{10, 26} described that MB-assisted US increased the drug efficacy, such as gemcitabine, in comparison to the systemic chemotherapy alone. Given the recent clinical progress in pancreatic adenocarcinoma cytotoxic therapy, our present study thus explored the efficiency of microbubble-assisted ultrasound to deliver a rather large drug-loaded nanoparticle, Nab-paclitaxel (130 nm in diameter). Therefore, the present study aims to investigate whether the combination of US and MBs is able to deliver of Nab-paclitaxel *in-vitro* and *in-vivo*.

3-Experimental section

Chemicals and microbubbles

Nab-paclitaxel (Celgene, Courbevoie, France) was a generous gift from Dr. Tournamille (Regional Center of Cancerology, Henry Kaplan, CHRU de Tours, Tours, France). The clinical dose of Nab-paclitaxel is 40 mg/kg²⁷. All microbubbles have been kindly offered by Bracco Suisse S.A. (Geneva, Switzerland). BG8214 contrast agents were used for both contrast-enhanced ultrasound imaging (CEUS) and acoustically-mediated drug delivery^{28, 29}. BG8610 and BG8214 MBs show similar characteristics as Bracco's formulation described in Schneider *et al*³⁰ and in Escoffre *et al*²⁹, respectively.

Cell Culture

Human pancreatic adenocarcinoma cells BxPC-3 were kindly provided by Prof. F.X. Caroli-Bosc (Department of Hepato-gastro-enterology and digestive oncology, CHRU d'Angers, Angers, France). This cell line was derived from a pancreatic ductal adenocarcinoma. BxPC-3 cells were cultured as a monolayer in RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich™, St. Louis, MO) complemented with 10% fetal calf serum (FCS; Eurobio, Courtaboeuf, France) and with 1% penicillin and streptomycin mixture (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA).

Ultrasound setup

A 1 MHz single-element ultrasound transducer (15 mm diameter, 25 mm native focal distance; Sofranel, Sartrouville, France) was used to deliver US waves with an US setup described in Escoffre *et al*²⁹.

Membrane permeabilization to small molecules

Cell membrane permeabilization to small molecules was assessed with propidium iodide (PI; 100 μ M; 669.39 Da; hydrodynamic radius \sim 0.6 nm) ^{31, 32}. For enzymatic trypsinization, BxPC-3 cells were incubated with 0.25% trypsin-EDTA (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) and then resuspended in OptiMEM[®] High W/GlutaMAX-1 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) complemented with 1% FCS. The cell viability was evaluated using Trypan Blue exclusion assay and was around 98%. The cell suspension was acoustically permeabilized in presence of PI (0.1 mL) and gas microbubbles (microbubble-to-cell ratio of 5) using the US setup reported in Escoffre *et al*²⁹. This mixture was exposed to 1 MHz sinusoidal US waves composed of pulses 40 cycles length, repeated 100 μ s (*i.e.*, 40% duty cycle), at 400 kPa (peak negative pressure) for a total exposure time of 30 seconds. These settings were optimized in our previous experimental studies^{33, 34}. Finally, the permeabilization level was assessed by flow cytometry as previously described³³.

Membrane permeabilization to fluorescent nanoparticles

Membrane permeabilization to 150 nm DiagnNano[™] green fluorescent silica nanoparticles (50 mg/mL; 130 nm in diameter; Creative Diagnostics, Shirley NY) was assessed using the same *in-vitro* protocol defined for PI delivery. These nanoparticles were used as similar size particles to Nab-paclitaxel. Fifteen minutes after ultrasound application, the cell suspension was twice washed in Dulbecco's phosphate-buffered saline solution (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) and the permeabilization level was then measured by flow cytometry.

In-vitro Nab-paclitaxel delivery

Nab-paclitaxel (Celgene SARL, Paris, France) was delivered into BxPC3 cells using the same US settings and setup as previously defined. A final concentration of 2.5 ng/mL Nab-paclitaxel was chosen based on *in-vitro* preliminary unpublished data. Immediately after US exposure, cells were cultured following the protocol described in Escoffre *et al.*³³

Cell viability

As previously reported³³, the cell viability was assessed using a methylthiazolyldiphenyltetrazolium bromide (MTT; ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) colorimetric assay 48 and 72 hours after treatment.

In-vivo Nab-paclitaxel delivery

The Animal Care and Regional Committee for Ethics in Animal Experiments, Centre Val-de-Loire (No. 2017020117591464) approved all *in-vivo* procedures (No. 2017020117591464). Male Balb/c nude mice (6 weeks old, 20-30 g) were purchased from Envigo (Gannat, France) and were housed with 12 h light cycle and food and water *ad libitum*. They were weighted twice a week during the whole therapeutic planning.

All experiments were performed under a sterile biosafety cabinet. As previously reported²⁹, BxPC-3 cells (5×10^6 cells in 100 μ L PBS) were subcutaneously injected in each flank of 40 mice under gaseous anesthesia (3% isoflurane in oxygen). Mice were divided into 7 groups at a rate of 8 to 9 mice per group (**Table 1**). Tumor perfusion and dimensions were measured

using CEUS and B-mode imaging, respectively. A fully perfused tumor and a tumor volume of 50 mm³ are both criteria for starting the tumor treatment as follows (Day 0): an i.v. injection of Nab-paclitaxel (5 or 20 mg/kg b.w.; or saline) was followed immediately by a bolus injection of MBs (70 µL for each type of MBs). The tumor was exposed to the similar *in-vitro* acoustic parameters (*i.e.*, 1 MHz, 100 µs PRF, 40% duty cycle, 400 kPa PNP) for a period of 3 mins. The treatment was performed twice a week until protocol endpoints are reached (*i.e.*, 5.5 weeks).

Anatomical ultrasound imaging

As previously described²⁹, tumor dimensions were determined using B-mode US imaging (Vevo 2100 System, Visualsonics-Fujifilm Inc., Toronto, Canada). The tumor volume was assessed using the formula²⁹:

$$Tumor\ volume = \frac{length \times width \times thickness}{2}$$

Quality of mouse life

To evaluate the quality of life, variations in mouse behavior (*i.e.*, respiratory deficiency, loss of locomotion, loss of appetite, *etc*) and in body weight were analyzed twice a week during the study.

Immunohistochemistry

After a surgical excision of the tumors, these tissues were fixed in 10% formalin for 24 hrs and were then embedded in paraffin and cut in 3 µm tissue sections. As previously

described³⁵, one section was stained with haematoxylin-eosin-saffron (HES) in order to measure the size of the BxPC3 tumors with a microscope and a micrometer and to determine the percentage of necrosis in the whole section (5-9 tumors/group) as performed in today practice when cancer necrosis has a prognostic value.

For immunohistochemical staining, slices were prepared and immunostained for Ki-67 according to the protocol described by Figiel *et al*³⁶ and Perrouin Verbe *et al*³⁷. The proliferation index of tumor was expressed as a percentage of total cancer cells. Slices were analyzed by an expert pathologist (GF).

Statistical analysis

All quantitative data are collected for statistical analysis using the non-parametric Mann-Whitney U test (significance was defined as $p < 0.05$) with GraphPad Prism v.6.0a (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA).

4-Results

Nab-paclitaxel delivery in BxPC3 cells

As shown in **Figure 6A**, MMT assay was used to assess the cell viability 72 hrs after Nab-paclitaxel delivery with or without MB-assisted US. The exposure of BxPC-3 cells to US in presence of BG8610 and BG8214 MBs did not modify the cell viability in comparison to the control condition (**Figure 6A**). When the pancreatic adenocarcinoma cells were incubated with 2.5 ng/mL of Nab-paclitaxel, the cell viability significantly declined compared to the

control condition without Nab-paclitaxel ($61 \pm 2\%$ vs $100 \pm 0.1\%$; $p < 0.001$). BxPC-3 cells treated with Nab-paclitaxel at 2.5 ng/mL and exposed to US in the presence of BG8610 MBs exhibited a slight but non-significant reduction in their viability in comparison to the treatment with Nab-paclitaxel alone. The combination of US and BG8214 MBs with 2.5 ng/mL of Nab-paclitaxel induced a significant diminution in the cell viability compared to the Nab-paclitaxel treatment alone ($50 \pm 2\%$ vs $61 \pm 2\%$; $p < 0.01$). All together, these datas show that BG8214 MB in combination with US and Nab-paclitaxel induced a higher cell mortality compared to Nab-paclitaxel treatment alone.

Effects of BG8610 and BG8214 MBs on the membrane permeabilization of BxPC3 cells

The membrane permeabilization of BxPC3 cells is a key step for acoustically-mediated drug delivery and strongly depends on the MB properties (*e.g.*, type, dose, *etc.*). To gain insight into the effect of BG8610 and BG8214 MBs in combination with US on the membrane permeability, the acoustically-mediated membrane permeabilization to fluorescent nanoparticles was assessed using flow cytometry. **Figure 6B** indicates that the permeabilization level of BxPC-3 cells to the fluorescent nanoparticles (Fluo-NPs) was not statistically different from the control condition. This result suggests that the simple incubation of Fluo-NPs with BxCP-3 cells did not lead to their intracellular uptake. However, the exposure of the cells to US in the presence of MBs and Fluo-NPs induced a significant increase in the permeabilization level to Fluo-NPs compared to the Fluo-NPs incubation alone ($31 \pm 2\%$ with BG8610 and $26 \pm 2\%$ with BG8214 vs $2 \pm 0.5\%$; $p < 0.05$). There is no significant difference in the efficacy of BG8610 and BG8214 MBs to permeabilize the BxPC-3 cells to Fluo-NPs.

Considering that the acoustically-mediated membrane permeabilization is commonly monitored using small and non-permeant molecule^{38, 39} such as propidium iodide, effects of BG8610 and BG8214 MBs on membrane permeability of BxPC-3 cells were assessed by intracellular uptake of propidium iodide using flow cytometry. The permeabilization level to propidium iodide is $2 \pm 0.01\%$ in absence of US, indicating likely that these cells internalizing propidium iodide are presumably dead (**Figure 6C**)³⁸. In agreement with previous investigations^{40, 41}, the permeabilization level to propidium iodide significantly increased using US and MBs ($p < 0.05$). As illustrated in **Figure 6C**, BG8214 MBs were more efficient than BG8610 MBs to induce membrane permeabilization to small and non-permeant molecule ($78 \pm 1\%$ vs $53 \pm 1\%$; $p < 0.01$) and both of them did not affect the cell viability (**Figure 6A**).

In-vivo Nab-paclitaxel delivery

As described in **Table 1**, subcutaneous PC tumors were treated with either BG8214 MB-assisted US on its own (Group 2), or i.v. administration of one Nab-paclitaxel dose at 5 (Group 3) or 20 mg/kg (Group 5) on its own, or by i.v. injection of one Nab-paclitaxel dose at 5 (Group 4) or 20 mg/kg (Group 6) in combination with MB-assisted US using BG8214 MBs, or by i.v. administration of one Nab-paclitaxel dose at 20 mg/kg in combination with MB-assisted US using BG88610 MBs (Group 7). In addition, a group of subcutaneous PC tumors were not treated and considered as control group (Group 1). The therapeutic effectiveness of Nab-paclitaxel delivery with or without MBs and US was monitored using anatomical US imaging every 3 day before the treatment²⁹.

As shown in **Figure 7A**, BG8214 MBs in combination with US application did not influence the tumor growth compared to the control group (Group 2 vs Group 1; $p > 0.05$). In addition, the repeated i.v. administration of one Nab-paclitaxel dose at 5 mg/kg on its own resulted in a significant reduction in the tumor volume compared to control group (**Figures 7A and 7B**; Group 3 vs Group 1; $p < 0.05$). Furthermore, the acoustically-mediated Nab-paclitaxel delivery with BG8214 MBs led to an additional decrease in tumor volume after three treatments in comparison to Nab-paclitaxel treatment alone (**Figure 7B**; Group 4 vs Group 3; $p < 0.05$).

As shown in **Figure 7C**, the repeated i.v. injection of one Nab-paclitaxel dose at 20 mg/kg on its own induced a significant reduction in tumor volume compared to the repeated delivery of a Nab-paclitaxel dose at 5 mg/kg on its own or in combination with BG8214 MB-assisted US (Group 5 vs Groups 3 and 4; $p < 0.01$). The acoustically-assisted delivery of one Nab-paclitaxel dose at 20 mg/kg with BG8214 MBs resulted in a slight but statistically significant reduction in tumor volume compared to the 20 mg/kg Nab-paclitaxel treatment alone (**Figure 7C**; Group 6 vs Group 5; $p < 0.05$). However, the combination of this chemotherapy with BG8610 MB-assisted US induced a significant diminution in tumor volume until the 8th treatment in comparison to the 20 mg/kg Nab-paclitaxel treatment alone (**Figure 7C**; Group 7 vs Group 5; $p < 0.05$). There is no significant difference in the therapeutic effectiveness between both types of MBs for the repeated delivery of one Nab-paclitaxel dose at 20 mg/kg (**Figure 7C**; Group 6 vs Group 7). These data indicate that sonoporation potentiate the therapeutic efficacy of one Nab-paclitaxel dose at 5 mg/kg as well as at 20 mg/kg in subcutaneous PC mouse model.

To support these data, histological analyses were carried out at the end of the therapeutic protocol. The pathologist considered the quality of the tumor slices, accountability, placement

and slide staining adequate for our study. Major change in histological features between the seven experimental groups laid in the proliferation and necrosis indices. Indeed, the repeated delivery of one Nab-paclitaxel dose at 5 (Group 3) and 20 mg/kg (Group 5) on its own induced a significant 10% and 20% decrease in proliferation index compared to the control group, respectively (**Figure 8**; $p < 0.05$).

However, as shown in the **Figure 9**, the control tumors showed high and significant necrosis index in comparison to tumors treated with a Nab-paclitaxel dose at 5 (Group 3) or 20 mg/kg (Group 5) ($54 \pm 6\%$ vs $11 \pm 4\%$ or 0% , respectively; $p < 0.05$). In addition, the acoustically-mediated delivery of one Nab-paclitaxel dose at 5 mg/kg with BG8214 MBs led to significant reduction in proliferation index in comparison to the 5 mg/kg Nab-paclitaxel treatment alone (**Figure 8**; Group 3 vs Group 4; $p < 0.05$). This result suggests a dose-effect of the Nab-paclitaxel on the tumor proliferation. However, there is no significant difference in necrosis index between the delivery of one Nab-paclitaxel dose at 5 mg/kg on its own and in combination with BG8214 MB-assisted US (**Figure 9**; Group 3 vs Group 4; $p > 0.05$). In addition, the proliferation and necrosis index did not significantly change between the delivery of one Nab-paclitaxel dose at 20 mg/kg on its own and in combination with BG8214 or BG8610 MB-assisted US (**Figures 8 and 9**; Groups 6 and 7 vs Group 5; $p < 0.05$).

Mouse quality of life

The assessment of mouse behavior and body weight showed that no adverse effect was detected when the subcutaneous tumors were exposed to BG8214 MB-assisted US on its own in comparison to control group (**Figure 10A**; Group 2 vs Group 1; $p > 0.05$). In addition, the repeated i.v. administration of one Nab-paclitaxel dose at 5 mg/kg in combination with or

without BG8214 MB-assisted US did not change the mouse behavior and body weight compared to control group (**Figure 10B**; Group 4 vs Group 3; $p > 0.05$).

However, the repeated i.v. injection of one Nab-paclitaxel dose at 20 mg/kg induced a significant diminution in body weight (**Figure 10C**; Group 5 vs Group 1; $p < 0.05$) and overall deterioration of mouse health status, thus suggesting such treatment induced systemic toxicity. Interestingly, the repeated delivery of one Nab-paclitaxel dose at 20 mg/kg using MB-assisted US (BG8214 or BG8610) slowed down the body weight loss related to systemic toxicity of such drug dose (**Figure 10**; Groups 6 and 7 vs Group 5).

5-Discussion

This study aimed into evaluating the effectiveness of the MB-assisted US for Nab-paclitaxel delivery in *in-vitro* and *in-vivo* pancreatic tumor model. First, *in-vitro* results demonstrated that the acoustically-mediated Nab-paclitaxel delivery led to a significant reduction in cell viability of BxPC3 cells in comparison with Nab-paclitaxel treatment on its own (**Figure 7A**). In agreement with previous studies, these results showed indirectly that the increase in cell death could be attributed to an enhanced intracellular delivery of Nab-paclitaxel or paclitaxel released from Nab-paclitaxel through acoustically-induced hydrophilic pores^{42, 43}.

In comparison to other low molecular weight chemotherapeutic drugs, Nab-paclitaxel is a nanoparticle-based drug with a size of approximately 130 nm. The present study hence demonstrated that US in combination with MBs is able to increase the intracellular uptake of much larger molecules (*e.g.*, nanoparticles). Indeed, these investigations reported that the MB-assisted US reversibly enhances the native permeability of plasma membrane of cancer cells through the generation of hydrophilic pores with a size ranging from 10 to 200 nm^{21, 44}.

The intracellular uptake of nanoparticles (*e.g.*, Nab-paclitaxel) and low molecular weight drugs (*e.g.*, paclitaxel) rely on passive diffusion of these compounds through these membrane pores^{45, 46}. Thus, these compounds diffused directly (*i.e.*, free access) into the cytoplasm of cancer cells.

Subsequently, we described that the therapeutic effectiveness of *in-vitro* acoustically-mediated Nab-paclitaxel delivery was reliant on the type of MBs. Indeed, BG8214 MBs are more efficient than BG8610 MBs for Nab-paclitaxel-induced cell death, with the ultrasound settings applied in this study (**Figure 6A**). In addition, the BG8214 MBs are as effective as BG8610 MBs for increasing the intracellular uptake of fluorescent nanoparticles (as Nab-paclitaxel model drug) (**Figure 6B**) while the former ones are the most efficient MBs for enhancing the intracellular incorporation of propidium iodide (as low molecular weight model drug) (**Figure 6C**). These data are in agreement with previous studies that reported that the effectiveness of the acoustically-mediated membrane permeabilization and intracellular drug uptake were reliant on the MB properties including the size, the shell composition, the gas and the concentration⁴⁷⁻⁴⁹. Indeed, these properties impact the MB response to the US excitation¹⁴. The exposure of different MB types to the same US conditions should result in different acoustic phenomena that could variously permeabilize the plasma membrane of nearby cancer cells thus enhancing the intracellular incorporation of anti-cancer molecules.

Our results suggest that under US exposure, BG8610 and BG8214 MBs should generate two classes of membrane pores. Indeed, **Figure 6B** shows that both MBs induced the formation of large membrane pores (*i.e.*, > 100 nm), allowing the intracellular uptake of nanoparticles as well as small molecules (**Figure 6C**). In addition, **Figure 6C** indicates that both MBs led to the creation of small membrane pores (*i.e.*, < 100 nm) through which only small molecules (*e.g.*, propidium iodide) enter into the cells. The statistical difference observed in the

intracellular incorporation of propidium iodide between both MBs (**Figure 6C**) suggest that BG8214 MBs might generate higher number of small membrane pores than BG8610 MBs. However, one cannot exclude that both MBs created similar number of small membrane pores with different lifetimes. Indeed, BG8214 MBs might create longer-lived membrane pore than BG8610 MBs. Further additional investigations will have to confirm these hypotheses.

Subsequently, our preclinical results revealed that *in-vivo* acoustically-mediated Nab-paclitaxel delivery resulted in a significant reduction in tumor volume in comparison to Nab-paclitaxel treatment on its own (**Figures 6 and 7**). Using BG8214 MBs, US potentiates the therapeutic effectiveness of low (*i.e.*, 5 mg/kg; Group 4) as well as high (*i.e.*, 20 mg/kg; Groups 6 and 7) dose of Nab-paclitaxel in subcutaneous PC model in nude mouse (**Figures 7B and 7C**).

However, there is no significant difference in the therapeutic effectiveness between BG8214 and BG8610 MBs for the delivery of high dose of Nab-paclitaxel (Group 6 vs Group 7). Under our experimental conditions, no adverse side effect due to US protocol is observed. Nevertheless, systemic administration of 20 mg/kg Nab-paclitaxel (Group 5) is associated with an overall deterioration of mouse health status (*e.g.*, loss of body weight, reduced locomotion, *etc.*). These results were partially confirmed by histological analysis (**Figures 8 and 9**). Indeed, the latter did not show any significant difference between tumors treated with i.v. injection of one Nab-paclitaxel dose at 20 mg/kg on its own (Group 5) or in combination with MB-assisted US (independently of MB types; Groups 6 and 7) in proliferation and necrosis indices as shown using the tumor volume measured with US imaging. We hypothesize that HES and Ki67 staining is not sensitive enough to detect slight difference in tumor response to high dose of Nab-paclitaxel in comparison with the US imaging.

Surprisingly, the i.v. delivery of both drug doses on its own or by MB-assisted US leads to a significant diminution in tumor necrosis.

We hypothesize that such treatments result in tumor regression by apoptosis thus preventing the tumor necrosis. Additional and complementary molecular assays (TUNEL assay) should be considered to analyze tumor response (*e.g.*, tumor apoptosis) at molecular level in our future investigations.

In clinical practice, MB-assisted US is compatible with current Nab-paclitaxel-based chemotherapy protocols^{4, 50}. This method should be capable to enhance bioavailability of paclitaxel in the tumor interstitial compartment and to improve its therapeutic effectiveness while minimizing its systemic toxicity (**Figure 10**)^{51, 52}. Undeniably, the exposure of MBs to US in the tumor microvessels may reversibly increase the vascular permeability and consequently improve the extravasation and the i.t. bioavailability of Nab-paclitaxel or paclitaxel released from Nab-paclitaxel^{53, 54}. In addition, the acoustically-mediated permeabilization may enhance the uptake of paclitaxel in the endothelial cells. Thus, this method might induce the irreversible damage of tumor vasculature and decrease the source of nutrients and oxygen in the tumor tissues^{29, 55}. Further additional investigations will have to investigate the *in-vivo* mechanisms involved in the delivery of Nab-paclitaxel in our mouse model. The extravasation of fluorescent Nab-paclitaxel should be assessed using intravital fluorescence imaging⁵⁶ during the ultrasound protocol and their biodistribution by using histological techniques.

Our preclinical therapeutic protocol is prone to improvements in terms of US parameters (*e.g.*, peak negative pressure, duty cycle, pulse repetitive frequency, exposure period, *etc.*) and gas bubbles (*e.g.*, concentration, composition of MB shell, size, *etc.*). Moreover, further

investigations including the drug biodistribution and pharmacokinetics studies will have to establish that the potentiation of therapeutic efficacy of anti-cancer drugs is positively associated with their increased i.t. accumulation²³. To prove the innocuity of this promising approach, drug biodistribution towards healthy organs ought to be examined and physiological functions of these organs should be evaluated using imaging modalities, histological and blood biochemistry analyses. All these aspects will have to be investigated in orthotopic PC mouse model.

6-Conclusion

In conclusion, we reported that acoustically-mediated Nab-paclitaxel delivery improved the *in-vitro* and *in-vivo* therapeutic effectiveness of paclitaxel in comparison with Nab-paclitaxel treatment on its own. Nevertheless, further developments are still required to potentiate this therapeutic protocol. MB-assisted US could be a great method to enhance the efficiency of current anti-cancer drugs while minimizing the systemic side effects.

7-Acknowledgments

We acknowledge Prof. F.X. Caroli-Bosc (Department of Hepato-gastro-enterology and digestive oncology, CHRU d'Angers, Angers, France), Dr. J.F. Tournamille (Regional Center of Cancerology, Henry Kaplan, CHRU de Tours, Tours, France), Mrs Schubnel and Mr. Aubert (PST Animalerie, Université de Tours). This work was supported by the CANCECEN (DB), FARE-SNFGE (TL), Ligue Contre le Cancer (AB), Inserm (AB) and Cancéropôle Grand-Ouest (TL) grants.

8-Références Bibliographiques

Références de la partie I

1. Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J. W., Comber, H., et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur. J. Cancer* 49, **2013**, 1374–1403.
2. Drees solidarités-santégouv.fr
3. Jain, R. K. Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors. *Adv. Drug Deliv.*, **2001**, Rev. 46, 149–168.
4. Aryal, M., Arvanitis, C. D., Alexander, P. M., and Mcdannold, N. Ultrasound-mediated blood-brain barrier disruption for targeted drug delivery in the central nervous system. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2014**, 72, 94–109.
5. Azagury, A., Khoury, L., Enden, G., and Kost, J. Ultrasound mediated transdermal drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2014**, 72, 127–143
6. Kiessling, F., Fokong, S., Koczera, P., Lederle, W., and Lammers, T. Ultrasound microbubbles for molecular diagnosis, therapy, and theranostics. *J. Nucl. Med.*, **2012**, 53, 345–348.
7. Rychak, J. J., and Klivanov, A. L. Nucleic acid delivery with microbubbles and ultrasound. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2014**, 72, 82–93.
8. Unga, J., and Hashida, M. Ultrasound induced cancer immunotherapy. *Adv. Drug Deliv.*, **2014**, Rev. 72, 144–153.
9. Unger, E., Porter, T., Lindner, J., and Grayburn, P.. Cardiovascular drug delivery with ultrasound and microbubbles. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2014**, 72, 110

10. Lentacker, I., De Cock, I., Deckers, R., De Smedt, S. C., and Moonen, C. T. Understanding ultrasound induced sonoporation: definitions and underlying mechanisms. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2014**, 72, 49–64
11. Hernot, S., and Klibanov, A. L. Microbubbles in ultrasound-triggered drug and gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, 60, 1153–1166.
12. Sirsi, S. R., and Borden, M. A. State-of-the-art materials for ultrasound-triggered drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2014**, 72, 3–14.
13. Postema, M., Van Wamel, A., Ten Cate, F. J., and De Jong, N. High-speed photography during ultrasound illustrates potential therapeutic applications of microbubbles. *Med. Phys.*, **2005**, 32, 3707
14. Kudo, Nobuki, Okada, Kengo & Yamamoto, Katsuyuki. Sonoporation by single-shot pulsed ultrasound with microbubbles adjacent to cells. *Biophys J*, **2009**, 96(12), 4866–4876.
15. WU, JUNRU. Theoretical study on shear stress generated by microstreaming surrounding contrast agents attached to living cells. *Ultrasound Med Biol*, **2002**, 28(1), 125–129.
16. Qiu Y, Zhang C, Tu J, Zhang D Microbubble-induced sonoporation involved in ultrasound-mediated DNA transfection in vitro at low acoustic pressures. *J Biomech*, **2012**, 45:1339–45
17. Doinikov, A. A., and Bouakaz, A. Acoustic microstreaming around an encapsulated particle. *J. Acoust. Soc. Am.*, **2010**, 127, 1218–1227.
18. Ohl CD & Wolfrum B. Detachment and sonoporation of adherent HeLa-cells by shock wave-induced cavitation. *Biochim Biophys Acta*, **2003**, 1624(1-3):131-138.

19. Yang F, et al. Experimental study on cell self-sealing during sonoporation. *J. Control Release.*,**2008**, 131:205–210.
20. Marmottant,, Hilgenfeldt. Controlled vesicle deformation and lysis by single oscillating bubbles. *Nature*, **2003**, 423(6936), 153–156
21. Chen, Shuyuan, Shohet, Ralph, Bekeredjian, Raffi, Frenkel, Peter, Grayburn. Optimization of ultrasound parameters for cardiac gene delivery of adenoviral or plasmid deoxyribonucleic acid by ultrasound-targeted microbubble destruction. *J Am Coll Cardiol*, **2003**, 42(2), 301–308.
22. Van Wamel, Annemieke, Kooiman, Klazina, Harteveld, Miranda, Emmer, Marcia, Ten Cate, Folkert, Versluis, Michel, De Jong, Nico. Vibrating microbubbles poking individual cells : drug transfer into cells via sonoporation. *J Control Release*,**2006**, 112(2), 149–155
23. Zhou, Yun, Shi, Jingyi, Cui, Jianmin, Deng, Cheri X. Effects of extracellular calcium on cell membrane resealing in sonoporation. *J Control Release*,**2008**, 126(1), 34–43.
24. Prentice P, Cuschieri A, Dholakia K, Prausnitz, M, Campbell P, Membrane disruption by optically controlled microbubble cavitation, *Nature Physics*,**2005**, vol. 1, no. 2, pp. 107–110
25. Sundaram J, Mellein BR, Mitragotri S. An experimental and theoretical analysis of ultrasoundinduced permeabilization of cell membranes. *Biophys*,**2003**,. J., 84 : 3087–3101
26. Deng CX, Sieling F, Pan H, Cui J. Ultrasound-induced cell membrane porosity. *Ultrasound Med Biol*,**2004**, 30:519–26

27. Bart H.A.Lammertink, ClemensBos, RoelDeckers, GertStorm, ChritT.W.Moonen1 and Jean-MichelEscoffre.Sonochemotherapy: from bench to beside, *Frontier in pharmacology*,**2015**
28. Ohl Da, Arora M, Ikink R, de Jong N,Versluis M, Delius M, Lohse D. Sonoporation from jetting cavitation bubbles. *Biophys J*, **2006**, 1;91(11):4285-95
29. Forbes MM, Steinberg RL, O'Brien WD Jr, Examination of inertial cavitation of Optison in producing sonoporation of chinese hamster ovary cells. *Ultrasound Med Biol*. **2008** Dec;34(12):2009-18.
30. Price RJ, Skyba DM, Kaul S, Skalak TC. Delivery of colloidal particles and red blood cells to tissue through microvessel ruptures created by targeted microbubble destruction with ultrasound. *Circulation* **1998**; 98: 1264
31. Sheikov N, McDannold N, Sharma S, Hynynen K. Effect of focused ultrasound applied with an ultrasound contrast agent on the tight junctional integrity of the brain microvascular endothelium. *Ultrasound Med Biol* **2008**; 34: 1093-104.
32. Juffermans LJ, van Dijk A, Jongenelen CA, Drukarch B, Reijerkerk A, de Vries HE, *et al*. Ultrasound and microbubble-induced intra- and intercellular bioeffects in primary endothelial cells.
33. Kooiman K, Emmer M, Foppen-Harteveld M, van Wamel A, de Jong N. Increasing the endothelial layer permeability through ultrasoundactivated microbubbles. *IEEE Trans Biomed Eng* **2010**; 57: 29-32.
34. Kaddur K, Lebegue L, Tranquart F, Midoux P, Pichon C, Bouakaz A. Transient transmembrane release of green fluorescent proteins with sonoporation. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*. **2010** Jul;57(7):1558-67.
35. Michael C. Cochran, BS, John R. Eisenbrey, PhD, Michael C. Soulen, MD, Susan M. Schultz, RDMS, Richard O. Ouma, Sarah B. White, MD, Emma E. Furth, MD,

- and Margaret A. Wheatley, PhD. Disposition of ultrasound sensitive polymeric drug carrier in a rat hepatocellular carcinoma model. *Acad Radiol.* **2011** November ; 18(11): 1341–1348
36. Gabizon A, Catane R, Uziely B, et al. Prolonged circulation time and enhanced accumulation in malignant exudates of doxorubicin encapsulated in polyethylene-glycol coated liposomes. *Cancer Res.* **1994**; 54(4):987–992
 37. Nishiyama N, Kataoka K. Current state, achievements, and future prospects of polymeric micelles as nanocarriers for drug and gene delivery. *Pharmacol Ther.* **2006**; 112(3):630–648.
 38. Eisenbrey JR, Burstein OM, Kambhampati R, et al. Development and optimization of a doxorubicin loaded poly(lactic acid) contrast agent for ultrasound directed drug delivery. *J Control Release.* **2010**; 143(1):38–44.
 39. Zhou S, Li S, Liu Z, Tang Y, Wang Z, Gong J, Liu C. Ultrasound-targeted microbubble destruction mediated herpes simplex virus-thymidine kinase gene treats hepatoma in mice. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* **2010**, 29:170
 40. Sakakima Y, Hayashi S, Yagi Y, Hayakawa A, Tachibana K, Nakao A. Gene therapy for hepatocellular carcinoma using sonoporation enhanced by contrast agents. *Cancer Gene Therapy*, 2005;12, 884–889
 41. Yu B-F, Wu J, Zhang Y, Sung H-W, Xie, Li R-K. Ultrasound-targeted HSVtk and Timp3 gene delivery for synergistically enhanced antitumor effects in hepatoma *Cancer Gene Therapy*, **2013**; 20, 290–297.
 42. Liu Q, Hongzhi Z, Wu S, Zhao X, Zhong Y, Lu L, Zheng L. Impact of microbubbles-enhanced ultrasound on liver ethanol ablation. *Ultrasound in Med. & Biol.*, **2013**; Vol. 39, No. 6, pp. 1039–1046.

43. Cho, Y. K., Kim J-K, Kim M-Y, Rhim H, Han J-K. Systematic review of randomized trials for hepatocellular carcinoma treated with percutaneous ablation therapies. *Hepatology*, **2009**; 49(2): 453-459.
44. Hayashi S, Mizuno M, Yoshida J, Nakao A. Effect of sonoporation on cationic liposome-mediated IFN β gene therapy for metastatic hepatic tumors of murine colon cancer. *Cancer Gene Therapy*, **2009**; 16, 638–643
45. Natalya Rapoport Phase-shift, stimuli-responsive perfluorocarbon nanodroplets for drug delivery to cancer. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. **2012**.
46. Kotopoulis S, Delalande A, Popa M, Mamaeva V, Dimceviski G, Gilja O-H, Postema M, Gjertsen B-J, McCormack E. Sonoporation-enhanced chemotherapy significantly reduces primary tumour burden in an orthotopic pancreatic cancer xenograft. *Mol Imaging Biol*, 2013.
47. Dimceviski G, Kotopoulis S, Bjånes T, DagHoemd, Schjøtt J, Gjertsen B-T, Biermann M,, Molven A, Sorbye H,,McCormack E, Postema M, Gilja O-H. A human clinical trial using ultrasound and microbubbles to enhancegemcitabine treatment of inoperable pancreatic cancer. *Journal of Controlled Release* 243,**2016**; 172–181
48. Wang Y, Li Y, Yan K, Shen L, Yang W, Gong J, Ding K. Clinical study of ultrasound and microbubbles for enhancing chemotherapeutic sensitivity of malignant tumors in digestive system. *Chin J Cancer Res*. **2018** ;30(5):553-563.

Références de la partie II

1. Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Dikshit, R.; Eser, S.; Mathers, C.; Rebelo, M.; Parkin, D. M.; Forman, D.; Bray, F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* **2015**, *136*, (5), E359-86.
2. Malvezzi, M.; Bertuccio, P.; Rosso, T.; Rota, M.; Levi, F.; La Vecchia, C.; Negri, E. European cancer mortality predictions for the year 2015: does lung cancer have the highest death rate in EU women? *Ann Oncol* **2015**, *26*, (4), 779-86.
3. Ferlay, J.; Partensky, C.; Bray, F. More deaths from pancreatic cancer than breast cancer in the EU by 2017. *Acta Oncol* **2016**, *55*, (9-10), 1158-1160.
4. Giordano, G.; Pancione, M.; Olivieri, N.; Parcesepe, P.; Velocci, M.; Di Raimo, T.; Coppola, L.; Toffoli, G.; D'Andrea, M. R. Nano albumin bound-paclitaxel in pancreatic cancer: Current evidences and future directions. *World J Gastroenterol* **2017**, *23*, (32), 5875-5886.
5. Von Hoff, D. D.; Ramanathan, R. K.; Borad, M. J.; Laheru, D. A.; Smith, L. S.; Wood, T. E.; Korn, R. L.; Desai, N.; Trieu, V.; Iglesias, J. L.; Zhang, H.; Soon-Shiong, P.; Shi, T.; Rajeshkumar, N. V.; Maitra, A.; Hidalgo, M. Gemcitabine plus nab-paclitaxel is an active regimen in patients with advanced pancreatic cancer: a phase I/II trial. *J Clin Oncol* **2011**, *29*, (34), 4548-54.
6. Von Hoff, D. D.; Ervin, T.; Arena, F. P.; Chiorean, E. G.; Infante, J.; Moore, M.; Seay, T.; Tjulandin, S. A.; Ma, W. W.; Saleh, M. N.; Harris, M.; Reni, M.; Dowden, S.; Laheru, D.; Bahary, N.; Ramanathan, R. K.; Tabernero, J.; Hidalgo, M.; Goldstein, D.; Van Cutsem, E.; Wei, X.; Iglesias, J.; Renschler, M. F. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *N Engl J Med* **2013**, *369*, (18), 1691-703.

7. Conroy, T.; Desseigne, F.; Ychou, M.; Bouche, O.; Guimbaud, R.; Becouarn, Y.; Adenis, A.; Raoul, J. L.; Gourgou-Bourgade, S.; de la Fouchardiere, C.; Bennouna, J.; Bachet, J. B.; Khemissa-Akouz, F.; Pere-Verge, D.; Delbaldo, C.; Assenat, E.; Chauffert, B.; Michel, P.; Montoto-Grillot, C.; Ducreux, M.; Groupe Tumeurs Digestives of, U.; Intergroup, P. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med* **2011**, *364*, (19), 1817-25.
8. Gunturu, K. S.; Yao, X.; Cong, X.; Thumar, J. R.; Hochster, H. S.; Stein, S. M.; Lacy, J. FOLFIRINOX for locally advanced and metastatic pancreatic cancer: single institution retrospective review of efficacy and toxicity. *Med Oncol* **2013**, *30*, (1), 361.
9. Papadatos-Pastos, D.; Thillai, K.; Rabbie, R.; Ross, P.; Sarker, D. FOLFIRINOX - a new paradigm in the treatment of pancreatic cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* **2014**, *14*, (10), 1115-25.
10. Dimcevski, G.; Kotopoulis, S.; Bjanes, T.; Hoem, D.; Schjott, J.; Gjertsen, B. T.; Biermann, M.; Molven, A.; Sorbye, H.; McCormack, E.; Postema, M.; Gilja, O. H. A human clinical trial using ultrasound and microbubbles to enhance gemcitabine treatment of inoperable pancreatic cancer. *J Control Release* **2016**, *243*, 172-181.
11. Zhang, Y.; Chang, S.; Sun, J.; Zhu, S.; Pu, C.; Li, Y.; Zhu, Y.; Wang, Z.; Xu, R. X. Targeted Microbubbles for Ultrasound Mediated Short Hairpin RNA Plasmid Transfection to Inhibit Survivin Gene Expression and Induce Apoptosis of Ovarian Cancer A2780/DDP Cells. *Mol Pharm* **2015**, *12*, (9), 3137-45.
12. Hirabayashi, F.; Iwanaga, K.; Okinaga, T.; Takahashi, O.; Ariyoshi, W.; Suzuki, R.; Sugii, M.; Maruyama, K.; Tominaga, K.; Nishihara, T. Epidermal growth factor receptor-targeted sonoporation with microbubbles enhances therapeutic efficacy in a squamous cell carcinoma model. *PLoS One* **2017**, *12*, (9), e0185293.

13. Sennoga, C. A.; Kanbar, E.; Auboire, L.; Dujardin, P. A.; Fouan, D.; Escoffre, J. M.; Bouakaz, A. Microbubble-mediated ultrasound drug-delivery and therapeutic monitoring. *Expert Opin Drug Deliv* **2017**, *14*, (9), 1031-1043.
14. Shpak, O.; Verweij, M.; de Jong, N.; Versluis, M. Droplets, Bubbles and Ultrasound Interactions. *Adv Exp Med Biol* **2016**, *880*, 157-74.
15. Doinikov, A. A.; Bouakaz, A. Acoustic microstreaming around a gas bubble. *J Acoust Soc Am* **2010**, *127*, (2), 703-9.
16. Wu, J. Theoretical study on shear stress generated by microstreaming surrounding contrast agents attached to living cells. *Ultrasound Med Biol* **2002**, *28*, (1), 125-9.
17. Junge, L.; Ohl, C. D.; Wolfrum, B.; Arora, M.; Ikink, R. Cell detachment method using shock-wave-induced cavitation. *Ultrasound Med Biol* **2003**, *29*, (12), 1769-76.
18. Ohl, C. D.; Wolfrum, B. Detachment and sonoporation of adherent HeLa-cells by shock wave-induced cavitation. *Biochim Biophys Acta* **2003**, *1624*, (1-3), 131-8.
19. Ohl, C. D.; Arora, M.; Ikink, R.; de Jong, N.; Versluis, M.; Delius, M.; Lohse, D. Sonoporation from jetting cavitation bubbles. *Biophys J* **2006**, *91*, (11), 4285-95.
20. Postema, M.; van Wamel, A.; ten Cate, F. J.; de Jong, N. High-speed photography during ultrasound illustrates potential therapeutic applications of microbubbles. *Med Phys* **2005**, *32*, (12), 3707-11.
21. Lentacker, I.; De Cock, I.; Deckers, R.; De Smedt, S. C.; Moonen, C. T. Understanding ultrasound induced sonoporation: definitions and underlying mechanisms. *Adv Drug Deliv Rev* **2014**, *72*, 49-64.
22. Zeghimi, A.; Escoffre, J. M.; Bouakaz, A. Role of endocytosis in sonoporation-mediated membrane permeabilization and uptake of small molecules: a electron microscopy study. *Phys Biol* **2015**, *12*, (6), 066007.

23. Lammertink, B. H.; Bos, C.; Deckers, R.; Storm, G.; Moonen, C. T.; Escoffre, J. M. Sonochemotherapy: from bench to bedside. *Front Pharmacol* **2015**, *6*, 138.
24. Kotopoulis, S.; Delalande, A.; Popa, M.; Mamaeva, V.; Dimcevski, G.; Gilja, O. H.; Postema, M.; Gjertsen, B. T.; McCormack, E. Sonoporation-enhanced chemotherapy significantly reduces primary tumour burden in an orthotopic pancreatic cancer xenograft. *Mol Imaging Biol* **2014**, *16*, (1), 53-62.
25. Yu, M. H.; Lee, J. Y.; Kim, H. R.; Kim, B. R.; Park, E. J.; Kim, H. S.; Han, J. K.; Choi, B. I. Therapeutic Effects of Microbubbles Added to Combined High-Intensity Focused Ultrasound and Chemotherapy in a Pancreatic Cancer Xenograft Model. *Korean J Radiol* **2016**, *17*, (5), 779-88.
26. Kotopoulis, S.; Dimcevski, G.; Gilja, O. H.; Hoem, D.; Postema, M. Treatment of human pancreatic cancer using combined ultrasound, microbubbles, and gemcitabine: a clinical case study. *Med Phys* **2013**, *40*, (7), 072902.
27. Neesse, A.; Michl, P.; Tuveson, D. A.; Ellenrieder, V. nab-Paclitaxel: novel clinical and experimental evidence in pancreatic cancer. *Z Gastroenterol* **2014**, *52*, (4), 360-366.
28. Arthuis, C. J.; Novell, A.; Escoffre, J. M.; Patat, F.; Bouakaz, A.; Perrotin, F. New insights into uteroplacental perfusion: quantitative analysis using Doppler and contrast-enhanced ultrasound imaging. *Placenta* **2013**, *34*, (5), 424-31.
29. Escoffre, J. M.; Novell, A.; Serriere, S.; Lecomte, T.; Bouakaz, A. Irinotecan delivery by microbubble-assisted ultrasound: in vitro validation and a pilot preclinical study. *Mol Pharm* **2013**, *10*, (7), 2667-75.
30. Schneider, M.; Anantharam, B.; Arditì, M.; Bokor, D.; Broillet, A.; Bussat, P.; Fouillet, X.; Frinking, P.; Tardy, I.; Terrettaz, J.; Senior, R.; Tranquart, F. BR38, a new ultrasound blood pool agent. *Invest Radiol* **2011**, *46*, (8), 486-94.

31. Escoffre, J. M.; Bellard, E.; Faurie, C.; Sebai, S. C.; Golzio, M.; Teissie, J.; Rols, M. P. Membrane disorder and phospholipid scrambling in electroporabilized and viable cells. *Biochim Biophys Acta* **2014**, *1838*, (7), 1701-9.
32. Mukherjee, P.; S.S.P., N.; Kessler, J. A.; Espinosa, H. D. Combined Numerical and Experimental Investigation of Localized Electroporation-Based Cell Transfection and Sampling. *ACS Nano* **2018**, *12*, (12), 12118-12128.
33. Zeghimi, A.; Novell, A.; Thepault, R. A.; Vourc'h, P.; Bouakaz, A.; Escoffre, J. M. Serum influence on in-vitro gene delivery using microbubble-assisted ultrasound. *J Drug Target* **2014**, *22*, (8), 748-60.
34. Escoffre, J. M.; Piron, J.; Novell, A.; Bouakaz, A. Doxorubicin delivery into tumor cells with ultrasound and microbubbles. *Mol Pharm* **2011**, *8*, (3), 799-806.
35. Dagher, J.; Delahunt, B.; Rioux-Leclercq, N.; Egevad, L.; Coughlin, G.; Dungleison, N.; Gianduzzo, T.; Kua, B.; Malone, G.; Martin, B.; Preston, J.; Pokorny, M.; Wood, S.; Samaratunga, H. Assessment of tumour-associated necrosis provides prognostic information additional to World Health Organization/International Society of Urological Pathology grading for clear cell renal cell carcinoma. *Histopathology* **2019**, *74*, (2), 284-290.
36. Figiel, S.; Vasseur, C.; Bruyere, F.; Rozet, F.; Maheo, K.; Fromont, G. Clinical significance of epithelial-mesenchymal transition markers in prostate cancer. *Hum Pathol* **2017**, *61*, 26-32.
37. Perrouin Verbe, M. A.; Bruyere, F.; Rozet, F.; Vandier, C.; Fromont, G. Expression of store-operated channel components in prostate cancer: the prognostic paradox. *Hum Pathol* **2016**, *49*, 77-82.
38. Escoffre, J. M.; Derieppe, M.; Lammertink, B.; Bos, C.; Moonen, C. Microbubble-Assisted Ultrasound-Induced Transient Phosphatidylserine Translocation. *Ultrasound Med Biol* **2017**, *43*, (4), 838-851.

39. van Rooij, T.; Skachkov, I.; Beekers, I.; Lattwein, K. R.; Voorneveld, J. D.; Kokhuis, T. J. A.; Bera, D.; Luan, Y.; van der Steen, A. F. W.; de Jong, N.; Kooiman, K. Viability of endothelial cells after ultrasound-mediated sonoporation: Influence of targeting, oscillation, and displacement of microbubbles. *J Control Release* **2016**, *238*, 197-211.
40. Derieppe, M.; de Senneville, B. D.; H., K.; Moonen, C.; Bos, C. Tracking of cell nuclei for assessment of in vitro uptake kinetics in ultrasound-mediated drug delivery using fibered confocal fluorescence microscopy. *Mol Imaging Biol* **2014**, *16*, (5), 642-51.
41. Juffermans, L. J.; van Dijk, A.; Jongenelen, C. A.; Drukarch, B.; Reijerkerk, A.; de Vries, H. E.; Kamp, O.; Musters, R. J. Ultrasound and microbubble-induced intra- and intercellular bioeffects in primary endothelial cells. *Ultrasound Med Biol* **2009**, *35*, (11), 1917-27.
42. Geers, B.; Lentacker, I.; Alonso, A.; Sanders, N. N.; Demeester, J.; Meairs, S.; De Smedt, S. C. Elucidating the mechanisms behind sonoporation with adeno-associated virus-loaded microbubbles. *Mol Pharm* **2011**, *8*, (6), 2244-51.
43. De Cock, I.; Zagato, E.; Braeckmans, K.; Luan, Y.; de Jong, N.; De Smedt, S. C.; Lentacker, I. Ultrasound and microbubble mediated drug delivery: acoustic pressure as determinant for uptake via membrane pores or endocytosis. *J Control Release* **2015**, *197*, 20-8.
44. Meijering, B. D.; Juffermans, L. J.; van Wamel, A.; Henning, R. H.; Zuhorn, I. S.; Emmer, M.; Versteilen, A. M.; Paulus, W. J.; van Gilst, W. H.; Kooiman, K.; de Jong, N.; Musters, R. J.; Deelman, L. E.; Kamp, O. Ultrasound and microbubble-targeted delivery of macromolecules is regulated by induction of endocytosis and pore formation. *Circ Res* **2009**, *104*, (5), 679-87.

45. Derieppe, M.; Yudina, A.; Lepetit-Coiffe, M.; de Senneville, B. D.; Bos, C.; Moonen, C. Real-time assessment of ultrasound-mediated drug delivery using fibered confocal fluorescence microscopy. *Mol Imaging Biol* **2013**, *15*, (1), 3-11.
46. Afadzi, M.; Strand, S. P.; Nilssen, E. A.; Masoy, S. E.; Johansen, T. F.; Hansen, R.; Angelsen, B. A.; Davies, L. C. Mechanisms of the ultrasound-mediated intracellular delivery of liposomes and dextrans. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control* **2013**, *60*, (1), 21-33.
47. Li, T.; Tachibana, K.; Kuroki, M.; Kuroki, M. Gene transfer with echo-enhanced contrast agents: comparison between Albunex, Optison, and Levovist in mice--initial results. *Radiology* **2003**, *229*, (2), 423-8.
48. Kudo, N.; Okada, K.; Yamamoto, K. Sonoporation by single-shot pulsed ultrasound with microbubbles adjacent to cells. *Biophys J* **2009**, *96*, (12), 4866-76.
49. Escoffre, J. M.; Novell, A.; Piron, J.; Zeghimi, A.; Doinikov, A.; Bouakaz, A. Microbubble attenuation and destruction: are they involved in sonoporation efficiency? *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control* **2013**, *60*, (1), 46-52.
50. Dadi, N.; Stanley, M.; Shahda, S.; O'Neil, B. H.; Sehdev, A. Impact of Nab-Paclitaxel-based Second-line Chemotherapy in Metastatic Pancreatic Cancer. *Anticancer Res* **2017**, *37*, (10), 5533-5539.
51. Yan, F.; Li, L.; Deng, Z.; Jin, Q.; Chen, J.; Yang, W.; Yeh, C. K.; Wu, J.; Shandas, R.; Liu, X.; Zheng, H. Paclitaxel-liposome-microbubble complexes as ultrasound-triggered therapeutic drug delivery carriers. *J Control Release* **2013**, *166*, (3), 246-55.
52. Ting, C. Y.; Fan, C. H.; Liu, H. L.; Huang, C. Y.; Hsieh, H. Y.; Yen, T. C.; Wei, K. C.; Yeh, C. K. Concurrent blood-brain barrier opening and local drug delivery using drug-carrying microbubbles and focused ultrasound for brain glioma treatment. *Biomaterials* **2012**, *33*, (2), 704-12.

53. Snipstad, S.; Berg, S.; Morch, Y.; Bjorkoy, A.; Sulheim, E.; Hansen, R.; Grimstad, I.; van Wamel, A.; Maaland, A. F.; Torp, S. H.; Davies, C. L. Ultrasound Improves the Delivery and Therapeutic Effect of Nanoparticle-Stabilized Microbubbles in Breast Cancer Xenografts. *Ultrasound Med Biol* **2017**, *43*, (11), 2651-2669.
54. Mullick Chowdhury, S.; Lee, T.; Willmann, J. K. Ultrasound-guided drug delivery in cancer. *Ultrasonography* **2017**, *36*, (3), 171-184.
55. Lin, C. Y.; Tseng, H. C.; Shiu, H. R.; Wu, M. F.; Chou, C. Y.; Lin, W. L. Ultrasound sonication with microbubbles disrupts blood vessels and enhances tumor treatments of anticancer nanodrug. *Int J Nanomedicine* **2012**, *7*, 2143-52.
56. Derieppe, M.; Escoffre, J. M.; Denis de Senneville, B.; van Houtum, Q.; Rijbroek, A.; van der Wurff-Jacobs, K.; Dubois, L.; Bos, C.; Moonen, C. Assessment of Intratumoral Doxorubicin Penetration after Mild Hyperthermia-Mediated Release from Thermosensitive Liposomes. *Contrast Media Mol Imaging* **2019**, *2019*, 2645928.

9 – Tableaux et figures

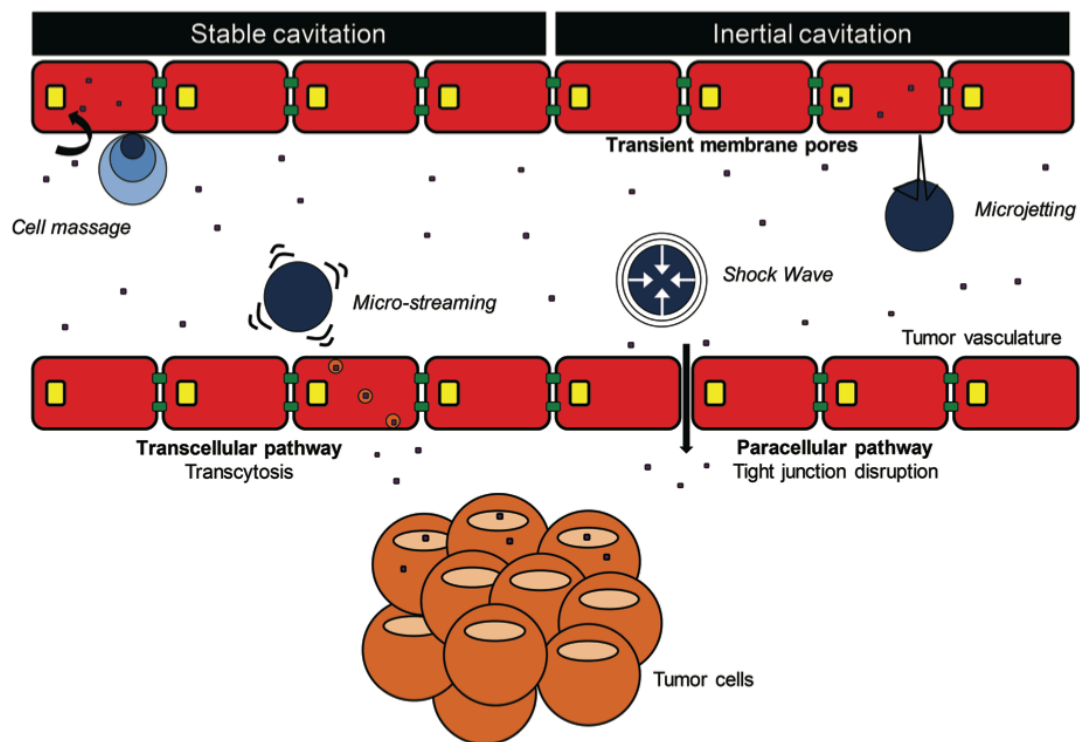


Figure 1 : Mécanismes d'action de la sonoporation : les différents comportements des microbulles et le passage moléculaire, d'après Lammertink et al, 2015

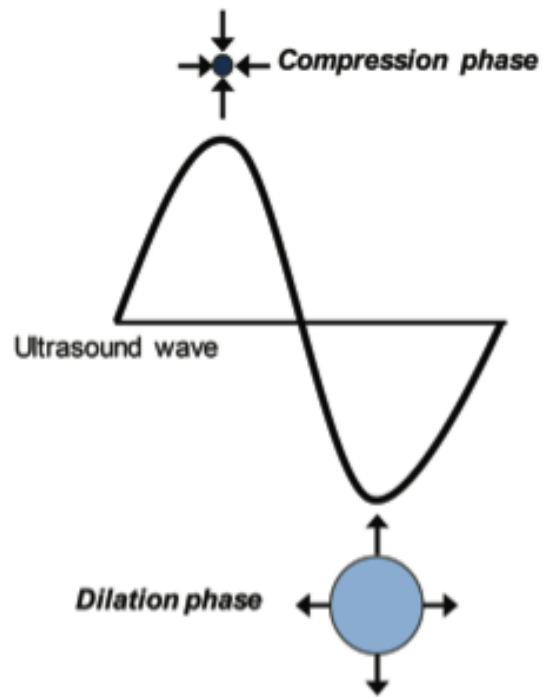


Figure 2 : Comportement de la microbulle sous l'effet des ultrasons, d'après Lammertink et al, 2015²⁷.

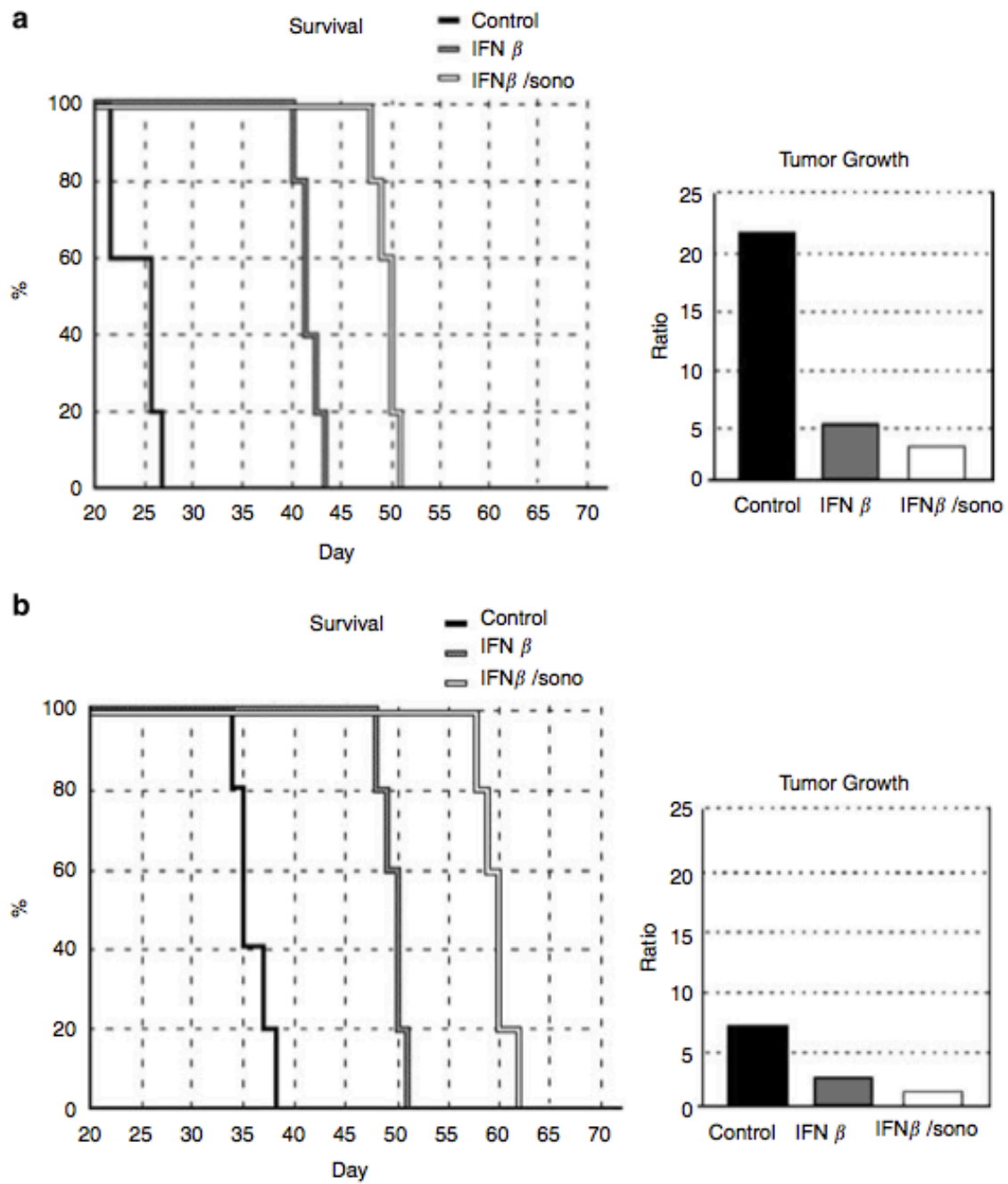


Figure 3 : Effet de la sonoporation du liposome INFbeta dans un modèle de métastases hépatiques de cancer colorectal d'après Hayashi et al, 2009⁴⁴.

a- Moyenne de survie

b- Combinaison avec le traitement par cisplatine

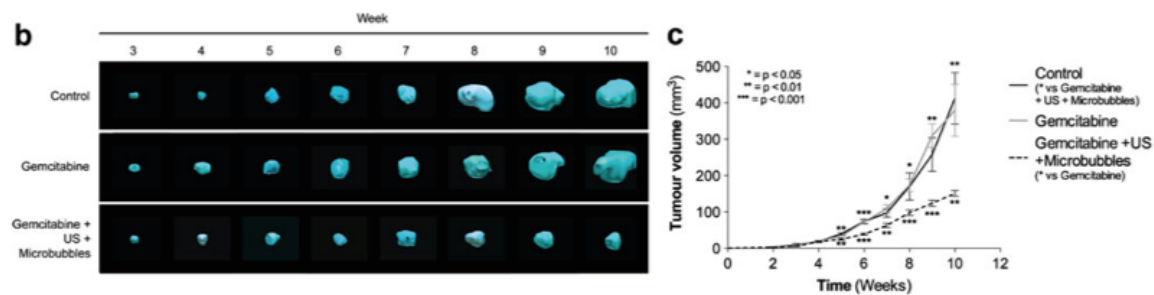


Figure 4 : Volume tumoral des différents groupes de traitement selon les semaines de traitement d'après Kotopoulis et al, 2013⁴⁶.

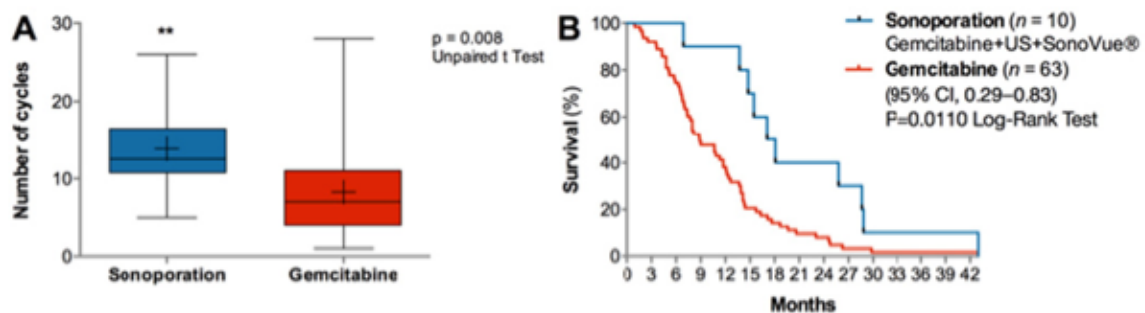


Figure 5 : Nombre de cycles de chimiothérapie (A) et survie (B) dans les deux groupes de traitement : sonoporation + gemcitabine et gemcitabine seule, d'après Dimcevski et al, 2016⁴⁷.

Table 1. Design of experimental groups

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6	Group 7
Nab-paclitaxel	-	-	5 mg/kg	5 mg/kg	20 mg/kg	20 mg/kg	20 mg/kg
BG8214	-	+	-	+	-	+	-
BG8610	-	-	-	-	-	-	+
US	-	+	-	+	-	+	+

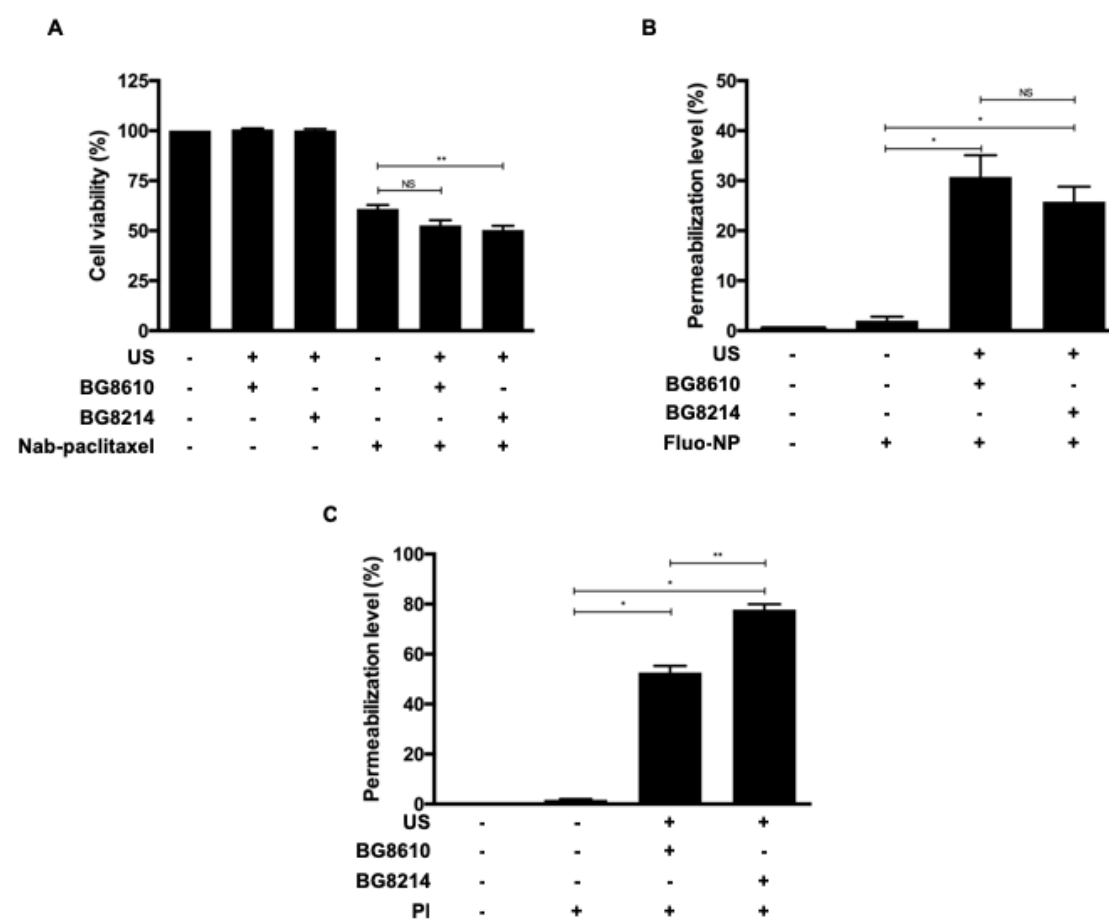


Figure 6. Acoustically-mediated Nab-paclitaxel delivery in BxPC3.

BxPC3 cells were treated with Nab-paclitaxel (130 nm in diameter), fluorescent nanoparticles (130 nm in diameter) or propidium iodide (hydrodynamic radius ~0.6 nm) on its own or combined with US and BG8214 or BG8610 microbubbles. Seventy-two hours later, cell viability was assessed using MTT assay (A). The intracellular uptake of fluorescent nanoparticles (B) and propidium iodide (C) was examined by flow cytometry 10 min after molecular delivery. These results were expressed as mean \pm SEM of five independent experiments. Significance was defined as $p < 0.05$ (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; Mann-Whitney test).

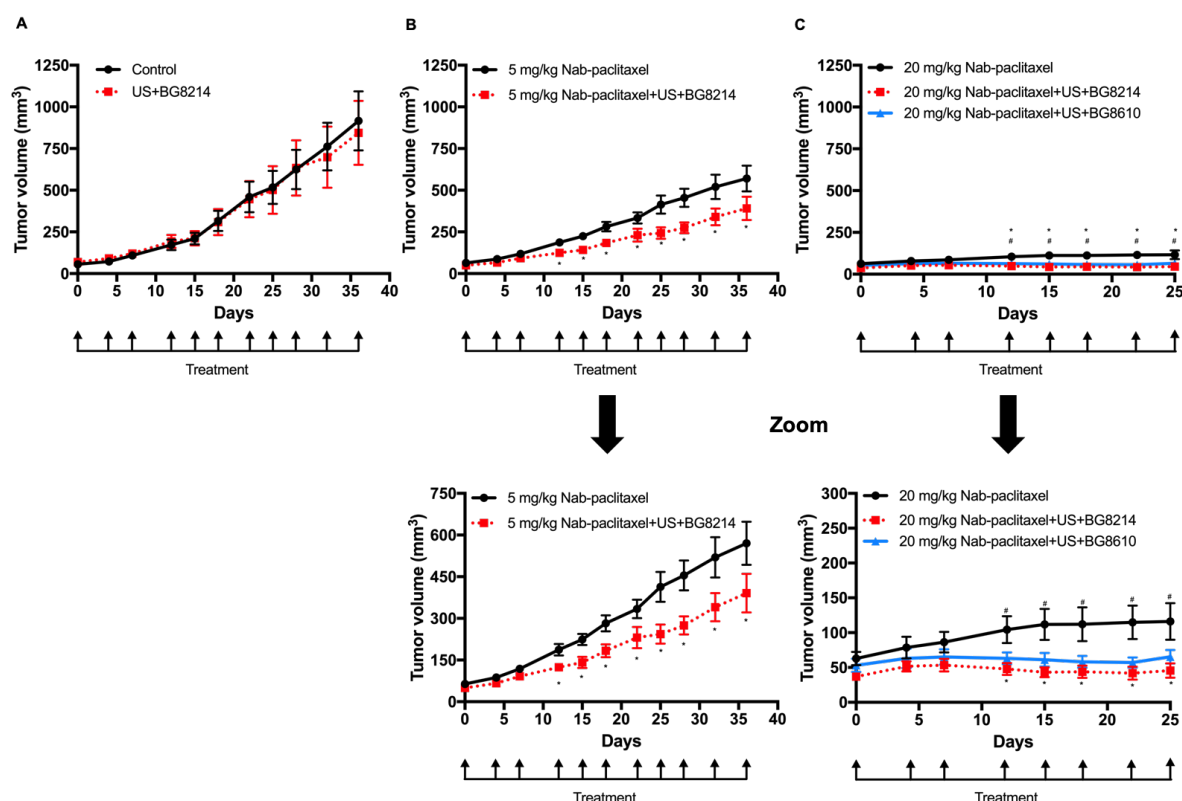
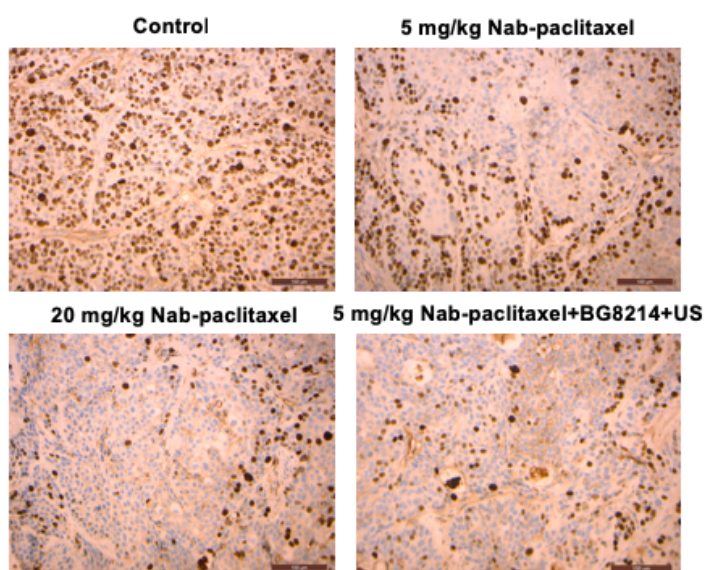


Figure 7. Acoustically-mediated Nab-paclitaxel delivery in subcutaneous BxPC3 tumors. Tumors were treated either by MB-assisted US on its own (Group 2) (A), or by i.v. injection of one Nab-paclitaxel dose at 5 mg/kg of alone (Group 3) or combined with BG8214 MB-assisted US (Group 4) (B), by i.v. delivery of one Nab-paclitaxel dose at 20 mg/kg on its own

(Group 5) or combined with MB-assisted US using BG8214 (Group 6) or BG8610 (Group 7) MBs (C). The tumor volume was monitored using anatomical US imaging every 3 day before the treatment. These results were expressed as mean \pm SEM of 8-9 tumors. Significance was defined as $p < 0.05$ (* $p < 0.05$; # $p < 0.05$; Mann-Whitney test).

A



B

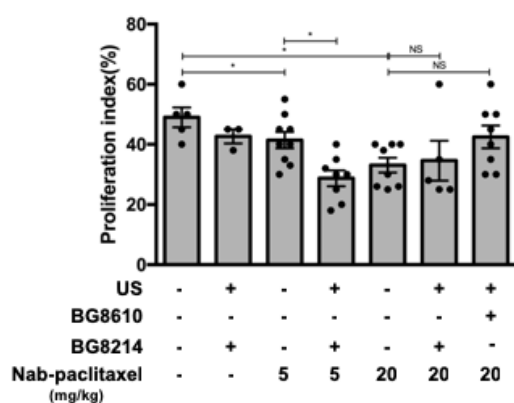


Figure 8. Proliferation staining using Ki-67 immunohistochemistry of BxPC3 tumor sections. (A) Representative images of BxPC3 tumors where significant difference in proliferation index was detected between these groups. (B) Quantitative analysis of tumor proliferation.

These results were expressed as mean \pm SEM of 5-9 tumors. Significance was defined as $p < 0.05$ (* $p < 0.05$; Mann-Whitney test).

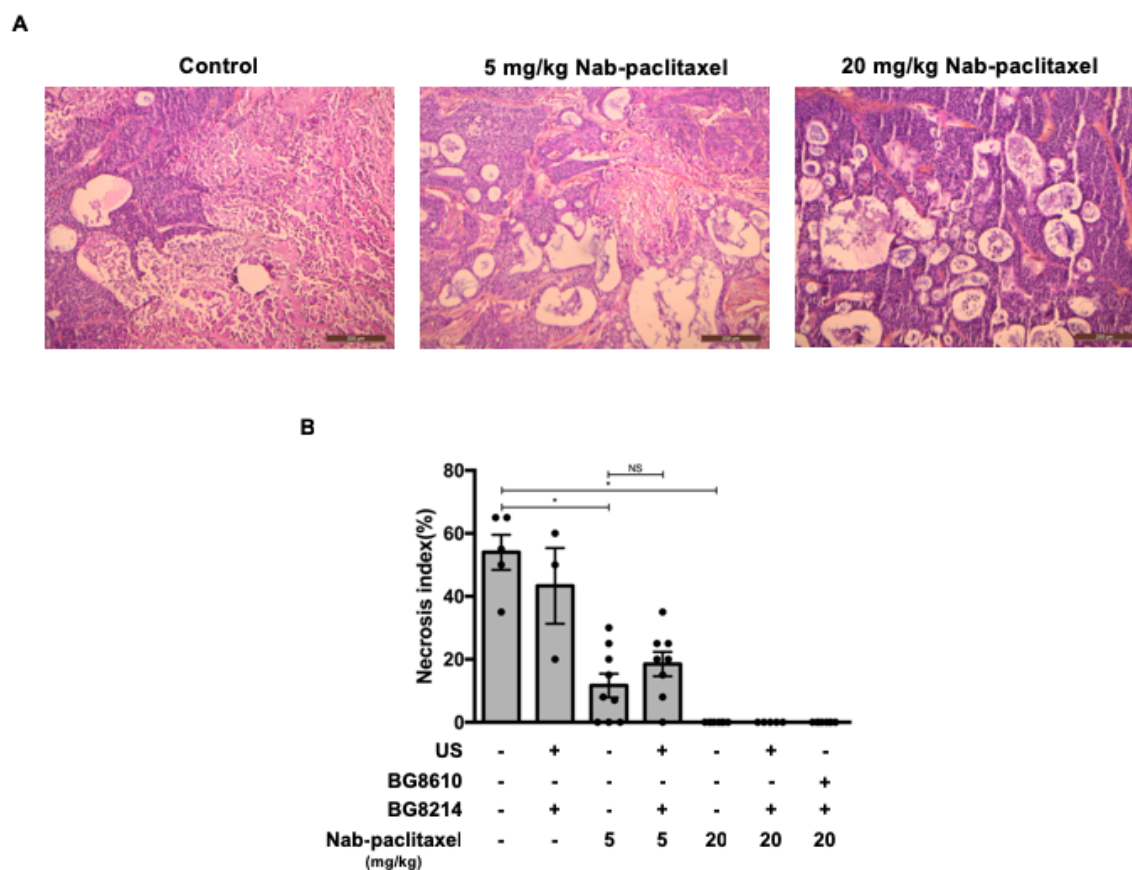


Figure 9. Assessment of tumor necrosis using H&E staining of BxPC3 tumor sections. (A) Representative images of BxPC3 tumors where significant difference in necrosis index was detected between these groups. (B) Quantitative analysis of tumor necrosis. These results were expressed as mean \pm SEM of 5-9 tumors. Significance was defined as $p < 0.05$ (* $p < 0.05$; Mann-Whitney test).

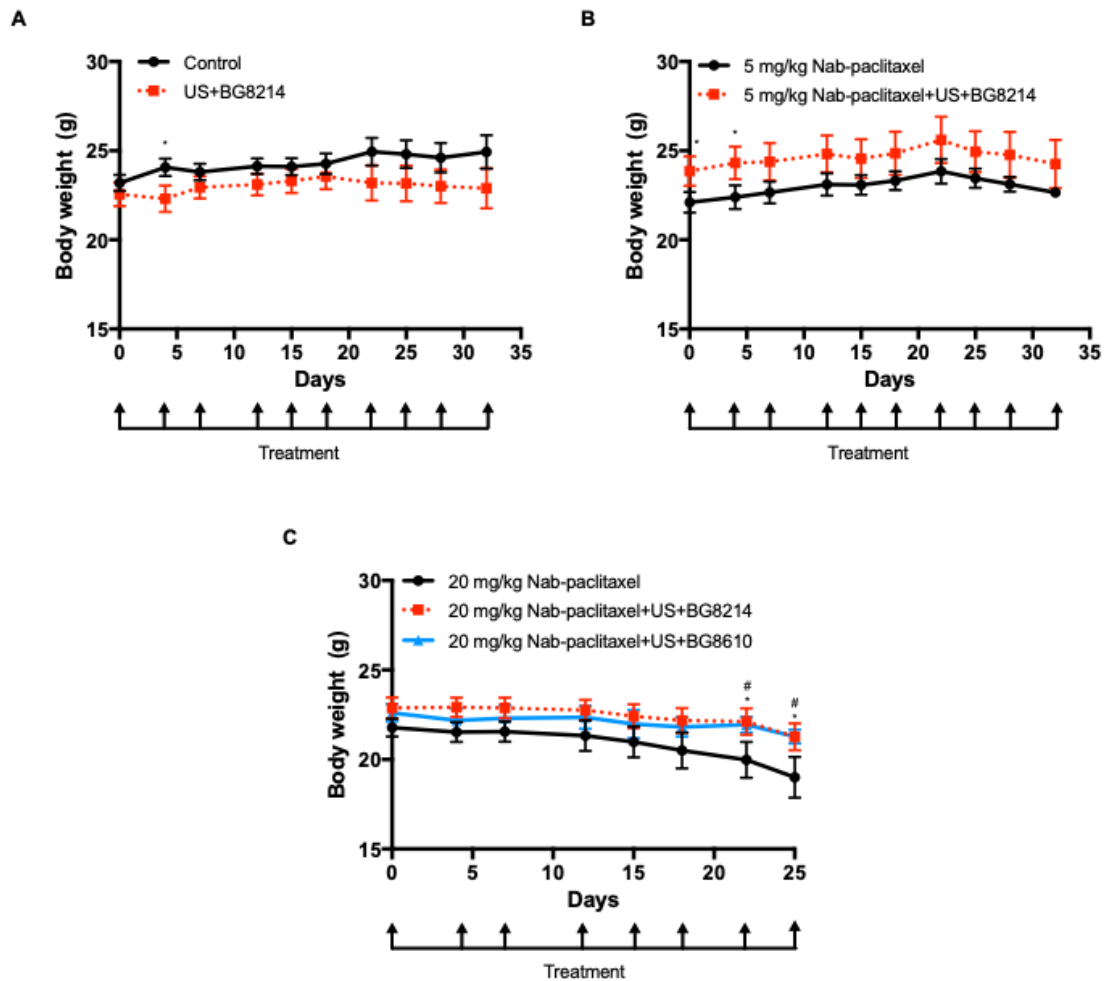


Figure 10. Effect(s) of *in-vivo* acoustically-mediated Nab-paclitaxel delivery on mouse body weight. These results were expressed as mean \pm SEM of 8-10 mice. Significance was defined as $p < 0.05$ (* $p < 0.05$; # $p < 0.05$; Mann-Whitney test).

Vu, le Directeur de Thèse

Pr T. LECOMTE
n° RPPS 10001456002
Gastro-Entérologie et Oncologie Digestive
Hôpital TROUSSEAU - 37044 TOURS CEDEX 9

Vu, le Doyen
De la Faculté de Médecine de Tours
Tours, le

Bressand-Falewee Diane

77 pages – 1 tableau – 10 figures

Résumé : Amélioration de la délivrance du Nab-paclitaxel par la sonoporation sur des tumeurs pancréatiques humaines : étude in-vitro et in-vivo.

Introduction : Malgré les récentes avancées dans la chimiothérapie du cancer du pancréas, le pronostic de ce cancer reste sombre avec une survie globale à 5 ans tous stades confondus de l'ordre de 5 %. La mauvaise biodisponibilité intra-tumorale des chimiothérapies prescrites dans ce cancer, explique en partie ces mauvais résultats. Une technique thérapeutique prometteuse utilisant des microbulles de gaz et des ultrasons dénommée sonoporation s'est développée dans le but d'augmenter la délivrance ciblée intra-tumorale des médicaments.

Matériels et méthodes :

In-vitro : La chimiothérapie par Nab-paclitaxel (NP) à la concentration de 2.5 ng/mL était administrée sur des cellules tumorale BxPC3 en suspension. Les paramètres ultrasonore étaient les suivant : pression 400 kPa, fréquence 1 Mhz, exposition aux ultrasons pendant 30 secondes. Le test de viabilité cellulaire utilisé était le test MTT.

In-vivo : Des souris Balb/c nude ont été inoculées bilatéralement avec 5.10^6 cellules BxPC-3. Les souris étaient randomisées en différents groupes : sérum physiologique, NP 20 mg/kg, NP 20 mg/kg + sonoporation, NP 5mg/kg , NP 5mg/kg + sonoporation.

Résultats : In vitro, la viabilité cellulaire était diminuée avec la sonoporation du NP en comparaison au NP seul $p < 0,01$. In vitro, la croissance tumorale était significativement ralentie dans les groupes sonoporation + NP. Il n'y avait pas de toxicité dans les groupes sonoporation

Conclusion : La sonoporation du NP est une méthode prometteuse pour améliorer l'efficacité thérapeutique du NP dans l'adénocarcinome pancréatique

Mots clés : Pneumopathies d'hypersensibilité, NO exhalé, lymphocytose

Jury :

Président du Jury :	Professeur Claude LINASSIER
Directeur de thèse :	Professeur Thierry LECOMTE
Membres du Jury :	Professeur Gaëlle FROMONT- HANKARD
	Professeur Driffa MOUSSATA
	Professeur Frédéric PATAT
	Docteur Jean-Michel ESCOFFRE

Date de soutenance : 11 septembre 2019