

Délivrance de molécules thérapeutiques par sonoporation dans un modèle murin de métastases hépatiques de cancer colorectal

Marie Roy, Sophie Serrière, Jean-Michel Escoffre

▶ **To cite this version:**

Marie Roy, Sophie Serrière, Jean-Michel Escoffre. Délivrance de molécules thérapeutiques par sonoporation dans un modèle murin de métastases hépatiques de cancer colorectal. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Tours (UT), Tours, FRA, 2024. Français. ⟨NNT : ⟩. ⟨tel-04852326⟩

HAL Id: tel-04852326

https://inserm.hal.science/tel-04852326v1

Submitted on 20 Dec 2024

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

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



Distributed under a Creative Commons CC BY-NC-ND 4.0 - Attribution - Non-commercial use - No Derivative Works - International License

UNIVERSITÉ DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE : Santé Sciences Biologiques et Chimie du Vivant

Université de Tours, INSERM, Imaging Brain & Neuropsychiatry, iBraiN U1253

THÈSE présentée par :

Marie ROY

soutenue le : **10 décembre 2024**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Tours**
Discipline/ Spécialité : Cancérologie

Délivrance de molécules thérapeutiques par sonoporation dans un modèle murin de métastases hépatiques de cancer colorectal

THÈSE co-dirigée par :

Dr. ESCOFFRE Jean-Michel	CR, UMR 1253, Université de Tours, Inserm
Dr. SERRIÈRE Sophie	IR, UMR 1253, Université de Tours, Inserm

RAPPORTEURS :

Dr. GOLZIO Muriel	DR, UMR 5089, Université Paul-Sabatier, CNRS
Dr. TAULIER Nicolas	DR, UMR 7371-1146, Sorbonne Université, CNRS, Inserm

---

JURY :

Dr. ESCOFFRE Jean-Michel	CR, UMR 1253, Université de Tours, Inserm
Dr. SERRIÈRE Sophie	IR, UMR 1253, Université de Tours, Inserm
Dr. GOLZIO Muriel	DR, UMR 5089, Université Paul-Sabatier, CNRS
Dr. TAULIER Nicolas	DR, UMR 7371-1146, Sorbonne Université, CNRS, Inserm
Dr. BERTHON-WALKER Béatrice	CR, UMR 8063-1273, Université PSL, CNRS, Inserm
Pr. VANDIER Christophe	PU, UMR 1069, Université de Tours, Inserm

Remerciements

Je tiens à remercier les membres du jury pour l'attention qu'ils ont portée à mon travail de thèse, pour leur disponibilité et leur bienveillance. Je remercie la Dr. Muriel Golzio, Directrice de Recherche à l'IPBS (Institute of Pharmacology and Structural Biology) à Toulouse, et le Dr. Nicolas Taulier, Directeur de Recherche au Laboratoire d'Imagerie Biomédicale à Sorbonne Université, Paris, d'avoir accepté de relire ce travail. Je remercie également les examinateurs, la Dr. Béatrice Berthon-Walker, Chargée de recherche au Laboratoire Physique pour la Médecine à l'ESPCI Paris, et le Pr. Christophe Vandier, Directeur du laboratoire N2Cox à Tours.

Je tiens à remercier la Ligue contre le cancer et à la Région Centre Val de Loire pour le financement de ces travaux de thèse.

Je remercie le Dr Ayache Bouakaz de m'avoir accueillie au sein de son équipe.

Sophie et Jean-Michel, je tiens tout particulièrement à vous remercier pour votre encadrement au cours de ces trois années. Merci pour votre disponibilité, votre confiance et votre complémentarité. Je me répète, mais je suis pleinement consciente de la chance que j'ai eue de vous avoir. Si cette thèse a été une si belle aventure pour moi, c'est en grande partie grâce à vous, merci.

Damien, merci pour tous les codes que tu as écrits pour moi, que ce soit pour mesurer automatiquement l'aire des sphéroïdes, pour la segmentation des foies ou pour l'optimisation du timing des manips *in vivo*. Merci pour le temps que tu m'as consacré.

Edward, merci de m'avoir transmis ton expertise en chirurgie, ainsi que pour tous tes conseils au laboratoire. Ton aide a été précieuse.

Concernant la partie *in vivo* de ces travaux de thèse, je tiens à remercier également Sylvie et Valérie pour votre soutien lors des manips. Ce fut un plaisir de travailler avec vous.

Coralie, tu as marqué mes premiers jours au laboratoire par ton accueil chaleureux. Merci pour ton temps et pour les analyses histologiques sur les foies de souris.

Dévina, je te remercie pour ton accueil, tes conseils et ton soutien, que ce soit en culture cellulaire ou lors de la rédaction de ma thèse.

Coco, je suis très heureuse de t'avoir rencontré durant ma thèse. Nous avons partagé nos joies et nos peines de doctorants. Merci pour nos discussions scientifiques (et autres !) et bien sûr pour les caractérisations des transducteurs en début de thèse, qui se sont terminées en pool party en salle laser…

Fabrice et Iyad, merci de m'avoir acceptée dans votre bureau... Merci pour votre bienveillance, et pour votre CALME et SILENCE durant la rédaction de ma thèse. Fabrice, je suis heureuse d'avoir pu te transmettre mes connaissances sur 3D slicer, et Iyad, mes compétences en raccourcis clavier… Bon, alors, médianes ou moyennes ?

Sandrine, merci de m'avoir écoutée raconter ma vie de doctorante…, de m'avoir montré la chirurgie sur les brebis, et pour ce congrès prolongé à Rotterdam.

Jean-Yves, merci pour la fabrication des dispositifs ultrasonores adaptés aux sphéroïdes.

Stéphanie, merci pour toutes ces commandes passées, ces réservations d'hôtels et de billets de train qui m'ont permis d'aller en congrès sereinement. Merci pour ta bonne humeur, ton accueil et nos discussions.

Je remercie l'ensemble de mon équipe pour m'avoir accueillie durant la thèse. Un grand merci aux doctorants de l'équipe, Arthur et Karen, pour les moments partagés. Je vous souhaite une belle fin de thèse et une belle réussite.

Zuhal, merci pour la relecture de la thèse. Aucune (ou presque) faute de français ne t'échappe !

Je remercie les stagiaires Ascelin, Millie et Romain, que j'ai eu la chance d'encadrer et à qui j'ai pu faire découvrir le petit monde des sphéroïdes. Merci pour votre confiance et votre implication.

Thierry Dupont, merci pour nos échanges sur l'analyse des données *in vivo*. Ils m'ont permis d'apporter un regard différent sur mes résultats et de mener l'analyse à son terme.

Je tiens à remercier mes parents, Christine et Jean-Guy, pour tout. Papa, tu m'as transmis depuis toute petite cette curiosité scientifique. Merci de m'avoir gentiment encouragée à faire un bac scientifique, de m'avoir donné les moyens de poursuivre mes études à Tours, Clermont-Ferrand, Paris, Montréal… et pour toutes les fois où vous avez répondu à mes appels à l'aide durant mes années étudiantes. C'est grâce à votre soutien que j'ai pu vivre ma thèse dans les meilleures conditions. Merci d'avoir toujours cru en moi et pour tout votre amour, qui rend ma vie si douce.

Merci à mes frères, Valentin et Paul, ainsi qu'à mes belles-sœurs, Hélèna et Allison, et à mes deux petits amours, Issa et Maryam. Merci pour votre soutien, vos conseils, votre écoute et tous ces bons moments partagés.

Je tiens à remercier mon grand-père pour sa présence tout au long de ma thèse et l'intérêt qu'il a porté à mon travail. Merci infiniment d'avoir assisté à ma soutenance, c'était un honneur. Bien sûr, mes pensées vont également à mes grands-mères et à Grand-Papa. Malgré leur absence, ils sont toujours avec moi.

Merci à ma belle-famille pour votre soutien et votre présence à la soutenance. Votre présence a été une grande force pour moi.

Merci à mes amies. J’ai beaucoup de chance de vous avoir et de pouvoir compter sur vous. Marie et Louise, même si la vie nous éloigne, depuis toutes petites, vous êtes là et m’apportez tant ! Louise et Marie-Laure, merci pour tous ces moments de déconnexion en Auvergne, à la mer, à Dublin, et pour tous nos débats ponctués et conjugués…

Stéphane, merci pour ton soutien quotidien, et plus particulièrement pour ton aide dans la préparation de mes présentations en anglais (yes, of course). Merci pour tous ces moments de décompression, ta bienveillance, tes conseils avisés et ton amour.

À toutes celles et ceux qui ont croisé mon chemin durant ces années et ont contribué de près ou de loin à ce travail, je vous adresse mes sincères remerciements.

Table des matières

Liste des figures ____ *i*

Liste des tableaux ____ *iii*

Abréviations ____ *iv*

Chapitre I. Introduction ____ *1*

I.I. Le cancer colorectal et ses métastases hépatiques ____ **3**
I.1. Épidémiologie, dépistage et facteurs de risques du cancer colorectal ____ 3
I.2. Symptômes et Diagnostic ____ 4
I.3. Les stades du cancer colorectal ____ 4
I.4. Traitements du cancer colorectal ____ 6
I.4.1 Chirurgie ____ 6
I.4.2 Chimiothérapie ____ 7
I.4.3 Thérapies ciblées ____ 10
I.4.4 Immunothérapie ____ 11
I.4.5 Radiothérapie ____ 11
I.5. Métastases hépatiques de cancer colorectal ____ 12

I.II. Délivrance de molécules thérapeutiques ____ **13**
II.1. Barrières biologiques limitant la pénétration des molécules chimiothérapeutiques ____ 13
II.2. Les méthodes de délivrance de molécules thérapeutiques ____ 16
II.2.1 La nanovectorisation ____ 16
II.2.2 Évolution des nanomédicaments ____ 16
II.2.3 Les différents types de nanovecteurs ____ 17
II.3. Méthodes physiques de délivrance de molécules thérapeutiques ____ 19
II.3.1 Laser ____ 19
II.3.2 Champ électrique ____ 20
II.3.3 Champ magnétique ____ 20
II.3.4 Champ ultrasonore ____ 21

I.III. La sonoporation ____ **21**
III.1. Les agents de contraste ultrasonores ____ 21
III.2. Propriétés acoustiques des microbulles ____ 22
III.3. Effet de l'oscillation des MBs sur les barrières biologiques ____ 23
III.4. Microbulles pour la délivrance ciblée de médicament ____ 24

I.IV. Études *in vitro* ____ **26**
IV.1. Molécules chimiothérapeutiques ____ 26
IV.2. Vectorisation d'acides nucléiques ____ 28

I.V. Études précliniques ____ **31**
V.1. Coadministration chimiothérapie et MB ____ 31
V.2. Microbulles chargées en chimiothérapie ____ 32
V.3. Délivrance d'anticorps thérapeutiques ____ 34
V.4. Délivrance de cellules NK par sonoporation ____ 36

I.VI. Études cliniques ____ **41**

Chapitre II. Objectifs de la thèse ____ *47*

Chapitre III. La sonoporation in vitro de sphéroïdes tumoraux ____ *51*

III.I. Introduction ____ **51**

III.II. Publication ____ **52**

III.III. Synthèse ____ **92**

Chapitre IV. Délivrance de molécules chimiothérapeutiques par sonoporation dans un modèle 3D de sphéroïdes de cancer colorectal *97*

IV.I. Introduction **97**

IV.II. Publication **98**

IV.III. Synthèse **113**

Chapitre V. Délivrance de molécules thérapeutiques par sonoporation dans un modèle murin de métastases hépatiques de cancer colorectal *119*

V.I. Les modèles murins de métastases hépatiques de cancer colorectal **119**
I.1. Modèles spontanés de formation de métastases hépatiques de CCR 121
I.2. Modèles expérimentaux de métastases hépatiques de CCR 122
I.3. Modèles modifiés génétiquement 124
I.4. Modèles PDX (Patient-Derived Xenograft) 125
I.5. Modèles PDOX (Patient-Derived Organoids Xenografts) 126

V.II. Caractérisation des modèles et suivi du développement des métastases hépatiques de CCR **127**
II.1. Le scanner X 128
II.2. La tomographie par émission de positons (TEP) 129
II.3. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) 132
II.4. L'imagerie ultrasonore 134
II.5. L'imagerie de bioluminescence (BLI) 135
II.6. L'imagerie de fluorescence 137

V.III. Matériel et méthodes **140**
III.1. Lignée cellulaire 140
III.2. Les animaux 140
III.3. Présentation des plans expérimentaux 140
III.3.1 Session 1 140
III.3.2 Session 2 141
III.3.3 Session 3 142
III.3.4 Session 4 143
III.4. La chirurgie 143
III.5. L'imagerie de bioluminescence 145
III.6. Le scanner X 145
III.7. L'imagerie échographique en mode B 145
III.8. Analyse anatomopathologique 146
III.9. L'imagerie TEP 147
III.10. Chimiothérapie et traitement des animaux 147
III.11. Protocole de sonoporation 147
III.12. Analyse des images et exploitation des résultats 148
III.12.1 Imagerie de bioluminescence 148
III.12.2 Echographie 148
III.12.3 Scanner X 149
III.12.4 Imagerie TEP 150
III.12.5 Analyses statistiques 150

V.IV. Résultats **150**
IV.1. Caractérisation du modèle murin de métastases hépatiques de CCR 150
IV.1.1 Session 1 150
IV.1.2 Session 2 155
IV.2. Protocole de délivrance de l'irinotécan par sonoporation dans un modèle murin de métastases hépatiques de CCR 160
IV.2.1 Session 3 160
IV.2.2 Session 4 164

V.V. Discussion **172**
V.1. Établissement du modèle 172
V.2. Les modalités d'imagerie 173

V.2.1 La BLI 173
V.2.2 L'échographie 174
V.2.3 Le scanner X 175
V.2.4 Imagerie TEP au ^{18}F-FDG 177
V.3. Mise au point du protocole de délivrance de l'irinotécan par sonoporation 179
V.3.1 Analyses des données 180
V.3.2 Modèle métastatique et sensibilité au traitement 184
V.3.3 Paramètres acoustiques et non acoustiques 185

Conclusion générale et perspectives ***191***

Annexes ***199***

Références bibliographiques ***215***

Liste des figures

Figure 1. Les stades du cancer colorectal. 5

Figure 2. Les principales chirurgies réalisées dans le traitement du cancer colorectal. 7

Figure 3. Les différentes cibles des molécules chimiothérapeutiques. 8

Figure 4. Métabolisation et mécanisme d'action de l'irinotécan. 9

Figure 5. Cibles des thérapies ciblées utilisées dans le traitement du cancer colorectal. 10

Figure 6. Mécanisme d'action du pembrolizumab. 11

Figure 7. Barrières limitant la pénétration des molécules thérapeutiques dans le tissu tumoral. 14

Figure 8. Les différents types de nanovecteurs et leur intérêt dans l'amélioration de la délivrance de molécules thérapeutiques. 16

Figure 9. Perméabilisation de la barrière hémato-tumorale par sonoporation favorisant une délivrance ciblée de molécules thérapeutiques dans la tumeur. 21

Figure 10. Phénomène de cavitation des microbulles en fonction de la pression acoustique. 23

Figure 11. Phénomènes acoustiques impliqués dans le processus de sonoporation et effets biologiques induits par la cavitation des microbulles à proximité de la membrane plasmique. 23

Figure 12. Schéma des différents types de microbulles utilisés en imagerie et en thérapie. 25

Figure 13. Principales méthodes pour la mise en place d'un modèle murin de métastases hépatiques de CCR. 120

Figure 14. Principe de l'imagerie TEP. 130

Figure 15. Cibler le métabolisme du glucose des cellules tumorales avec le radiotraceur ^{18}F-FDG. 131

Figure 16. Principe de l'IRM. 133

Figure 17. Principe de l'imagerie de bioluminescence pour la détection de métastases hépatiques. 136

Figure 18. Plan expérimental de la session 1. 141

Figure 19. Plan expérimental de la session 2. 142

Figure 20. Plan expérimental de la session 3. 143

Figure 21. Plan expérimental de la session 4. 143

Figure 22. Protocole de chirurgie pour la mise en place d'un modèle murin de métastases hépatiques de CCR. 144

Figure 23. Détection des métastases hépatiques de CCR par imagerie de bioluminescence. 151

Figure 24. Exemples d'échographies du foie sain et de métastases hépatiques. 152

Figure 25. Observation histologique des métastases hépatiques après une coloration HES et mise en évidence de la vascularisation tumorale par un immunomarquage du CD31. 154

Figure 26. Visualisation par scanner X du foie et des métastases hépatiques après injection i.v. de l'agent de contraste ExiTron nano 12000. 155

Figure 27. Variations de l'intensité du contraste de l'ExiTron nano 12000 dans le foie, obtenues après analyses des images de scanner X. 156

Figure 28. Dégradation de la structure du foie entre le J19 et le J26 après l'injection intra-splénique des cellules tumorales. 157

Figure 29. Variations du volume du foie obtenues après analyses des images de scanner X. 157

Figure 30. Évolution du volume total des métastases hépatiques obtenu par échographie. ... 159

Figure 31. Évaluation de l'imagerie TEP au ^{18}F-FDG pour la détection des métastases hépatiques de CCR chez la souris. 163

Figure 32. Variations du volume des métastases hépatiques, obtenues à partir des images échographiques. 166

Figure 33. Courbes de Kaplan-Meier décrivant le pourcentage de survie. 166

Figure 34. Variations du volume de métastases hépatiques par souris en fonction du groupe de traitement. 167

Figure 35. Variations du volume de métastases hépatiques comprises entre 0 et 4500 % (sans les valeurs extrêmes). 168

Figure 36.Variations du volume de métastases hépatiques par souris en fonction du groupe de traitement. 169

Figure 37. Variations du volume du foie obtenues après analyses des images de scanner X. 170

Figure 38. Corrélation entre le volume du foie obtenu à partir des images de scanner X et le volume des métastases hépatiques mesuré à partir des échographies. 171

Figure 39. Les principaux paramètres acoustiques et non acoustiques impliqués dans la délivrance de molécules thérapeutiques par sonoporation. 186

Liste des tableaux

Tableau 1. Études *in vitro* de la délivrance de molécules thérapeutiques par sonoporation dans des lignées cellulaires de CCR. 30

Tableau 2. Études précliniques de la délivrance de molécules thérapeutiques par sonoporation dans des modèles murins de CCR. 38

Tableau 3. Volume et nombre de métastases hépatiques par souris obtenus en échographie. 153

Tableau 4. Récapitulatif du volume des métastases hépatiques et de leurs nombres obtenus en échographie. 158

Tableau 5. Résultats de la détection des métastases hépatiques par bioluminescence et du volume des métastases par souris avant le traitement. 160

Tableau 6. Médiane du volume des métastases hépatiques..... 162

Tableau 7. Médiane du volume du foie. 162

Tableau 8. Temps de doublement médian des métastases hépatiques de CCR. 162

Tableau 9. Résultats de la détection des métastases hépatiques par bioluminescence et du volume des métastases par souris avant le traitement. 164

Tableau 10. Temps de doublement des métastases hépatiques de CCR. 170

Abréviations

#	
^{18}F-FDG	FluoroDéoxyGlucose marqué au Fluor-18
5-FU	5-FluoroUracil
^{68}Ga-FAPI	Gallium-68–labeled Fibroblast Activation Protein Inhibitor
A	
ACE	Antigène Carcino-Embryonnaire
ANOVA	Analysis Of VAriance
APC	Adenomatous Polyposis Coli
B	
BLI	BioLuminescence Imaging
C	
CCR	Cancer ColoRectal
CTCAE	Common Terminology Criteria for Adverse Events
D	
DC	Duty Cycle
Dox	Doxorubicine
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
E	
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
G	
GEMM	Genetically Engineered Mouse Models
GFP	Green Fluorescent Protein
H	
HES	Hématoxyline, Eosine, Safran
HIF-1α	Hypoxia Inducible Factor 1
I	
i.p.	IntraPéritonéale
i.t.	IntraTumorale
i.v.	IntraVeineuse
IFN-β	InterFéroN-β
IFN-γ	InterFéroN-γ
IM	Index Mécanique
IMC	Immune-Microbubble Complex
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
L	
Luc	Luciférase
M	
MB(s)	MicroBulle(s)
MBO_2	MicroBulle chargée en Oxygène
MEC	Matrice ExtraCellulaire
miRNA	Micro RiboNucleic Acid
N	
NA	Non Applicable
NK	Natural Killer
NP(s)	NanoParticule(s)
P	
PD-1	Programmed cell Death protein-1
PD-L1	Programmed Death Ligand-1
PDOX	Patient Derived Organoid Xenograft
PDX	Patient Derived Xenograft
PEG	PolyEthylène Glycol
PNP	Peak Negative Pressure
PRF	Pulse Repetition Frequency
Q	
Q1	Quartile 1
Q3	Quartile 3
R	
RECIST	Response Evaluation Criteria In Solid Tumours
S	
shRNA	Short Hairpin RiboNucleic Acid
SUV	Standardized Uptake Value
T	
TEP	Tomographie par Emission de Positons

Chapitre I. Introduction

Chapitre I. Introduction

I.I. Le cancer colorectal et ses métastases hépatiques

I.1. Épidémiologie, dépistage et facteurs de risques du cancer colorectal

Le cancer colorectal (CCR) est un enjeu majeur de santé publique en France, se classant au troisième rang des cancers les plus fréquents tous sexes confondus avec 47 582 nouveaux cas en 2023 et 17 117 décès en 2018 (Santé publique France, 2024a). Il constitue le deuxième cancer le plus répandu chez les femmes, après le cancer du sein, et le troisième chez les hommes, précédé par les cancers de la prostate et du poumon. Le taux de survie à 5 ans est d'environ 63%. Ce taux progresse positivement ces dernières années, notamment grâce au dépistage précoce et à l'amélioration des traitements (Santé publique France, 2024a).

En effet, depuis 2015 en France, un programme de dépistage encourage les personnes âgées de 50 à 74 ans à réaliser un test immunologique, permettant de détecter la présence d'hémoglobine dans les selles. Malgré les efforts déployés pour sensibiliser la population au dépistage du CCR, le taux de participation est insuffisant. Pour l'année 2020-2021, ce taux de participation en France s'élevait à seulement 35%, demeurant ainsi inférieur à la moyenne européenne (Santé publique France, 2024b).

Les facteurs de risques de développer un CCR sont principalement liés à l'âge, au mode de vie et aux antécédents familiaux. En effet, ce risque augmente à partir de 50 ans et l'âge moyen d'apparition d'un CCR est de 73 ans (Siegel *et al.*, 2020). Parmi les risques liés au mode de vie, le régime alimentaire joue un rôle crucial, notamment une consommation riche en viande rouge, en viande transformée, en charcuterie, en graisses ainsi qu'une faible consommation de fibres sont associées à une augmentation du risque de développer un CCR (Bingham *et al.*, 2003; Bouvard *et al.*, 2015; Kerr *et al.*, 2017; Vallis and Wang, 2022; van Duijnhoven *et al.*, 2009). L'inactivité physique (Perera *et al.*, 2012), le surpoids, l'obésité (Perera *et al.*, 2012), le tabagisme (Liang *et al.*, 2009) et la consommation excessive d'alcool (Baan *et al.*, 2007) sont également des facteurs de risques accrus. Dans 15% des cas de CCR, des antécédents familiaux sont identifiés (Lowery *et al.*, 2016). Ce risque est augmenté lorsque des mutations génétiques héréditaires sont existantes, représentant ainsi 5% des cas de CCR (Launoy, 2019). Parmi ces affections héréditaires liées à une mutation, la polypose adénomateuse familiale et le syndrome de Lynch présentent un risque particulièrement élevé notamment si les polypes colorectaux, causés par ces mutations génétiques, ne sont pas pris en charge (Biondi *et al.*, 2021; Yurgelun and Hampel, 2018). De plus, les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de

l'intestin, telles que la maladie de Crohn ou la rectocolite hémorragique, présentent également un risque accru de développer un CCR (Clarke and Feuerstein, 2019).

I.2. Symptômes et Diagnostic

Les patients atteints d'un CCR peuvent être asymptomatiques en particulier au début de la maladie. A un stade plus avancé, des symptômes digestifs apparaissent comme des douleurs abdominales, des troubles du transit intestinal, la présence de sang dans les selles puis des symptômes plus généraux comme une anémie, une perte de poids, l'altération de l'état général et de la fièvre (Holtedahl *et al.,* 2021). La présence de ces symptômes ou le résultat positif à un test de dépistage de CCR mènera à un examen clinique et à un interrogatoire sur les symptômes, les antécédents et les facteurs de risque du patient pour confirmer le diagnostic d'un CCR (e-cancer, 2021). L'examen de référence est la coloscopie qui consiste à introduire un endoscope, constitué d'un tube souple équipé d'une caméra et de pinces, permettant de visualiser l'ensemble des parois du rectum et du côlon et d'effectuer des prélèvements (biopsies) si nécessaire. Une analyse anatomopathologique des biopsies confirmera le diagnostic de CCR. Si ces examens révèlent la présence de lésions cancéreuses alors un bilan d'extension sera réalisé afin d'évaluer l'étendue et l'agressivité de la tumeur pour orienter au mieux sa prise en charge. Ce bilan d'extension comprend un bilan sanguin complet avec notamment le dosage du marqueur tumoral ACE (antigène carcino-embryonnaire) et une imagerie par résonance magnétique (IRM) ou un scanner X thoraco-abdomino-pelvien afin d'obtenir des informations anatomiques sur la tumeur (dimension, localisation) et son éventuelle propagation à d'autres organes. En cas de suspicion de présence de métastases d'autres imageries peuvent être effectuées comme une échographie ou une IRM hépatique et un TEP-scan (Tomographie par Émission de Positons couplée au scanner X).

I.3. Les stades du cancer colorectal

L'ensemble des informations recueillies au cours de l'examen clinique et du bilan d'extension permettent d'évaluer le stade de la maladie afin de définir la stratégie thérapeutique la mieux adaptée au patient. Pour définir le stade du CCR, la classification TNM (Tumor, Node, Metastasis) est utilisée et permet d'évaluer l'étendue de la tumeur, l'atteinte ganglionnaire et la présence de métastases (Hari *et al.,* 2013; Svrcek, 2023; Weiser, 2018). A l'issu de cette classification, le stade du CCR est défini comme suit (**Figure 1**) :

- Stade 0 : La tumeur est *in situ*, aucun ganglion lymphatique n'est affecté et aucune métastase à distance n'est présente.

- Stade I : La tumeur envahit les couches sous-muqueuses et/ou musculeuses de la paroi intestinale sans atteindre les ganglions lymphatiques et il n'y a pas de métastase(s) à distance.
- Stade IIA : La tumeur envahit la sous-séreuse ou les tissus péricoliques/périrectaux sans atteindre les ganglions lymphatiques et il n'y a pas de métastase(s) à distance.
- Stade IIB : La tumeur a traversé toutes les couches de la paroi intestinale atteignant le péritoine viscéral sans atteindre les ganglions lymphatiques et il n'y a pas de métastase(s) à distance.
- Stade IIC : La tumeur a traversé la paroi du côlon ou du rectum jusqu'à d'autres organes sans atteindre les ganglions lymphatiques et il n'y a pas de métastase(s) à distance.
- Stade III : Les cellules cancéreuses ont envahi les ganglions lymphatiques proches de la tumeur, en fonction de leur nombre et de l'étendue de la tumeur, le stade III est divisé en stade IIIA, IIIB, et IIIC, il n'y a pas de métastase(s) à distance.
- Stade IV : Les cellules cancéreuses se sont disséminées et ont atteint des organes éloignés ou des ganglions lymphatiques éloignés, le stade IVA est attribué lorsque les métastases sont localisées dans un seul organe et le stade IVB lorsque plusieurs organes ou le péritoine sont atteints.

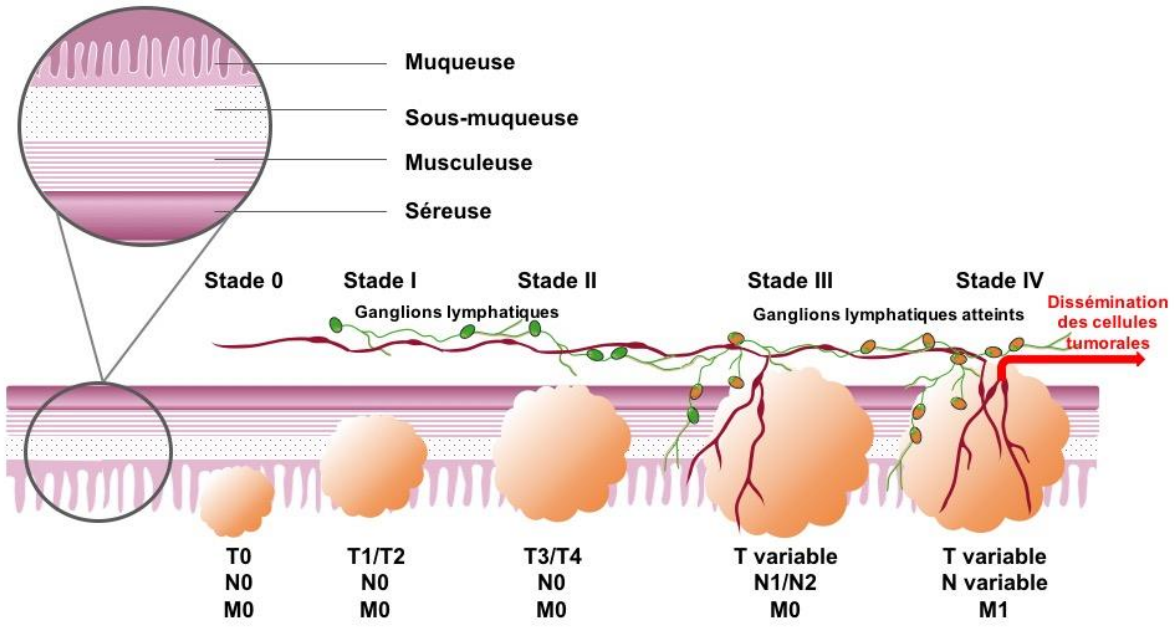


Figure 1. Les stades du cancer colorectal. T0 = pas de tumeur primitive ; T1 = envahissement de la sous-muqueuse ; T2 = envahissement de la sous-musculeuse ; T3 = envahissement de la sous-séreuse ou des tissus péricoliques et périrectaux non péritonisés ; T4 = envahissement des organes à proximité ou du péritoine viscéral ; N0 = pas de métastases ganglionnaire ; N1 = 1 à 3 ganglions régionaux métastatiques ; N2 = ganglions métastatiques régionaux ≥4 ; M0 = pas de métastases à distance ; M1 = métastases à distance.

Définir le stade du CCR permet ensuite d'établir le pronostic de la maladie et d'orienter la stratégie thérapeutique, en prenant en compte les antécédents du patient et son état général.

I.4. Traitements du cancer colorectal

Plusieurs types de traitements sont utilisés pour soigner les CCR comme la chirurgie, les traitements médicamenteux (chimiothérapies/thérapies ciblées/immunothérapies) et la radiothérapie. À un stade précoce, le traitement par chirurgie est le plus fréquemment employé afin de retirer entièrement les lésions tumorales. Il est également possible d'administrer un traitement par chimiothérapie afin de diminuer la taille de la tumeur avant la résection chirurgicale (chimiothérapie néoadjuvante) ou après la chirurgie (chimiothérapie adjuvante) afin d'éliminer toutes les cellules tumorales et de limiter les récidives. Lorsque le stade de la maladie est plus avancé ou que la chirurgie n'est pas envisageable, le traitement par chimiothérapie est réalisé en combinaison ou non avec la radiothérapie.

I.4.1 Chirurgie

L'intervention chirurgicale est le traitement de référence du CCR (Gérard *et al.,* 2017; Lecomte *et al.,* 2024; Phelip *et al.,* 2019). L'excision locale (stade 0 ou I) des polypes ou d'une tumeur localisée est réalisée pendant une coloscopie. Ensuite, l'analyse anatomopathologique des prélèvements permet d'évaluer si la résection a permis d'enlever l'ensemble des lésions. Dans le cas contraire, une nouvelle chirurgie ou un traitement par chimiothérapie sera préconisé. A un stade plus avancé, la résection de l'intestin peut être nécessaire. Dans ce cas, en fonction de la localisation de la tumeur, une chirurgie est réalisée afin d'enlever une partie de l'intestin grêle ou du gros intestin (côlon, rectum, anus) où se situe la tumeur (**Figure 2**). Parmi ces différents types de chirurgie, la colectomie segmentaire consiste à enlever un segment du côlon où se situe la tumeur avec des marges de 5 cm (Lecomte *et al.,* 2024). L'hémicolectomie revient à retirer une partie (droite ou gauche) du côlon. La sigmoïdectomie permet d'extraire la partie terminale (sigmoïde) du côlon. La colectomie totale consiste à enlever la totalité du côlon. De plus, un curage ganglionnaire est réalisé afin de retirer au moins 12 ganglions lymphatiques à proximité de la tumeur. A l'issu de la chirurgie, les extrémités du côlon sont raccordées par anastomose afin de rétablir le circuit intestinal. Lorsque la tumeur est localisée au niveau du rectum, une proctectomie partielle ou totale est réalisée (Gérard *et al.,* 2017).

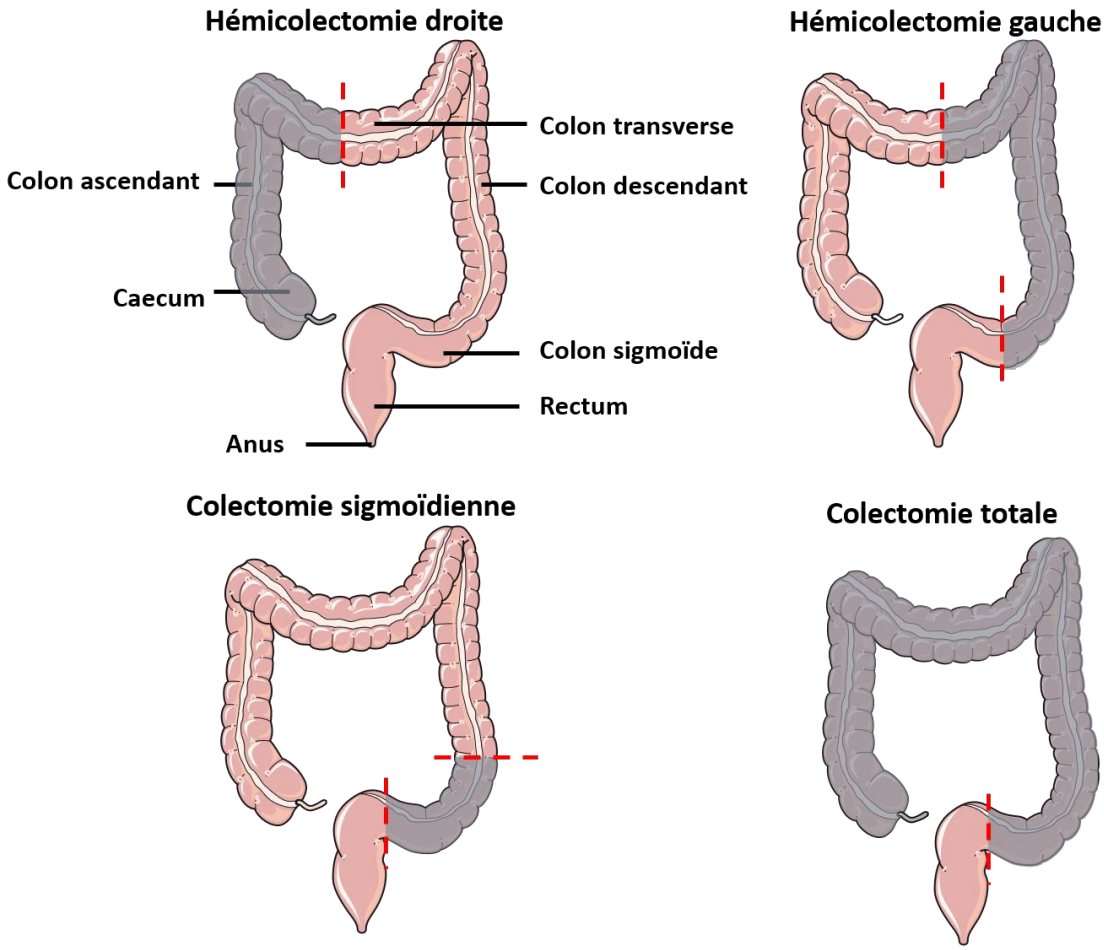


Figure 2. Les principales chirurgies réalisées dans le traitement du cancer colorectal.

I.4.2 Chimiothérapie

La chimiothérapie est administrée au patient après une chirurgie afin d'éliminer les éventuelles cellules cancéreuses résiduelles, et de réduire le risque de récidive, dans ce contexte elle est qualifiée de chimiothérapie adjuvante. Ce traitement peut également être prescrit avant la chirurgie (chimiothérapie néoadjuvante) afin de réduire au maximum la taille de la tumeur. Lorsque le CCR est au stade métastatique, la chimiothérapie est systématiquement prescrite qu'elle soit néoadjuvante ou qu'elle constitue la seule possibilité thérapeutique lorsque la chirurgie n'est pas envisageable.

Les principales molécules chimiothérapeutiques utilisées pour le traitement du CCR sont : le 5-fluorouracil (5-FU) ; la capécitabine (Xeloda®) ; l'oxaliplatine (Eloxatine®) ; l'irinotécan (Campto®) ; le raltitrexed (Tomudex®) ; la trifluridine / tipiracil (Lonsurf®). Ces molécules sont administrées seules ou en association en fonction du protocole thérapeutique. Les traitements de chimiothérapie sont principalement administrés par voie intraveineuse (i.v.), mais il existe également des chimiothérapies orales. Le traitement par chimiothérapie est planifié sous forme

de cures, correspondant à plusieurs jours de traitements consécutifs, espacées par des phases de « repos » sans traitement durant quelques jours/semaines. Les principaux protocoles administrés dans le CCR sont (Lecomte *et al.*, 2024): FOLFOX (5-FU, acide folinique (Leucovorine), oxaliplatine), FOLFOXIRI (5-FU, acide folinique, oxaliplatine, irinotécan), XELOX (capécitabine, oxaliplatine).

Les molécules de chimiothérapies sont classées en fonction de leur mécanisme d'action et de leur appartenance à une famille chimique. Ainsi, il existe 4 classes de molécules chimiothérapeutiques ; les antimétabolites, les inhibiteurs de topoisomérases I et II, les alkylants et les poisons du fuseau mitotique (**Figure 3**).

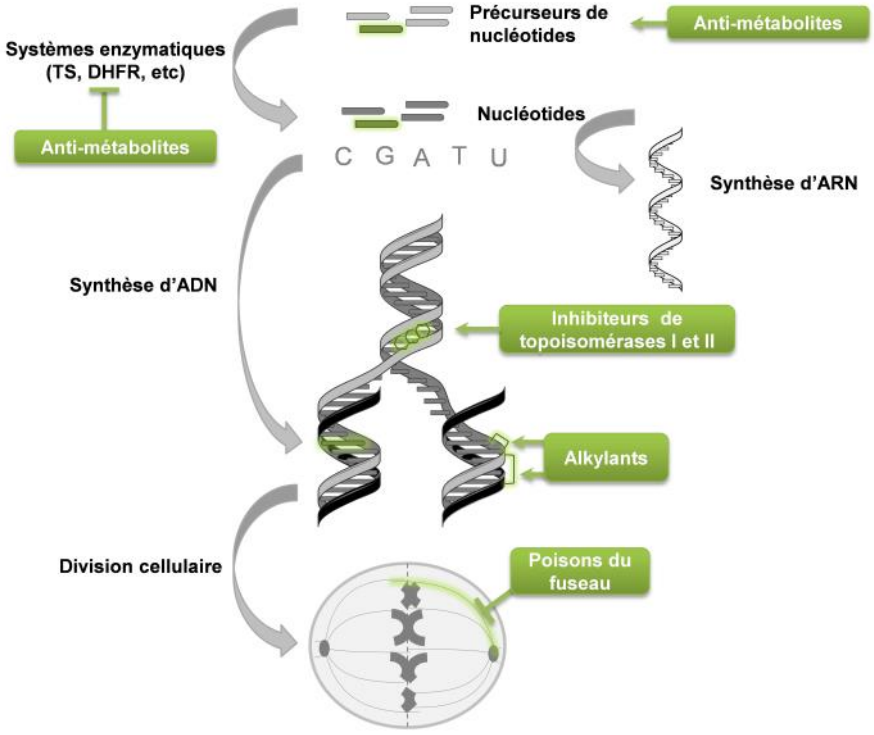


Figure 3. Les différentes cibles des molécules chimiothérapeutiques. D'après Faure, 2017.

Le 5-FU, analogue fluoré de l'uracile, est un antinéoplasique cytostatique appartenant à la classe des antimétabolites de type anti-pyrimidique (Longley *et al.*, 2003). L'uracile est une molécule qui intervient dans la composition des ARN, c'est un précurseur de la thymine, base nécessaire à la synthèse de l'ADN. Le principal mécanisme d'action du 5-FU est de bloquer la méthylation de l'uracile en thymine inhibant ainsi la synthèse de l'ADN et conduisant à la mort de la cellule. De plus, l'incorporation du 5-FU phosphorylé et triphosphaté dans l'ARN à la place de l'uracile, induit des erreurs dans la synthèse de l'ARN menant à un dysfonctionnement de la synthèse des protéines par la cellule. Le 5-FU est administré par voie systémique et est

souvent associé à l'acide folinique, qui potentialise son effet cytotoxique. La capécitabine est un précurseur du 5-FU permettant une prise orale du traitement.

L'oxaliplatine est un antinéoplasique appartenant à la classe des sels de platine (Raymond *et al.,* 1998). Cette molécule subit une biotransformation dans le compartiment sanguin générant des dérivés actifs qui peuvent se lier à l'ADN formant des ponts inter- et intra-brins bloquant la synthèse de l'ADN et conduisant à la mort de la cellule.

L'irinotécan est un antinéoplasique, dérivé hémi-synthétique de la camptothécine. L'irinotécan est une prodrogue, il est métabolisé par la carboxylestérase dans le foie (**Figure 4**) (Ozawa *et al.,* 2021). Le SN-38 est le métabolite actif de l'irinotécan qui est 100 à 1000 fois plus actif. Cette molécule agit comme un inhibiteur spécifique de la topoisomérase I, enzyme responsable de la modification de la topologie de l'ADN au cours des processus de réplication et de transcription. Ainsi, son inhibition induit des lésions simple-brin de l'ADN bloquant la fourche de réplication de l'ADN, conduisant à la mort cellulaire.

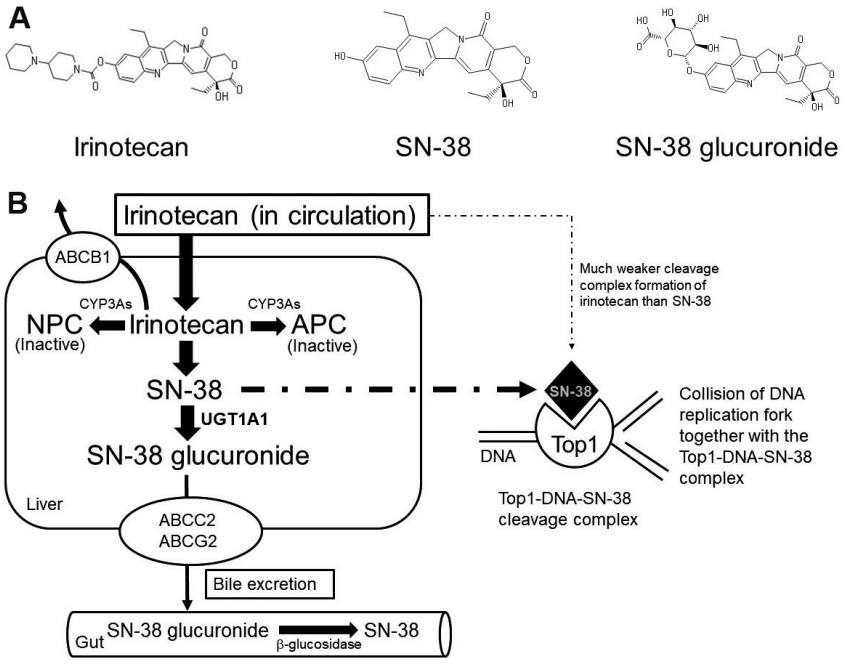


Figure 4. Métabolisation et mécanisme d'action de l'irinotécan. (A) Structure moléculaire de l'irinotécan, du SN-38 et du SN-38 glucuronide. (B) L'irinotécan est métabolisé par la carboxylestérase dans le foie et converti en SN-38 (métabolite actif). Le SN-38 est éliminé sous forme de glucuronoconjuguée par l'enzyme hépatique Uridine Diphosphate Glucuronosyl-Transférase 1A1 (UGT1A1) et excrété dans la bile. Dans les cellules tumorales, le SN-38 forme un complexe ADN/Topoisomérase I/ SN-38, bloquant la fourche de réplication et conduisant à des cassures doubles brins létales pour la cellule. D'après Ozawa *et al.*, 2021.

Le raltitrexed est un analogue de l'acide folique appartenant à la classe des antimétabolites (Liu *et al.*, 2014). C'est un inhibiteur de la thymidilate-synthase, enzyme qui permet la synthèse de la thymidine monophosphate en thymidine triphosphate. Ce nucléotide étant essentiel dans la synthèse de l'ADN, l'action du raltitrexed induit la fragmentation de l'ADN puis la mort cellulaire. Cette molécule est souvent prescrite lorsque les patients ont une contre-indication du 5-FU.

I.4.3 Thérapies ciblées

Les protocoles de chimiothérapies précédemment décrits peuvent être administrés en association avec une thérapie ciblée. Les principales cibles de ces thérapies sont : 1) le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) impliqué dans le phénomène de néo-angiogenèse tumorale, et 2) l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) souvent sur-exprimé par les cellules tumorales, il est impliqué dans la prolifération cellulaire (Cacheux *et al.*, 2011). Les anti-angiogéniques agissant sur le VEGF ou sur son récepteur sont le bévacizumab (Avastin™), l'aflibercept (Zaltrap®) et le régorafénib (Stivarga®). D'autre part, les thérapies ciblées inhibant l'EGFR sont le cétuximab (Erbitux™) et le panitumumab (Vectibix™) (**Figure 5**).

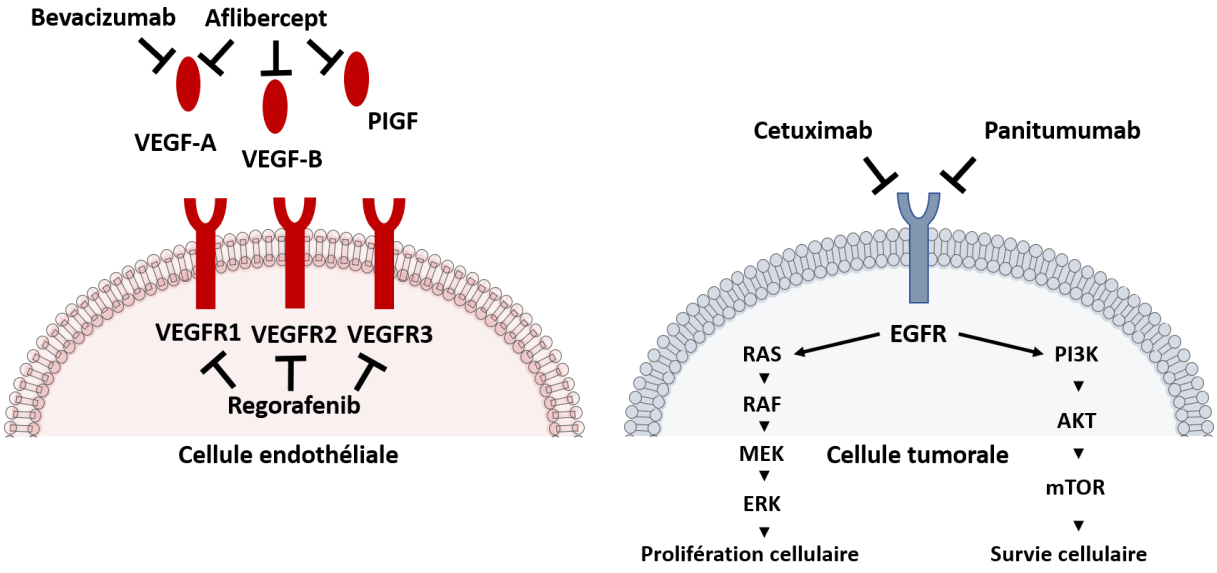


Figure 5. Cibles des thérapies ciblées utilisées dans le traitement du cancer colorectal.

I.4.4 Immunothérapie

Dans le traitement du CCR, la principale immunothérapie disponible est le pembrolizumab (Keytruda®), appartenant aux inhibiteurs de points de contrôles immunitaires ciblant le récepteur « Programmed cell Death protein 1 » (PD-1) (Wahid *et al.*, 2017) (**Figure 6**). Ce dernier est exprimé à la surface des lymphocytes T et constitue un point de contrôle immunitaire. En effet, PD-1 agit comme un régulateur négatif de l'activité des lymphocytes T lors de son interaction avec le ligand « Programmed Death Ligand-1 » (PD-L1) exprimé à la surface des cellules présentatrices d'antigène. Cependant, les cellules tumorales sont capables d'exprimer le ligand PD-L1, leur permettant d'échapper au système immunitaire. Ainsi, l'inhibition de PD-1 par le pembrolizumab permet de lever le point de contrôle et active la réponse immunitaire antitumorale.

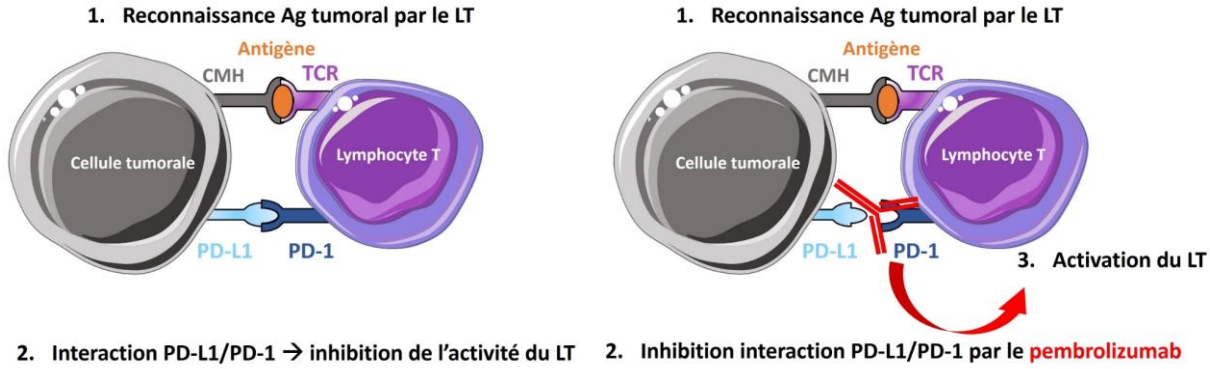


Figure 6. Mécanisme d'action du pembrolizumab.

I.4.5 Radiothérapie

La radiothérapie consiste à utiliser des rayonnements ionisants, appliqués de façon ciblée sur la région à traiter, à l'aide d'un repérage anatomique sur des images obtenues par scanner X ou IRM. Les rayons induisent des altérations de l'ADN des cellules, générant l'arrêt de la division cellulaire ou la mort cellulaire. La radiothérapie est utilisée principalement pour le traitement du cancer du rectum, souvent associée à une chimiothérapie avant la chirurgie.

I.5. Métastases hépatiques de cancer colorectal

Comme décrit précédemment, un stade avancé d'un CCR est associé à un pronostic défavorable et un risque de récidive précoce. Dans ce contexte, il est important de souligner qu'environ 40 à 60 % des patients atteints d'un CCR développent des métastases hépatiques (Phelip *et al.,* 2019; Väyrynen *et al.,* 2020). Parmi ces patients, 10 à 25 % présentent des métastases synchrones, c'est-à-dire qu'elles sont détectées simultanément avec le cancer primitif, et environ 20 à 25 % des patients développeront des métastases métachrones, qui se développeront après le diagnostic du cancer primaire (Phelip *et al.,* 2019). Le seul traitement potentiellement curatif des métastases hépatiques de CCR est la chirurgie qui est associée à une survie à 5 ans de 25 à 50%. Cependant, seulement 20 % des patients seront éligibles à la résection chirurgicale des métastases hépatiques. Pour les métastases non résécables d'emblée, il est important de distinguer celles qui le seront potentiellement de celles qui ne le seront jamais afin d'adapter au mieux les traitements (Bismuth *et al.,* 2007; Dupré *et al.,* 2013). Les critères de non résécabilité reposent principalement sur la proximité entre les métastases et une structure vasculaire, la taille et le nombre de lésions, le volume de foie restant inférieur à 20-30 % et l'état général du patient. Cependant, ces critères peuvent évoluer notamment grâce à un traitement par chimiothérapie néoadjuvante visant à diminuer la taille de la tumeur. Les principaux protocoles utilisés dans les cas de métastases non résécables d'emblée sont de types FOLFIRI ou FOLFIRINOX associés ou non à une thérapie ciblée (bévacizumab, cétuximab, panitumumab). Ces dernières années, l'association de thérapies ciblées à la chimiothérapie a démontré une augmentation de l'efficacité des protocoles de chimiothérapie néoadjuvante, conduisant à une amélioration du taux de survie à 5 ans et à une augmentation du nombre de patients éligibles à la chirurgie. (Dupré *et al.,* 2013). La nécessité de poursuivre le développement d'approches thérapeutiques visant à une conversion du statut de résécabilité des métastases dans ce contexte est cruciale. Cependant, malgré ces données encourageantes, le traitement par chimiothérapie présente de nombreuses limites. Le manque de spécificité de ce type de traitement engendre de nombreux effets secondaires chez les patients, pouvant conduire à l'arrêt ou au changement du traitement, limitant ainsi l'efficacité thérapeutique.

Généralement, les effets secondaires engendrés par la chimiothérapie sont des nausées, des vomissements, des diarrhées et une perte d'appétit. Ce traitement a également un impact sur les cellules sanguines pouvant causer une anémie, une leucopénie et une thrombopénie. Des effets indésirables cutanés sont également identifiés, ainsi que des troubles respiratoires, cardiaques et hépatiques. Les effets indésirables ont un impact sur la qualité de vie du patient mais

également sur l'efficacité thérapeutique. Ces conséquences concernant les patients atteints de métastases hépatiques de CCR ont été décrites dans plusieurs études. En effet, l'hépatotoxicité induite par les molécules chimiothérapeutiques peut rendre une intervention chirurgicale impossible ou augmenter le taux de mortalité (Dupré *et al.,* 2013). Par exemple, un traitement à base d'irinotécan a été associé à des taux élevés d'insuffisance hépatique post-opératoire (Baumgaertner *et al.,* 2010). Plus généralement, la toxicité systémique induite par les molécules chimiothérapeutiques peut limiter la tolérance du traitement, et par conséquent, conduire à l'arrêt, à la diminution des doses administrées ou à des modifications du protocole thérapeutique limitant ou retardant son efficacité. De plus, chez les patients non-répondeurs à la chimiothérapie néoadjuvante, il existe un risque accru que les métastases initialement résécables deviennent inopérables à cause de leur développement durant cette phase de chimiothérapie néoadjuvante (Dupré *et al.,* 2013).

I.II. Délivrance de molécules thérapeutiques

II.1. Barrières biologiques limitant la pénétration des molécules chimiothérapeutiques

La grande majorité des molécules chimiothérapeutiques est administrée par voie i.v.. Cependant, il existe également des formulations pour une prise orale de ces molécules. Ces dernières agissent principalement sur les cellules en division, de façon non spécifique. Administrées par voie i.v., ces molécules circulent dans l'organisme entier grâce au flux sanguin (Dewhirst and Secomb, 2017). Une fois qu'elles atteignent les vaisseaux sanguins à proximité de la tumeur, elles doivent traverser la paroi endothéliale de ces vaisseaux pour accéder à l'environnement interstitiel entourant les cellules tumorales. Le transport de ces molécules est gouverné par les phénomènes de diffusion et de convection (Dewhirst and Secomb, 2017). La diffusion correspond à un mouvement passif des molécules d'un compartiment où sa concentration est élevée vers un compartiment où cette dernière est plus faible. La convection est un mouvement induit par le flux de liquide dans les vaisseaux sanguins ou dans l'environnement interstitiel. Lors de leur transport vers les cellules tumorales, les molécules peuvent se lier de manière non spécifique à des protéines ou à d'autres composants tissulaires présents dans le microenvironnement tumoral (Jain, 2001). Cette liaison non spécifique affecte donc la biodisponibilité des molécules (Chang *et al.,* 2016). De plus, ces molécules chimiothérapeutiques peuvent subir des transformations chimiques/métaboliques dans l'organisme pouvant affecter leurs structures et leurs fonctions, et potentiellement leurs efficacités thérapeutiques. De plus, les molécules chimiothérapeutiques sont souvent des

molécules de faible poids moléculaire (< 4 kDa), qui sont rapidement éliminées de la circulation sanguine, limitant ainsi leur accumulation au sein de la tumeur. Ainsi, l'administration de la dose optimale d'une molécule thérapeutique dans le tissu tumoral dépend, en partie, de ses propriétés pharmacologiques (pharmacocinétique, biodistribution, pharmacodynamique), de ses propriétés physicochimiques (poids moléculaire, charge, hydrophobicité, *etc.*) mais également des caractéristiques physiopathologiques de la tumeur (Jain, 2001; Minchinton and Tannock, 2006; Tehrani *et al.*, 2024). En effet, le développement anarchique de la vascularisation tumorale, les modifications des pressions interstitielles, la présence d'une matrice extracellulaire (MEC) dense et l'hypoxie jouent un rôle majeur dans l'efficacité de la délivrance des molécules thérapeutiques (Chang *et al.*, 2016; Krol *et al.*, 1999; Moulder and Rockwell, 1987; Provenzano *et al.*, 2012; Vaupel and Mayer, 2007; Yuan *et al.*, 2001) (**Figure 7**).

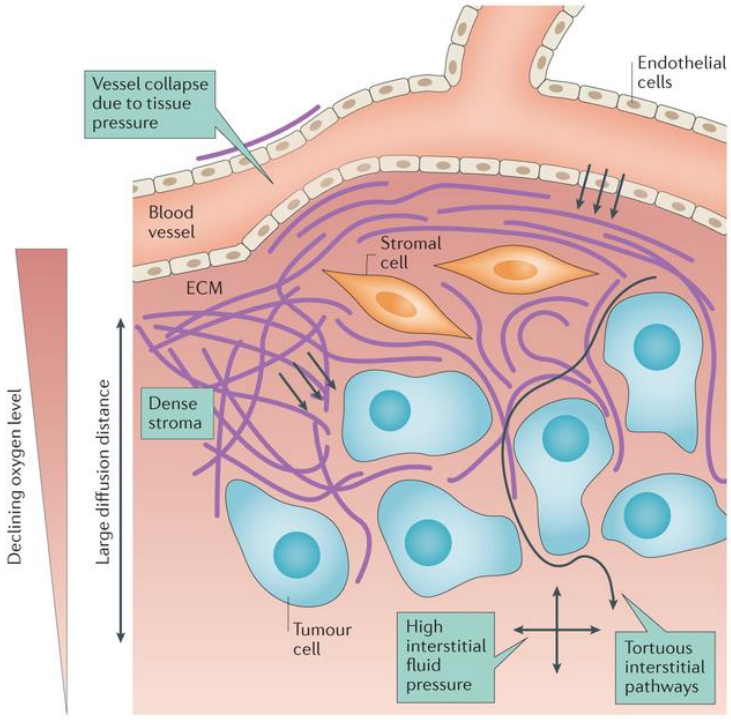


Figure 7. Barrières limitant la pénétration des molécules thérapeutiques dans le tissu tumoral. Les pressions exercées par les tissus peuvent provoquer un rétrécissement des vaisseaux, réduisant le flux sanguin. Les cellules endothéliales constituent une barrière, empêchant l'extravasation des molécules thérapeutiques. La présence d'une matrice extracellulaire (MEC) dense limite la diffusion des molécules thérapeutiques. Ces dernières peuvent également se lier aux composants de la MEC. L'augmentation de la pression interstitielle limite la circulation des fluides dans l'environnement tumoral. D'après Dewhirst and Secomb, 2017.

Les tumeurs présentent généralement un gradient de prolifération cellulaire inversement proportionnel au gradient d'oxygénation de la tumeur, créant des régions hypoxiques (Jain and Stylianopoulos, 2010; Zaidi *et al.*, 2019). En conséquence, l'accessibilité des agents

thérapeutiques est très limitée dans ces zones tumorales. La présence d'une MEC dense entourant les cellules tumorales et les cellules du microenvironnement tumoral agit comme une barrière physique et limite l'accès des molécules thérapeutiques (Jain, 1987). En effet, les agents thérapeutiques doivent parcourir une distance plus importante avant d'atteindre les cellules tumorales, et peuvent se lier aux composants de la MEC réduisant ainsi considérablement la quantité libre de molécules thérapeutiques (Dewhirst and Secomb, 2017; Primeau *et al.,* 2005). L'augmentation de la pression interstitielle est également un facteur limitant la diffusion en profondeur des molécules thérapeutiques dans le tissu tumoral. L'augmentation de la pression interstitielle est due à l'angiogenèse tumorale, à un drainage lymphatique inefficace et à la compression des vaisseaux sanguins (Jain, 1994; Jain and Stylianopoulos, 2010; Padera *et al.,* 2002). Les nouveaux vaisseaux sanguins anormaux, présentant une perméabilité accrue, favorisent l'infiltration de liquide au sein du tissu tumoral, ce phénomène est connu sous le nom d'effet EPR (Enhanced Permeability and Retention effect) et favorise l'extravasation des molécules vers la tumeur (Maeda *et al.,* 2000). En revanche, le système de drainage lymphatique est souvent inefficace dans les tumeurs. Il participe à l'augmentation de la pression interstitielle et réduit le mouvement des fluides dans l'espace interstitiel, limitant considérablement la diffusion des molécules thérapeutiques (Jain, 1987). De plus, la prolifération excessive des cellules tumorales, ainsi que la présence d'une MEC dense, peuvent générer un stress tissulaire compressif important, réduire l'espace interstitiel et comprimer les vaisseaux sanguins fonctionnels, réduisant alors le flux sanguin à proximité de la tumeur (Chauhan *et al.,* 2014; Stylianopoulos *et al.,* 2012).

En conclusion, la chimiothérapie est nécessaire et efficace pour réduire la taille des métastases hépatiques de CCR afin que les patients bénéficient d'un traitement curatif par chirurgie. Cependant, les molécules chimiothérapeutiques sont non spécifiques et induisent d'important effets secondaires conduisant parfois à l'arrêt du traitement. De plus, les barrières biologiques (e.g., barrière hémato-tumorale) et les caractéristiques propres au microenvironnement tumoral limitent la diffusion/pénétration de ces molécules dans les cellules tumorales, restreignant ainsi leurs potentiels thérapeutiques. Pour pallier ces limitations, il est nécessaire de concevoir des systèmes de vectorisation de ces molécules efficaces et ciblés afin d'augmenter leur biodisponibilité intratumorale (i.t.) et d'améliorer leur efficacité thérapeutique tout en réduisant les effets secondaires indésirables sur les tissus sains.

II.2. Les méthodes de délivrance de molécules thérapeutiques

II.2.1 La nanovectorisation

Ces dernières années, les méthodes de délivrance ciblée de médicaments se sont considérablement développées, et un intérêt particulier s'est porté sur les « nanomédicaments ». L'objectif principal de cette méthode de délivrance est d'encapsuler les molécules thérapeutiques (*e.g.*, chimiothérapeutiques, éléments radioactifs, anticorps, acides nucléiques, *etc.*) dans des nanovecteurs afin d'augmenter (i) la solubilité des molécules thérapeutiques, (ii) leur durée de vie plasmatique, (iii) d'améliorer leur biodisponibilité, (iv) de diminuer les effets secondaires sur les tissus sains, (v) d'améliorer leur extravasation et (vi) d'augmenter leur spécificité vis-à-vis des cellules tumorales (**Figure 8**) (Briolay *et al.*, 2021; Jain and Stylianopoulos, 2010; Wolfram and Ferrari, 2019; Zhang *et al.*, 2020).

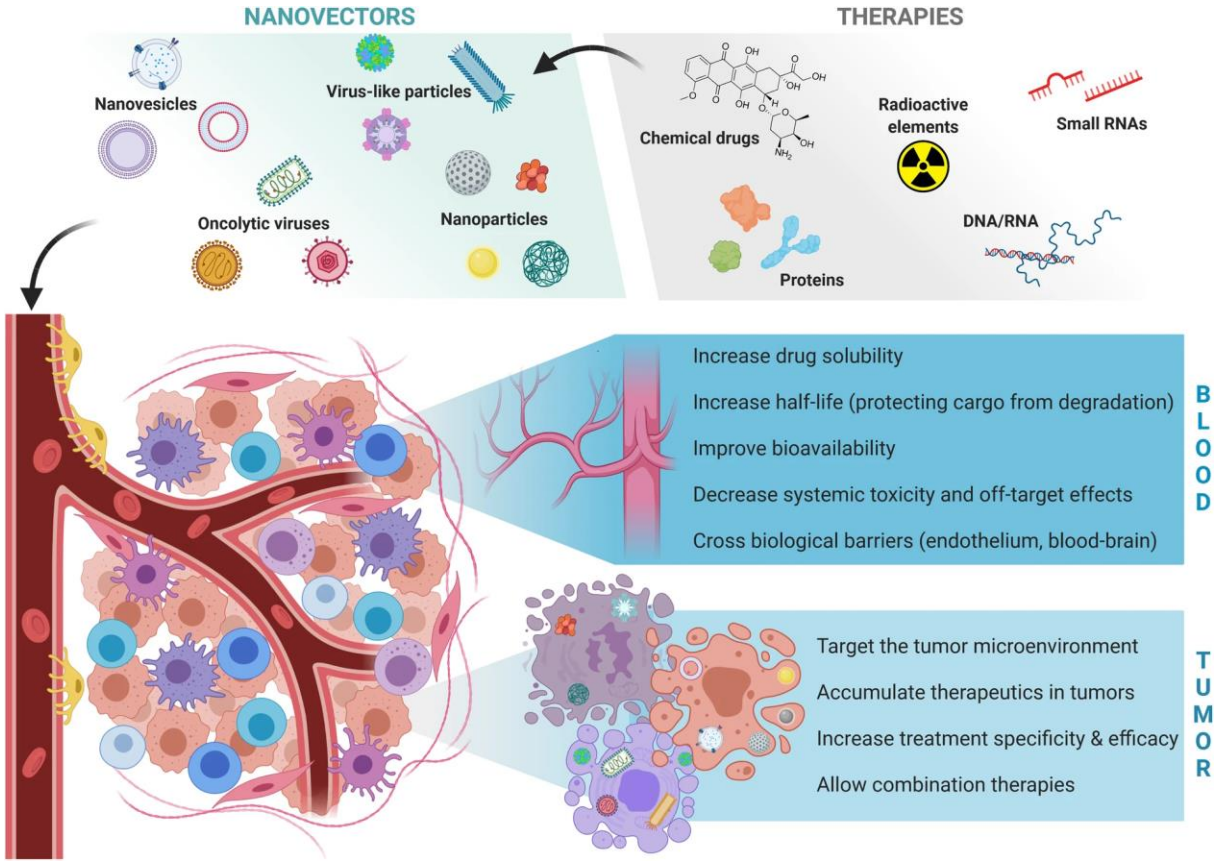


Figure 8. Les différents types de nanovecteurs et leur intérêt dans l'amélioration de la délivrance de molécules thérapeutiques. D'après Briolay *et al.*, 2021.

II.2.2 Évolution des nanomédicaments

Les nanomédicaments de premières générations ont été développés afin de résoudre les problèmes de solubilité de certaines molécules thérapeutiques et de réduire leur toxicité (Caster

et al., 2017). La nanomatrice d'encapsulation était principalement constituée de liposomes. Cependant, il s'est avéré que ces formulations étaient reconnues par le système immunitaire comme des éléments du « non soi ». Ils étaient alors éliminés par phagocytose, engendrant une forte accumulation hépatosplénique (Liu *et al.,* 2022; Woodle and Lasic, 1992). Afin de limiter la reconnaissance par le système immunitaire et d'augmenter leur durée de circulation sanguine, les nanomédicaments de deuxième génération ont été développés. La fonctionnalisation des NanoParticules (NPs) à base de polymères hydrophiles de types polyéthylène glycol (PEG) a permis d'empêcher la reconnaissance de ces NPs par les macrophages et de les stabiliser, augmentant ainsi leur durée de circulation sanguine et leur accumulation passive dans les tumeurs via l'effet EPR (Liu *et al.,* 2022; Sanchez-Cano and Carril, 2020). Par exemple, le Doxil® est une formulation liposomale PEGylée à libération prolongée de la doxorubicine (Dox), connu comme étant le premier nanomédicament à avoir obtenu une autorisation de mise sur le marché (Barenholz, 2012). Cette formulation a permis d'augmenter son temps de circulation de 300 fois par rapport à la Dox libre et de réduire sa cardiotoxicité (Gabizon *et al.,* 2003; O'Brien *et al.,* 2004). Cependant, la présence de molécules de PEG à la surface des NPs peut réduire leur internalisation par les cellules tumorales. Ainsi, l'identification de marqueurs spécifiques des cellules tumorales et une meilleure connaissance du microenvironnement tumoral ont conduit au développement de nanomédicaments de troisième génération afin d'améliorer l'accumulation spécifique des molécules thérapeutiques dans la tumeur. En effet, le ciblage actif des cellules tumorales est possible en greffant des ligands (*e.g.,* anticorps, peptides, protéines, *etc.*) à la surface des NPs, permettant ainsi aux molécules thérapeutiques d'être délivrées spécifiquement dans le tissu cible et réduisant leur accumulation non spécifique dans les tissus sains (Bahrami *et al.,* 2017; Caster *et al.,* 2017; Hu *et al.,* 2017; Marques *et al.,* 2020). La dernière génération de nanomédicaments repose sur l'utilisation d'un stimulus endogène ou exogène (*e.g.,* variation du pH, lumière, température, champ magnétique, ultrasons, *etc.*) qui déclenche la libération de la molécule thérapeutique lorsqu'elle a atteint le tissu cible (Karimi *et al.,* 2016; Moradi Kashkooli *et al.,* 2020; Wei *et al.,* 2017). Ces technologies favorisent une administration ciblée du médicament, limitant ainsi sa libération prématurée et diminuant les doses administrées au patient.

II.2.3 Les différents types de nanovecteurs

Il existe un grand nombre de nanovecteurs, qui peuvent être classés en fonction de leur nature/composition. Les NPs organiques regroupent celles composées de lipides (*e.g.,* liposome, micelle, *etc.*), les assemblages de macromolécules (*e.g.,* ADN/ARN, acide polylactique,

nanogel, dendrimère, ferritine, protéine, polysaccharide, *etc.*) ou les hybrides (*e.g.*, polymérosome, micelle polymérique, *etc.*) (Briolay *et al.*, 2021; Patra *et al.*, 2018; Yao *et al.*, 2020). Les NPs composées de lipides, comme les liposomes, sont les plus utilisées dans les études précliniques et cliniques car elles possèdent une bonne biocompatibilité et peuvent vectoriser une grande variété de molécules thérapeutiques. En effet, les molécules hydrophobes peuvent être insérées dans la couche lipidique des NPs ou être solubilisées dans un compartiment hydrophobe au sein des NPs. Les molécules hydrophiles peuvent être fixées à la surface des NPs ou solubilisées dans un compartiment aqueux au sein des NPs (García-Pinel *et al.*, 2019). Cependant, ces dernières possèdent une faible capacité de chargement en molécule et leur stabilité est souvent limitée, conduisant ainsi à la libération prématurée des molécules thérapeutiques contenues dans ces NPs (Woodle and Lasic, 1992). Les NPs formées à partir d'un assemblage de macromolécules permettent d'augmenter la capacité de charge en molécules thérapeutiques et présentent une plus grande stabilité. La seconde famille de NPs est constituée de NPs inorganiques comme les particules métalliques (*e.g.*, or, zinc, fer, argent, *etc.*), ou à base de silice ou de polystyrène, les « quantum dots » et les nanotubes de carbone (Huang *et al.*, 2011). Cependant, les molécules thérapeutiques ne peuvent être fixées qu'à leur surface ce qui engendre leur dégradation rapide dans le sang. En revanche, les NPs d'or ou les spions (*i.e.*, super paramagnetic iron nanoparticles) sont utilisées pour la thérapie photothermique et l'hyperthermie. Elles se sont montrées particulièrement efficaces en association avec la chimiothérapie (Huang *et al.*, 2011). D'autres types de nanovecteurs sont développés comme les nanovésicules biologiques et bio-inspirées (Parodi *et al.*, 2017). Les microvésicules (50 nm à 1 µm) et les exosomes (50 à 150 nm) sont produits à partir de bourgeonnement de la membrane plasmique ou endosomale de la cellule. Ces nanovecteurs sont peu immunogènes et efficacement internalisés par les cellules (Meng *et al.*, 2020). Les « virus-like particles » (25 à 100 nm) sont composés de structures protéolipidiques qui reproduisent la structure des virus, mais sont dépourvus de matériel génétique. Les « virus-like particles » contiennent des protéines du non-soi, capables de stimuler la réponse immunitaire antitumorale. Ils peuvent être également utilisés comme vecteur d'acides nucléiques ou autres molécules thérapeutiques (Rohovie *et al.*, 2017). Les virus oncolytiques sont capables d'infecter spécifiquement les cellules tumorales, induisant la mort des cellules cancéreuses, et stimulant le système immunitaire. Les virus oncolytiques peuvent être vecteur de gènes codants des protéines cytotoxiques ou immunomodulatrices (*e.g.*, cytokine), ou encore, de gènes permettant d'améliorer leur réplication dans les cellules tumorales (Dhuri *et al.*, 2024). Les minicellules de bactéries (400 nm) sont issues d'une division cellulaire bactérienne anormale

et sont capables de transcrire et de traduire un gène d'intérêt. Elles permettent d'encapsuler une large gamme de molécules chimiothérapeutiques et d'acides nucléiques et présentent une capacité de charge élevée, jusqu'à 1000 fois supérieure à celle des liposomes (Ali *et al.*, 2020). L'ajout d'un anticorps bispécifique à la surface de ces minicellules, ciblant d'une part, les polysaccharides spécifiques des minicellules et, d'autre part, dirigé contre une cible spécifique des cellules tumorales, est facilité par rapport à d'autres types de vecteurs (Ali *et al.,* 2020).

Les stratégies basées sur l'utilisation des nanovecteurs se développent considérablement, donnant lieu à la création de plateforme de délivrance de médicaments complexes pouvant combiner plusieurs molécules thérapeutiques, stratégies de ciblage et/ou agents d'imagerie. Comme évoqué précédemment, le développement de nanovecteurs sensibles à des stimuli externes permet d'améliorer la délivrance ciblée et efficace des molécules thérapeutiques.

II.3. Méthodes physiques de délivrance de molécules thérapeutiques

Les méthodes physiques de délivrance de médicaments reposent sur l'utilisation de différentes sources physiques comme la lumière (laser), les champs électriques, magnétiques et ultrasonores. Ces méthodes provoquent des perturbations mécaniques au niveau des tissus tumoraux, favorisant ainsi leur perméabilisation et la pénétration intracellulaire de molécules chimiothérapeutiques (He *et al.,* 2022; Sun *et al.,* 2020). De plus, ces agents physiques peuvent être utilisés comme des stimuli externes pour activer la libération de molécules thérapeutiques encapsulées dans un vecteur sensible à ces derniers (Rodriguez-Devora *et al.,* 2012).

II.3.1 Laser

Le laser femtoseconde délivre des impulsions très brèves, qui en présence de NPs d'or ou de carbone, induisent la formation transitoire de pores au niveau la membrane plasmique des cellules tumorales (Chakravarty *et al.,* 2010; Schneckenburger, 2019). Ainsi, en combinant cette méthode avec une injection systémique de molécules thérapeutiques, il est possible d'améliorer leur extravasation et leur pénétration au sein des cellules tumorales (Esenaliev *et al.,* 2000). Cette méthode a été étudiée, *in vitro* et *in vivo*, pour perméabiliser des cellules de la barrière hémato-encéphalique, des cellules de leucémie myéloïde chronique, des cellules cancéreuses de prostate, des cellules de gliosarcome et des cellules de CCR (Chakravarty *et al.,* 2010; Esenaliev *et al.,* 2000). D'autre part, le laser peut être exploité comme un stimulus externe pour induire la libération de molécules thérapeutiques encapsulées dans un vecteur et/ou activer des molécules photosensibles à potentiel thérapeutique (*i.e.,* thérapie photodynamique). Ainsi,

le laser peut être utilisé pour perméabiliser les cellules cibles afin d'améliorer la pénétration intracellulaire d'un médicament et/ou comme un activateur physique de molécules photosensibles cytotoxiques (Li *et al.,* 2023).

II.3.2 Champ électrique

L'application d'un champ électrique au niveau de la membrane plasmique des cellules tumorales peut perturber temporairement son intégrité et conduire à la formation transitoire de pores et ainsi faciliter le passage des molécules à travers la membrane plasmique, ce phénomène est défini sous le terme d'électroperméabilisation ou d'électroporation. Cette méthode est étudiée et appliquée en cancérologie pour la délivrance d'acide nucléique (électrotransfert de gènes) et de molécules chimiothérapeutiques (électrochimiothérapie) (de Caro *et al.,* 2024; Gehl, 2003; Malyško-Ptašinskė *et al.,* 2023; Vásquez *et al.,* 2015). Cette modalité est principalement appliquée dans le traitement des tumeurs cutanées. En effet, l'accès des électrodes à des tumeurs profondes est limité. Néanmoins, des développements technologiques sont en cours pour proposer des électrodes qui seraient introduites par voie endocavitaire (Markelc *et al.,* 2013). Cette méthode permet de diminuer les doses de molécules chimiothérapeutiques administrées au patient et, par conséquent, de réduire leurs effets secondaires (Malyško-Ptašinskė *et al.,* 2023; Rega *et al.,* 2022).

II.3.3 Champ magnétique

Les NPs magnétiques sont utilisées pour le traitement des tumeurs par hyperthermie. En effet, sous l'application d'un champs magnétique, ces NPs convertissent l'énergie magnétique en chaleur créant un échauffement local pouvant conduire à la mort des cellules tumorales par hyperthermie (Hauser *et al.,* 2015; Price *et al.,* 2018). Ce type de traitement ciblé peut être utilisé en combinaison avec la chimiothérapie ou avec la radiothérapie. En effet, l'augmentation locale de la température favorise la pénétration des molécules thérapeutiques dans les cellules tumorales (Liu *et al.,* 2020). De plus, l'hyperthermie peut inhiber les mécanismes de réparations de l'ADN des cellules tumorales traitées par chimiothérapie, conduisant à un effet thérapeutique synergique de l'hyperthermie et de la chimiothérapie (Liu *et al.,* 2020; Oei *et al.,* 2015). Comme évoqué précédemment, les NPs magnétiques peuvent servir de nanovecteurs, par exemple, en les recouvrant, avec un polymère thermosensible permettant à la fois l'encapsulation de molécules thérapeutiques et la libération contrôlée et ciblée de ces dernières après l'application d'un champ magnétique alternatif sur la tumeur (Briolay *et al.,* 2021; Ferjaoui *et al.,* 2019). De plus, l'hyperthermie accroît localement le débit sanguin et augmente le taux d'oxygène. Ce

dernier étant nécessaire à la formation de radicaux libres en radiothérapie, la combinaison de l'hyperthermie et de la radiothérapie génère un effet thérapeutique synergique (Liu *et al.*, 2020). Ainsi, l'hyperthermie induite par les NPs, sous l'application d'un champ magnétique, permet de sensibiliser les tumeurs à la chimiothérapie et à la radiothérapie.

II.3.4 Champ ultrasonore

La sonoporation est une méthode physique de délivrance ciblée et non invasive de molécules thérapeutiques qui associe des microbulles (MBs) de gaz et des ultrasons afin de perméabiliser transitoirement des barrières biologiques (*e.g.*, barrière hémato-tumorale, barrière hémato-encéphalique, *etc.*) et les membranes cellulaires permettant ainsi l'extravasation des molécules thérapeutiques et leur pénétration au sein du tissu/cellules cibles (Kooiman *et al.*, 2020; Lammertink *et al.*, 2015; Presset *et al.*, 2020; Sennoga *et al.*, 2017) (**Figure 9**).

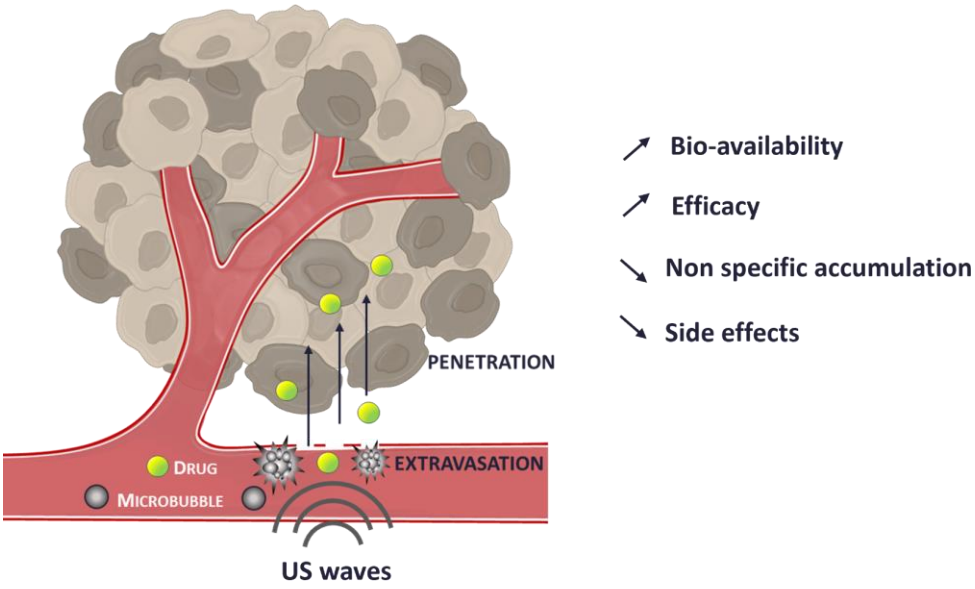


Figure 9. Perméabilisation de la barrière hémato-tumorale par sonoporation favorisant une délivrance ciblée de molécules thérapeutiques dans la tumeur.

I.III. La sonoporation

III.1. Les agents de contraste ultrasonores

Les agents de contraste ultrasonores sont principalement utilisés en imagerie de contraste ultrasonore pour évaluer la perfusion microvasculaire des tissus (Fröhlich *et al.*, 2015; Hoffmann, 2001; Wilson and Burns, 2010). Cette modalité d'imagerie est utilisée en cardiologie pour diagnostiquer des anomalies vasculaires ou du myocarde, et en oncologie pour caractériser l'angiogenèse tumorale et détecter des lésions cancéreuses, principalement hépatiques et mammaires (Baud *et al.*, 2017; Forsberg *et al.*, 2007; Lassau *et al.*, 2014, 2011;

Pochon *et al.,* 2010). Ces agents de contraste ultrasonores sont composés d'une solution de MBs contenant un gaz encapsulé par une paroi biocompatible. Ils sont injectés par voie i.v. (*e.g.*, bolus ou perfusion) afin d'augmenter l'échogénicité du compartiment vasculaire. Par conséquent, leurs propriétés physicochimiques (*e.g.,* taille, chimie de la paroi, nature du gaz, *etc.*) et pharmacologiques (*e.g.,* pharmacocinétique et biodistribution) définissent leur performance en tant qu'agent de contraste (*e.g.,* solubilité, stabilité, échogénicité, *etc.*) (Ignee *et al.,* 2016; Sennoga *et al.,* 2017). La taille des MBs est un paramètre essentiel et doit être inférieure à 10 μm pour faciliter le franchissement du lit capillaire pulmonaire et permettre leur diffusion dans la circulation sanguine (Appis *et al.,* 2015). La nature du gaz est un paramètre déterminant la solubilité des MBs dans le sang et les propriétés acoustiques des MBs. En effet, les premières générations de MBs étaient composées d'air, et donc très solubles dans le sang, limitant leur durée de vie plasmatique (Schutt *et al.,* 2003). Des améliorations ont été apportées en utilisant des gaz comme le perfluorocarbone (perfluorobutane, perfluoropropane) ou l'hexafluorure de soufre, biologiquement inertes avec un poids moléculaire élevé, réduisant ainsi leur dissolution dans le sang. L'enveloppe des MBs permet de stabiliser l'interface air/liquide. Elle est biocompatible et peut être constituée de lipides (SonoVue® ou Definity®), de polymères, de surfactants et de protéines (Optison®) (Ignee *et al.,* 2016).

III.2. Propriétés acoustiques des microbulles

L'échogénicité d'une MB repose sur la différence d'impédance acoustique entre la MB et son environnement, entrainant ainsi la réflexion de l'onde ultrasonore. En effet, le gaz encapsulé dans la MB possède une impédance acoustique supérieure au sang et aux tissus environnants, augmentant ainsi le contraste des images échographiques (Kooiman *et al.*, 2020, 2014). D'autre part, lorsqu'une onde ultrasonore interagit avec une MB, cette dernière subit des phases de compression lorsque l'amplitude de l'onde est positive, et de dilation lorsque l'amplitude de l'onde est négative (Kooiman *et al.,* 2014) (**Figure 10**). Ces oscillations peuvent être plus ou moins intenses en fonction de la pression acoustique exercée sur les MBs. Les MBs sont alors dans un régime de cavitation stable ou inertielle. A de faibles pressions acoustiques, la MB oscille de façon linéaire en fonction de l'amplitude de l'onde, ce qui correspond à la cavitation stable. Lorsque la pression acoustique augmente, la MB subit des déformations asymétriques (cavitation inertielle) pouvant aller jusqu'à l'explosion de la MB (Kooiman *et al.,* 2014).

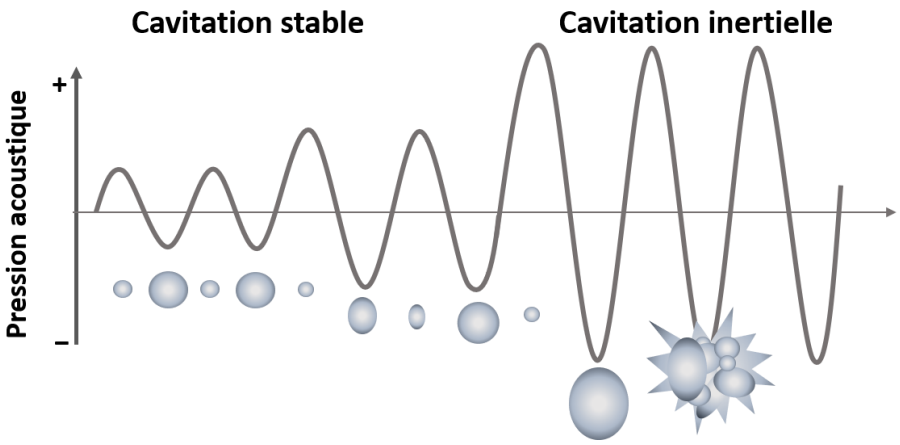


Figure 10. Phénomène de cavitation des microbulles en fonction de la pression acoustique.

III.3. Effet de l'oscillation des MBs sur les barrières biologiques

Au-delà de leurs diverses applications en imagerie diagnostique, l'utilisation des MBs s'est étendue à un usage thérapeutique pour la délivrance ciblée de médicaments par sonoporation. Plusieurs phénomènes acoustiques sont impliqués dans le processus de sonoporation en fonction du régime de cavitation des MBs (**Figure 11**).

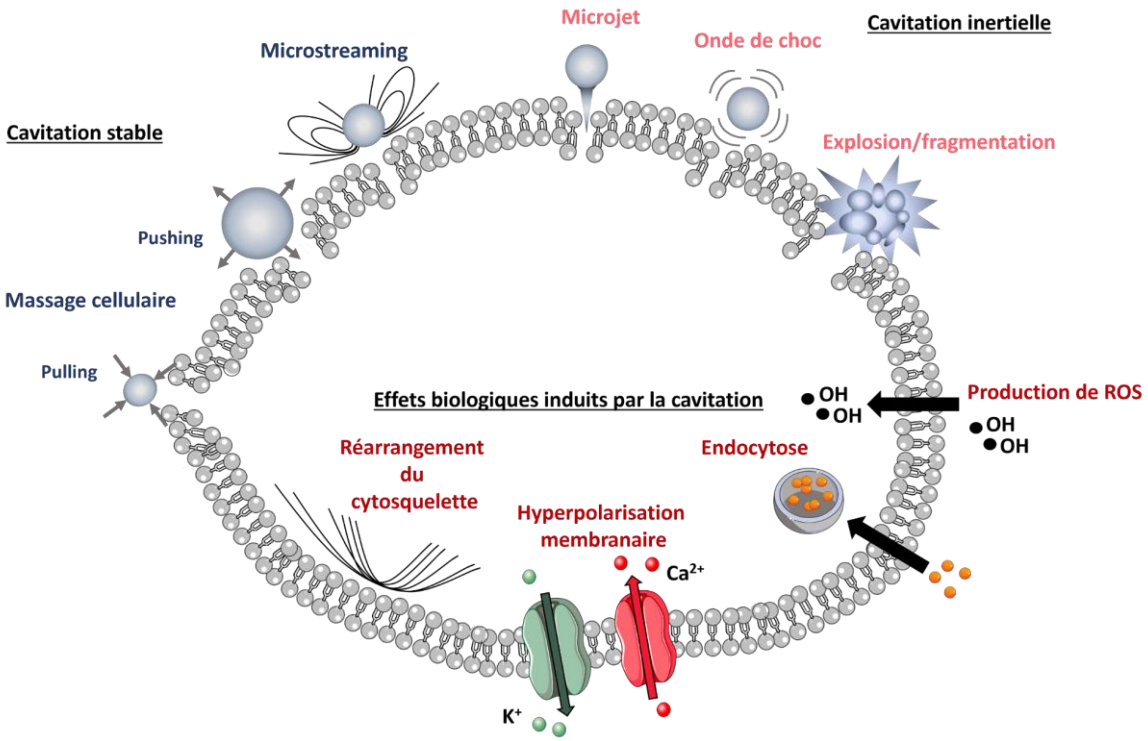


Figure 11. Phénomènes acoustiques impliqués dans le processus de sonoporation et effets biologiques induits par la cavitation des microbulles à proximité de la membrane plasmique.

Dans un régime de cavitation stable, les oscillations volumétriques de la MB en contact avec la membrane d'une cellule ou d'une paroi endothéliale induisent une déformation mécanique

de ces dernières (phénomène de pulling/pushing). Lorsque ces oscillations se produisent à une certaine distance de ces barrières biologiques, des microflux sont générés autour des MBs. Ces microflux induisent des forces de cisaillement sur ces barrières biologiques générant ainsi leur perméabilisation (Doinikov and Bouakaz, 2010; Wu, 2002). Dans un régime de cavitation inertielle, les oscillations non linéaires des MBs mènent à leur destruction et à la production d'une onde de choc qui vient percuter ces barrières biologiques et les perméabiliser. Dans de rare cas, une déformation asymétrique des MBs conduit à la formation de microjets qui viennent perforer et donc perméabiliser ces barrières biologiques. Ces différents phénomènes acoustiques produisent des effets mécaniques, des effets chimiques (*e.g.,* production locale d'espèces réactives de l'oxygène) et des effets thermiques (*e.g.,* augmentation locale de la température) au contact de barrières biologiques telles que la paroi endothéliale de vaisseaux sanguins ou la membrane plasmique des cellules (Kooiman *et al.,* 2020; Prentice *et al.,* 2005). Ces différents effets induisent la perméabilisation de ces barrières biologiques aux molécules thérapeutiques en stimulant des voies intracellulaires (formation de pores membranaires, stimulation de l'endocytose), paracellulaires (perturbation des jonctions serrées) et transcellulaires (stimulation de la transcytose) (Derieppe *et al.,* 2015; Marmottant and Hilgenfeldt, 2003; Meijering *et al.,* 2009; Tran *et al.,* 2007; Yang *et al.,* 2020; Zeghimi *et al.,* 2015).

III.4. Microbulles pour la délivrance ciblée de médicament

Les MBs sont soit coadministrées avec les molécules thérapeutiques, soit administrées de manière séquentielle avec ces molécules, soit utilisées comme vecteur (**Figure 12**). Dans la majorité des protocoles *in vivo* de délivrance de molécules thérapeutiques, la stratégie de coadministration est prédominante. L'administration séquentielle des MBs et des molécules thérapeutiques nécessite une bonne connaissance des propriétés physicochimiques et pharmacologiques de ces dernières (Lammertink *et al.,* 2015).

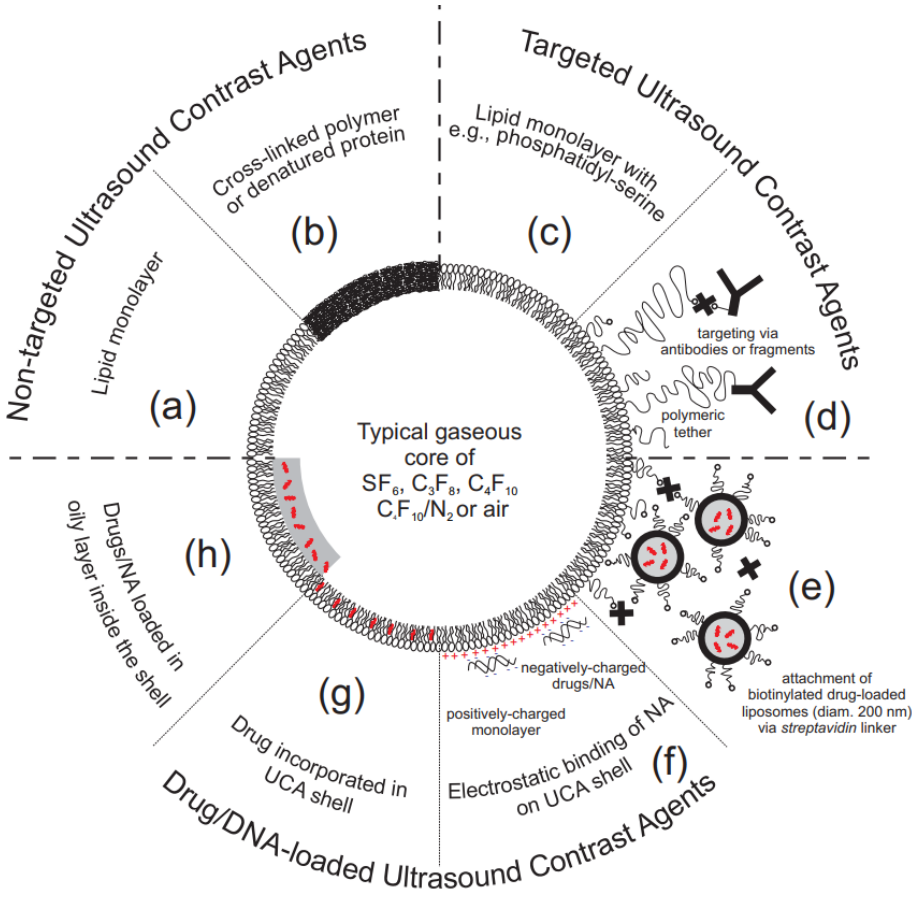


Figure 12. Schéma des différents types de microbulles utilisés en imagerie et en thérapie. La coque de la microbulle, renfermant le gaz, peut être constituée (a) d'une monocouche lipidique, (b) de polymères réticulés ou de protéines dénaturées. Des molécules spécifiques peuvent être greffées à la surface des MBs, telles que (c) des phosphatidylsérines, (d) des anticorps monoclonaux ou des fragments d'anticorps, leur permettant de cibler spécifiquement des tissus *in vivo*. (e) Des médicaments hydrophiles peuvent être chargés dans des liposomes conjugués à la surface des MBs ; (f) des médicaments ou des acides nucléiques chargés négativement peuvent être liés électrostatiquement à la surface des MBs chargées positivement ; (g) des médicaments peuvent être incorporés dans la couche lipidique de l'enveloppe de la MB ou (h) à l'intérieur de la MB. D'après Sennoga *et al.*, 2017.

L'utilisation des MBs comme vecteur de molécules thérapeutiques est possible et dépend des propriétés physicochimiques de la MB et de la molécule thérapeutique (Kooiman *et al.*, 2014; Navarro-Becerra and Borden, 2023; Sennoga *et al.*, 2017). Par exemple, les acides nucléiques ayant une charge négative peuvent se lier par des interactions électrostatiques aux lipides, chargés positivement, qui constituent la paroi de la MB. Les molécules thérapeutiques lipophiles sont insérées dans la paroi hydrophobe des MBs ou solubilisées dans une cavité hydrophobe au sein des MBs. Les molécules hydrophiles sont encapsulées dans des NPs qui sont liées à la surface des MBs. Lorsque les MBs atteignent le tissu d'intérêt, l'exposition de ce dernier aux ultrasons induit non seulement le relargage des molécules thérapeutiques des MBs mais également la perméabilisation de ce tissu. Cependant, l'utilisation de ces MBs est limitée

par l'efficacité de chargement en molécules thérapeutiques dans/sur les MBs. L'efficacité des protocoles de chargement des MBs en molécules thérapeutiques dépend des propriétés physicochimiques de ces molécules et des doses nécessaires pour obtenir un effet thérapeutique. Pour améliorer ces protocoles, de nouvelles formulations consistant à greffer à la surface des MBs de nombreuses NPs à cœur hydrophile ou hydrophobe sont en cours de développement et de validation.

De plus, l'utilisation de MBs ciblées est une stratégie prometteuse pour augmenter le ciblage de la délivrance de molécules thérapeutiques par sonoporation. Cette stratégie consiste à intégrer un ligand ou un anticorps à la surface des MBs permettant l'accumulation spécifique des MBs chargées en molécules thérapeutiques dans le tissu d'intérêt. Par exemple, le récepteur VEGFR2 (Vascular Endothelial Growth Factor Factor), marqueur de l'angiogenèse tumorale peut être ciblé par un anticorps anti-VEGFR2 présent à la surface des MBs. Ce ciblage permet également de visualiser et de caractériser la vascularisation des tumeurs lors d'une imagerie diagnostique (Charalambous *et al.,* 2021; Ingram *et al.,* 2020; Smeenge *et al.,* 2017).

I.IV. Études *in vitro*

L'efficacité de la sonoporation à délivrer des molécules thérapeutiques telles que des chimiothérapeutiques (Chen *et al.,* 2018; Hayashi *et al.,* 2009; Lamanauskas *et al.,* 2013; Yukiko Watanabe *et al.,* 2008) ou des acides nucléiques (Hayashi *et al.,* 2009; Nie *et al.,* 2015; Wang *et al.,* 2022), dans diverses lignées cellulaires de CCR a été démontrée dans plusieurs études *in vitro*. De plus, ces études ont évalué l'efficacité de la délivrance de ces molécules soit en coadministration avec les MBs soit en utilisant des MBs chargées et/ou ciblées. L'ensemble de ces études sont répertoriées dans le **Tableau 1**.

IV.1. Molécules chimiothérapeutiques

Plusieurs études ont évalué la délivrance de molécules chimiothérapeutiques par sonoporation. Parmi ces études, certains protocoles ont exploré la coadministration de cisplatine et de bléomycine avec des MBs, tandis qu'un autre protocole a étudié l'efficacité de la codélivrance de la camptothécine et la floxuridine, chargées dans une MB, associée à la thérapie photodynamique. Les protocoles de sonoporation ont été réalisés sur des cellules en suspension ou sur des cellules en monocouche de CCR murin (Colon-26) et humain (HCT-116 et HT-29).

Watanabe *et al.,* ont ainsi démontré l'efficacité thérapeutique de la délivrance du cisplatine par sonoporation dans la lignée cellulaire Colon-26, dérivée d'un adénocarcinome murin

(Yukiko Watanabe *et al.,* 2008). Une suspension cellulaire (5.10^5 cellules/mL) est incubée en présence de 1 mM cisplatine et de MBs (7 % v/v) puis exposée à une séquence ultrasonore (Fréquence de 1 MHz ; intensité acoustique de 1 W/cm^2 ; Rapport cyclique [duty cycle ; DC] = 50 % ; Fréquence de répétition des impulsions [pulse repetition frequency ; PRF] = 250 Hz) pendant 10 secondes. Après 24 h, la viabilité cellulaire et l'apoptose ont été évaluées par un test MTT et par une mesure de l'activité de la caspase 3 activée, respectivement. La délivrance de cisplatine par sonoporation (US+MBs) a induit une diminution de la viabilité cellulaire d'environ 50 % par apoptose comparativement aux cellules exposées aux ultrasons seuls en présence de cisplatine. Ces résultats suggèrent que la délivrance de cisplatine par ultrasons seuls n'augmente pas la concentration intracellulaire de cisplatine et ne potentialise donc pas son efficacité thérapeutique, démontrant ainsi l'importance des MBs dans le processus de sonoporation. En effet, Lamanauskas *et al.,* ont étudié le rôle des MBs dans la délivrance de la bléomycine par sonoporation dans des cellules HCT-116 de CCR humain (Lamanauskas *et al.,* 2013). Pour atteindre cet objectif, une suspension cellulaire (5.10^5 cellules/mL) est incubée avec 20 nM de bléomycine et des MBs (SonoVue® ou BR14®, ratio MB/cellules de 5 :1) puis exposée à une séquence ultrasonore (1 MHz ; DC = 10 %) pendant 0,1 à 5 s en faisant varier la pression acoustique (Peak Negative Pressure ; PNP) de 100 à 300 kPa. La destruction des MBs a été déterminée en mesurant l'atténuation ultrasonore de ces dernières au cours de la sonoporation. La viabilité cellulaire a été évaluée par un test MTT, 24 h après la sonoporation. D'après leurs résultats, la diminution de la viabilité cellulaire induite par la délivrance de la bléomycine par sonoporation est corrélée positivement avec la destruction des MBs. En effet, l'exposition d'une suspension cellulaire à une courte séquence ultrasonore (100 kPa, 0,3 s) en présence de bléomycine induit une cavitation stable qui ne permet pas d'induire une diminution significative de la viabilité cellulaire. Une destruction maximale des MBs est atteinte lorsqu'une pression acoustique de 300 kPa pendant 5 secondes est appliquée. Dans ces conditions, la délivrance de la bléomycine par sonoporation induit une diminution de 30 % de la viabilité cellulaire. Cette étude démontre que l'efficacité de la sonoporation est dépendante de la destruction des MBs et des paramètres ultrasonores utilisés.

Parmi les études *in vitro*, il y a peu de données disponibles sur la corrélation entre la potentialisation de l'efficacité des molécules thérapeutiques délivrées par sonoporation et l'augmentation de la concentration intracellulaire de ces dernières. L'utilisation de molécules thérapeutiques possédant des propriétés de fluorescence intrinsèques ou le marquage de ces molécules par des agents fluorescents permet d'observer et de quantifier l'augmentation de la

pénétration intracellulaire de ces molécules après sonoporation par microscopie à fluorescence. Par exemple, Chen *et al.,* ont étudié l'efficacité d'une thérapie combinant un traitement de chimiothérapie et une thérapie photodynamique induite par sonoporation (Chen *et al.,* 2018). Pour atteindre ces objectifs, ils ont développé des MBs chargées en porphyrine (photosensibilisateur), en camptothécine et en floxuridine (agents chimiothérapeutiques) afin de les codélivrer dans les cellules HT-29 par sonoporation. Les propriétés spectrales de la porphyrine et de la camptothécine leur a permis d'étudier la pénétration intracellulaire de ces molécules par microscopie à fluorescence. Une monocouche de cellules HT-29 est exposée à une séquence ultrasonore (1 MHz, 1 W/cm^2 ; DC = 50 %) en présence de MBs thérapeutiques pendant 1 min, suivie ou non de l'activation de la porphyrine par une irradiation laser. Les résultats montrent que la sonoporation a permis d'améliorer significativement l'internalisation intracellulaire de la porphyrine et de la camptothécine dans les cellules HT-29. Ce phénomène a conduit à une diminution d'un facteur 1,5 de la viabilité cellulaire comparativement au traitement des cellules avec les MBs seules. De plus, l'irradiation laser des cellules ainsi traitées a induit un effet cytotoxique additionnel significatif démontrant la synergie des deux thérapies. Pour conclure, l'ensemble de ces études sur la délivrance de molécules chimiothérapeutiques par sonoporation démontrent la capacité de cette modalité à améliorer significativement l'efficacité thérapeutique de ces molécules.

IV.2. Vectorisation d'acides nucléiques

La sonoporation apparait également comme une méthode prometteuse de vectorisation de gènes thérapeutiques. L'efficacité de la sonoporation à vectoriser des acides nucléiques, tels que des ADN plasmidiques, des petits ARN interférents, des petits ARN en épingle à cheveux (short hairpin RNA, shRNA), des micro ARN (miARN) et des oligonucléotides, a été démontrée dans plusieurs modèles de cancer *in vitro* et *in vivo* (Navarro-Becerra and Borden, 2023; Tomizawa *et al.,* 2013). Dans ce contexte, plusieurs études ont évalué l'efficacité de cette méthode sur des cellules de CCR humain (LoVo et SW620) et murin (Colon-26), en utilisant des shRNA pour inhiber l'expression d'oncogènes ou des plasmides codant pour l'interféron-β (IFN-β) afin de stimuler la réponse immunitaire antitumorale.

Les analyses de biomarqueurs diagnostiques et/ou pronostiques du CCR ont identifié plusieurs cibles thérapeutiques. En effet, la dérégulation de l'expression de certains micro-ARN favorise l'initiation et la progression tumorale. Ils sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires comme la prolifération cellulaire, la migration cellulaire, l'invasion tumorale,

l'angiogenèse et l'apoptose (Mishra *et al.,* 2016). Par exemple, le miR-503–5p, micro-ARN, est surexprimé dans le tissu tumoral et dans le sérum des patients atteints de CCR. Cette surexpression est associée à des résistances à l'oxaliplatine (Li *et al.,* 2020; Wen *et al.,* 2021; Xu *et al.,* 2017). Une étude *in vitro* a démontré que l'inhibition de l'expression du miR-503–5p induit une diminution des capacités des cellules tumorales de CCR à migrer et à proliférer, et augmente leur mort par apoptose (Wen *et al.,* 2021). Cependant, l'efficacité de transfection de plasmides par lipofection est peu efficace *in vivo*. Dans ce contexte, Wang *et al.,* ont vectorisé par sonoporation un plasmide codant un ARN interférent, shmiR-503–5p, ciblant le miR-503–5p, dans les cellules de CCR, LoVo et SW620 (Wang *et al.,* 2022). Pour atteindre cet objectif, les cellules sont incubées avec des MBs et le plasmide, shmiR-503–5p-EGFP, puis exposées à une séquence ultrasonore (2 MHz ; 0,5 ou 1 ou 2,5 W/cm^2 ; index mécanique (IM) = 0,28) pendant 30 secondes. L'ajout de la séquence codant la protéine fluorescente, GFP (Green Fluorescent Protein), dans le plasmide a permis d'évaluer le taux de transfection par microscopie à fluorescence. L'augmentation du taux de cellules transfectées avec le plasmide shmiR-503–5p par sonoporation est associée à la diminution significative de l'expression du miR-503-5p dans ces cellules, comparativement aux cellules transfectées par lipofection. Cette inhibition de l'expression du miR-503-5p conduit à une diminution de la viabilité cellulaire, de la migration et de l'invasion des cellules tumorales. Ainsi, plusieurs études ont démontré que la méthode de sonoporation améliore la vectorisation des acides nucléiques au sein des cellules de CCR.

Malgré leur faible nombre, les études in vitro démontrent que des molécules thérapeutiques aussi diverses que des molécules chimiothérapeutiques et des acides nucléiques peuvent être vectorisées efficacement par sonoporation.

Tableau 1. Études *in vitro* de la délivrance de molécules thérapeutiques par sonoporation dans des lignées cellulaires de CCR.

Réf.	Cellules	Molécule	MB	Paramètres acoustiques	Augmentation de la pénétration intracellulaire	Augmentation de l'efficacité thérapeutique	Principaux résultats
(Y. Watanabe *et al.*, 2008)	Colon 26 (CCR murin)	Cisplatine	MB contenant du C_3F_8	1 MHz, 1 W/cm^2, DC = 50 %, PRF 250 Hz, pendant 10 s	NA	Oui	• Diminution significative de la viabilité cellulaire
(Chen *et al.*, 2018)	HT-29 (CCR humain)	• Porphyrine (agent photodynamique) • Camptothécine et floxuridine (chimiothérapies)	MB contenant du C_3F_8 chargée en drogues	1 MHz, 1 W/cm^2, DC = 50 %, pendant 1 min	Oui	Oui	• Augmentation de l'internalisation intracellulaire des molécules thérapeutiques • Augmentation de la cytotoxicité • Effet synergique de la chimiothérapie et de la thérapie photodynamique
(Hayashi *et al.*, 2009)	Colon 26 (CCR murin)	• Gène codant l'interféron-β (IFN-β) • Cisplatine	BR14®	1 MHz, 0,5 W/cm^2, DC = 20 %, pendant 30 s	NA	Oui	• Augmentation significative de la production d'IFN-β • Diminution significative de la viabilité cellulaire
(Wen *et al.*, 2021)	LoVo et SW620 (CCR humain)	Plasmide codant un shmiR-503–5p	SonoVue®	2 MHz, 0,5 ou 1 ou 2,5 W/cm^2, IM = 0,28, pendant 30 s	NA	Oui	• Diminution de l'expression du miR-503-5p • Diminution significative de la viabilité, de la migration et de l'invasion des cellules tumorales
(Nie *et al.*, 2015)	LoVo (CCR humain)	Plasmide codant Rac1-shARN	SonoVue®	1 MHz, 2 W/cm^2, pendant 5 min	NA	Oui	• Inhibition de l'expression de la protéine Rac1 • Réarrangement du cytosquelette • Inhibition de la migration et de l'invasion cellulaire • Augmentation significative de l'apoptose
(Lamanauskas *et al.*, 2013)	HCT-116 (CCR humain)	Bléomycine	SonoVue® ou BR14®	1 MHz, DC = 10 %, 1000 cycles par pulse, PNP de 100 à 300 kPa, pendant 300 ms à 5 s	NA	Oui	• Corrélation entre l'efficacité de la sonoporation et la destruction des MBs • Diminution significative de la viabilité cellulaire

CCR : cancer colorectal ; MB : microbulle ; DC : duty cycle (rapport cyclique) ; PRF : pulse repetition frequency (fréquence de répétition des impulsions) ; NA : non applicable ; IFN-β : interféron-β ; IM : index mécanique ; PNP : peak negative pressure (pic négatif de pression)

I.V. Études précliniques

Les études précliniques menées sur des modèles *in vivo* de CCR, ont permis d'évaluer la capacité de la sonoporation à délivrer de nombreuses molécules thérapeutiques, incluant des molécules chimiothérapeutiques (Dox, cisplatine, camptothécine/floxuridine, irinotécan, SN-38, 5-FU et oxaliplatine), des anti-angiogéniques (endostatine), des immunothérapies comme les inhibiteurs de points de contrôle immunitaires, des acides nucléiques et également des cellules NK (Natural Killer). Certains protocoles reposent sur une stratégie de coadministration des molécules thérapeutiques et des MBs, tandis que d'autres ont utilisé des MBs chargées en molécules thérapeutiques ou des MBs ciblées (anti-VEGFR2). L'ensemble des protocoles de sonoporation a été mené sur des modèles de CCR murins ou humains sous-cutanés. Ces études sont répertoriées dans le **Tableau 2**.

V.1. Coadministration chimiothérapie et MB

L'une des molécules chimiothérapeutiques les plus étudiées dans les protocoles de sonoporation est la Dox, sous forme libre ou nanoformulée. La Dox est l'un des agents anticancéreux les plus utilisés seul ou en combinaison avec d'autres médicaments pour traiter les tumeurs solides. Cependant, l'utilisation clinique actuelle de la Dox libre reste limitée en raison des effets indésirables sévères qu'elle engendre. L'encapsulation de la Dox dans des liposomes PEGylés (Doxil® ou Caelyx®) ou dans des NPs polymériques a considérablement réduit sa cardiotoxicité et d'autres de ces effets indésirables. Cependant, cette formulation limite l'accumulation i.t. de la Dox (O'Brien *et al.,* 2004). Dans ce contexte, afin d'augmenter l'efficacité thérapeutique de sa formulation liposomale, sa coadministration avec des MBs et l'exposition des tissus tumoraux aux ultrasons a été évaluée *in vivo* dans plusieurs études précliniques (Huang *et al.,* 2023; Lin *et al.,* 2012b, 2012a; Nittayacharn *et al.,* 2019). En effet, Lin *et al.,* ont étudié l'efficacité de la délivrance de la formulation liposomale de la Dox par sonoporation sur la croissance tumorale de tumeurs de petites (< 30 mm^3) et grandes tailles (> 100 mm^3) dans un modèle murin sous-cutané d'adénocarcinome colorectal murin (CT-26) (Lin *et al.,* 2012a). Lorsque les tumeurs ont atteint une taille inférieure à 30 mm^3 ou supérieure à 100 mm^3, les souris ont toutes reçu une injection i.v. de 5 mg/kg de Dox, une fois par semaine pendant 3 semaines. Pour le groupe de souris traitées par sonoporation, ces dernières ont reçu une injection de 100 µL/kg de MB (SonoVue®) suivie d'une exposition aux ultrasons (Fréquence 1 MHz, 10 ms de durée d'impulsion, DC = 1 %, PRF = 1 Hz) pendant 2 min. Les résultats montrent qu'après deux traitements, la délivrance de la Dox à 5 mg/kg par sonoporation est

significativement plus efficace que l'administration de la Dox seule dans des tumeurs de taille inférieure à 30 mm^3, induisant ainsi une diminution significative de la croissance tumorale. Cependant, l'administration de la Dox à 5 mg/kg délivrée par sonoporation ne se révèle pas plus efficace que le traitement avec la Dox seule dans des tumeurs de taille supérieure à 100 mm^3. L'étude de l'accumulation de la Dox dans les tissus tumoraux peut en partie expliquer ces résultats. En effet, l'analyse de la concentration i.t. de la Dox 24 heures après la sonoporation de ces tumeurs (> 100 mm^3) montre que l'accumulation de la Dox dans les tissus tumoraux est plus rapide et deux fois plus élevée lorsque la Dox est délivrée par sonoporation, comparativement à son administration seule. Cependant, à 48 h après sonoporation, les concentrations de Dox dans ces deux groupes expérimentaux sont équivalentes. Concernant les tumeurs supérieures à 100 mm^3, une dose de Dox administrée à 10 mg/kg a été testée et a permis de diminuer significativement la croissance tumorale lorsque cette dernière est délivrée par sonoporation en comparaison à une administration seule de Dox à cette même dose. Cette étude démontre que le protocole de coadministration de la Dox et des MBs, combinée à la sonoporation, est une méthode efficace pour améliorer la pénétration i.t. de la Dox et augmente son efficacité thérapeutique, en particulier pour les tumeurs de petites tailles (< 30 mm^3). Elle démontre également que l'efficacité de la sonoporation dépend de la taille des tumeurs. En effet, pour les tumeurs d'une taille supérieure à 100 mm^3, il est nécessaire d'augmenter la dose de Dox de 5 mg/kg à 10 mg/kg afin d'améliorer significativement l'efficacité thérapeutique de la Dox délivrée par sonoporation, par rapport à l'administration seule de Dox.

V.2. Microbulles chargées en chimiothérapie

L'utilisation de MBs chargées en molécules thérapeutiques présente plusieurs avantages. Tout d'abord, cette stratégie permet de surmonter les différences de biodistribution entre les MBs et les molécules thérapeutiques, assurant ainsi leur colocalisation pendant la sonoporation. L'encapsulation de la molécule thérapeutique dans les MBs limite la pénétration des molécules thérapeutiques dans les tissus sains, réduisant leurs effets secondaires. Dans cette configuration, les MBs agissent comme des vecteurs, en protégeant les molécules thérapeutiques d'une éventuelle dégradation et permettant leur libération ciblée et contrôlée. De plus, l'utilisation de MBs ciblées permet d'améliorer d'avantage leur accumulation dans le tissu cible. Dans ce contexte, Ingram *et al.,* ont étudié l'efficacité thérapeutique de l'administration d'irinotécan par sonoporation en utilisant des MBs chargées en irinotécan et ciblant le VEGFR2 (thMB ; therapeutic microbubble) dans un modèle murin d'adénocarcinome colorectal sous-cutané (CT-26) (Ingram *et al.,* 2020). Les souris ont reçu une injection i.v. de thMB (150-200 µL de 10^8

thMB, soit 2 mg/kg d'irinotécan) ou d'irinotécan libre (2 mg/kg). Quatre minutes après l'injection des thMBs, les tumeurs ont été exposées aux ultrasons pendant cinq secondes (Fréquence de 2,2 MHz, PNP de 260 kPa, PRF de 1 kHz, impulsion ultrasonore de 10 µs). Les souris ont reçu ce traitement cinq fois pendant trois semaines. Ce protocole a significativement inhibé la croissance tumorale par rapport à l'administration seule de l'irinotécan sous sa forme libre. En effet, l'inhibition de la croissance tumorale était de 38 % pour l'irinotécan libre par rapport à des tumeurs non traitées, et de 50 % pour l'irinotécan délivré par sonoporation. En mesurant les concentrations d'irinotécan et de SN-38 (métabolite actif de l'irinotécan) dans les tumeurs, les auteurs ont montré que l'efficacité thérapeutique de l'irinotécan délivré par sonoporation était liée à une augmentation significative des concentrations d'irinotécan et de SN-38 dans les tumeurs. Ces résultats indiquent que la combinaison de MBs chargées en irinotécan et d'ultrasons est une stratégie efficace pour l'administration de chimiothérapies dans le CCR.

Comme décrit précédemment, les protocoles de chimiothérapie associent le plus souvent le 5-FU, l'irinotécan et l'oxaliplatine afin de traiter les patients atteints d'un CCR localisé ou métastatique. Cependant, ce type de traitement peut engendrer d'importants effets secondaires. Dans ce contexte, Gao *et al.*, ont étudié l'efficacité thérapeutique d'un traitement avec des MBs chargées avec ces trois molécules chimiothérapeutiques (MB-FIRINOX) dans modèle murin de xénogreffe sous-cutanée de CCR humain (HT-29) (Gao *et al.,* 2021). Lorsque les tumeurs ont atteint un volume tumoral de 100 mm^3, les souris ont été réparties en 4 groupes ; un groupe contrôle (sans traitement), un groupe traité avec une injection i.v. de FOLFIRINOX (oxaliplatine à 2,5 mg/kg, acide folinique à 50 mg/kg, irinotécan à 25 mg/kg et 5-FU à 25 mg/kg) ; un groupe recevant une injection i.v. de MB-FIRINOX (irinotécan à 2,72 ± 1,64 mg/kg, oxaliplatine à 1,63 ± 0,19 mg/kg et 5-FUR à 1,86 ± 0,14 mg/kg et une injection intrapéritonéale (i.p.) d'acide folinique à 50 mg/kg) sans ultrasons, et enfin le dernier groupe recevant une injection i.v. des MB-FIRINOX exposé aux ultrasons. Ces différents traitements ont été répétés cinq fois sur une période de dix-sept jours. Les tumeurs ont été exposées aux ultrasons (Fréquence de 1 MHz, DC = 30 %, PRF de 100 Hz, PNP de 480 kPa,) pendant 3,5 min. Les résultats ont montré une diminution significative de la croissance tumorale pour le groupe MB-FIRINOX + ultrasons, avec des tumeurs 195 % plus petites que les tumeurs non traitées alors que les souris traitées avec FOLFIRINOX avaient des tumeurs 113 % plus petites que les tumeurs non traitées. Il est intéressant de noter que l'amélioration de l'efficacité thérapeutique de l'association du 5-FU, avec l'irinotécan et l'oxaliplatine a été obtenue en utilisant des MB-

FIRINOX contenant des doses de ces molécules bien inférieures (13 fois, 9 fois et 1,5 fois, respectivement) à celles utilisées pour le traitement standard, FOLFIRINOX. Cependant, le temps de survie moyen des souris traitées avec les MB-FIRINOX + ultrasons était supérieur mais non significatif par rapport au groupe FOLFIRINOX (44,40 ± 3,85 jours *vs* 37,50 ± 7,72 jours, respectivement). Cette étude a démontré que l'utilisation combinée de MBs chargées avec ces trois molécules chimiothérapeutiques délivrées par sonoporation augmentait leurs efficacités thérapeutiques avec des doses considérablement plus faibles que le traitement standard FOLFIRINOX.

V.3. Délivrance d'anticorps thérapeutiques

Parmi les thérapies ciblées disponibles pour le traitement du CCR, les immunothérapies, appartenant aux inhibiteurs des points de contrôles immunitaires, sont administrées en combinaison avec des chimiothérapies et permettent de stimuler la réponse immunitaire antitumorale. Dans certaines tumeurs, les cellules tumorales surexpriment à leur surface des ligands (*e.g.,* PD-L1) qui peuvent se lier à des récepteurs (*e.g.,* PD-1) présents à la surface des lymphocytes. Cette liaison transmet des signaux inhibiteurs aux lymphocytes, permettant aux cellules tumorales d'échapper au système immunitaire. Les anticorps monoclonaux ciblent les récepteurs inhibiteurs présents à la surface des lymphocytes (*e.g.,* CTLA4, PD1) ou leurs ligands (*e.g.,* PD-L1, ligand de PD1) afin d'inhiber l'immunosuppression induite par les cellules tumorales (**Figure 6**). Cependant, en monothérapie, les inhibiteurs de points de contrôle immunitaires engendrent des effets indésirables inflammatoires ou auto-immuns. Par conséquent, la combinaison de l'immunothérapie avec la chimiothérapie, souvent utilisée en clinique, peut potentialiser les effets secondaires de chaque thérapie. Dans ce contexte, Kim *et al.,* ont développé des MBs couplées à des anticorps anti-PD-L1, appelés « immune-microbubble complex » (IMC) afin d'évaluer leur délivrance par sonoporation dans un modèle murin d'adénocarcinome murin (CT26) (Kim *et al.,* 2020). Lorsque les volumes tumoraux étaient d'environ 30 à 50 mm^3, les souris recevaient une injection i.v. de l'anticorps anti-PD-L1 (200 µg) ou de l'IMC (200 µg). Ensuite, la tumeur était exposée aux ultrasons (Fréquence 1,1 MHz, 100 W, PRF = 100 Hz, DC = 5 %) pendant 5 s. Les traitements ont été répétés 3 fois avec un intervalle de 3 jours entre chaque session de traitement. L'efficacité thérapeutique a été évaluée en mesurant le volume tumoral pendant 16 jours. De plus, une partie des souris a été sacrifiée 24 h après le traitement, pour déterminer l'accumulation de l'anticorps dans les tissus tumoraux par immunohistologie. L'efficacité thérapeutique maximale a été observée pour le groupe traité avec l'IMC + ultrasons où les souris présentaient un volume tumoral moyen de

309,7 ± 56,4 mm³ à 16 jours après le premier traitement, comparativement au groupe traité avec l'anticorps anti-PD-L1 + ultrasons où le volume tumoral moyen était de 480,5 ± 58,1 mm³. Ce bénéfice thérapeutique a été corrélé avec une augmentation significative de la concentration i.t. de l'anticorps anti-PD-L1 dans les tissus tumoraux des souris ayant reçu le traitement IMC+US comparativement aux autres groupes contrôles. Ainsi, cette étude démontre que l'utilisation de MBs couplées à des inhibiteurs de points de contrôle immunitaire, délivrées par sonoporation, permet d'augmenter significativement l'efficacité de cette immunothérapie. De plus, l'augmentation de cette efficacité thérapeutique est directement liée à l'augmentation de la concentration i.t. des anticorps thérapeutiques délivrés par sonoporation.

Comme décrit précédemment, le microenvironnement tumoral peut constituer une barrière majeure limitant la pénétration de petites molécules et de macromolécules. Notamment, la vascularisation tumorale anarchique et non fonctionnelle engendre l'apparition de régions hypoxiques et limite l'action et l'accès des cellules immunitaires au sein de la tumeur. Ainsi, de nouvelles stratégies thérapeutiques reposent sur la normalisation de la vascularisation tumorale afin d'augmenter la perfusion et l'oxygénation des tumeurs. L'objectif étant de favoriser la pénétration des molécules thérapeutiques dans le tissu tumoral, notamment celles dont le mécanisme dépend de l'oxygène, mais également de faciliter l'élimination des métabolites immunosuppresseurs et de renforcer la réponse immunitaire antitumorale. Par conséquent, l'utilisation de MBs chargées en oxygène, et codélivrées avec des molécules thérapeutiques, apparaît comme une stratégie prometteuse pour diminuer l'hypoxie tumorale et favoriser la pénétration des molécules thérapeutiques dans les tumeurs. Dans ce contexte, Huang *et al.,* ont évalué l'efficacité de la sonoporation à délivrer différents types de molécules thérapeutiques, une chimiothérapie, le Doxil®, et un anticorps thérapeutique, anti-PD-1, dans un modèle murin d'adénocarcinome colorectal sous-cutané (CT-26) en utilisant des MBs contenant un mélange de gaz (C_3F_8) et d'oxygène (MBO_2) afin de réduire l'hypoxie tumorale (Huang *et al.,* 2023). Dans un premier temps, les auteurs ont évalué l'hypoxie tumorale 24 h après un traitement par sonoporation avec les MBO_2, en évaluant par immunofluorescence et par Western blot l'expression du biomarqueur HIF-1α (hypoxia inducible factor 1) dans les tumeurs. Les résultats montrent une diminution significative de l'expression de l'HIF-1α, dans les tumeurs traitées par sonoporation avec les MBO_2, comparativement à celles traitées par ultrasons seuls ou ayant reçues uniquement l'injection de MBO_2. Dans un second temps, les auteurs ont déterminé l'extravasation et l'accumulation i.t. de liposomes (modélisant la formulation du Doxil®) et de l'anticorps anti-PD-1 après sonoporation. Pour cela, les souris ont

reçu une injection i.v. de liposomes marqués avec le fluorophore, Dil (50 mg/kg) ou de l'anticorps anti-PD-1 marqué avec le fluorochrome Cy5.5 (4 mg/kg). Après 5 minutes, les souris ont reçu une injection de MBO_2 (4 mg/mL, 200 µL) et les tumeurs ont été exposées aux ultrasons (Fréquence de 1 MHz, 3 W/cm^2) pendant 5 min. L'extravasation des anticorps anti-PD-1 ou des liposomes a été observée par microscopie à fluorescence en temps réel *in vivo* pendant 120 min. De plus, l'accumulation i.t. de ces molécules a été évaluée 2 h après le traitement par spectrophotométrie. Les résultats ont montré que le traitement des tumeurs par sonoporation favorisait l'extravasation, la pénétration et l'accumulation i.t. des anticorps anti-PD-1 ou des liposomes.

Dans un second temps, l'efficacité thérapeutique de la délivrance de l'anticorps anti-PD-1 (1,25 mg/kg) ou de la Dox (5 mg/kg) libre ou liposomale (Doxil®) par sonoporation a été évaluée en utilisant le protocole de traitement décrit ci-dessus. Le traitement a été réalisé lorsque les tumeurs avaient atteint un volume de 50 mm^3. Il a été répété 4 fois sur une période de 9 jours. La délivrance d'anticorps anti-PD-1 par sonoporation a significativement ralenti la croissance tumorale et a amélioré le temps de survie moyen à 34 jours comparativement au traitement par injection de l'anticorps seul (28 jours) ou par sonoporation seul (22 jours). De plus, ce traitement a stimulé la réponse immunitaire antitumorale, comme en témoigne l'augmentation significative de la sécrétion d'interféron-γ (IFN-γ), de l'infiltration i.t. de cellules T CD8+ et de la réduction de la présence de cellules immunosuppressives Treg dans le tissu tumoral. La délivrance de la Dox sous sa forme libre ou liposomale (Doxil®), par sonoporation a inhibé plus efficacement la croissance tumorale et a amélioré le temps de survie moyen des souris comparativement à leurs administrations seules. Ce bénéfice thérapeutique a également été corrélé avec une augmentation significative de l'apoptose et un ralentissement significatif de la prolifération cellulaire dans les tissus tumoraux. L'ensemble de ces résultats démontre l'efficacité de la sonoporation à augmenter l'accumulation i.t. de différents types de thérapies anticancéreuses et à améliorer leurs efficacités thérapeutiques dans un modèle murin de xénogreffes sous-cutanées de CCR. De plus, l'utilisation de MBs chargées en O_2 semble être une approche efficace pour améliorer l'oxygénation des tumeurs.

V.4. Délivrance de cellules NK par sonoporation

La sonoporation permet d'augmenter transitoirement la perméabilité de la barrière hémato-tumorale, et favorise l'extravasation de molécules thérapeutiques et également celle des cellules immunitaires circulantes. Dans ce contexte, Sta Maria *et al.*, ont étudié l'efficacité de la

sonoporation à favoriser l'accumulation i.t. des cellules immunitaires NK dans un modèle murin de CCR sous-cutané (LS-174T) (Sta Maria *et al.,* 2015). En effet, les cellules NK sont très étudiées en immunothérapie pour leur capacité à cibler spécifiquement les cellules tumorales et à activer la réponse immunitaire antitumorale. Chaque souris a reçu une injection sous-cutanée de cellules tumorales LS-174T (6.10^5 cellules dans 0,2 mL) au niveau de chaque flanc et une des tumeurs n'a pas été traitée par les ultrasons et a été utilisée comme contrôle interne. Lorsque les tumeurs ont atteint un volume compris entre 200 et 300 mm^3, les souris ont reçu une injection i.v. d'une solution, contenant 10^7 cellules NK marquées au ferumoxytol (agent de contraste IRM) et 100 µL de MBs Optison®. Les ultrasons ont été appliqués sur une des deux tumeurs pour chaque souris (Fréquence à 510 kHz, durée d'impulsion 10 ms toutes les secondes, PRF 1Hz, PNP de 0,25 ou 0,5 MPa) durant 1 minute. Les résultats obtenus par IRM ont montré une augmentation significative de la pénétration des cellules NK dans les tumeurs traitées par sonoporation (PNP de 0,5 MPa) comparativement aux tumeurs controlatérales non-exposées aux ultrasons. Les tumeurs exposées à une pression acoustique plus faible de 0,25 MPa n'ont pas montré d'accumulation i.t. significative des cellules NK. Cependant, à une pression acoustique de 0,5 MPa, une augmentation significative de l'accumulation de ces cellules a été observée dans la tumeur non traitée qui était située sur le flanc opposé à la tumeur exposée aux ultrasons. Ces résultats suggèrent que l'application des ultrasons à 0,5 MPa peut induire des effets non seulement localisés sur la tumeur traitée, mais aussi systémique, affectant également la tumeur non traitée. Cette étude démontre que la sonoporation est une méthode efficace pour favoriser l'accumulation i.t. de cellules immunitaires.

En conclusion, ces études précliniques révèlent que la sonoporation est une modalité ultrasonore efficace et sûre de délivrance de molécules thérapeutiques (e.g., molécules chimiothérapeutiques, anticorps thérapeutiques, acides nucléiques, etc.) et de cellules immunitaires (e.g., cellules NK) dans des modèles de CCR murin et humain sous-cutanés. En revanche, nous constatons que cette modalité n'a pas été évaluée dans des modèles murins orthotopiques et métastatiques de CCR.

Tableau 2. Études précliniques de la délivrance de molécules thérapeutiques par sonoporation dans des modèles murins de CCR.

Réf.	Modèle murin	Molécule	MB	Paramètres acoustiques	Augmentation de la pénétration i.t.	Augmentation de l'efficacité thérapeutique	Réduction de la concentration dans les organes non-cibles	Principaux résultats
(Y. Watanabe *et al.*, 2008)	Xénogreffe sous-cutanée de cellules HT-29-luc	Cisplatine	MB contenant du C_3F_8	1 MHz, 3 W/cm^2, DC = 20 %, PRF 1000 Hz, pendant 60 s	NA	Oui	NA	• Diminution significative de l'activité de la luciférase des cellules tumorales
(Chen *et al.*, 2018)	Xénogreffe sous-cutanée de cellules HT-29	• Porphyrine • Camptothécine • Floxuridine	MB contenant du C_3F_8 chargée drogues	1 MHz, 1 W/cm^2, DC = 50 %, pendant 3 min	Oui	Oui	Oui	• Augmentation i.t. de la porphyrine dans la tumeur • Diminution significative de l'accumulation non spécifique de la porphyrine dans le foie • Diminution de la croissance tumorale
(Lin *et al.*, 2012b)	Injection sous-cutanée de cellules CT-26 (murin)	Doxil®	SonoVue®	1 MHz, DC = 50 % PRF 50 Hz, 10 ms d'impulsion, PNP de 0,6 MPa, pendant 60 s	NA	Oui	NA	• Augmentation de l'efficacité de la délivrance du Doxil® sur des tumeurs de petites et moyennes tailles
(Lin *et al.*, 2012a)	Injection sous-cutanée de cellules CT-26 (murin)	Doxil®	SonoVue®	1 MHz, DC = 1 %, PFR 1 Hz, 10 ms d'impulsion, PNP de 1,2 MPa, pendant 2 min	Oui	Oui	NA	• Augmentation de la concentration i.t. de la Dox • L'efficacité thérapeutique dépend de la taille initiale des tumeurs
(Ingram *et al.*, 2020)	Xénogreffe sous-cutanée de cellules SW480	• Irinotécan • SN-38	MB ciblées VEGFR et chargées en irinotécan	2,2 MHz, PRF 1 kHz, PNP de 260 kPa, impulsion US en rafale de 10 µs, pendant 5 s	Oui	Oui	Oui	• Diminution de la croissance tumorale • Corrélation entre effet thérapeutique et augmentation i.t. de l'irinotécan et du SN-38

(Charalambous *et al.*, 2021)	Xénogreffe sous - cutanée de cellules SW480	• Combrestatine • Irinotécan	MB + Lipid-Oil-Nanodroplets contenant la combrestatine et ciblées VEGFR2	2,2 MHz, PRF de 1 kHz, PNP de 260 kPa, impulsion US en rafale de 10 µs, pendant 5 s	Oui	Oui	NA	• Inhibition de la croissance tumorale
(Zhang *et al.*, 2014)	Xénogreffe sous-cutanée de cellules HT-29-GFP	Endostatine (Endostar)	MB Targestar-SA chargée avec Endostar	238 kHz, 1,4 MPa, 10 fois pendant 10 s avec un intervalle de 10 s entre chaque exposition	NA	Oui	NA	• Diminution de la perfusion et de la croissance tumorale
(Kim *et al.*, 2020)	Injection sous-cutanée de cellules CT26	Anti-PD-L1	MB contenant du SF_6 complexée avec anti-PD-L1 (IMC : immune-MB-complex)	1,1 MHz, 100 W, DC = 5 %, PRF 100 Hz, pendant 5 s	Oui	Oui	NA	• Augmentation de l'accumulation de l'anticorps anti-PD-L1 dans le tissu tumoral • Ralentissement de la croissance tumorale
(Huang *et al.*, 2023)	Injection sous-cutanée de cellules CT26	• Anti-PD1 • Doxil®	MB contenant du C_3F_8 et de l'O_2 (MBO_2)	1 MHz, 1 ou 2 ou 3 W/cm^2, pendant 5 min	Oui	Oui	NA	• Diminution de l'hypoxie tumorale • Augmentation de l'extravasation et de la pénétration i.t. des anticorps anti-PD-1 et des liposomes • Augmentation de la réponse immunitaire antitumorale • Diminution de la croissance tumorale
(Gao *et al.*, 2021)	Xénogreffe sous-cutanée de cellules HT-29	• 5-fluorouridine • Irinotécan • Oxaliplatine	MB contenant du C_4F_{10} chargée en drogues (MB-FIRINOX)	1 MHz, 3,5 W/cm^2, DC = 30 %, PRF 100Hz, PNP 480 kPa, IM = 0,48, pendant 3,5 min	NA	Oui	NA	• Ralentissement de la croissance tumorale • Meilleure tolérance du traitement
(Wang *et al.*, 2015)	Xénogreffe sous-cutanée de cellules LS174T	• Nanoparticule fluorescence • miARN-122 encapsulé	BR38®	1,8 MHz, PRF 100Hz, 5,4 MPa, 1000 impulsions de 5 cycles	Oui	NA	NA	• Augmentation du miARN-122 dans les tumeurs
(Lin *et al.*, 2010)	Injection sous-cutanée de cellules CT26	Nanoparticules (lipid-coated quantum dot nanoparticles)	SonoVue®	1 MHz, DC = 1 %, PRF 1 Hz, PNP 1,2 MPa, impulsion de 10 ms, pendant 2 min	Oui	NA	NA	• L'augmentation de la pénétration des NP dans les tissus tumoraux est fonction de la concentration en MB, du temps d'exposition aux ultrasons

								(100 µL de MB, exposition de 2 min) • Augmentation significative de l'accumulation i.t. des NP
(Bush *et al.*, 2019)	Xénogreffe sous-cutanée de cellules SW620	Irinotécan	PS101 (émulsion de microgouttelettes de perfluorométhylcyclopentane contenant des MB Sonazoid)	• Activation des PS101 à 8 MHz (IM= 0,3) • 500 kHz (2 cycles d'excitation, burst period 125 ms) ; IM = 0,2, pendant 1 à 5 min	NA	Oui	NA	• Diminution du volume tumoral • Augmentation du temps de survie médian
(Sta Maria *et al.*, 2015)	Xénogreffe sous-cutanée de cellules LS174T	Cellules Natural Killer (NK)	Optison®	510 kHz; 10 ms/s, pendant 1 min	Oui	NA	NA	• Augmentation de l'accumulation i.t. des cellules NK (0,5 MPa) • Action locale et systémique

Luc : luciférase ; MB : microbulle ; NA : non applicable ; DC : duty cycle (rapport cyclique) ; PRF : pulse repetition frequency (fréquence de répétition des impulsions) ; PNP : peak negative pressure (pic négatif de pression) ; i.t. : intratumorale ; Dox : doxorubicine ; VEGFR : vascular endothelial growth factor receptor (récepteur du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire); GFP : green fluorescent protein ; PD-L1 : programmed-death ligand 1 ; IMC ; immune microbubble complex ; PD-1 : programmed cell death protein 1 ; CCR : cancer colorectal ; IFNβ : interféron β ; NK : natural killer.

I.VI. Études cliniques

Actuellement, plusieurs essais cliniques recrutent des patients, et d'autres ont publié leurs premiers résultats. Ces études cliniques évaluent la faisabilité, l'efficacité et l'innocuité de protocoles de délivrance par sonoporation de molécules chimiothérapeutiques seules ou en association avec des thérapies ciblées chez des patients atteints de métastases hépatiques de CCR.

L'essai clinique (NCT03458975) SONCHIMIO à Tours est en cours depuis 2017 et a pour objectif de démontrer la faisabilité d'un protocole de sonoporation pour améliorer l'efficacité thérapeutique d'un traitement conventionnel de chimiothérapie FOLFIRI (5-FU, leucovorine et irinotécan) en association avec une thérapie ciblée anti-VEGFR ou anti-EGFR (bévacizumab ou cétuximab) chez des patients atteints de métastases hépatiques de CCR non résécables. Pour chaque patient, 2 ou 4 métastases sont sélectionnées puis randomisées pour déterminer lesquelles seront traitées par sonoporation. Ensuite, les patients recevront leur traitement de chimiothérapie/immunothérapie ainsi que l'injection des MBs (SonoVue®). Chez un même patient, des métastases seront exposées aux ultrasons alors que d'autres ne seront pas traitées par ultrasons afin de les utiliser comme contrôle. L'objectif principal de cette étude est d'évaluer, à 2 mois, la réponse objective des métastases hépatiques traitées avec le protocole de délivrance par sonoporation de la chimiothérapie/immunothérapie en comparaison avec celles recevant uniquement la chimiothérapie/immunothérapie. La réponse objective est définie comme une diminution d'au moins 30 % du diamètre le plus long de chaque métastase hépatique mesurée à partir d'images obtenues en scanner X. Les objectifs secondaires de l'étude sont d'évaluer l'innocuité et la tolérance de ce protocole, en se basant sur les critères standardisés « Common Terminology Criteria for Adverse Events » (CTCAE) utilisés pour la classification et la gravité des événements indésirables. De plus, le pourcentage maximal de réduction de la densité tumorale et l'évolution de la vascularisation tumorale seront évalués par scanner X, IRM et échographie de contraste ultrasonore. Enfin, la pharmacocinétique de l'anticorps thérapeutique ainsi que l'évolution du profil sanguin des cytokines pro- et anti-inflammatoires seront également étudiées.

Haram *et al.,* ont récemment publié les résultats de leur essai clinique (NCT03477019) portant sur l'évaluation de l'efficacité de la délivrance de chimiothérapie par sonoporation chez des patients présentant des métastases hépatiques provenant d'un CCR (Haram *et al.,* 2023).

Les métastases ont été sélectionnées à partir des images obtenues par scanner X avant le début du traitement. Ces métastases ont été randomisées pour déterminer celles qui seront traitées (délivrance de la chimiothérapie par sonoporation) et celles qui serviront de contrôle (coadministration de la chimiothérapie et des MBs sans ultrasons). Seize patients ont reçu le traitement FOLFIRI, un patient a reçu le traitement FOLFOXIRI, et deux patients ont reçu un traitement reposant sur l'association du panitumumab avec la chimiothérapie FOLFIRI. Un bolus de 1 mL de MBs (SonoVue®) a été administré par voie i.v. toutes les 3,5 minutes, répétée neuf fois sur une durée totale de 35 minutes. Les patients présentaient plusieurs métastases hépatiques. Leur traitement a donc nécessité de développer une procédure de navigation utilisant la plateforme CustusX pour aligner correctement les images obtenues par scanner X et par échographie afin de cibler précisément ces lésions lors de la sonoporation. La sonde ultrasonore 4V-D est une sonde cliniquement approuvée, qui permet de traiter le volume entier de chaque métastase. Ainsi, la métastase hépatique ciblée a été exposée aux ultrasons (Fréquence de 1,7 MHz, PNP = 0,65 MPa, PRF = 0,33 Hz, 33 oscillations, DC = 0,2 - 0,4 %, IM = 0,5). Ce traitement a été répété en moyenne 3,5 fois, à des intervalles de 2 ou 3 semaines. Pour chaque patient, un scanner X a été réalisé 3 semaines avant le traitement et un autre après le dernier traitement. L'objectif principal de l'étude est d'évaluer la réponse thérapeutique (basée sur les critères « Response Evaluation Criteria In Solid Tumours 1.1 » ; RECIST 1.1) et de comparer les changements de volume entre les métastases traitées ou non par sonoporation. L'objectif secondaire est d'évaluer la toxicité en consignant les effets indésirables d'après le questionnaire CTCAE jusqu'à 8 semaines après le traitement. D'après les critères RECIST 1.1, 4 patients (23,5 %) ont montré une réponse partielle indiquant une diminution ≥ 30 % de la somme des diamètres les plus longs des métastases. Onze patients (64,7 %) ont présenté une stabilisation de la maladie et deux patients (11,7 %) ont présenté une progression de la maladie. Les patients dont les lésions traitées ont montré une diminution plus importante ou une augmentation moins marquée que celles des lésions contrôles ont été classés comme répondeurs. Ainsi, 12 des 17 patients ont été classés comme ayant répondu favorablement à la délivrance de la chimiothérapie par sonoporation. Cependant, bien qu'une tendance à la diminution du volume des lésions traitées par sonoporation soit observée, les différences constatées ne sont pas significatives. En effet, une analyse complémentaire a été réalisée en sélectionnant trois lésions supplémentaires non traitées par sonoporation et a démontré une importante hétérogénéité de réponse au traitement chimiothérapeutique chez un même patient. Ainsi, certaines métastases ont augmenté en volume tandis que d'autres ont diminué. Les principaux évènements indésirables décrits sont associés à la chimiothérapie et aucun des effets

secondaires observés n'a été directement lié au traitement par sonoporation. L'ensemble de ces données démontre ainsi la faisabilité et l'innocuité du protocole de délivrance de la chimiothérapie par sonoporation.

Un essai clinique (NCT02233205) a été mené à l'Hôpital du Cancer de Pékin (Chine) afin d'évaluer l'innocuité d'un protocole de délivrance de chimiothérapie par sonoporation chez des patients présentant un carcinome pancréatique ou des métastases hépatiques de tumeurs gastro-intestinales (Wang *et al.*, 2018). Cet essai clinique a inclus douze patients : un patient avec un carcinome pancréatique primaire et onze patients avec des métastases hépatiques provenant de carcinomes du pancréas (1), du côlon (9) et de la vésicule biliaire (1). Concernant les patients présentant des métastases hépatiques provenant d'un CCR, les protocoles de chimiothérapie étaient soit l'irinotécan seul, soit l'irinotécan en association avec le cétuximab (Erbitux®), soit le FOLFIRI (5-FU, irinotécan) en association avec le cétuximab ou le bévacizumab, soit le FOLFOXIRI (5-FU, acide folinique, oxaliplatine, irinotécan), soit le XELOX (capécitabine, oxaliplatine). Trente minutes après l'administration i.v. de la chimiothérapie, 1 mL de SonoVue® MBs a été injecté par la même voie d'administration. Cette injection a été répétée cinq fois en 20 minutes. Connectée au système échographique LogiQ E9 (GE Healthcare), une sonde convexe abdominale C1-5 (GE Healthcare, USA) a été positionnée sur l'abdomen des patients afin de cibler la lésion tumorale, puis les ultrasons ont été appliqués (IM de 0,4 à 1). Les objectifs principaux de cet essai clinique étaient d'évaluer la tolérance du protocole de sonoporation et de déterminer l'IM maximal et la durée d'exposition aux ultrasons que les patients pouvaient tolérer. L'objectif secondaire était d'évaluer l'efficacité de ce protocole (basé sur les critères RECIST) en mesurant la taille des tumeurs à partir d'images IRM et de scanner X. Les résultats ont montré qu'aucun des 12 patients n'a présenté d'événements indésirables graves, hormis ceux inhérents à la chimiothérapie (nausées, vomissements, fièvre, *etc.*). Ainsi, les résultats suggèrent que le traitement par sonoporation avec un IM ≤ 1 est une procédure bien tolérée par les patients. Parmi les 12 patients, 6 ont montré une stabilisation de la maladie, tandis qu'un seul patient a obtenu une réponse partielle après le premier cycle de traitement. La survie médiane sans progression de maladie était de 91 jours. Cependant, les patients n'ont pas reçu le même régime de chimiothérapie, ni le même nombre de traitement, l'IM a également varié entre les patients. Il est, par conséquent, difficile de conclure sur l'efficacité de ce protocole de traitement.

Shen *et al.,* ont mené une étude sur 3 patients au Nangton Cancer Hospital, en Chine (Shen *et al.,* 2020). Cette étude avait pour objectif d'évaluer l'efficacité thérapeutique de la délivrance de chimiothérapie par sonoporation chez des patients présentant des métastases hépatiques ou de la paroi abdominale. Les métastases ont été localisées avec le système échographique iU22 (Philips, Bothell, Washington, USA). Les MBs utilisées étaient des MBs composées de CO_2, non cliniquement approuvées et fabriquées en laboratoire. Après injection i.v. des MBs, les métastases (hépatiques ou de la paroi abdominale) ont été exposées aux ultrasons (20 kHz, 2 W/cm^2, et DC = 40 %) pendant 10 min. Ce protocole de sonoporation a été répété 3 fois/jour pendant 5 jours avec un intervalle de temps de 2 jours. Chaque patient a reçu un traitement de chimiothérapie différent : un patient présentant des métastases hépatiques a été traité avec de l'oxaliplatine (130 mg/m^2) en i.v. le premier jour et avec de la capécitabine (1000 mg/m^2) par voie orale 2 fois/ jour pendant 14 jours. Un second patient présentant des métastases hépatiques a été traité avec de l'oxaliplatine (130 mg/m^2), du folate de calcium (200 mg/m^2) puis avec une perfusion de 5-FU (500 mg/m^2) pendant 24 heures. Le troisième patient avec des métastases de la paroi abdominale a été traité avec de l'épirubicine (50 mg/m^2) en i.v. le premier jour du traitement et avec du cisplatine (30 mg/m^2) en perfusion pendant 3 jours et suivie d'une perfusion de 5-FU (500 mg/m^2) de 24 h pendant 5 jours. La réponse au traitement a été évaluée en mesurant l'évolution de la taille des lésions tumorales par scanner X pour deux patients, tandis que la taille et l'activité métabolique de la lésion tumorale chez le troisième patient ont été déterminées par une imagerie TEP-scan au ^{18}F-FDG (FluoroDéoxyGlucose marqué au Fluor 18) avant et après le traitement. Les résultats ont montré que la procédure de sonoporation n'engendrait pas d'effets secondaires délétères chez les patients. Une diminution de la taille des métastases hépatiques ainsi qu'une diminution de l'activité métabolique et de la taille des métastases de la paroi abdominale ont été observées à la suite des traitements. Cependant, il parait difficile de conclure sur l'innocuité et l'efficacité de ce protocole en raison du nombre limité de patients, et de l'utilisation de MBs et d'une séquence ultrasonore non conventionnelle.

En conclusion, l'ensemble de ces études cliniques démontre la faisabilité et l'innocuité de la délivrance de molécules thérapeutiques (e.g., molécules chimiothérapeutiques et anticorps thérapeutiques) par sonoporation. Cependant, l'efficacité thérapeutique de ces protocoles n'a pas été clairement établie en raison de la non-standardisation des protocoles de sonoporation et du faible nombre de patients traitées.

Chapitre II. Objectifs de la thèse

Chapitre II. Objectifs de la thèse

Dans le chapitre I de cette thèse, nous avons vu que de nombreuses études ont ainsi démontré l'efficacité et l'innocuité de la sonoporation à améliorer la délivrance de molécules thérapeutiques sur des modèles *in vitro* et *in vivo* de CCR, ainsi que sa faisabilité et son innocuité en clinique. L'efficacité de cette modalité de traitement repose sur (i) les paramètres ultrasonores utilisés, (ii) le type et la concentration en MB, (iii) la voie d'administration des molécules et des MBs et (iv) le schéma thérapeutique utilisé. Le développement et la validation de protocoles de sonoporation pour la délivrance des molécules thérapeutiques nécessitent l'utilisation de modèles murins pertinents du CCR. Cependant, depuis 1959, la règle des 3R en expérimentation animale, fait évoluer les considérations éthiques sur l'utilisation des animaux et favorise le développement de modèles cellulaires (remplacement) et murins (raffinement) plus pertinents.

Parmi ces nouveaux modèles, les sphéroïdes tumoraux se sont révélés très pertinents pour étudier de nouvelles thérapies anticancéreuses. Les sphéroïdes sont constitués d'un amas de cellules cancéreuses qui s'organisent en 3D, reproduisant plus fidèlement l'architecture, l'hétérogénéité tumorale et la résistance au traitement d'une tumeur *in vivo* comparativement aux modèles cellulaires en 2D. Toutefois, dans la littérature environ 10 publications ont étudié la sonoporation, comme méthode de délivrance de molécules thérapeutiques sur des sphéroïdes. Dans ce contexte, notre premier objectif est de développer un modèle 3D de sphéroïdes de CCR pour étudier l'influence de paramètres liés aux ultrasons et aux MBs sur la perméabilisation des sphéroïdes et d'étudier la capacité de la sonoporation à délivrer des molécules chimiothérapeutiques dans ce modèle.

D'autre part, les études précliniques démontrant que la sonoporation potentialise l'efficacité thérapeutique de molécules anti-cancéreuses ont exploité des modèles murins de CCR sous-cutanés qui ne reflètent pas la réalité clinique. Par conséquent, les protocoles de sonoporation ne sont pas optimisés pour la délivrance de molécules dans les tumeurs orthotopiques et métastatiques. Notre second objectif est de développer et de caractériser un modèle murin de métastases hépatiques de CCR pour développer un schéma thérapeutique de délivrance de l'irinotécan par sonoporation.

Chapitre III. La sonoporation *in vitro* de sphéroïdes tumoraux

Chapitre III. La sonoporation *in vitro* de sphéroïdes tumoraux

III.I. Introduction

Le développement et la validation de méthodes de délivrance de molécules anti-cancéreuses nécessitent l'utilisation de modèles cellulaires et animaux. Parmi ces modèles, la culture cellulaire en monocouche ou en suspension est largement utilisée en raison de sa facilité de mise en œuvre, de son coût modéré et de sa capacité à permettre des analyses à grande échelle. Après avoir été validées sur des modèles cellulaires, ces méthodes de délivrance de molécules thérapeutiques sont généralement testées sur des modèles animaux (xénogreffes sous-cutanées ou orthotopiques, tumeurs chimio-induites…) afin d'évaluer leur efficacité et leur innocuité avant d'initier des études cliniques. Néanmoins, les récentes réformes relatives à l'expérimentation animale et en particulier à l'éthique en expérimentation animale (Règle des 3R) ont favorisé le développement de modèles alternatifs à l'expérimentation animale et plus performants que les modèles cellulaires en 2D actuels : les sphéroïdes tumoraux. Ces modèles 3D de cellules tumorales sont de plus en plus exploités pour évaluer l'efficacité de molécules thérapeutiques, pour étudier les performances de systèmes de délivrance, pour valider des formulations médicamenteuses et pour identifier des cibles thérapeutiques. Ces modèles peuvent être plus ou moins complexes, composés de cellules tumorales seules ou en coculture avec d'autres types cellulaires présents dans le microenvironnement tumoral (fibroblastes, cellules immunitaires, adipocytes, *etc*.). Dans ce contexte, nous avons rédigé une revue sur l'utilisation de modèles 3D de sphéroïdes tumoraux pour étudier la capacité des thérapies ultrasonores à délivrer des molécules thérapeutiques. La première partie de cette revue introduit les principales méthodes de culture pour produire des sphéroïdes ainsi que leurs avantages et leurs limitations. La seconde partie décrit, pour chaque modalité de thérapie ultrasonore, leur principe et dans quel objectif les sphéroïdes ont été exploités. Les thérapies ultrasonores présentées sont : la sonoporation, la thérapie sonodynamique, la cavitation inertielle, les ultrasons de faible intensité acoustique et l'hyperthermie moyenne induite par les ultrasons focalisés de faible intensité acoustique. Cette revue s'achève par une discussion sur les limites de ces modèles 3D et de leur utilisation. Elle présente également de nouvelles perspectives sur le développement de modèles plus complexes et mieux adaptés à la délivrance de molécules thérapeutiques par ultrasons.

Référence : Roy, M.; Alix, C.; Bouakaz, A.; Serrière, S.; Escoffre, J.-M. Tumor Spheroids as Model to Design Acoustically Mediated Drug Therapies: A Review. *Pharmaceutics* **2023**, *15*, 806. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15030806

III.II. Publication

pharmaceutics

MDPI

Review

Tumor Spheroids as Model to Design Acoustically Mediated Drug Therapies: A Review

Marie Roy [1], Corentin Alix [1], Ayache Bouakaz [1], Sophie Serrière [1,2,*,†] and Jean-Michel Escoffre [1,*,†]

[1] UMR 1253, iBrain, Université de Tours, Inserm, 37032 Tours, France
[2] Département d'Imagerie Préclinique, Plateforme Scientifique et Technique Analyse des Systèmes Biologiques, Université de Tours, 37032 Tours, France
* Correspondence: sophie.serriere@univ-tours.fr (S.S.); jean-michel.escoffre@univ-tours.fr (J.-M.E.); Tel.: +33-(0)247366343 (S.S.); +33-(0)247366191 (J.-M.E.)
† These authors contributed equally to this work.

Abstract: Tumor spheroids as well as multicellular tumor spheroids (MCTSs) are promising 3D in vitro tumor models for drug screening, drug design, drug targeting, drug toxicity, and validation of drug delivery methods. These models partly reflect the tridimensional architecture of tumors, their heterogeneity and their microenvironment, which can alter the intratumoral biodistribution, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of drugs. The present review first focuses on current spheroid formation methods and then on in vitro investigations exploiting spheroids and MCTS for designing and validating acoustically mediated drug therapies. We discuss the limitations of the current studies and future perspectives. Various spheroid formation methods enable the easy and reproducible generation of spheroids and MCTSs. The development and assessment of acoustically mediated drug therapies have been mainly demonstrated in spheroids made up of tumor cells only. Despite the promising results obtained with these spheroids, the successful evaluation of these therapies will need to be addressed in more relevant 3D vascular MCTS models using MCTS-on-chip platforms. These MTCSs will be generated from patient-derived cancer cells and nontumor cells, such as fibroblasts, adipocytes, and immune cells.

Keywords: multicellular tumor spheroid; drug delivery; microbubble-assisted ultrasound; sonodynamic therapy; therapeutic ultrasound; mild hyperthermia; cavitation

check for updates

Citation: Roy, M.; Alix, C.; Bouakaz, A.; Serrière, S.; Escoffre, J.-M. Tumor Spheroids as Model to Design Acoustically Mediated Drug Therapies: A Review. *Pharmaceutics* **2023**, *15*, 806. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15030806

Academic Editor: Franco Dosio

Received: 30 January 2023
Revised: 22 February 2023
Accepted: 27 February 2023
Published: 1 March 2023

Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

The active and targeted delivery of anticancer drugs (e.g., chemotherapeutics, therapeutic antibodies, tyrosine kinase inhibitors, nucleic acids, etc.) into tumor tissues is a major challenge in oncology to eradicate tumors and to avoid their recurrence and the formation of metastases while reducing the side effects of these treatments. In this context and for decades, drug delivery methods have been designed and first validated using in vitro models. Two-dimensional in vitro tumor models, including monolayer cell culture, are mostly used for drug screening, drug design, drug targeting, and drug toxicity and for the validation of drug delivery methods. However, several of these pharmaceutical developments, which have shown great promise in vitro, failed in vivo. The main explanation for such a failure lies in the fact that two-dimensional (2D) in vitro tumor models do not reflect the three-dimensional (3D) organization of a tumor in vivo and its pathophysiology [1]. In these 2D models, tumor cells are more sensitive to anticancer drugs than in vivo because these drugs have direct access to cell membranes and specifically to membrane receptors, targets of drugs, or targeted-drug-loaded carriers. In addition, these tumor cells are clones that have the same physiology and are grown in monoculture. Such 2D models do not reflect the in vivo context and specifically the influence of the tumor microenvironment on drug resistance and efficacy [2]. Indeed, the extracellular matrix (a noncellular meshwork of crosslinked collagens, proteoglycans, and glycoproteins) operates in coordinated mode

with tumor cells and nontumor cells such as cancer-associated fibroblasts, cancer-associated adipocytes, and tumor-infiltrating lymphocytes. This meshwork plays a major role in the 3D architecture of tumors and their tumor microenvironment thus facilitating the interaction between the different kinds of cells through tight intercellular junctions. All these cells communicate with each other through the production and secretion of signaling molecules such as chemokines, cytokines, hormones, and growth factors [3]. The extracellular matrix also notably affects the biodistribution of drugs and their access to tumor cells. In addition, abnormal vascularization observed in the core of the tumor does not allow a supply of nutrients and oxygen, which generates hypoxic regions resistant to anticancer treatments, particularly radiotherapy but also chemotherapy [4]. Altogether, these molecular and cellular actors, as well as their interactions with each other, create a complex environment that influences the intratumoral biodistribution, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of drugs.

Accordingly, animal models are still essential to investigate these pharmacological properties. However, since 1959, the 3Rs principle (Reduce, Refine, Replace) has provided a stricter framework in animal experimentation. Two of these 3Rs aim to reduce the number of animals and to replace their use with alternative methods as soon as possible. In this context, 3D in vitro tumor models have been developed to overcome the limitations of the 2D in vitro tumor models described above and to better predict the in vivo response to anticancer therapies while limiting the use of animal models [5]. Among these 3D models, tumor spheroids or multicellular tumor spheroids (MCTSs) are the most commonly used models for the design and validation of chemotherapeutic strategies. These spheroids are 3D clusters of tumor cells without (termed spheroids) or with (termed MCTS) other types of cells (e.g., fibroblasts, adipocytes, immune cells, etc.). Depending on their cell composition and size, the 3D organization of spheroids creates a gradient of oxygen, nutrients, and metabolites from the periphery to the core of the spheroids, thereby generating an inverse gradient of carbon dioxide and metabolic waste [6,7]. Both of these gradients are responsible for forming a necrotic core, an intermediate layer of quiescent cells, and an outer layer of proliferative cells, thus partially mimicking in vivo tumor physiology [8]. Indeed, their architectures give the spheroids greater resistance to drugs than that observed in 2D in vitro models, thus improving the predictive tumor drug sensitivity [9,10]. In addition, the interaction of a dense extracellular matrix with the spheroid's cells (which themselves interact with each other via intracellular junctions) creates a molecular and cellular network that simulates, albeit partly, the physiological barriers encountered in vivo during the evaluation of drug penetration into the tumors [11–13]. MCTSs are composed of tumor cells and other types of cells (e.g., fibroblasts, adipocytes, immune cells, etc.) that can also more precisely but still partially mimic tumor heterogeneity and its microenvironment, which influence the efficacy of drug delivery and the therapeutic benefit of the treatment [14]. These MCTSs also make it possible to investigate the molecular targeting of anticancer therapies [15]. Regarding the advantages previously stated about the physiological properties of spheroids, these 3D models are now widely used in pharmaceutical oncology to develop innovative treatments for cancer.

In oncology, the efficacy of systemic chemotherapy is often far from sufficient because of the tumor microenvironment, which restricts both intratumoral drug bioavailability and the targeting of tumor cells. In addition, these systemic chemotherapies are frequently related to severe off-target effects as a consequence of the nonspecificity of these therapies. In this regard, the development and validation of targeted drug delivery methods are required to increase the therapeutic dose of the drug into the tumor tissue while minimizing side effects to healthy tissues. These drug delivery methods might have a great benefit in the design of first-line, neoadjuvant, and palliative care. Among these methods, ultrasound (US) is a promising delivery method for several therapeutic molecules (e.g., chemotherapeutic drugs, immunotherapeutic agents, nucleic acids, and sensitizing agents) in various kinds of tumors. Depending on acoustic parameters, ultrasound can generate both thermal and mechanical stimuli, which may be exploited (i) to trigger the release of drugs from

particles (e.g., liposomes, polymer particles, micelles, microbubbles, etc.), (ii) to excite sensitizers, and (iii) to induce the reversible permeabilization of biological barriers (e.g., endothelial barriers, plasma membrane, etc.), thus improving the accumulation of drugs in tumor cells [16–25]. These US strategies, including mild hyperthermia, sonodynamic therapy, microbubble-assisted US, and US on its own, improve the efficacy of anticancer therapies in a safe and noninvasive way [26–29]. In addition, these cost-effective strategies are applicable to a wide range of superficial and deep tumors. For a few decades, drug-loaded particles and drug delivery protocols using therapeutic US have been evaluated in spheroids [30–33]. In the present review, we first provide a survey of different spheroid culture system methods and then of in vitro investigations, which exploit spheroids to design acoustically mediated drug delivery methods and to evaluate their therapeutic efficacy. The limitations and future perspectives of these studies are also debated.

2. Methods

The PubMed® and Web of Science™ electronic databases were screened by two authors of this review (M.R. and J.-M.E.) using predefined search dates (January 1991–July 2022) and terms for the in vitro 3D spheroid model and therapeutic US for anticancer drug delivery. The PubMed® and Web of Science™ database search terms used were ((sonodynamic therapy) AND (spheroid)) OR ((ultrasound) AND (spheroid) AND (drug delivery)) OR ((ultrasound-induced cavitation) AND (spheroid)). An "English language" filter was applied. Table 1 summarizes the inclusion and exclusion criteria. The selection process is outlined in Figure 1. Twenty-four publications met our inclusion criteria. These publications were sorted by the type of therapeutic US used: 11 publications with sonodynamic therapy, 7 publications with microbubble-assisted US, 2 publications with US-mediated mild hyperthermia, 2 publications with low-intensity pulsed US and gold nanoparticles, 1 publication with acoustic cavitation, and 1 publication with laser-generated focused US.

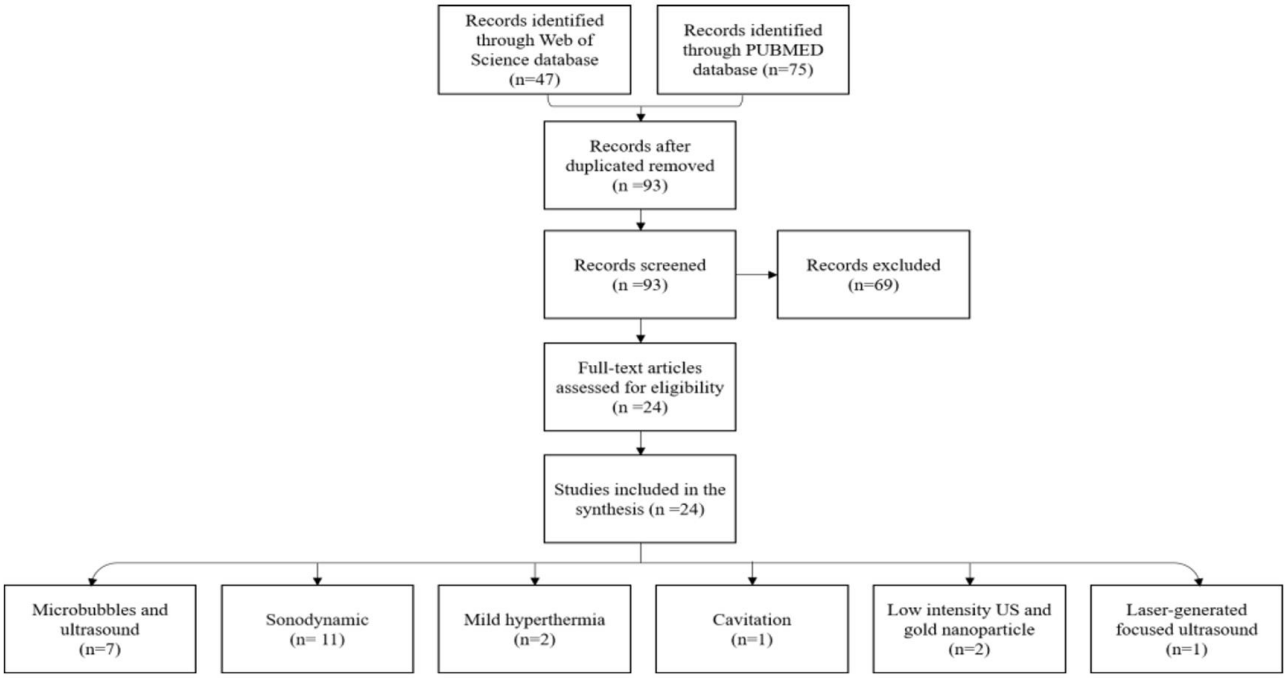


Figure 1. Flowchart of publication selection procedure.

Table 1. Inclusion and exclusion criteria applied for the selection of publications.

Inclusion Criteria	Exclusion Criteria
Involving US therapeutic on multicellular tumor spheroid for anticancer drug delivery	Without US on spheroid
English	Without drug delivery
	In silico, in vivo
	Review papers, comments, letters
	Other languages

3. Results

3.1. Different Spheroid Culture System Methods

In the present section, the different spheroid culture system methods from the simplest to implement, such as the hanging drop method [34], liquid overlay technique or nonadherent culturing surface [35,36], and magnetic levitation [30,37], to the most complex, including matrix- or scaffold-based methods [38–46], microfluidic devices [47,48], and bioreactor culture systems for large-scale production, are described. The choice of a spheroid culture system method depends not only on the type and quantity of spheroid required but also on the technical and financial means available [36,49]. The advantages and limitations of these main methods are shown in Figure 2.

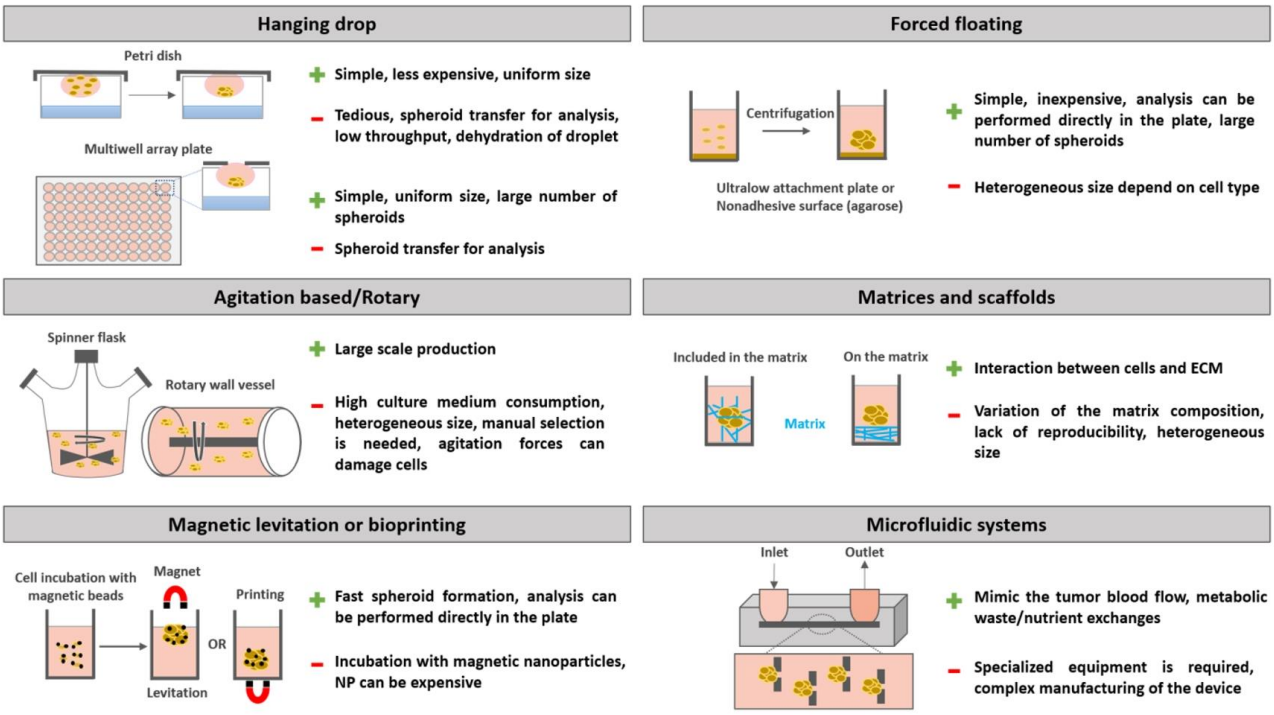


Figure 2. The main methods for spheroid formation. Advantages (+) and limitations (−).

3.1.1. Hanging Drop Method

The hanging drop method is the simplest and least expensive technique to implement, but it does not allow obtainment of a large number of spheroids. This method consists of depositing a drop of cell suspension in the lid of a Petri dish. The lid is then turned over, and the drop remains suspended due to surface tension [34]. Gravity induces the aggregation of cells, thus facilitating the formation of spheroids. A saline solution is added to the bottom of the Petri dish to prevent evaporation of the drops. However, changing the culture medium in this configuration remains difficult and time-consuming, resulting in

limited production of spheroids. Currently, more elaborate multiwell cell culture plates have been developed to replace Petri dishes [50]. The tops of these plates have small holes that allow drops to be placed in a simple way, thus resulting in a higher yield and more homogeneous spheroids.

3.1.2. Forced Floating Methods

Forced floating methods are partly based on the use of plastic surfaces treated to prevent the attachment of cells to these surfaces and to promote their aggregation. Thus, so-called "ultralow attachment" (ULA) multiwell microplates are marketed. The tumor cells are seeded and centrifuged. Then, spheroids are formed after a few days [51]. Among forced floating methods, the "liquid overlay" technique involves adding an inert liquid to the bottom of the culture well, such as agarose or poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (pHEMA), to limit cell adhesion [35,51]. All these methods are inexpensive, easy to set up, and reproducible.

3.1.3. Rotary Cell Culture/Agitation-Based Culture

The agitation-based culture method relies on the culture of tumor cells under permanent agitation, which prevents sedimentation and promotes cell–cell interactions, thus resulting in the formation of spheroids. This method provides a large-scale production of spheroids. Several systems are commercially available, such as the "spinner flask", where a rod with two paddles agitates the cell culture medium continuously inside the flask [52]. In this system, the agitation parameters are crucial to avoid excessive shear forces that could affect cell physiology. If this system makes it easy to supply nutrients and to eliminate cell waste, it consumes a large amount of cell culture medium. Another limitation of this device is the heterogeneous size of the spheroid obtained, which consequently requires manual screening of the latter to obtain a population of homogenous spheroids. To homogenize the size of the spheroid, it is also possible to combine techniques, for example, by initiating the formation of spheroids in a liquid overlay and then transferring them to agitation-based culture systems for their growth [53].

Based on the same principle, other devices are grouped under the term "rotating cell culture bioreactors" (e.g., roller tube, rotating wall vessel), in which a tube containing a suspension of cells rotates on itself, providing constant agitation. For example, the rotating wall vessel system consists of a cylinder containing a cell culture chamber surrounding a rotator, which allows the rotation of this chamber along a horizontal axis at constant speed. Thus, the gravitational force is counterbalanced with a hydrodynamic force that maintains cells in suspension by creating a microgravity that decreases the shear stresses compared to the spinner flask while allowing the homogeneous circulation of nutrients and O_2 in the medium [54].

3.1.4. Matrix-Based Methods

The use of semisynthetic [46], synthetic (poly(lactic-co-glycolic) acid, polycaprolactone, poly(ethylene glycol)), and biological (Matrigel® [40], gelatin [41], alginate [42,43], collagen [44,45]) matrices can induce the formation of spheroids and reproduce the interaction between the tumor cells and the extracellular matrix met in vivo. These cells are grown on the matrix or are included in the matrix [38,39,53]. Among the matrices, the most widely used is Matrigel, a solubilized basement membrane matrix secreted by Engelbreth-Holm-Swarm mouse sarcoma cells containing laminin, collagen, elastin, entactin, fibronectin, and fibrinogen and supplemented with numerous growth factors [40]. Once gelled, Matrigel forms a mesh with viscoelastic properties comparable to those of the extracellular matrix in vivo. Then, the tumor cells organize themselves in 3D and interact with the different constituents of the Matrigel [46]. The main limitation of these biological matrices is their composition, which can vary between different batches, thus resulting in a lack of reproducibility in the studies. Indeed, spheroids of different sizes can be obtained, making pharmaceutical studies difficult. To overcome these issues, semisyn-

thetic or synthetic hydrogels have been designed. The composition and properties of these hydrogels are controlled, resulting in more reproducible results. Even if these hydrogels are biologically inert and not biodegradable, RGD peptide units for β-integrin-mediated cell adhesion as well as sites biodegradable through metalloproteinases can be included in the hydrogels. The development and purification of such hydrogels remain complex and expensive. Therefore, hybrid hydrogels combining the advantages of biological and synthetic hydrogels have been developed. These hydrogels include natural constituents that promote adhesion and reproduce the viscoelastic properties of the extracellular matrix in vivo [55].

3.1.5. Magnetic Levitation or Printing

Magnetic levitation relies on the incubation of paramagnetic iron oxide nanoparticles with tumor cells overnight. As a result, these nanoparticles are internalized by the cells. After removing excess nanoparticles, the cells are seeded in ULA plates. A magnet is then placed on top of the plate to isolate the cells and to promote their aggregation. It is also possible to place the magnet underneath the plate, and in this case, the process is called "magnetic printing". At the recommended concentration, nanoparticles do not induce toxicity, but the equipment needed, such as some commercially available nanoparticles or magnet plates, can be relatively expensive [56,57]. These techniques have several advantages, including the possibility of maintaining spheroids in culture for long periods of time (beyond 12 weeks) and the fact that spheroid formation can be very rapid within a few hours [58–60]. The magnetic forces between the magnet and the spheroids can also be extremely useful when changing media or manipulating the spheroids, facilitating maintenance and limiting the loss of spheroids [57].

3.1.6. Microfluidic Systems

Microfluidic systems can be useful either for spheroid production or for the maintenance of spheroids in culture under controlled fluid conditions [47]. Spheroid formation using microfluidic systems can be classified into two main categories: emulsion-based methods for microdroplet formation generating spheroids encapsulated in a matrix or microarray-based methods allowing spheroid formation by capturing cells in microwells [47]. On the other hand, the commercially available microfluidic systems for spheroid culture make it possible to reproduce the biological flows encountered in vivo to ensure the supply of nutrients to the spheroid and to evacuate metabolic waste [47]. Each system has its own way of working, but in general, they are made up of an inlet and an outlet connection between which, via microfluidic chains, the liquid will circulate toward the microwells containing the spheroid [48,61]. The flow parameters and the composition of the cell culture medium as well as that of the extracellular matrix can be precisely controlled using these systems [59,61].

3.2. Contribution of MCTS to the Design of Acoustically Mediated Drug Therapies

In this section, we provide a review of in vitro investigations that exploit spheroids to design and evaluate acoustically mediated drug therapies. First, the principle of each US method on which these therapies are based will be introduced. Then, we will explain how the use of spheroids allowed the development of these drug therapies.

3.2.1. Drug Delivery Using Microbubble-Assisted Ultrasound

Microbubble-assisted ultrasound (MB-assisted US) is a noninvasive and targeted drug delivery method that enhances the therapeutic efficacy of anticancer drugs (e.g., chemotherapeutic drugs, oncolytic viruses, kinase inhibitors, nucleic acids, immunotherapeutics, and sonosensitizers) by increasing their intratumoral biodistribution and reducing their off-target effects [62–66]. In vivo, these drugs are either co-injected or injected sequentially with MBs or loaded on or into the MBs before their administration [67]. After a sufficient accumulation of drugs and MBs into the tumor tissue (after intratumoral injection) or into

the tumor microvasculature (after intravenous injection), the tumor tissue is exposed to US. Subsequently, the US-mediated volumetric oscillations of MBs generate a number of local acoustic events (e.g., pulling/pushing process, microstreaming, shock waves, and microjet) near the plasma membrane of tumor cells or the blood–tumor barrier, which promote their reversible permeabilization. This enhances the extravasation, penetration, and retention of anticancer drugs into tumor tissues through the stimulation of paracellular and transcellular pathways. The efficacy and safety of this acoustically mediated drug delivery method strongly depend on (i) the pharmacological properties of anticancer drugs and MBs, (ii) the physiology of tumor tissue, (iii) US devices and parameters, and (iv) treatment schemes. Since the advent of spheroids, the latter are increasingly used to investigate the efficacy of US protocols and new formulations of drugs or/and MBs, or to evaluate the influence of the tumor microenvironment on the efficacy of treatment (Table 2).

- Evaluation of proof of concepts

Doxorubicin (Dox) is a potent anticancer drug prescribed on its own or in combination with other drugs for the treatment of solid tumors. However, its clinical use is still rather limited because of its off-target effects. To overcome this issue, Dox is either actively administered in free form using drug delivery methods or encapsulated inside pegylated liposomes (Doxil® or Caelyx®) or polymeric nanoparticles, which can be passively administered but also actively delivered. Thus, Paškevičiūtė et al. [68] evaluated the influence of MB-assisted US on the delivery of doxorubicin (Dox) into monolayer cells and MCTS of triple-negative breast cancer (MDA-MB-231) or non-small-cell lung cancer (NSCLC) (A549) cells cocultured with human fibroblasts. MCTSs were formed using a magnetic 3D bioprinting method. Then, cell monolayers and MCTSs (200–225 μm) were exposed to MB-assisted US (1 MHz, 10 Hz pulse repetition frequency (PRF), 50% duty cycle (DC), 0.5 MPa peak negative pressure (PNP) for 20 s or 2 min; SonoVue® MBs: 20 μL) in the presence of Dox (10 μM). Using the native fluorescence of Dox, the penetration and distribution of this drug into the MCTS were monitored by fluorescence microscopy. Regardless of the US exposure time, MB-assisted US did not increase the intracellular Dox fluorescence in cell monolayers compared to Dox treatment alone. Nevertheless, the cytotoxicity of Dox after MB-assisted US was enhanced by approximately 5.7% in comparison with Dox treatment alone. In addition, the exposure of NSCLC MCTSs to MB-assisted US for 20 s induced 1.4-fold and 1.8-fold increases in Dox fluorescence into the edge and middle regions of the MCTS 1 h post-US exposure, respectively. However, a two-fold increase in Dox fluorescence was detected only in the middle regions of spheroids 2 h post-US exposure. A US exposure time of 2 min did not enhance Dox fluorescence in either region of breast cancer MCTSs 1 h post-US exposure, while there was a 1.6-fold increase in Dox fluorescence in both regions 2 h after US exposure. Although these data show that MB-assisted US increases the penetration and accumulation of Dox in both NSCLC and breast cancer MCTSs, we regret that the authors did not seek to correlate this enhanced bioavailability of Dox with an increase in its cytotoxicity, by investigating its effect on MCTS viability and growth.

Table 2. Drug delivery using MB-assisted US.

Ref.	Drug, Dye, Particles	Cell Line	Spheroid Formation Method	US Parameters	Microbubbles	Drug Distribution	Cytotoxicity Assay	Main Outcomes
[69]	Dox (543.52 Da)	MDA-MB-231 (BC cell line)	ULA plate with Geltrex matrix	1 MHz, 8 cycles, 2 ms PRP, for 30 s	Definity™	Confocal microscopy	• Live/dead cell viability assay • Monitoring of spheroid size	• Higher diffusion coefficient of Dox in deep region • Significant reduction in spheroid growth
[68]	Dox	MDA-MB-231 - A549 (NSCLC)	Magnetic 3D bioprinting - Coculture with a ratio 1:1	1 MHz, 50% DC, 0.5 MPa for 20 s or 2 min	SonoVue®	Confocal microscopy	NA	Increase in Dox fluorescence into the middle layer and not in the central region of BC and NSCLC MCTS
[70]	• Fluorescent polystyrene beads • Fluorescent labeled liposomes • (Dox)-loaded thermosensitive liposomes carried on MBs (100–200 nm)	NIH/3T3 (Fibroblasts) - 4T1 (BC cell line)	Microwell array chip coat with agarose mono- and coculture	1 MHz, 10% DC, 2000 cycles/pulse, 2 W cm^{-2} for 10 s	Lab-made lipid-shelled MBs	Flow cytometry Confocal microscopy	• CellTiter-Glo® cell viability assay • Incucyte live cell analysis • Luciferase assay	• Efficient delivery of liposomes and Dox in the outer layer of the spheroid • Increase in the intracellular uptake of liposomes and Dox • Significant increase in Dox delivery in spheroids compared to MCTSs • MCTSs are less sensitive to the treatment compared to spheroids • Acoustically mediated Dox delivery using (Dox)-loaded thermosensitive liposomes carried on MBs is more efficient than co-administration approach
[71]	• Gem (263.20 Da) • PTX (853.90 Da)	Panc-01 (PDAC cancer cell)	Liquid overlay: Plate coated with agarose	1 MHz, 100 Hz PRF, 30% DC, 0.48 MPa PNP for 30s	Lab-made drug-loaded, lipid-shelled MBs	NA	• Spheroid morphology • MTT assay	The combination of Gem/PTX-loaded MBs with US induced higher cytotoxic effects than Gem-loaded MBs with US

Table 2. *Cont.*

Ref.	Drug, Dye, Particles	Cell Line	Spheroid Formation Method	US Parameters	Microbubbles	Drug Distribution	Cytotoxicity Assay	Main Outcomes
[31]	• Ox (397.29 Da) • Ir (586.70 Da)	Panc-01	Liquid overlay: Plate coated with agarose	1 MHz, 100 Hz PRF, 50% DC, 3 W cm^{-2} for 30 s	Lab-made drug-loaded, lipid-shelled MBs	NA	• Spheroid morphology • Propidium iodide staining	• Acoustically mediated Ir delivery using Ir-loaded MBs significantly decreased the viability of spheroid than the acoustically mediated Ir delivery without MBs • The combination of Ox/Ir-loaded MBs with US induced significant inhibition of spheroid growth compared to those treated with Ir-loaded MBs and US
[48]	Dox	HCT116 (CC cell line) - HFFF2 (Human fetal foreskin fibroblast)	ULA plate Microfluidic system - Coculture with a ratio 1:1	1 kHz PRF, 1% DC, 0.81 MPa PNP, for 2 s	Lab-made lipid-shelled MBs	Confocal microscopy	• Spheroid morphology • CellTiter-Glo® Cell Viability Assay • NucRed Dead labelling	• Dox delivery using MB-assisted US induced a significant increase in Dox uptake into the spheroid and a significant decrease in cell viability • Acoustically mediated Dox delivery using Dox-loaded MBs is more efficient in Dox uptake and cell mortality than the co-delivery of Dox-loaded liposomes with MBs +US or Dox-loaded liposomes alone • MCTS are most resistant to Dox (IC50 = 1.9 μM) compared to spheroids (IC50 = 0.9 μM)

Table 2. *Cont.*

Ref.	Drug, Dye, Particles	Cell Line	Spheroid Formation Method	US Parameters	Microbubbles	Drug Distribution	Cytotoxicity Assay	Main Outcomes
[72]	Fluorescent cationic, anionic and neutral nanoparticles (20, 40, 100 nm)	MCF-7 (BC cell line)	Agitation based method with agarose beads	1 MHz, 10 Hz PRF, 10–50% DC, 0.5 MPa for 10–90 s	Optison®	Confocal microscopy	NA	• Penetration into spheroids decreased when nanoparticle size increased • Anionic nanoparticles penetrated deeper than neutral and cationic nanoparticles • Nanoparticles penetration also depended on time exposure and duty cycle

Dox = doxorubicin; BC = breast cancer; ULA = ultralow attachment plate; PRP = pulse repetition period; NSCLC = nonsmall cell lung cancer; DC = duty cycle; NA = not available; MBs = microbubbles; MCTS = multicellular tumor spheroid; Gem = gemcitabine; PTX = paclitaxel; PDAC = pancreatic ductal adenocarcinoma; PNP = peak negative pressure; PRF = pulse repetition frequency; Ox = oxaliplatin; Ir = irinotecan; CC = colon cancer IC50 = half maximal inhibitory concentration.

Moreover, Misra et al. [69] investigated the influence of MB-assisted US on the penetration, distribution, and efficacy of doxorubicin (Dox) in a breast cancer (MDA-MB-231) spheroid model. To achieve this objective, spheroids were generated by seeding and by growing breast cancer cells in a ULA microplate using Geltrex as the extracellular matrix. These spheroids (size 300–400 μm) were incubated with Dox (50 μM) and MBs (Definity^{TM} at 1.7% v/v concentration) under magnetic steering. They were then exposed to US waves (1 MHz, 8 cycles, 2 ms pulse repetition period (PRP), 770 kPa PNP for 30 s). The penetration and accumulation of Dox into the spheroid were monitored by confocal laser scanning microscopy (CLSM). The results revealed that MB-assisted US significantly increased the penetration of Dox into the deeper regions of spheroids. After spheroid dissociation, the intracellular uptake of Dox was assessed using flow cytometry. This analysis confirmed that acoustically mediated Dox delivery significantly enhanced Dox uptake per cell by 25% and was associated with a 1.2-fold increase in total fluorescence compared to Dox treatment alone. The therapeutic efficacy of this treatment was assessed 4 h after Dox delivery using a live/dead cell viability assay (Cellbrite^{TM} Orange/Nuclear Blue^{TM} DCS1) with flow cytometry. The analysis of this early cell mortality did not show a significant increase in cell death after acoustically mediated Dox delivery compared to Dox treatment alone, despite a significant increase in the penetration and the distribution of Dox into the spheroid. Accordingly, the authors analyzed the therapeutic efficacy of this treatment over a long-term period by monitoring the growth of the spheroids for 28 days after treatment. As reported in the short-term period (4 h after treatment), no significant difference was observed in spheroid size after acoustically mediated Dox delivery compared to Dox treatment alone. Altogether, these results show that MB-assisted US increases the penetration and intracellular uptake of Dox into deeper spheroid layers. However, surprisingly, this improvement does not translate into an increase in the therapeutic efficacy of Dox, suggesting that the increased dose of Dox into the spheroid is not enough to induce an additional loss of cell viability in comparison with Dox treatment alone. Nevertheless, we think that an optimization of US- and MB-related parameters should make it possible to establish a positive correlation between a significant accumulation of Dox in the spheroids and a significant decrease in their growth.

- Influence of acoustic parameters on dye/nanoparticle delivery

Recently, our research group investigated the influence of peak negative pressure (PNP) on the delivery of the fluorescent dye, propidium iodide (PI) (used as a drug model), into colorectal cancer spheroids [73]. The colorectal cancer cells (HCT-116) were seeded and cultured in a ULA 96-well microplate. The spheroids (300 μm in diameter) were incubated with PI (100 μM) and Vevo MicroMarker^{TM} MBs (30 μL; 2×10^9 MBs/mL). Then, they were immediately exposed to US waves (1 MHz, 100 μs BP, 40% DC, 100 kPa to 400 kPa) for 30 s. The dye delivery into spheroids was assessed by measuring the fluorescence intensity of PI with fluorescence imaging microscopy. As shown in Figure 3A,B, the exposure of spheroids to an acoustic pressure of 100 kPa in the presence of MBs significantly induced an increase in the fluorescence intensity into the spheroids compared to PI treatment alone ($p < 0.05$), suggesting a significant enhancement of the penetration and the accumulation of PI into the spheroids. The increase in the acoustic pressure from 200 kPa to 300 kPa resulted in an additional increase in the fluorescence intensity compared with that obtained at 100 kPa ($p < 0.05$). At both 300 and 400 kPa, a similar fluorescence intensity was detected in spheroids ($p > 0.05$). As displayed in Figure 3B, the increase in the acoustic pressure from 100 to 300 kPa induced a linear increase in the fluorescence intensity before reaching a plateau. The influence of acoustic pressure on spheroid growth and viability was determined by measuring the spheroid area for 13 days and by using trypan blue staining on the 13th day, respectively. As shown in Figure 3C,D, the increase in acoustic pressure from 100 to 400 kPa did not affect spheroid growth and viability. Altogether, these results suggest that acoustic pressure is a key parameter in improving the delivery of small molecules into spheroids.

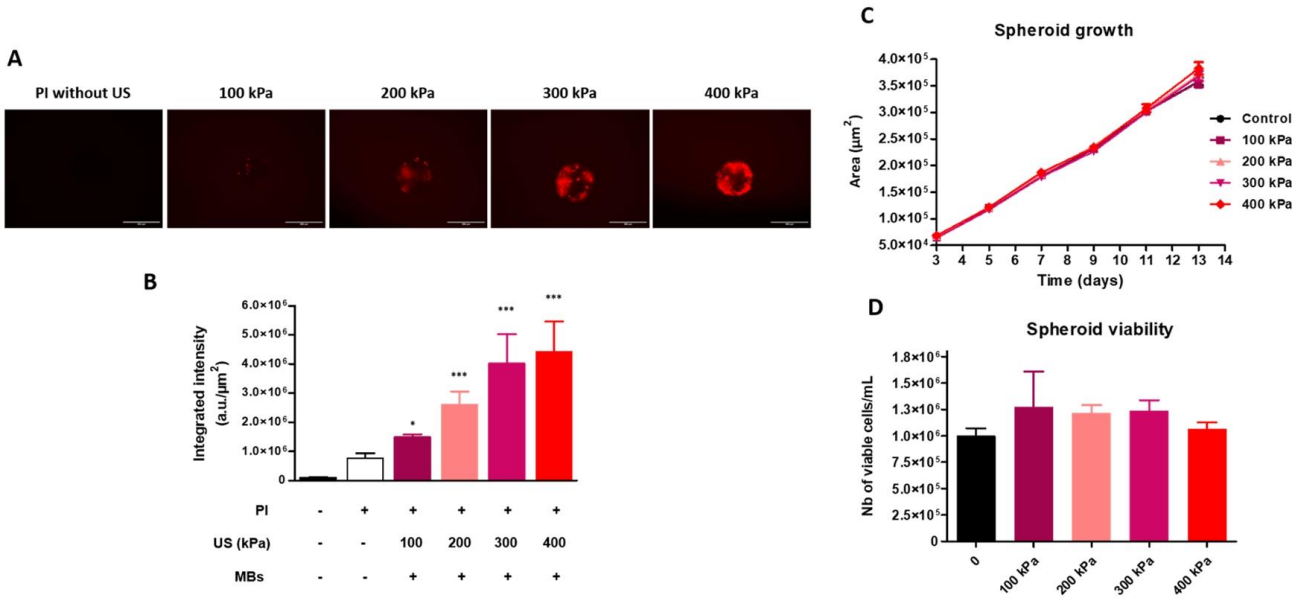


Figure 3. Effect of acoustic pressure on spheroid permeabilization and viability. HCT-116 colon cancer cells were used to generate spheroids in ULA 96-well plates (500 cells/well). At Day 3, when spheroids reached a diameter of 300 µm, the influence of acoustic pressure on cell permeabilization (**A**,**B**), spheroid growth (**C**), and spheroid viability (**D**) was evaluated. To visualize cellular permeabilization, 5 spheroids were transferred to a plastic cuvette under agitation with a magnetic stirrer, and 30 µL of Vevo Micromarker^{TM} MBs (VisualSonics Inc., Toronto, ON, Canada) and 100 µM propidium iodide (PI) were added to McCoy's medium supplemented with 1% FCS. Spheroids were exposed to 1 MHz sinusoidal US waves with a peak negative pressure of 100 kPa to 400 kPa, burst period of 100 µs, and 40 cycles per pulse for 30 s. The same procedure was applied without PI to evaluate spheroid growth monitored with the EVOS M5000 microscope taking the measurement of the spheroid area with ImageJ software. On Day 13, spheroid viability was assessed using trypan blue staining, and the percentage of viable cells was calculated with Countess automated cell counter. The integrated fluorescence intensity of PI was represented as a function of acoustic pressure. The Mann–Whitney, nonparametric test was used for statistical analysis, and significance was established as * $p < 0.05$ and *** $p < 0.005$ compared to the control condition with PI/without US. Each bar represents the mean ± standard error of the mean (SEM). The scale bar indicates 300 µm.

Moreover, Grainger et al. [72] investigated the effects of the size (20, 40, and 100 nm) and surface charge (anionic, cationic, and neutral) of fluorescent nanoparticles (NPs) as well as US parameters (duty cycle, US exposure time) on the penetration of these NPs into breast cancer spheroids. Breast cancer cells (MCF-7) were seeded on agarose beads and cultured in an orbital shaker to generate spheroids. These spheroids (300–350 µm) were exposed to US waves (1 MHz, 10 Hz PRF, 10–50% DC, 0.5 MPa for 10–90 s) in the presence of 3.64×10^{13} fluorescent NPs and MBs (Optison®—50 µL). The adhesion and penetration of NPs on or inside the spheroids were assessed using optical imaging microscopy. The simple incubation of spheroids with 20 and 40 nm NPs induced high adhesion and penetration into the spheroid surface and intermediate layer compared to deeper layers. Regardless of the US parameters, the exposure of spheroids to MB-assisted US increased the penetration of NPs into the spheroid core in a size-dependent manner. Nevertheless, the acoustically enhanced penetration of NPs into spheroids strongly depended on DC. Thus, 30% DC was the optimal DC to induce the highest penetration and retention of 20 nm NPs into the spheroids without affecting the spheroid integrity and viability. In addition, the concentration of 20 nm anionic NPs in the core, intermediate layers and surface of the spheroid was nearly twice as much as that of neutral and cationic NPs. Anionic NPs should more easily penetrate through the spheroid's interstitium because

of the electrostatic repulsion with the negatively charged patterns present at the surface of tumor cells and in the extracellular matrix embedding these cells. These results show that the acoustically mediated delivery of small anionic nanoparticles is a suitable strategy to significantly accumulate drugs into the core of tumors.

- Evaluation of the new formulation of drug-loaded MBs

Gao et al. [31] designed a new formulation of liposome-loaded MBs carrying irinotecan (Ir) and oxaliplatin (Ox). Both chemotherapeutic drugs are commonly associated with 5-fluorouracil and folinic acid for the treatment of advanced pancreatic cancer. This chemotherapeutic regimen, also called FOLFIRINOX, has shown a great benefit on patient survival, but this regimen is only prescribed for patients with good physical condition because of its acute side effects. In this new formulation, oxaliplatin was encapsulated into liposomes, which were then conjugated on lab-made and phospholipid-shelled MBs containing irinotecan (Ir/Ox-loaded MBs). Pancreatic tumor cells (Panc-01) were seeded and cultured on 96-well plates coated with agarose solution to generate spheroids 96 h after seeding. These spheroids were incubated with Ir-loaded MBs (50 μM Ir and 9.55 × 108 MB/mL) or Ir/Ox-loaded MBs (low dose: 25 μM Ir and 129 μM Ox; high dose: 50 μM Ir and 258 μM Ox) and then exposed to US waves (1 MHz, 100 Hz PRF, 50% DC, 3 W cm^{-2}) for 30 s. The efficacy of treatment was measured 48 h later by observing the size and integrity of spheroids using optical imaging and by staining the spheroid with PI, a fluorescent dye that labels the dead cells. First, the acoustically mediated irinotecan delivery using Ir-loaded MBs into spheroids induced a 42% increase in the PI fluorescence compared to those treated with free irinotecan delivered with US alone. As a result, the former spheroids displayed a loss of spheroid cohesion and a smaller size than the latter ones. In addition, the exposure of spheroids to MB-assisted US with a low dose of Ir/Ox-loaded MBs resulted in a substantial decrease in spheroid size and loss of spheroid integrity, while the PI fluorescence was not significantly increased compared to the spheroids treated with a low dose of Ir/Ox-loaded MBs without US exposure. The spheroids incubated only with a high dose of Ir/Ox-loaded MBs (i.e., without US application) were also smaller with reduced spheroid cohesion and showed higher PI fluorescence (32%) than those exposed to a low dose of Ir/Ox-loaded MBs in the presence of US. The acoustically mediated drug delivery into the spheroids using a high dose of Ir/Ox-loaded MBs induced a further 52% in PI fluorescence compared to those treated only with this MB dose. This fluorescence was significantly higher than that of spheroids exposed to US in the presence of Ir-loaded MBs. These results indicate that MB-assisted US using Ir/Ox-loaded MBs is more effective than MB-assisted US using Ir-loaded MBs in this spheroid of pancreatic cancer. To confirm these results in vivo, the Ir/Ox-loaded MBs (4.75 ± 0.83 mg/kg Ir; 0.91 ± 0.34 mg/kg Ox) were administered intravenously in a subcutaneous pancreatic cancer (BxPC3) xenograft tumor model. Once tumors reached approximately 100 mm^3, they were exposed to US (1 MHz, 30% DC, 100 Hz PRF, 0.48 MPa PNP) for 3.5 min. The tumor dimensions were measured using a Vernier caliper over time. This treatment resulted in the inhibition of tumor growth compared to control conditions (no treatment, free Ox/Ir or Ir/Ox-loaded MBs). If these in vivo results surprisingly confirmed the results obtained with the spheroids, we can see here two limitations: (i) the tumor cell lines used for the spheroids and in vivo studies are different (Panc-01 versus BxPC3), and it is unlikely that these cell lines have the same sensitivity to the treatment; and (ii) the use of the avascular spheroids. The spheroids were incubated directly with the Ir/Ox-loaded MBs whereas they were administered intravenously in vivo. Indeed, the spheroids were incubated directly with the free drugs or drug-loaded MBs whereas these latter were administered intravenously in vivo. In the spheroid model, MB-assisted US induces (i) the release of the drugs from MBs, (ii) the loss of spheroid cohesion thus facilitating the drug penetration inside the spheroids, and (iii) the permeabilization of the tumor cells thus improving the intracellular uptake of drugs. In the in vivo tumor model, MB-assisted US may permeabilize the tumor microvasculature and consequently enhance the drug extravasation and its intratumoral bioavailability. This permeabilization may increase the intracellular delivery of drugs in the endothelial cells, thus potentiating

the destruction of tumor vasculature and reducing the nutrient supply of tumors. It is well known that because the MBs are pure vascular agents, MB-assisted US has no direct effect on tumor cells in vivo compared to spheroid models. Nevertheless, this study is the first to report on the acoustically mediated co-delivery of two chemotherapeutic drugs using liposome-loaded MBs.

In the same way, Logan et al. [71] generated stable MB formulations loaded with gemcitabine (Gem-loaded MBs) or a combination of gemcitabine and paclitaxel (Gem/PTX-loaded MBs). This drug combination is a standard of care chemotherapy regimen used in the treatment of patients with advanced pancreatic cancer. It has shown a survival benefit compared to gemcitabine monotherapy. Nevertheless, this regimen is associated with severe off-target toxicity. Both drugs were incorporated into the MB shells during the self-assembly process. As previously described, a suspension of Panc-01 cells was seeded and cultured on microplates coated with agarose solution for 4 days to establish spheroids. These spheroids were incubated with Gem-loaded MBs or Gem/PTX-loaded MBs (10 µM Gem; 6.2 µM PTX; 3×10^7 MBs) and then immediately exposed to US waves (1 MHz, 100 Hz PRF, 30% DC, 0.48 MPa) for 30 s. Two days later, spheroid morphology was observed using optical microscopy, and spheroid viability was assessed using a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. The spheroids treated with Gem-loaded MBs and then exposed to US displayed a loss of spheroid integrity compared to those treated with US on its own (i.e., without MBs) or with Gem-loaded MBs alone (i.e., without US). However, the acoustically mediated co-delivery of gemcitabine and paclitaxel into spheroids using Gem/PTX-loaded MBs magnified this biological response. Indeed, a significant loss of spheroid cohesion was detected with much cellular debris surrounding these spheroids. As a result, Gem-loaded MBs following US exposure reduced the spheroid viability from 90 ± 10% (i.e., Gem-loaded MBs without US) to 62 ± 5% (i.e., Gem-loaded MBs with US) while the combination of US with Gem/PTX-loaded MBs decreased this viability from 84 ± 10% to 30 ± 6%. Moreover, Logan et al. investigated the therapeutic efficacy of their therapeutic MBs in a subcutaneous pancreatic cancer (BxPC3) xenograft tumor model. They administered intravenously the Gem-loaded MBs (2.8 ± 0.3 mg/kg Gem; $1 \times 10^9 \pm 2 \times 10^7$ MBs/mL) or Gem/PTX-loaded MBs (3.2 ± 0.4 mg/kg Gem; 2.0 ± 0.2 mg/kg PTX; $8.6 \times 10^8 \pm 1 \times 10^7$ MBs/mL). Then, the tumors (150 mm^3) were exposed to US (1 MHz, 30% DC, 100 Hz PRF, 0.48 MPa PNP) for 3.5 min, and their dimensions were measured using a Vernier caliper during the tumor growth. Regardless of the type of the therapeutic MBs used, this protocol inhibited the tumor growth compared to control conditions (no treatment, free Gem, or free Gem/PTX). Surprisingly, there was no significant difference in the therapeutic efficacy between both therapeutic MBs. As previously described for Gao et al., in vivo results partly confirmed the results obtained with the spheroids. In addition, the same limitations persist, namely the use of two different tumor cell lines in vitro and in vivo and the use of the avascular spheroids. Nevertheless, these data confirmed the potential of MB-assisted US to co-deliver both chemotherapeutic drugs for the targeted treatment of pancreatic cancer.

- Evaluation of the impact of the tumor microenvironment on the efficacy of treatment

The importance of the tumor microenvironment in the process of tumor progression and in resistance to pharmacological treatments has been widely studied [2,4]. To mimic this tumor microenvironment and its heterogeneity, MCTSs are generated by coculturing tumor cells with other types of cells (e.g., fibroblasts, adipocytes, immune cells, etc.) and with extracellular matrix. For example, the coculture of fibroblasts with tumor cells induces their differentiation into cancer-associated fibroblasts, which are characterized by the expression of α-smooth muscle actin [74]. These cancer-associated fibroblasts promote tumor growth, tumor aggressiveness, metastasis, and resistance to anticancer drugs, partly due to the formation of a dense extracellular matrix that restricts drug penetration into the tumor, thereby rendering treatment less efficient [75,76]. In this context, MCTSs are also used to develop MB-assisted US as a targeted drug delivery method [48,70].

Roovers et al. [70] investigated and compared the efficacy of MB-assisted US using fluorescent regular liposomes (RL) and temperature-sensitive liposomes (TSL) based on Doxil® and ThermoDox® formulations to encapsulate and deliver Dox into spheroids and MCTSs. These formulations were either co-administered with MBs or loaded on MBs. To achieve this objective, murine breast cancer (4T1) cells only (spheroids) or with fibroblasts in a 1:5 ratio (MCTS) were seeded and cultured on an agarose-based microwell array for 48 h for spheroid formation (100–150 µm). The efficacy of Dox and fluorescent liposome (LPS) delivery was assessed 24 h after US exposure using flow cytometry and confocal microscopy (Figure 4). Flow cytometry analysis confirmed that MB-assisted US using RL-loaded MBs is a more efficient strategy to deliver Dox into spheroids and MCTSs. The gradient in fluorescence shown by the cell population thus treated indicated that the location of the cell within the spheroids and MCTSs significantly impacted the efficacy of Dox and/or RL uptake. In addition, the positive correlation between RL and Dox fluorescence revealed that intact RL-loaded LPS was delivered into the spheroids and MCTSs. As expected, confocal microscopy revealed a colocalization of RL and Dox fluorescence in the outer layers of the spheroids because of the slow Dox release from RL. Then, both 3D models were incubated with TSL-loaded MBs and then exposed to US. Twenty minutes and one centrifugation later, spheroids and MCTSs were heated at 42 °C for 15 min to induce Dox release from TSL. Flow cytometry analysis showed that the treatment of spheroids and MCTSs with TSL-loaded MBs and US, followed by mild hyperthermia is the more efficient method to deliver Dox from TSL. As a result, the correlation between TSL and Dox fluorescence was less notable. Confocal microscopy analysis confirmed these results. After mild hyperthermia, Dox leaked out of the TSL and diffused further into the spheroids as well as MCTSs, suggesting that the stroma in the MCTS is not a barrier to the diffusion of Dox into MCTSs.

Regardless of the type of Dox-loaded LPS, similar results were obtained between spheroids and MCTS, confirming that the tumor stroma has no significant impact on acoustically mediated Dox delivery.

Then, the cytotoxicity of these different strategies was evaluated 72 h after treatment by observing morphological changes in spheroids and MCTSs using optical microscopy and by assessing spheroid viability using a CellTiter-Glo® 3D cell viability assay. Both untreated spheroids and MCTSs grew closely in size over time and were perfectly cohesive. The spheroids treated with TSL-loaded MBs and US, followed by mild hyperthermia, displayed a significant loss of cohesion, while MCTSs mostly shed cell fragments. This difference may be explained by the presence of extracellular matrix in the MCTS, which maintained MCTS cohesion. It is unfortunate that the authors did not report similar data for RL-loaded MBs. Nevertheless, they described the spheroid viability for both Dox-loaded MB formulations. Regardless of both 3D models, MB-assisted US using RL-loaded MBs induced significant cytotoxicity (viability < 30% for spheroids and MCTS) compared to RL treatment alone (viability > 60% for spheroids and MCTS) or to the coadministration of RL with MBs and exposure to US (viability > 50% for spheroids; >60% MCTS). This strategy is as effective as Dox treatment alone. Similar results were obtained when spheroids and MCTSs were exposed to TSL-loaded MBs and US, followed by mild hyperthermia.

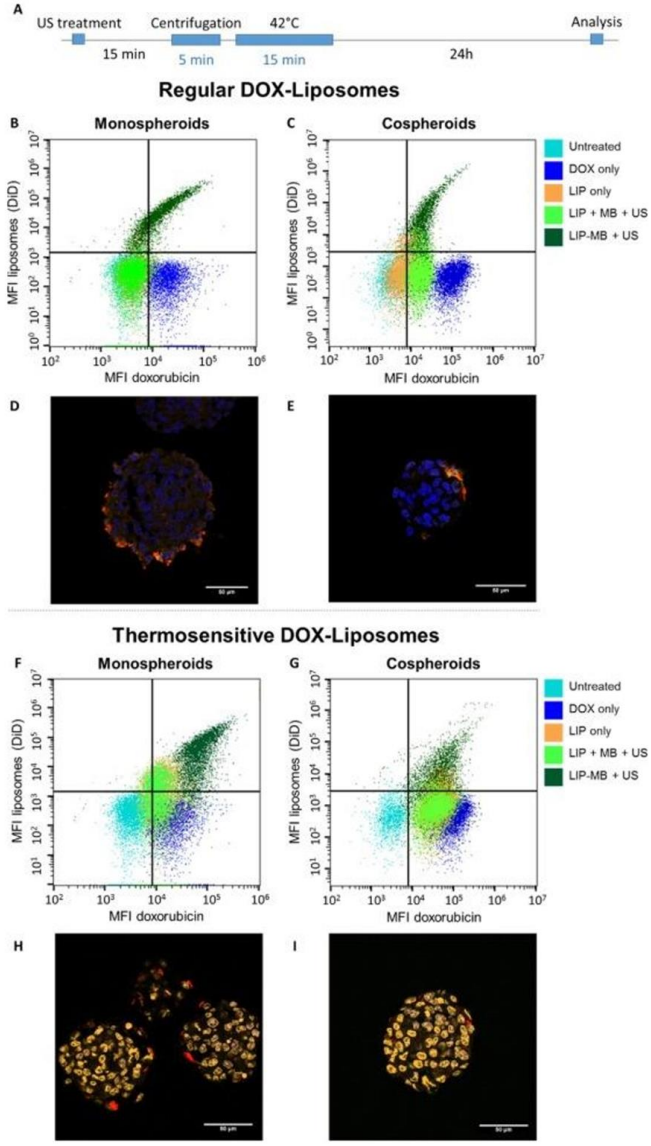


Figure 4. Localization of doxorubicin after sonoprinting and a short heating step. (**A**) Time diagram: 15 min after ultrasound treatment, the spheroids were centrifuged to remove any remaining free doxorubicin or DOX-liposomes. Subsequently, the spheroids were exposed to 42 °C for 15 min. After 24 h, the spheroids were analyzed using flow cytometry and confocal microscopy on cryosections. (**B**,**C**,**F**,**G**) Flow intensity scatter plots of the cellular delivery of doxorubicin (doxorubicin fluorescence, horizontal axis), (**B**–**C**) regular, and (**F**–**G**) thermosensitive liposomes (DiD fluorescence, vertical axis) in (**B**,**F**) monospheroids and (**C**,**G**) cospheroids. DOX = doxorubicin; LIP = DOX-liposomes; MB = microbubbles; US = ultrasound; LIP + MB + US = DOX-liposomes and microbubbles coadministered before ultrasound radiation; LIP-MB + US = DOX-liposomes loaded onto the microbubbles and exposed to ultrasound (i.e., sonoprinting). (**D**,**E**,**H**,**I**) 10 µm cryosections of (**D**,**H**) monospheroids and (**E**,**I**) cospheroids treated with (**D**–**E**) regular or (**H**,**I**) thermosensitive DOX-liposomes coupled onto microbubbles and exposed to ultrasound. Blue = DAPI, orange = doxorubicin, red = liposomes (DiD). The scale bars indicate 50 µm. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article). Reprinted from Sonoprinting liposomes on tumor spheroids by microbubbles and ultrasound, Volume 316, S. Roovers, et al., Pages 79–92, Copyright 2019, with permission from Elsevier [70].

Finally, the authors investigated the protective effect of the fibroblast-derived matrix on breast cancer cell viability by generating spheroids and MCTSs with luciferase-overexpressing breast cancer cells. Thus, luciferase expression was measured to selectively assess the viability of breast cancer cells in spheroids and MCTS 72 h after treatment. Regardless of LPS type, this analysis revealed that the MCTSs were less sensitive to Dox than spheroids when they were treated with Dox-loaded LPS (viability > 75% for MCTS versus <50% for spheroids) only or coadministered with Dox-loaded LPS and MBs and exposed to US (RL: viability > 75% for MCTS versus <50% for spheroids; TSL: viability > 50% for MCTS versus >40% for spheroids). This result thus confirms the protective effects of fibroblasts against Dox. However, MB-assisted US using both types of Dox-loaded MBs resulted in an identical decrease in cell viability into spheroids and MCTSs (viability < 25%), suggesting that this acoustically enhanced Dox delivery made it possible to overcome the protective effects of fibroblasts. This therapeutic efficacy was also higher than those of the treatments described above but as effective as free Dox (viability < 25%).

In conclusion, spheroids and MCTSs are powerful 3D tumor models to design and to validate protocols for drug delivery using MB-assisted US. Indeed, they are mainly used (i) to validate some proofs of concept, (ii) to investigate the effects of acoustic parameters and new formulations of MBs, (iii) to assess the penetration and accumulation of anticancer drugs (free or formulated drugs), (iv) to evaluate the therapeutic efficacy of these drugs, and (v) to study the influence of the tumor microenvironment on the efficacies of drug delivery and treatments. Nevertheless, their main limitation is the absence of tumor microvasculature, thus restricting the comparison of results on spheroids and MCTSs with in vivo data.

3.2.2. Sonodynamic Therapy

Sonodynamic therapy (SDT) represents an emerging therapeutic strategy that offers the possibility of eradicating solid tumors in a noninvasive and targeted manner [77]. This strategy relies on the sensitization of target tumor tissues with a nontoxic sensitizing agent (e.g., 5-aminolevulinic acid, Rose Bengal, protoporphyrin IX, etc.) and subsequent exposure of the sensitized tissues to relatively low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) [78]. SDT uses nontoxic sensitizers, which are commonly exploited as photosensitizers in photodynamic therapy (PDT). In addition, LIPUS is a nontoxic and nonthermal stimulus. The strong tissue penetrating power of US (>1 cm) makes it a superior anticancer strategy compared to similar alternative strategies including PDT, in which less penetrating light sources (<1 cm) are employed to induce cytotoxic effects in sensitized tumor tissues. Thus, SDT would find wider oncological applications, specifically for the noninvasive and targeted treatment of deep tumor lesions. Both sensitization and US exposure are nontoxic alone, whereas their combination results in cytotoxic events through the generation of reactive oxygen species (ROS) [79]. This strategy offers the advantage of increasing on-target responses while reducing adverse effects compared to conventional chemotherapy. In addition, the efficacy of SDT is often evaluated in association with chemotherapy, PDT, or targeted therapies [32,80–83]. As previously described for acoustically mediated drug delivery, the efficacy and safety of SDT strongly depend on (i) the pharmacological properties of sensitizers [83–85], (ii) the physiology of tumor tissue [83], (iii) US devices and parameters [80], and (iv) SDT treatment schemes on their own or combined with other anticancer therapies, including chemotherapy, radiotherapy, PDT, and therapeutic ultrasound [80,81,86–89]. In the next section, we will present and discuss the studies that exploited spheroids and MCTSs for the design of SDT protocols (Table 3).

- Investigation of drug penetration and efficacy

As previously reported, the in-homogeneous tumor vasculature and the increased interstitial pressure restricted the penetration and accumulation of NPs inside the tumor core [4,90,91]. Zhou et al. [86] investigated the efficacy of low-intensity focused ultrasound (LIFU) to enhance the intratumoral diffusion of NPs inside cervical cancer (HeLa) spheroids after one week of culture in spheroid microplates. In this study, the authors developed

theranostic nanoparticles (NPs) loaded with a sonosensitizer, IR780, a magnetic resonance imaging contrast agent, gadolinium diethylenetriaminepentacetate, and a phase transition material, perfluorohexane, for the treatment of cervical cancer using SDT and acoustic droplet vaporization. Cervical cancer cells were seeded and cultured in ULA microplates. One week later, fluorescent NPs (2 mg/mL) were added to spheroids and exposed to LIFU (2 treatments with 10 min intervals: 2.5 W cm^{-2} for 20 s). Then, the spheroids were observed under CLSM at 6 h posttreatment. In the absence of LIFU exposure, the fluorescent NPs were preferentially located on the surface of spheroids, and only a few NPs were detected inside the spheroids. The acoustically mediated NP delivery revealed a significant increase in fluorescent NPs inside the spheroid core. These NPs were homogenously distributed inside the spheroids. To confirm these results in vivo, the NPs (5 mg/mL, 200 µL) were injected intravenously in a subcutaneous cervical cancer xenograft tumor model. Then, the tumors were exposed to LIFU (two treatments with 10 min intervals: 2.5 W cm^{-2} for 10 min) 6 h after the NP administration. Six hours later, magnetic resonance imaging confirmed that the acoustically mediated NP delivery was a promising strategy to enhance the concentration of NPs in the tumor core. As reported above, these in vivo data partly confirmed the in vitro data on the spheroids. In addition, we notice here again that the main limitation in this study is the exploitation of the avascular spheroids. Indeed, the spheroids were incubated directly with the NPs whereas NPs were administered intravenously in vivo. We can legitimately ask ourselves whether the LIFU treatment has an effect only on the intratumoral bioavailability. The LIFU may improve the enhanced permeability and retention (EPR) effect by permeabilizing the tumor microvasculature. In addition, as in other publications, the analysis of anticancer treatment efficacy on spheroids was restricted to a unique parameter, here, the increase in the quantity of NPs inside the tumor. Indeed, the therapeutic efficacy of these theranostic NPs was evaluated in a subcutaneous cervical cancer xenograft tumor model. Thus, the increase in therapeutic efficacy of NP after LIFU treatment was positively correlated with the increase in intratumoral bioavailability of NPs induced by LIFU.

Similarly, Sun et al. [85] investigated the penetration and the efficiency of liposomes (iRGD-Lipo-sinoporphyrin sodium) targeting integrin-overexpressing cancer cells through an internalizing-RGD peptide (iRGD) and containing a sonosensitizer, sinoporphyrin sodium, on spheroids of glioma (C6). These spheroids were generated using ULA microplates for one week. Free-form and liposomal formulations (bare and targeted) of sonosensitizer (1 µM) were incubated with spheroids for 4 h. Using the native fluorescence of sonosensitizer, the spheroids were then observed under CLSM. The free-form and the bare liposomes of the sonosensitizer were mainly located in the peripheral layers of spheroids, while the targeted liposomes of the sonosensitizer were uniformly distributed inside the spheroids. Subsequently, the therapeutic efficacy of these formulations (0.5 µM) for SDT (0.6 W cm^{-2} for 1 min) were assessed by observing the morphology of spheroids under optical microscopy 24 h after treatment. Untreated spheroids depicted uniform and cohesive morphology. Free form and bare and targeted liposomal formulations of sonosensitizer and US treatments alone did not affect the morphology of spheroids. SDT with the free form of sonosensitizer induced a decrease in the size of only a few spheroids. Using the bare liposomes of sonosensitizer, SDT caused a strong loss of spheroid cohesion, thus inducing abundant individual cells in the plate. Finally, the exposure of spheroids to SDT with targeted liposomes of sonosensitizer generated full destruction of all spheroids.

Altogether, these results on spheroids indicated that the targeted liposomes of the sonosensitizer significantly accumulated into spheroids, thus causing significant cell death. By choosing to exploit an orthotopic glioma xenograft tumor model and to a administer intravenously their targeted liposomes of the sonosensitizer, the authors were confronted with the blood–brain barrier, which restricts the intracerebral delivery of therapeutic molecules [92]. To overcome this limitation, which they have not encountered while exploiting spheroids, they delivered their targeted liposomes of the sonosensitizer using MB-assisted US (see Section 3.2.1). Lab-made phospholipid MBs (20 µL) were injected

intravenously, and focused US (1 MHz, burst interval time: 1 s, 20% DC, 1 W, for 1 min) were immediately applied to tumors in order to open the blood–brain barrier. Then, the targeted liposomes of the sonosensitizer (1 mg/kg DVDMS) were administered intravenously. Thirty hours later, the SDT treatment (1 MHz, 1 W, for 1 min) was repeated twice within a five-day interval. This therapeutic protocol significantly prolonged the survival time (40 days versus 15 days) and improved the living status of glioma-bearing mice compared to control treatments (no treatment, free sonosensitizer, and SDT; untargeted liposomes of sonosensitizer and SDT). This improvement in therapeutic efficacy is closely associated with an increase in quantity of the sonosensitizer using MB-assisted US in the tumor tissue.

Afterward, Zhao et al. [84] designed ROS-responsive nanoscale coordination polymers through the self-assembly of porphyrins (sonosensitizer) and platinum, which carried an RGD targeting peptide and ROS-cleavable linker to increase Dox release during SDT (1.0 MHz, 2.0 W cm^{-2} for 15 min). The penetration and therapeutic efficacy of this therapeutic nanoplatform were evaluated on spheroids of breast cancer (MCF-7). These spheroids were generated in medium containing methylcellulose for 2 days. To investigate the Dox release and uptake behavior inside the spheroids, they were incubated with the targeted nanoplatform (200 μg/mL), exposed to US, and finally observed under CLSM. The spheroids incubated with the targeted nanoplatforms only showed a weak fluorescence intensity of Dox on their outer surface, while Dox was efficiently released and deeply internalized in the core of spheroids after US exposure. To assess the therapeutic efficacy of SDT, the spheroids were incubated with the targeted nanoplatform. Four hours later, they were stained using a live/dead assay (calcein-AM/PI). Subsequently, the spheroids were exposed to US. SDT significantly increased the apoptosis of tumor cells compared to treatment with the targeted nanoplatform only. In conclusion, this controllable and stimuli-responsive therapeutic nanoplatform is promising for SDT.

Moreover, Lee et al. [32] developed an SDT strategy on metastatic ovarian cancer spheroids (SKOV-3) using graphene nanoribbons (GNRs) functionalized with 4-arm polyethylene glycol (PEG) and chlorin e6 (Ce6) as a sonosensitizer (GNR-PEG-Ce6). To generate these spheroids, ovarian cancer cells were seeded and cultured on a nonadhesive pHEMA surface for 24 h (30–200 μm spheroid size). Optical imaging revealed that the adsorption of GNR-PEG-Ce6 (50 and 100 μg/mL) at the surface of spheroids prevented their adhesion to extracellular matrix proteins. This loss of spheroid adhesion was associated with a significant downregulation of integrin β1 and CD44 proteins on the surface of spheroids. This incubation also induced a loss of spheroid cohesion related to a significant downregulated expression of E-cadherin. Moreover, GNR-PEG-Ce6 (50 μg/mL) fully inhibited the adhesion and spreading of spheroids onto the mesothelial layer (LP-9) and subsequent mesothelial clearance, a key metastatic process. GNR-PEG-Ce6 can kill ovarian cancer spheroids adhered to mesothelial cell monolayers when combined with US. The interaction with GNR-PEG-Ce6 also loosens intercellular adhesions within the spheroids, rendering them more susceptible to chemotherapeutic drugs including cisplatin and paclitaxel. Thus, GNR-PEG-Ce6 increases the efficacy of chemotherapeutic and sonodynamic combination therapies. To assess the therapeutic efficacy of SDT using GNR-PEG-Ce6, spheroids were placed on a mesothelial cell monolayer and treated with GNR-PEG-Ce6 (50 μg/mL) for 48 h (Figure 5A). They were exposed to US (1 MHz, 0.8 W cm^{-2}) for 30 s. Then, a live/dead assay (calcein-AM/ethidium bromide) was performed 30 min later under fluorescence microscopy. The qualitative analysis of microscopic images showed that SDT using GNR-PEG-Ce6 induced a significant loss of spheroid viability compared to SDT using GNR-PEG (Figure 5B). Using a 2′,7′-dichlorofluorescin diacetate cellular ROS assay, the authors demonstrated that this cytotoxicity was related to a 3.5-fold increase in ROS levels after SDT with GNR-PEG-Ce6 compared to SDT with GNR-PEG for SKOV-3 spheroids but not in mesothelial cells (Figure 5C,D). In addition, using the live/dead assay, they reported that chemotherapy alone with cisplatin (20 μM) or paclitaxel (20 μM) led to a significant decrease in the viability of GNR-PEG-Ce6-treated spheroids, while the same chemotherapy dose on its own did not induce a notable effect on spheroid viability. These

results suggest that the loss of intercellular interaction in GNR-PEG-Ce6-treated spheroids improves the penetration of chemotherapeutic drugs inside the spheroids and thus their therapeutic efficacy. Finally, Lee et al. also validated the therapeutic benefit of this SDT on tumor spheroids derived from the ascites fluid of ovarian cancer patients.

- Influence of the tumor microenvironment

As previously reported, tumor hypoxia can limit the efficacy of SDT, which is highly oxygen consuming. To overcome this issue, Zhang et al. [83] designed a multifunctional chitosan-based nanoplatform (CEPH), which specifically targets EGFR-overexpressing cancer cells with erlotinib, an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TK inhibitor) and is loaded with a sonosensitizer, hematoporphyrin and perfluorooctyl bromide, an oxygen-storing agent, to locally deliver hematoporphyrin and oxygen to EGFR-overexpressing NSCLC cells. The effects of SDT (0.1 W cm^{-2} for 1 min) using CEPH (50 μg/mL) on tumor hypoxia were investigated using NSCLC spheroids. NSCLC cells (PC-9) were seeded and cultured using a protocol based on photocurable hydrogels for 2 weeks. Then, they were incubated under hypoxic conditions for 24 h. The spheroids were treated with CEPH for 2 h and exposed to US for 1 min. Subsequently, a fluorescent hypoxia probe (Image-iTTM green hypoxia agent) was exploited to assess the oxygen condition inside the spheroids. The untreated spheroids depicted an intense hypoxia signal, while their incubation with CEPH only significantly decreased this hypoxia signal. SDT consumes oxygen, thus increasing hypoxia. Nevertheless, the treatment of spheroids with CEPH in combination with US significantly decreased the hypoxia inside the spheroids compared to untreated spheroids. These results confirm that SDT is an oxygen-consuming process. This new therapeutic nanoplatform could alleviate the effects of tumor hypoxia and SDT-induced hypoxia as well as increase SDT efficacy. Unfortunately, the authors only exploited spheroids to investigate the effects of SDT on tumor hypoxia over a short post-treatment period. Indeed, they demonstrated that the combination of CEPH with US inhibited NSCLC cell growth under normoxic and hypoxic conditions and increased the synergistic effects of SDT and targeted molecular therapy using a monolayer of NSCLC cells.

In conclusion, in vitro studies have successfully reported the exploitation of spheroids to design SDT strategies in oncology. Thus, new sonosensitizers have been validated on spheroids and MCTSs, but the influences of the tumor microenvironment on the therapeutic efficacy of SDT have also been investigated in these 3D models. In addition, the therapeutic benefit of SDT combined with chemotherapy has also been described in spheroids and MCTSs. Even if these SDT strategies were also validated in small animal models of primary tumors and metastases of tumors, the absence of tumor vasculature in the spheroids and MCTSs remains their main limitation. The EPR effect of sonosensitizer-loaded nanoparticle cannot be investigated on avascular spheroids and MCTSs.

Table 3. Sonodynamic therapy.

Ref.	Sonosensitizer	Cells	Spheroid Formation Method	US Parameters	Specific Assay	Cytotoxicity Assay	Main Outcomes
[86]	Theranostic nanoparticles (Dil-IGP@P NPs): • IR780 as sonosensitizer and photoacoustic agent • Perfluorohexane for acoustic droplet vaporization	HeLa cells (cervical cancer cell line)	Spheroid microplate	2.5 W cm^{-2} for 20 s, with two treatments at 10 min interval	Penetration of fluorescent nanoparticles using confocal microscopy	NA	Strong and uniform distribution of nanoparticles inside the spheroids
[83]	Therapeutic nanoplatform (CEPH): • Hematoporphyrin as sonosensitizer • EGFR-TK inhibitor as targeted molecular therapies • Perfluorooctyl bromide for oxygen delivery	A549 - PC-9 (NSCLC cell lines)	Hydrogel of gelatin methacryloyl	0.1 W cm^{-2} for 1 min	Assessment of oxygen condition using fluorescent hypoxia probe	NA	Baseline spheroid hypoxia increased with SDT due to the oxygen-consuming nature of the process, but hypoxia is reduced after CEPH and US treatment
	Therapeutic nanoplatform (RGD/PTK@PEG/Dox): • Porphyrin as sonosensitizer • Doxorubicin (Dox) as anticancer drug • RGD peptide as targeting agent	MCF-7 (BC cell line)	Methylcellulose	1 MHz, 2.0 W cm^{-2} for 15 min	Dox delivery using confocal microscopy	Live/dead (calcein-AM/propidium iodide (PI)) cell assay	• Increase in Dox uptake inside the spheroid and specifically in deeper region • Increase in cell mortality inside the spheroid

Table 3. *Cont.*

Ref.	Sonosensitizer	Cells	Spheroid Formation Method	US Parameters	Specific Assay	Cytotoxicity Assay	Main Outcomes
[32]	Chlorin-e6 as sonosensitizer loaded on graphen nanoribbons	SKOV-3 (Ovarian cancer cell line)	polyHEMA-coated plate - Coculture of spheroid with the monolayer LP-9 mesothelial cells	1 MHz, 0.8 Wcm^{-2} for 30 s	Detection of ROS generation with DCFDA assay	Live/dead cell assay	• Strong production of ROS in the spheroids • Significant increase in cell death in the spheroids • Neither ROS production nor cytotoxic effect for LP-9 cell
[85]	Liposomes (Lipo): • Sinoporphyrin sodium (DVDMS) as sonosensitizer • iRGD as targeting agent	C6 (Murine glioma cell line)	ULA plate	0.6 W cm^{-2}	NA	Spheroid damage using optical microscopy	• Spheroid size reduction with DVDMS treatment alone + US compared to all other conditions without US (i.e., no treatment, DVDMS alone, Lipo-DVDMS, and iRGD-Lipo-DVDMS) • Complete spheroid destruction with Lipo-DVDMS + US or with iRGD-Lipo-DVDMS + US

Table 3. *Cont.*

Ref.	Sonosensitizer	Cells	Spheroid Formation Method	US Parameters	Specific Assay	Cytotoxicity Assay	Main Outcomes
[80]	• $AlPcS_{2a}$ as sonosensitizer • Bleomycin (BLM) as anticancer drug	F98 (Glioma cell line)	ULA plate	1 MHz, 100% DC, 0–0.6 W cm^{-2} for 3 min	Disruption of endolysosome membrane labelled with Lysotracker using fluorescence microscopy	• Measure of spheroid volume • Live/dead (Hoechst/ ethidium homodimer 1) cell assay	• After US treatment, Lysotracker escape from endosomes • Sonochemical internalization (SCI) have higher growth-inhibiting effect on spheroid than SDT or BLM alone • Increase in the fluorescence of ethidium homodimer (dead cells) after SCI treatment compared to BLM alone or SDT alone
[87]	5-aminolevulinc acid as sonosensitizer	A2058 (Melanoma cell line) - HT-1080 (Fibrosarcoma cell line) - SH-SY5Y (Neuroblastoma cell line)	Hanging drop plate (Perfecta 3D)	A2058: 0.32 mJ mm^{-2} for 1000 impulses at 4 impulses s^{-1} - HT-1080 and SH-SY5Y: 0.43 mJ mm^{-2} for 500 impulses at 4 impulses s^{-1}	NA	Monitoring of spheroid volume	Significant reduction in the spheroid volume from 24 h for HT-1080 and SH-SY5Y spheroids, and from 48 h for A2058 spheroids

Table 3. *Cont.*

Ref.	Sonosensitizer	Cells	Spheroid Formation Method	US Parameters	Specific Assay	Cytotoxicity Assay	Main Outcomes
[81]	Lab-made lipid-shelled MBs: (1) O_2MB-PTX-RB • Rose Bengal as sonosensitizer • Paclitaxel (PTX) as anticancer drug (2) O_2MB-PTX-Dox • Dox and PTX as anticancer drugs	MCF-7 (BC cell line)	ULA plate	1 MHz, 100 Hz PRF, 50% DC, 3.0 W cm^{-2} for 30 s	NA	• MTT assay • Spheroid damage • PI staining of dead cells	• Significant decrease in cell viability • Significant reduction in spheroid size
[82]	Nanoplatforms: • Cu-$CuFe_2O_4$ as sonosensitizer • Dox as anticancer drug	MCF-7	NA	2.0 W cm^{-2} for 15 min	NA	Live/dead (calcein-AM/PI) cell assay	Dox-loaded Cu-$CuFe_2O_4$ NPs + US induced a strong PI fluorescent signal on the whole spheroid compared to US only and Cu-$CuFe_2O_4$ NPs without US
[88]	Poly(lactic-*co*-glycolic acid) nanospheres (Chlor-PLGA NCs) • Chlorophyll (Chlor) as sonosensitizer	DU-145 (Human PDAC cell line)	Plate coated with agarose	1.5 MHz, 1.5 W cm^{-2} for 5 min	NA	• PI staining of dead cells • Measure of spheroid volume	• Significant increase in cell mortality • Significant reduction in spheroid volume

Table 3. *Cont.*

Ref.	Sonosensitizer	Cells	Spheroid Formation Method	US Parameters	Specific Assay	Cytotoxicity Assay	Main Outcomes
[89]	Poly-methyl methacrylate core-shell nanoparticles: • Meso-tetrakis (4-sulfonatophenyl) porphyrin as sonosensitizer	SH-SY5Y	NA	0.43 mJ mm^{-2} for 500 impulses (4 impulses s^{-1})	NA	Monitoring of spheroid volume	Significant reduction in spheroid volume

Dil-IGP@P NPs = 1:1′-Dioctadecyl-3,3,3′,3′-tetramethyl indocarbocyanine perchlorate—I(IR780)G(gadolinium diethylenetriaminepentacetate)P(perfluorohexane)@P(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles; NA = not available; CEPH = erlotinib modified chitosan perfluorooctyl bromide hematoporphyrin; EGFR-TK = epidermal growth factor receptor tyrosine kinase; NSCLC = nonsmall cell lung cancer; RGD/PTK@PEG/Dox = Arg-Gly-Asp peptide (RGD)/porphyrin, platinum, thioketal linker(PTK@)/polyethylene glycol (PEG)/doxorubicin (Dox); Dox = doxorubicin; BC = breast cancer; PI = propidium iodide; polyHEMA = poly(2-hydroxyethyl methacrylate); ROS = reactive oxygen species; DCFDA = 2′,7′-dichlorofluorescin diacetate; DVDMS = sinoporphyrin sodium; iRGD = internalizing RGD; AlPcS2a = aluminum phthalocyanine disulfonate; ULA = ultralow attachment; DC = duty cycle; SC I = sonochemical internalization; BLM = bleomycin; MBs = microbubbles; PTX = paclitaxel; RB = Rose Bengal; PRF = pulse repetition frequency; MTT assay = 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay; Chlor-PLGA NCs = chlorophyll-containing poly(lactic-co-glycolic acid) nanospheres and nanocapsules; PDAC = pancreatic ductal adenocarcinoma.

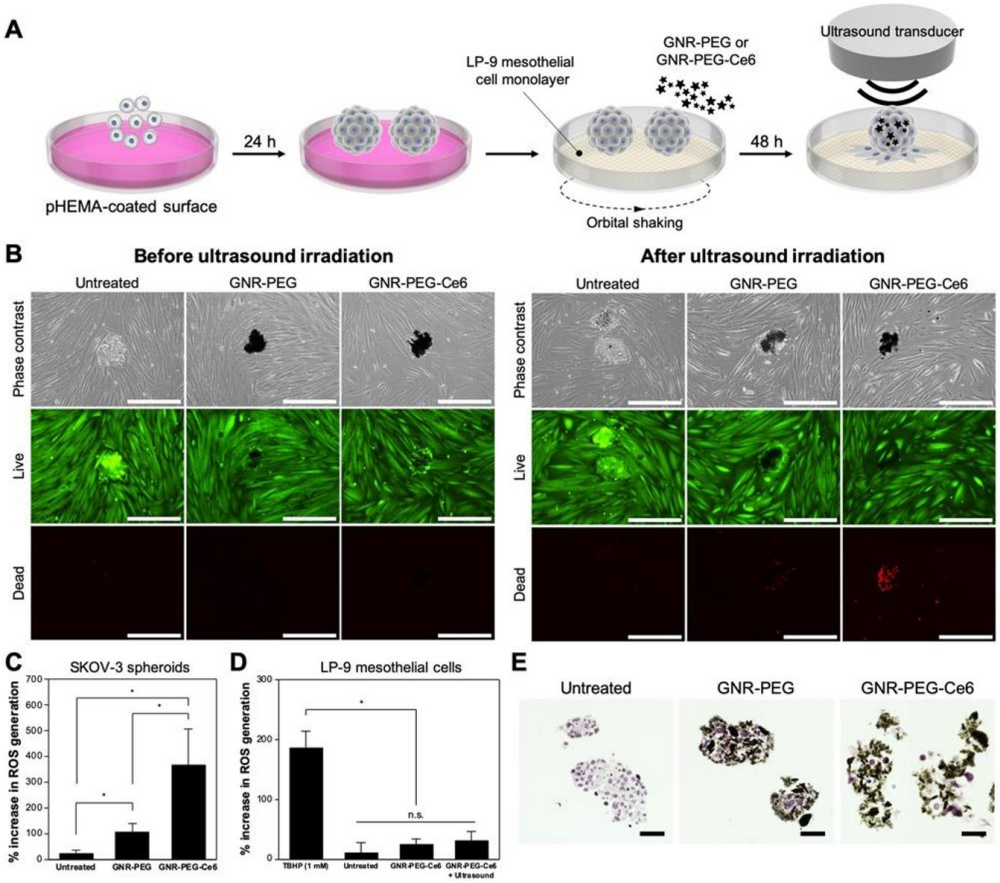


Figure 5. GNR-PEG-Ce6 can kill adhered ovarian cancer spheroids via sonodynamic therapy. (**A**) Schematic of the process for ultrasound irradiation of adhered spheroids. (**B**) Representative images of live (green) and dead (red) cells untreated, GNR-PEG-treated, and GNR-PEG-Ce6-treated SKOV-3 spheroids adhered to the LP-9 mesothelial cell layer before and after ultrasound irradiation. Scale bars indicate 400 μm. ROS generation in (**C**) SKOV-3 spheroids and (**D**) LP-9 mesothelial cells after ultrasound irradiation (* $p < 0.05$; n.s. non-significant). Tert-butyl hydrogen peroxide (TBHP) was used as a positive control in this assay. (**E**) Hematoxylin and eosin-stained (histological) cross-sections of untreated, GNR-PEG-treated, and GNR-PEG-Ce6-treated SKOV-3 spheroids. Scale bars indicate 50 μm. Adapted with permission from Lee et al., copyright 2021, Wiley-VCH [32].

3.2.3. Other Types of US-Mediated Drug Therapies

More anecdotally, spheroids have also been exploited to develop other acoustically mediated drug delivery strategies using US-induced inertial cavitation, low-intensity US (LIUS), laser-generated focused US (LGFU), and US-induced mild hyperthermia (Table 4) [93–96].

- US-induced inertial cavitation

The tumor microenvironment of pancreatic ductal adenocarcinoma contributes to chemoresistance. Leenhardt et al. [30] hypothesized that US-induced inertial cavitation could induce the disruption of the tumor microenvironment, thus facilitating the intratumoral bioavailability of chemotherapeutic drugs and improving their therapeutic efficacy. To validate this hypothesis, they exploited MCTSs generated from murine pancreatic ductal adenocarcinoma cells and murine embryonic fibroblasts using the magnetic nanoshuttle method. As we previously described, fibroblasts produce type 1 collagen, a major component of the extracellular matrix, which makes up the tumor microenvironment. The MCTSs were exposed to US with incremental inertial cavitation indices (1.1 MHz, 100 Hz PRF, 25%

DC, 0.4 to 3.5 MPa for 20 s) in the presence of gemcitabine (5 μM). Spheroid viability was evaluated using resazurin and BV-510 assays. The MCTSs were significantly less sensitive to gemcitabine (5 μM) than spheroids without fibroblasts (spheroid viability of 80% versus 60%), thus confirming that the tumor microenvironment restricted the therapeutic efficacy of gemcitabine. However, the combination of US-induced inertial cavitation (cavitation index of 20) with gemcitabine induced a significant decrease in MCTS viability compared to gemcitabine treatment alone (MCTS viability of 74.7 ± 5.5% versus 90.8 ± 5.5%). Both inertial cavitation (cavitation index of 20) and gemcitabine (5 μM) treatments altered the viability of tumor cells (cell viability < 20% versus 30%) compared to untreated MCTSs (cell viability of 50%). However, these treatments had no effect on fibroblast viability, thus supporting the protective role of fibroblasts against tumor cells. Altogether, these results suggest that the combination of US-induced cavitation with gemcitabine enhanced the therapeutic efficacy of gemcitabine in this MCTS model, thus validating the hypothesis that inertial cavitation may overcome stromal-related chemoresistance. Further experiments investigating the influence of inertial cavitation on the extracellular matrix of MCTSs and on gemcitabine penetration inside the MCTS are required to fully validate this hypothesis.

- Low-intensity ultrasound (LIUS)

As previously reported, cancer stem cells are undifferentiated and self-renewing cells that contribute to tumor initiation, progression, recurrence, and metastasis and resistance to anticancer treatments. For a few decades, new therapeutic strategies, also termed induction therapy, have aimed to suppress the protumor properties of cancer stem cells (self-renewal ability, the expression of stem-cell- and drug-resistance-related genes, etc.) and increasing anticancer drug sensitivity. Thus, Fadera et al. [97] designed an induction therapy based on retinoic acid (RA) with temozolomide (TMZ)-loaded gold NPs (TGNPs) associated with LIUS on glioblastoma multiforme (GBM) stem cells. TMZ is a current anticancer drug used for the treatment of GBM. RA is a typical chemical agent used to differentiate tumor stem cells by inhibiting signaling pathways involved in the induction and maintenance of the specific properties of cancer stem cells. According to the US parameters, LIUS also induces the differentiation of tumor stem cells. In this study, spheroids of GBM cells (U87-MG) were generated using a polyelectrolyte multilayer nanofilm system. This system selected GBM stem-like cells and enriched the GBM spheroids with them. The combinational therapy consisted of RA (unknown concentration) with TGNPs (1:15 ratio of TMZ and GNPs) combined with LIUS (1066 and 666 kHz dual frequency, 20% DC, 80 kPa for 10 min a day for a total of 3 days). This therapeutic efficacy was evaluated using different spheroid viability assays, including live/dead (calcein-AM/ethidium bromide), apoptosis (FITC-annexin V/PI), MTT, and lactate dehydrogenase assays. Regardless of the spheroid viability assays, the combinational therapy significantly decreased spheroid viability compared to TGNPs, free TMZ, or free RA treatments. For example, live/dead assay revealed that combinational therapy induced a two-fold decrease in spheroid viability compared to TGNP treatment alone. This therapy also resulted in a decrease in the size and number of spheroids. In addition, the exploration in CD133 expression, a biomarker of GBM stem-like cells, using flow cytometry, demonstrated that the combinational therapy led to a three-fold reduction of CD133 expression compared to untreated spheroids. Even though the molecular mechanisms governing the effectiveness of the combinational therapy have not been elucidated, these data suggested that this therapy can significantly decrease the viability of GBM cells as well as GBM stem-like cells.

Table 4. LIPUS and gold NPs, LGFU, acoustic cavitation, and mild hyperthermia.

Ref.	Drug/Dye/NPs/Liposome	Cell Line	Spheroid Formation Method	US Parameter	Analysis	Main Outcomes
[97]	• Retinoid acid (RA) • Temozolomide-loaded gold nanoparticles (TGNPs) as anticancer drugs	U87-MG (GBM cancer cell line)	Forced floating methods	666 and 1066 kHz dual-frequency, 20% DC, 80 kPa for 10 min/day for 3 days	• MTT assay • Live/dead cell assay • LDH assay • Apoptosis (Annexin V/PI) assay • Morphology	Combined treatment of RA and LIPUS-mediated TGNP induced: • Significant increase in the number of dead cells through apoptosis process • Significant decrease in the size and number of spheroids • Major structural damages
[93]	• Cisplatin (Cis) as anticancer drug • Gold nanocones (AuNCs)	A2780 (sensitive to cisplatin) - A2780cis (resistant to cisplatin) (ovarian cancer cell lines)	Agarose coated plate with Polyethylene glycol and dextran interface	1 MHz, 50% DC, 1.0 W cm^{-2} for 3 min	Calcein cell staining	• Significant decrease in the viability of A2780 and A2780cis spheroids • AuNCs improve the therapeutic efficacy of US+Cis treatment
[96]	Doxorubicin (Dox) loaded on Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) embedded in alginate microgels	HeLa cells (cervical cancer cell line)	Liquid overlay method with Agarose-gel-coated plate	18 mJ for 5 min	Monitoring of spheroid volume	Significant spheroid growth inhibition
[30]	Gemcitabine (Gem)	KPC (Murine PDAC cancer cells) - iMEF (Murine embryonic fibroblasts)	Magnetic 3D bioprinting protocol using nanoshuttles Cell coculture	1.1 MHz frequency, 100 Hz PRF, 25% DC, 0.4 to 3.5 MPa PNP for 20 s	• Resazurin assay • BV-510 viability assay	• Significant reduction in spheroid size • Significant decrease in the viability of KPC cells but not that of iMEF cells • MCTS are less sensitive to low Gem dose compared to spheroids

Table 4. *Cont.*

Ref.	Drug/Dye/NPs/Liposome	Cell Line	Spheroid Formation Method	US Parameter	Analysis	Main Outcomes
[33]	• Echogenic low-temperature-sensitive liposomes (E-LTSLs) • Dox as anticancer drug	A549 (NSCLC cells)	Liquid overlay method with agarose-gel-coated plate	5 MHz PRF, 50% DC, 3.25 W total acoustic power for 60 s	Concentration of Dox released in the supernatant and inside the spheroid after lysis, evaluate by spectrophotometry	• Increase in Dox concentration in cell medium to 34 μM for E-LTSL + HIFU compared to 12 μM without HIFU • Cellular uptake of Dox was 9.8 μM for E-LTSL + HIFU compared to 2.9 μM without HIFU
[98]	• Traditional temperature-sensitive liposomes (TTSLs) • Dox as anticancer drug	U87-MG	Hanging drop method	1 MHz sinusoidal waves with a PRP of 1 ms, 400 cycles per pulse and for different acoustic pressures (i.e., 0–2 MPa) and total exposure time (i.e., 0–30 min)	Spheroid size, doubling time	• US parameters at 1.75 MPa during 10 min were optimal to induce Dox release from TTSL • 2-fold doubling time increase was observed for spheroids treated with TTLS and FUS compared to spheroids treated with TTLS without hyperthermia induction

RA = retinoic acid; TGNPs = temozolomide-loaded gold nanoparticles; GBM = glioblastoma multiforme; DC = duty cycle; MTT assay = 3 -(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay; LDH = lactate dehydrogenase; PI = propidium iodide; LIPUS = low-intensity pulsed ultrasound; Cis = cisplatin; AuNCs = gold nanocones; Dox = doxorubicin; PLGA = poly(lactic-co-glycolic acid); Gem = gemcitabine; PDAC = pancreatic ductal adenocarcinoma; iMEF = murine embryonic fibroblast; KPC = murine PDAC cancer cells; PRF = pulse repetition frequency; PNP = peak negative pressure; E-LTSL = echogenic low-temperature-sensitive liposome; NSCLC = nonsmall cell lung cancer; HIFU = high intensity focused ultrasound; TTSL = traditional temperature-sensitive liposome; PRP = pulse repetition period.

- Laser-generated focused ultrasound (LGFU)

Laser-generated focused ultrasound (LGFU) has been designed to perform high-frequency (>10 MHz) and high-precision (focal spot < 1 mm) US therapy with reduced US-induced heating (DC < 0.001%). Di et al. [96] hypothesized that this US technology is a promising strategy to stimulate the release of drugs from NPs. To validate this hypothesis, they assessed the capability of LGFU to trigger Dox release from alginate microgels encapsulated with Dox-loaded polymeric NPs and its anticancer efficacy toward cervical cancer (HeLa) spheroids (Figure 6). These spheroids were generated using liquid overlay methods and treated seven days later. A microgel solution was exposed to LGFU (18 mJ laser input for 30 s), and the supernatant (50 µL) was collected and applied to spheroids. LGFU induced a two-fold increase in the release of Dox from microgels compared to untreated microgels (i.e., passively released Dox). The therapeutic efficacy of released Dox was assessed by measuring the size of spheroids over time under optical microscopy. Untreated spheroids were increasingly cohesive over time and grew exponentially (spheroid volume of 70×10^4 µm^3 at Day 7), while spheroids treated with passively released Dox exhibited a few dead cells around them, and their volumes were still stable (spheroid volume of 15×10^4 µm^3 at Day 7), demonstrating a cytostatic effect of the passively released Dox. However, the exposure of spheroids to LGFU-released Dox induced a significant decrease in spheroid volume (spheroid volume < 5×10^4 µm^3 at Day 7) with a full loss of spheroid cohesion and the spheroids compared to both experimental conditions described above. In conclusion, LGFU successfully induced the release of Dox from Dox-formulated microgels, which significantly hampered spheroid growth.

- Ultrasound-mediated mild hyperthermia

Focused ultrasound (FUS) is also a promising technology for the noninvasive and local mild heating (40–43 °C) of target tissues by depositing high acoustic intensity in the focal volume [99,100]. This mild hyperthermia can enhance the extravasation and accumulation of drug-loaded NPs within the heated tissue through increased blood perfusion and vascular permeability [19,101]. In addition, FUS-mediated mild hyperthermia also serves as an external trigger for targeted drug release from temperature-sensitive nanoparticles [102,103]. As previously described for other US therapies, spheroids were exploited here to evaluate new formulations of temperature-sensitive liposomes.

Indeed, Maples et al. [33] designed an echogenic and low-temperature-sensitive liposome (E-LTSL) loaded with Dox and perfluoropentane (US contrast agent), i.e., an US-imageable formulation of Dox-loaded TSL. They used spheroids of human lung adenocarcinoma (A549) to investigate the intracellular uptake of Dox released from E-LTSL after the application of FUS-mediated mild hyperthermia (41 °C). These spheroids were generated using a liquid overlay technique. Two or three days later, the spheroids were incubated with E-LTSL (100 µM) and then exposed to FUS (1.5 MHz, 5 MHz PRF, 5.5 W electric power, 3.25 W total acoustic power, 50% DC for 60 s). After FUS treatment, the supernatants were collected, and the spheroids were washed and then lysed to measure Dox fluorescence using a spectrofluorometer. The combination of E-LTSL and FUS-mediated mild hyperthermia resulted in complete release of encapsulated Dox in the supernatant compared to E-LTSL treatment alone (34.15 ± 0.2 µM versus 12.52 ± 0.08 µM). In agreement with these results, this treatment significantly increased the Dox concentration inside the spheroids in comparison with the LTSL treatment alone (9.85 ± 0.1 µM versus 2.97 ± 0.01 µM). Unfortunately, the authors did not monitor the cytotoxic effects of Dox on the growth of spheroids but instead on monolayers of human lung adenocarcinoma cells. They thus demonstrated the therapeutic efficacy of the combination of E-LTSL and FUS-mediated mild hyperthermia.

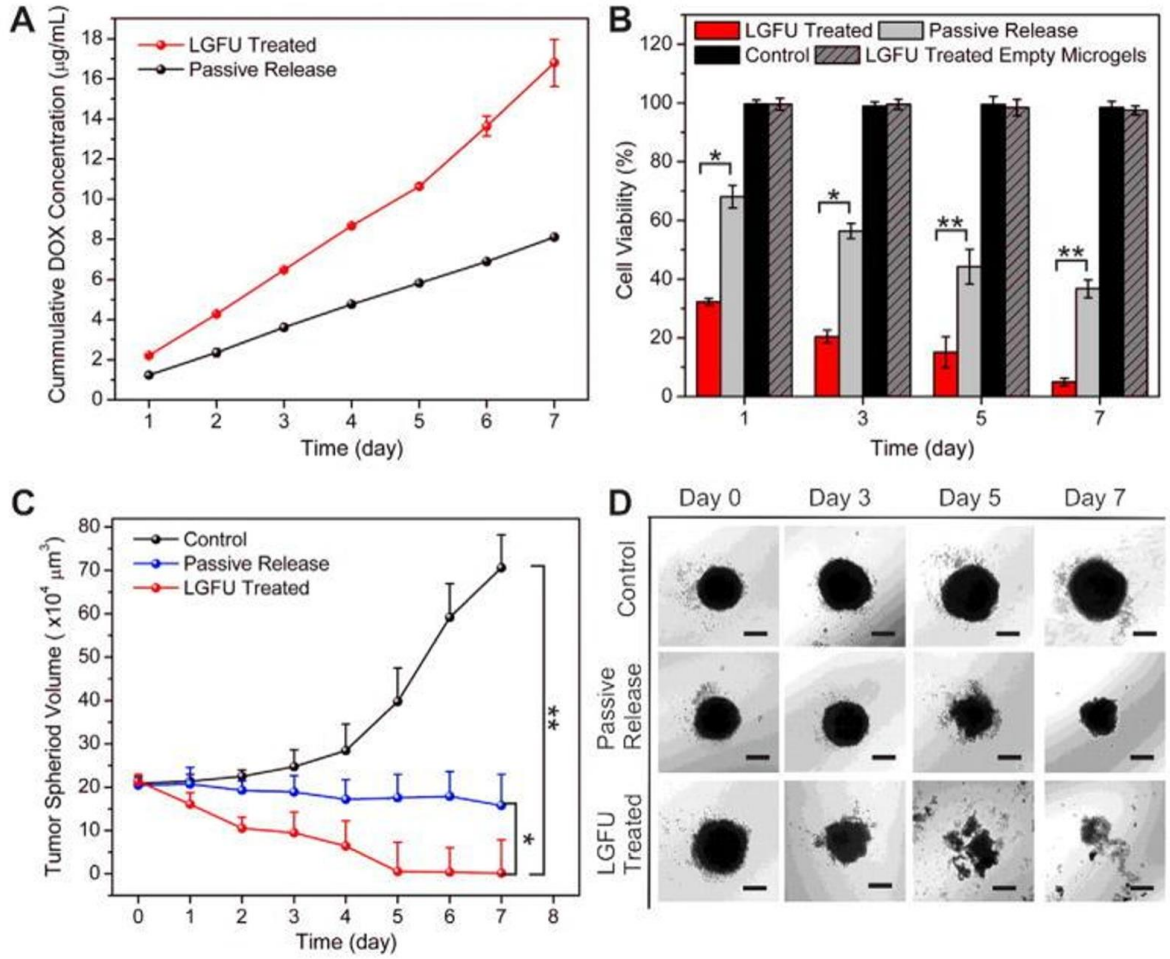


Figure 6. LGFU-induced anticancer effects in vitro. (**A**) The cumulative concentration of released DOX after 30 s treatment with LGFU (18 mJ) and passively released DOX without LGFU treatment. (**B**) Cell viability of HeLa cells treated by solutions from DOX-formulated microgels after 30 s treatment with LGFU (18 mJ) and passive released DOX. (**C**,**D**) Normalized HeLa tumor spheroid sizes and morphologies at day 0, day 3, day 5, and day 7 after treatment with solutions associated with DOX-formulated microgels treated with LGFU, formulations without LGFU treatment (passive release), and PBS (control). Scale bars: 100 μm. Data represents mean ± SD (n = 3). * $p < 0.05$ (t-test), ** $p < 0.01$ (two-tailed Student's t-test). Reprinted from Spatiotemporal drug delivery using laser-generated-focused ultrasound system, Volume 220 (Pt B), J. Di, et al., Pages 592–599, Copyright 2015, with permission from Elsevier [96].

Similarly, Escoffre et al. [98] exploited glioblastoma spheroids (U-87 MG) to investigate the cytotoxic effect of Dox released from traditional temperature-sensitive liposomes (TTSLs) after FUS-mediated mild hyperthermia. An in vitro study using spectrofluorimetry showed that 85% of Dox was released from TTSLs (10 μM) when they were heated to 42 °C with FUS (1 MHz, 1 ms PRP, 400 cycles/pulse, 1.75 MPa PNP for 10 min), while no Dox was released from TTSLs at 37 °C. After FUS exposure, the solution of Dox was deposited on a glioblastoma cell monolayer to assess the intracellular uptake and cytotoxic effect of Dox using flow cytometry and MTT assays, respectively. This FUS-released Dox was as efficiently taken up by tumor cells as free Dox at 37 °C and induced a 50% decrease in cell viability compared to treatment with preheated TTSL at 37 °C. Then, the therapeutic efficacy of FUS-released Dox was evaluated on glioblastoma spheroids by measuring their growth under optical microscopy. The spheroids were generated using the hanging

drop method. The FUS-released Dox resulted in a 1.7-fold decrease in spheroid growth in comparison to treatment with preheated TTSL at 37 °C. If this result confirmed the data obtained on glioblastoma cell monolayer, it is regrettable that the Dox penetration and accumulation inside the spheroids have not been investigated.

In conclusion, these in vitro studies have clearly illustrated that avascular spheroids and MCTSs are relevant biological tools for designing and validating other acoustically mediated drug therapies. They also make it possible to address the same questions (i.e., drug penetration, therapeutic efficacy, tumor microenvironment, etc.) encountered in drug delivery using MB-assisted US and SDT.

4. Future Perspectives and Conclusions

Tumor spheroids and MCTSs are relevant and promising 3D in vitro tumor models for assessing drug screening, drug design, drug targeting, drug toxicity, and drug delivery methods. Currently, several spheroid formation methods have been developed to readily and reproducibly generate spheroids and MCTSs. The most frequently employed method in the studies reviewed here is the liquid overlay method with an agarose coating. Additionally, we should note that some cell types are challenging to grow in 3D using simple methods and require either coculture with another cell type and/or with an extracellular matrix [104,105]. Some of these methods can be very expensive and require specific equipment but provide more sophisticated and specialized 3D tumor models, which are intermediate and complementary tools to cell culture monolayers or suspensions (2D in vitro tumor models) and to animal models.

For a few years, spheroids and MCTSs have been increasingly exploited to design and validate acoustically induced drug therapies, including drug delivery using MB-assisted US, US-induced inertial cavitation, LIUS, LGFU, US-induced mild hyperthermia, and SDT. Indeed, they are mainly used (i) to assess the effects of acoustic parameters on drug delivery and efficacy, (ii) to evaluate new drug formulations (e.g., drug-loaded NPs or MBs), (iii) to measure the penetration and distribution of anticancer drugs or sonosensitizers (free or formulated ones), (iv) to evaluate the therapeutic efficacy of these therapeutic molecules, and (v) to study the influence of the tumor microenvironment on the delivery of anticancer drugs or sonosensitizers and their therapeutic efficacies. One of the arguments for using spheroids rather than cell suspensions or cell culture monolayers is that they make it possible to investigate drug bioavailability and efficacy in 3D models similar to in vivo tumors. However, this literature review reveals that 33% of these studies designing acoustically mediated drug therapies mainly used spheroids to assess the penetration and biodistribution of free or formulated anticancer drugs/sonosensitizers. Indeed, the therapeutic efficacy of these therapeutic molecules on spheroid growth/viability was not investigated, whereas the dimensions of spheroids can easily be monitored over time under optical microscopy, or spheroid viability can be assessed using a dedicated 3D cell viability assay. Conversely, 67% of these studies did not explore the accumulation and bioavailability of free or formulated anticancer drugs/sonosensitizers inside the spheroids but only the therapeutic efficacy of these therapeutic molecules. This finding can easily be explained by the fact that the labeling of drugs or their nanoparticles with a fluorescent agent, for example, could affect their native penetration and biodistribution. Nevertheless, new analytical tools (e.g., immunoassays, mass spectrometry, etc.) will overcome this issue by dosing native drugs or nanoparticles.

The available literature claimed that spheroids and MCTSs can mimic the 3D architecture of tumors but also tumor heterogeneity (e.g., tumor cells, fibroblasts, adipocytes, immune cells, etc.) and microenvironment (e.g., intercellular interactions, extracellular matrix, hypoxia, necrosis, etc.), which influence the intratumoral bioavailability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of anticancer drugs and therefore chemoresistance [106,107]. Nevertheless, as with any model, they have some limitations and cannot fully reflect the reality of an in vivo tumor [108,109]. Indeed, spheroids and MCTSs can model the tumor heterogeneity and microenvironment to a limited extent only. In vivo, the cellular and

molecular compositions of the tumor microenvironment are much more complex than those of in vitro 3D tumor models [108,109]. Supporting this aspect, this literature review highlighted the importance of using MCTSs, i.e., spheroids made up of tumor cells and other cell types (e.g., fibroblasts, cancer stem cells) in the development of acoustically mediated drug therapies. These MCTSs recreate a tumor environment responsible for resistance to drug therapies, which can be overcome by the active delivery of drugs and specifically acoustically mediated ones. However, the exploitation of MCTSs generated from patient-derived cancer cells (PDCs) could be a solution (but certainly imperfect one) in order to closely approximate a tumor microenvironment in vivo. The current data also showed that such MCTSs are not usual. Indeed, only one publication described the validation of acoustically mediated drug therapy (i.e., SDT) on spheroids derived from PDC (i.e., ascites fluid of ovarian cancer patients), while these PDC have been shown to reflect patient tumor characteristics (i.e., genetic and histological features of the original tumor) and clinical responses to anticancer treatments [110]. For these reasons, future studies on the performance of treatment including acoustically mediated drug therapies should use these PDC-derived spheroids.

In addition, some examples, where the authors confirmed their data obtained on spheroids or MCTSs, in subcutaneous or orthotopic tumor xenograft models, revealed that the lack of vessels in spheroids and MCTSs is still a major drawback for the full design and validation of acoustically mediated drug therapies [31,71,81,85,86]. Indeed, the spheroids were incubated directly with the free drugs or drug-loaded sonosensitive particles (e.g., MBs and liposomes), whereas these latter were administered intravenously in vivo. In the spheroid model, US treatment alone (e.g., inertial cavitation, LIFU, mild hyperthermia) or MB-assisted US may induce (i) the release of the drugs from sonosensitive particles; (ii) the loss of spheroid cohesion, thus facilitating the drug penetration inside the spheroids; and (iii) the permeabilization the tumor cells, thus improving the intracellular uptake of drugs. In the in vivo tumor model, US treatment can permeabilize the tumor microvasculature and consequently enhance both the drug extravasation and its intratumoral bioavailability. This permeabilization may increase the intracellular delivery of drug in the endothelial cells, thus potentiating the destruction of tumor vasculature and reducing the nutrient supply of tumors. In addition, the thermal and mechanical stimuli generated using the US treatment can also induce the release the drugs from sonosensitive particles in the tumor interstitium and permeabilize the tumor cells and as described regarding spheroids and MCTSs. However, MB-assisted US has no direct effect on tumor cells in vivo because the MBs are pure vascular agents. Nowadays, the intravenous route is the relatively easy and safe way to be used in the clinic for the administration of drugs. To partially overcome this limitation, the exploitation of 3D vascularized tumor spheroid-on-chip models could be an option. These models designate a microfluidic spheroid model, which moderately reflects the 3D architecture of the tumor, tumor heterogeneity, and microenvironment [111–113]. Unlike spheroids on their own, they are able to mimic the dynamic properties of the tumor microenvironment, for example, by ensuring the constant perfusion of cell medium (or any other relevant biological fluids) to supply nutrients, US contrast agents (e.g., MBs, nanobubbles, nanodroplets, etc.), and/or drugs (e.g., free and formulated anticancer drugs/sonosensitizers) and for removing waste. These models make it easy and precise to control the mechanical pressures (i.e., flow rate, shear stress, etc.) and the biochemical environment (e.g., pH, growth factors, hormones, etc.). Surprisingly, no 3D vascularized tumor spheroid-on-chip model has been used in the developments of acoustically mediated drug therapies. One of the most likely reasons could be that the biocompatible materials used for these spheroid-on-chips are not acousto-compatible. Therefore, it will be necessary to acoustically characterize these chip platforms to limit the formation of standing waves during their use for designing acoustically mediated drug therapies. The presence of significant standing waves will require adjustments of US setups or even modifications of materials on spheroid on chips. We will note that exploring the off-targeted effects of systemic treatments, including the acoustically mediated drug therapies, cannot be assessed with such a 3D vascularized

tumor spheroid-on-chip model. Indeed, these effects are related to the interaction of the drugs with healthy tissues, which is itself influenced by the intratumoral bioavailability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of drugs.

Finally, another argument encouraging the exploitation of spheroids is the reduction in the number of animals or even the replacement of in vivo models. Unfortunately, we have no idea today whether the use of spheroids and MCTSs has made it possible to achieve these objectives of the 3R rules in the ethics of animal experimentation. Even if the use of these in vitro 3D models may reduce the number of animals, we believe the in vivo experiments only give the final proof of efficacy and the innocuity of a therapeutic protocol.

Author Contributions: Conceptualization, M.R., S.S. and J.-M.E.; methodology, M.R., S.S. and J.-M.E.; writing—original draft preparation, M.R., S.S. and J.-M.E.; writing—review and editing, C.A. and A.B.; supervision, S.S. and J.-M.E.; funding acquisition, S.S. and J.-M.E. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by INSERM, Université de Tours and Ligue Contre le Cancer (2021), and M.R. was the recipient of a Ph.D. fellowship from the Region Centre-Val de Loire.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Other data are available on reasonable request from the corresponding author.

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

Abbreviations

2D	two-dimensional
3D	three-dimensional
Ce6	chlorin e6
CEPH	erlotinib modified Chitosan Perfluorooctyl bromide Hematoporphyrin
CLSM	confocal laser scanning microscopy
DC	duty cycle
Dox	doxorubicin
EGFR-TK	epidermal growth factor receptor tyrosine kinase
E-LTSL	echogenic and low-temperature-sensitive liposome
FUS	focused ultrasound
Gem	gemcitabine
GBM	glioblastoma multiforme
GNR	graphene nanoribbons
Ir	irinotecan
iRGD	internalizing RDG
LGFU	laser-generated focused ultrasound
LIFU	low-intensity focused ultrasound
LIPUS	low-intensity pulsed ultrasound
LIUS	low-intensity ultrasound
LPS	liposome
MB	microbubble
MCTS	multi-cellular tumor spheroid
MTT	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
NPs	nanoparticles
NSCLC	nonsmall cell lung cancer
Ox	oxaliplatin
PDC	patient-derived cancer cells
PDT	photodynamic therapy
PEG	polyethylene glycol
pHEMA	poly(2-hydroxyethyl methacrylate)

PI	propidium iodide
PNP	peak negative pressure
PRF	pulse repetition frequency
PRP	pulse repetition period
PTX	paclitaxel
RA	retinoic acid
RGD	arginylglycylaspartic acid peptide
RL	regular liposome
ROS	reactive oxygen species
SDT	sonodynamic therapy
TGNP	temozolomide-loaded gold nanoparticles
TMZ	temozolomide
TSL	temperature-sensitive liposome
TTSL	traditional temperature-sensitive liposome
ULA	ultralow attachment
US	ultrasound

References

1. Pampaloni, F.; Reynaud, E.G.; Stelzer, E.H.K. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 839–845. [CrossRef] [PubMed]
2. Son, B.; Lee, S.; Youn, H.; Kim, E.; Kim, W.; Youn, B. The role of tumor microenvironment in therapeutic resistance. *Oncotarget* **2016**, *8*, 3933–3945. [CrossRef]
3. Huang, B.-W.; Gao, J.-Q. Application of 3D cultured multicellular spheroid tumor models in tumor-targeted drug delivery system research. *J. Control. Release* **2018**, *270*, 246–259. [CrossRef]
4. Jain, R.K.; Stylianopoulos, T. Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2010**, *7*, 653–664. [CrossRef] [PubMed]
5. Ravi, M.; Paramesh, V.; Kaviya, S.R.; Anuradha, E.; Solomon, F.D.P. 3D Cell Culture Systems: Advantages and Applications. *J. Cell. Physiol.* **2015**, *230*, 16–26. [CrossRef]
6. Alvarez-Pérez, J.; Ballesteros, P.; Cerdán, S. Microscopic images of intraspheroidal pH by 1H magnetic resonance chemical shift imaging of pH sensitive indicators. *Magn. Reson. Mater. Physics Biol. Med.* **2005**, *18*, 293–301. [CrossRef] [PubMed]
7. Hu, G.; Li, D. Three-dimensional modeling of transport of nutrients for multicellular tumor spheroid culture in a microchannel. *Biomed. Microdevices* **2007**, *9*, 315–323. [CrossRef] [PubMed]
8. Curcio, E.; Salerno, S.; Barbieri, G.; De Bartolo, L.; Drioli, E.; Bader, A. Mass transfer and metabolic reactions in hepatocyte spheroids cultured in rotating wall gas-permeable membrane system. *Biomaterials* **2007**, *28*, 5487–5497. [CrossRef]
9. Torisawa, Y.-S.; Takagi, A.; Shiku, H.; Yasukawa, T.; Matsue, T. A multicellular spheroid-based drug sensitivity test by scanning electrochemical microscopy. *Oncol. Rep.* **2005**, *13*, 1107–1112. [CrossRef]
10. Ward, J.P.; King, J.R. Mathematical modelling of drug transport in tumour multicell spheroids and monolayer cultures. *Math. Biosci.* **2003**, *181*, 177–207. [CrossRef]
11. Lin, R.-Z.; Chou, L.-F.; Chien, C.-C.M.; Chang, H.-Y. Dynamic analysis of hepatoma spheroid formation: Roles of E-cadherin and β1-integrin. *Cell Tissue Res.* **2006**, *324*, 411–422. [CrossRef] [PubMed]
12. Shin, C.S.; Kwak, B.; Han, B.; Park, K. Development of an in Vitro 3D Tumor Model to Study Therapeutic Efficiency of an Anticancer Drug. *Mol. Pharm.* **2013**, *10*, 2167–2175. [CrossRef] [PubMed]
13. Chen, L.; Xiao, Z.; Meng, Y.; Zhao, Y.; Han, J.; Su, G.; Chen, B.; Dai, J. The enhancement of cancer stem cell properties of MCF-7 cells in 3D collagen scaffolds for modeling of cancer and anti-cancer drugs. *Biomaterials* **2012**, *33*, 1437–1444. [CrossRef]
14. Xin, X.; Yang, H.; Zhang, F.; Yang, S.-T. 3D cell coculture tumor model: A promising approach for future cancer drug discovery. *Process. Biochem.* **2019**, *78*, 148–160. [CrossRef]
15. Costa, E.C.; Gaspar, V.M.; Marques, J.G.; Coutinho, P.; Correia, I.J. Evaluation of Nanoparticle Uptake in Co-culture Cancer Models. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e70072. [CrossRef]
16. Escoffre, J.-M.; Bouakaz, A. Minireview: Biophysical Mechanisms of Cell Membrane Sonopermeabilization. Knowns and Unknowns. *Langmuir* **2019**, *35*, 10151–10165. [CrossRef]
17. Kennedy, J.E. High-intensity focused ultrasound in the treatment of solid tumours. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 321–327. [CrossRef]
18. Yudina, A.; Moonen, C. Ultrasound-induced cell permeabilisation and hyperthermia: Strategies for local delivery of compounds with intracellular mode of action. *Int. J. Hyperth.* **2012**, *28*, 311–319. [CrossRef]
19. Kong, M.W.D.G. Review Hyperthermia and liposomes. *Int. J. Hyperth.* **1999**, *15*, 345–370. [CrossRef]
20. Snipstad, S.; Sulheim, E.; Davies, C.D.L.; Moonen, C.; Storm, G.; Kiessling, F.; Schmid, R.; Lammers, T. Sonopermeation to improve drug delivery to tumors: From fundamental understanding to clinical translation. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2018**, *15*, 1249–1261. [CrossRef]
21. Quaia, E. (Ed.) Physical Basis and Principles of Action of Microbubble-Based Contrast Agents. In *Contrast Media in Ultrasonography*; Medical Radiology; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2005; pp. 15–30. ISBN 978-3-540-40740-9.

22. Shpak, O.; Verweij, M.; de Jong, N.; Versluis, M. Droplets, Bubbles and Ultrasound Interactions. In *Therapeutic Ultrasound*; Escoffre, J.-M., Bouakaz, A., Eds.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2016; pp. 157–174. ISBN 978-3-319-22536-4.
23. Kooiman, K.; Roovers, S.; Langeveld, S.A.; Kleven, R.T.; Dewitte, H.; O'Reilly, M.A.; Escoffre, J.-M.; Bouakaz, A.; Verweij, M.D.; Hynynen, K.; et al. Ultrasound-Responsive Cavitation Nuclei for Therapy and Drug Delivery. *Ultrasound Med. Biol.* **2020**, *46*, 1296–1325. [CrossRef] [PubMed]
24. Lentacker, I.; De Cock, I.; Deckers, R.; De Smedt, S.; Moonen, C. Understanding ultrasound induced sonoporation: Definitions and underlying mechanisms. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, *72*, 49–64. [CrossRef]
25. Rosenthal, I.; Sostaric, J.Z.; Riesz, P. Sonodynamic therapy—-A review of the synergistic effects of drugs and ultrasound. *Ultrason. Sonochem.* **2004**, *11*, 349–363. [CrossRef]
26. Entzian, K.; Aigner, A. Drug Delivery by Ultrasound-Responsive Nanocarriers for Cancer Treatment. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 1135. [CrossRef]
27. Hijnen, N.; Langereis, S.; Grüll, H. Magnetic resonance guided high-intensity focused ultrasound for image-guided temperature-induced drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, *72*, 65–81. [CrossRef] [PubMed]
28. Deprez, J.; Lajoinie, G.; Engelen, Y.; De Smedt, S.; Lentacker, I. Opening doors with ultrasound and microbubbles: Beating biological barriers to promote drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2021**, *172*, 9–36. [CrossRef]
29. Nowak, K.M.; Schwartz, M.R.; Breza, V.R.; Price, R.J. Sonodynamic therapy: Rapid progress and new opportunities for non-invasive tumor cell killing with sound. *Cancer Lett.* **2022**, *532*, 215592. [CrossRef] [PubMed]
30. Leenhardt, R.; Camus, M.; Mestas, J.L.; Jeljeli, M.; Ali, E.A.; Chouzenoux, S.; Bordacahar, B.; Nicco, C.; Batteux, F.; Lafon, C.; et al. Ultrasound-induced Cavitation enhances the efficacy of Chemotherapy in a 3D Model of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma with its microenvironment. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 18916. [CrossRef]
31. Gao, J.; Nesbitt, H.; Logan, K.; Burnett, K.; White, B.; Jack, I.G.; Taylor, M.A.; Love, M.; Callan, B.; McHale, A.P.; et al. An ultrasound responsive microbubble-liposome conjugate for targeted irinotecan-oxaliplatin treatment of pancreatic cancer. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2020**, *157*, 233–240. [CrossRef]
32. Lee, H.R.; Kim, D.W.; Jones, V.O.; Choi, Y.; Ferry, V.E.; Geller, M.A.; Azarin, S.M. Sonosensitizer-Functionalized Graphene Nanoribbons for Adhesion Blocking and Sonodynamic Ablation of Ovarian Cancer Spheroids. *Adv. Health Mater.* **2021**, *10*, 2001368. [CrossRef]
33. Maples, D.; McLean, K.; Sahoo, K.; Newhardt, R.; Venkatesan, P.; Wood, B.; Ranjan, A. Synthesis and characterisation of ultrasound imageable heat-sensitive liposomes for HIFU therapy. *Int. J. Hyperth.* **2015**, *31*, 674–685. [CrossRef]
34. Foty, R. A Simple Hanging Drop Cell Culture Protocol for Generation of 3D Spheroids. *J. Vis. Exp.* **2011**, *51*, e2720. [CrossRef]
35. Metzger, W.; Sossong, D.; Bächle, A.; Pütz, N.; Wennemuth, G.; Pohlemann, T.; Oberringer, M. The liquid overlay technique is the key to formation of co-culture spheroids consisting of primary osteoblasts, fibroblasts and endothelial cells. *Cytotherapy* **2011**, *13*, 1000–1012. [CrossRef]
36. Costa, E.C.; de Melo-Diogo, D.; Moreira, A.F.; Carvalho, M.P.; Correia, I.J. Spheroids Formation on Non-Adhesive Surfaces by Liquid Overlay Technique: Considerations and Practical Approaches. *Biotechnol. J.* **2018**, *13*, 1700417. [CrossRef] [PubMed]
37. Kim, J.A.; Choi, J.-H.; Kim, M.; Rhee, W.J.; Son, B.; Jung, H.-K.; Park, T.H. High-throughput generation of spheroids using magnetic nanoparticles for three-dimensional cell culture. *Biomaterials* **2013**, *34*, 8555–8563. [CrossRef] [PubMed]
38. Liu, H.; Lu, T.; Kremers, G.-J.; Seynhaeve, A.L.B.; Hagen, T.L.M.T. A microcarrier-based spheroid 3D invasion assay to monitor dynamic cell movement in extracellular matrix. *Biol. Proced. Online* **2020**, *22*, 3. [CrossRef]
39. Curtis, K.J.; Schiavi, J.; Mc Garrigle, M.J.; Kumar, V.; McNamara, L.M.; Niebur, G.L. Mechanical stimuli and matrix properties modulate cancer spheroid growth in three-dimensional gelatin culture. *J. R. Soc. Interface* **2020**, *17*, 20200568. [CrossRef]
40. Benton, G.; Arnaoutova, I.; George, J.; Kleinman, H.K.; Koblinski, J. Matrigel: From discovery and ECM mimicry to assays and models for cancer research. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, *79–80*, 3–18. [CrossRef]
41. Arya, N.; Sardana, V.; Saxena, M.; Rangarajan, A.; Katti, D.S. Recapitulating tumour microenvironment in chitosan–gelatin three-dimensional scaffolds: An improved in vitro tumour model. *J. R. Soc. Interface* **2012**, *9*, 3288–3302. [CrossRef]
42. Jiang, T.; Munguia-Lopez, J.G.; Flores-Torres, S.; Grant, J.; Vijayakumar, S.; De Leon-Rodriguez, A.; Kinsella, J.M. Directing the Self-assembly of Tumour Spheroids by Bioprinting Cellular Heterogeneous Models within Alginate/Gelatin Hydrogels. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 4575. [CrossRef]
43. Samimi, H.; Sohi, A.N.; Irani, S.; Arefian, E.; Mahdiannasser, M.; Fallah, P.; Haghpanah, V. Alginate-based 3D cell culture technique to evaluate the half-maximal inhibitory concentration: An in vitro model of anticancer drug study for anaplastic thyroid carcinoma. *Thyroid. Res.* **2021**, *14*, 27. [CrossRef]
44. Le, V.-M.; Lang, M.-D.; Shi, W.-B.; Liu, J.-W. A collagen-based multicellular tumor spheroid model for evaluation of the efficiency of nanoparticle drug delivery. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* **2016**, *44*, 540–544. [CrossRef] [PubMed]
45. Nazari, S.S. Generation of 3D Tumor Spheroids with Encapsulating Basement Membranes for Invasion Studies. *Curr. Protoc. Cell Biol.* **2020**, *87*, e105. [CrossRef] [PubMed]
46. Liu, Z.; Vunjak-Novakovic, G. Modeling tumor microenvironments using custom-designed biomaterial scaffolds. *Curr. Opin. Chem. Eng.* **2016**, *11*, 94–105. [CrossRef]

47. Moshksayan, K.; Kashaninejad, N.; Warkiani, M.E.; Lock, J.G.; Moghadas, H.; Firoozabadi, B.; Saidi, M.S.; Nguyen, N.-T. Spheroids-on-a-chip: Recent advances and design considerations in microfluidic platforms for spheroid formation and culture. *Sens. Actuators B Chem.* **2018**, *263*, 151–176. [CrossRef]
48. Bourn, M.D.; Batchelor, D.V.; Ingram, N.; McLaughlan, J.R.; Coletta, P.L.; Evans, S.D.; Peyman, S.A. High-throughput microfluidics for evaluating microbubble enhanced delivery of cancer therapeutics in spheroid cultures. *J. Control. Release* **2020**, *326*, 13–24. [CrossRef]
49. Mehta, G.; Hsiao, A.Y.; Ingram, M.; Luker, G.D.; Takayama, S. Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. *J. Control. Release* **2013**, *164*, 192–204. [CrossRef]
50. Tung, Y.-C.; Hsiao, A.Y.; Allen, S.G.; Torisawa, Y.-S.; Ho, M.; Takayama, S. High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array. *Analyst* **2011**, *136*, 473–478. [CrossRef]
51. Friedrich, J.; Seidel, C.; Ebner, R.; Kunz-Schughart, L.A. Spheroid-based drug screen: Considerations and practical approach. *Nat. Protoc.* **2009**, *4*, 309–324. [CrossRef]
52. Lin, R.-Z.; Chang, H.-Y. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnol. J.* **2008**, *3*, 1172–1184. [CrossRef]
53. Ferreira, L.; Gaspar, V.; Mano, J. Design of spherically structured 3D in vitro tumor models -Advances and prospects. *Acta Biomater.* **2018**, *75*, 11–34. [CrossRef] [PubMed]
54. Barzegari, A.; Saei, A.A. An Update to Space Biomedical Research: Tissue Engineering in Microgravity Bioreactors. *Bioimpacts* **2012**, *2*, 23–32. [CrossRef] [PubMed]
55. Ruedinger, F.; Lavrentieva, A.; Blume, C.; Pepelanova, I.; Scheper, T. Hydrogels for 3D mammalian cell culture: A starting guide for laboratory practice. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 623–636. [CrossRef] [PubMed]
56. Türker, E.; Demirçak, N.; Arslan-Yildiz, A. Scaffold-free three-dimensional cell culturing using magnetic levitation. *Biomater. Sci.* **2018**, *6*, 1745–1753. [CrossRef]
57. Tseng, H.; Gage, J.A.; Shen, T.; Haisler, W.L.; Neeley, S.K.; Shiao, S.; Chen, J.; Desai, P.K.; Liao, A.; Hebel, C.; et al. A spheroid toxicity assay using magnetic 3D bioprinting and real-time mobile device-based imaging. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, srep13987. [CrossRef]
58. Białkowska, K.; Komorowski, P.; Bryszewska, M.; Miłowska, K. Spheroids as a Type of Three-Dimensional Cell Cultures—Examples of Methods of Preparation and the Most Important Application. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 6225. [CrossRef]
59. Nath, S.; Devi, G.R. Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. *Pharmacol. Ther.* **2016**, *163*, 94–108. [CrossRef]
60. Souza, G.R.; Molina, J.R.; Raphael, R.M.; Ozawa, M.G.; Stark, D.J.; Levin, C.S.; Bronk, L.; Ananta, J.S.; Mandelin, J.; Georgescu, M.-M.; et al. Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation. *Nat. Nanotechnol.* **2010**, *5*, 291–296. [CrossRef]
61. Sarkar, S.; Peng, C.-C.; Kuo, C.W.; Chueh, D.-Y.; Wu, H.-M.; Liu, Y.-H.; Chen, P.; Tung, Y.-C. Study of oxygen tension variation within live tumor spheroids using microfluidic devices and multi-photon laser scanning microscopy. *RSC Adv.* **2018**, *8*, 30320–30329. [CrossRef]
62. Escoffre, J.-M.; Sekkat, N.; Oujagir, E.; Bodard, S.; Mousset, C.; Presset, A.; Chautard, R.; Ayoub, J.; Lecomte, T.; Bouakaz, A. Delivery of anti-cancer drugs using microbubble-assisted ultrasound in digestive oncology: From preclinical to clinical studies. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2022**, *19*, 421–433. [CrossRef]
63. Zhang, N.; Foiret, J.; Kheirolomoom, A.; Liu, P.; Feng, Y.; Tumbale, S.; Raie, M.; Wu, B.; Wang, J.; Fite, B.Z.; et al. Optimization of Microbubble-Based DNA Vaccination with Low-Frequency Ultrasound for Enhanced Cancer Immunotherapy. *Adv. Ther.* **2021**, *4*, 2100033. [CrossRef] [PubMed]
64. Sasaki, N.; Ikenaka, Y.; Aoshima, K.; Aoyagi, T.; Kudo, N.; Nakamura, K.; Takiguchi, M. Safety Assessment of Ultra-sound-Assisted Intravesical Chemotherapy in Normal Dogs: A Pilot Study. *Front. Pharmacol.* **2022**, *13*, 844. [CrossRef]
65. Amate, M.; Goldgewicht, J.; Sellamuthu, B.; Stagg, J.; Yu, F.T. The effect of ultrasound pulse length on microbubble cavitation induced antibody accumulation and distribution in a mouse model of breast cancer. *Nanotheranostics* **2020**, *4*, 256–269. [CrossRef]
66. Ingram, N.; McVeigh, L.E.; Abou-Saleh, R.H.; Maynard, J.; Peyman, S.A.; McLaughlan, J.R.; Fairclough, M.; Marston, G.; Valleley, E.M.A.; Jimenez-Macias, J.L.; et al. Ultrasound-triggered therapeutic microbubbles enhance the efficacy of cytotoxic drugs by increasing circulation and tumor drug accumulation and limiting bioavailability and toxicity in normal tissues. *Theranostics* **2020**, *10*, 10973–10992. [CrossRef] [PubMed]
67. 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*, 1031–1043. [CrossRef]
68. Paškevičiūtė, M.; Januškevičienė, I.; Sakalauskienė, K.; Raišutis, R.; Petrikaitė, V. Evaluation of low-intensity pulsed ultrasound on doxorubicin delivery in 2D and 3D cancer cell cultures. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 16161. [CrossRef]
69. Misra, R.; Rajic, M.; Sathiyamoorthy, K.; Karshafian, R. Ultrasound and microbubbles (USMB) potentiated doxorubicin penetration and distribution in 3D breast tumour spheroids. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2021**, *61*, 102261. [CrossRef]
70. Roovers, S.; Deprez, J.; Priwitaningrum, D.; Lajoinie, G.; Rivron, N.; Declercq, H.; De Wever, O.; Stride, E.; Le Gac, S.; Versluis, M.; et al. Sonoprinting liposomes on tumor spheroids by microbubbles and ultrasound. *J. Control. Release* **2019**, *316*, 79–92. [CrossRef]
71. Logan, K.A.; Nesbitt, H.; Callan, B.; Gao, J.; McKaig, T.; Taylor, M.; Love, M.; McHale, A.P.; Callan, J.F. Synthesis of a gemcitabine-modified phospholipid and its subsequent incorporation into a single microbubble formulation loaded with paclitaxel for the treatment of pancreatic cancer using ultrasound-targeted microbubble destruction. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2021**, *165*, 374–382. [CrossRef]

72. Grainger, S.J.; Serna, J.V.; Sunny, S.; Zhou, Y.; Deng, C.X.; El-Sayed, M.E.H. Pulsed Ultrasound Enhances Nanoparticle Penetration into Breast Cancer Spheroids. *Mol. Pharm.* **2010**, *7*, 2006–2019. [CrossRef] [PubMed]
73. Roy, M.; Alix, C.; Bouakaz, A.; Serrière, S.; Escoffre, J.-M. Acoustically Mediated Drug Delivery in 3D Spheroid Model. In Proceedings of the 28th European Symposium on Ultrasound Contrast Imaging, Rotterdam, The Netherlands, 19–20 January 2023; pp. 157–159.
74. Nurmik, M.; Ullmann, P.; Rodriguez, F.; Haan, S.; Letellier, E. In search of definitions: Cancer-associated fibroblasts and their markers. *Int. J. Cancer* **2020**, *146*, 895–905. [CrossRef]
75. Muchlińska, A.; Nagel, A.; Popęda, M.; Szade, J.; Niemira, M.; Zieliński, J.; Skokowski, J.; Bednarz-Knoll, N.; Żaczek, A.J. Alpha-smooth muscle actin-positive cancer-associated fibroblasts secreting osteopontin promote growth of luminal breast cancer. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **2022**, *27*, 45. [CrossRef] [PubMed]
76. Liu, T.; Han, C.; Wang, S.; Fang, P.; Ma, Z.; Xu, L.; Yin, R. Cancer-associated fibroblasts: An emerging target of anti-cancer immunotherapy. *J. Hematol. Oncol.* **2019**, *12*, 86. [CrossRef] [PubMed]
77. Wan, G.-Y.; Liu, Y.; Chen, B.-W.; Liu, Y.-Y.; Wang, Y.; Zhang, N. Recent advances of sonodynamic therapy in cancer treatment. *Cancer Biol. Med.* **2016**, *13*, 325–338. [CrossRef] [PubMed]
78. Shibaguchi, H.; Tsuru, H.; Kuroki, M.; Kuroki, M. Sonodynamic Cancer Therapy: A Non-Invasive and Repeatable Approach Using Low-Intensity Ultrasound with a Sonosensitizer. *Anticancer. Res.* **2011**, *31*, 2425–2429. [PubMed]
79. Liu, X.; Pan, X.; Wang, C.; Liu, H. Modulation of reactive oxygen species to enhance sonodynamic therapy. *Particuology* **2023**, *75*, 199–216. [CrossRef]
80. Gonzales, J.; Nair, R.K.; Madsen, S.J.; Krasieva, T.; Hirschberg, H. Focused ultrasound-mediated sonochemical internalization: An alternative to light-based therapies. *J. Biomed. Opt.* **2016**, *21*, 78002. [CrossRef]
81. Logan, K.; Foglietta, F.; Nesbitt, H.; Sheng, Y.; McKaig, T.; Kamila, S.; Gao, J.; Nomikou, N.; Callan, B.; McHale, A.P.; et al. Targeted chemo-sonodynamic therapy treatment of breast tumours using ultrasound responsive microbubbles loaded with paclitaxel, doxorubicin and Rose Bengal. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2019**, *139*, 224–231. [CrossRef]
82. Gong, C.; Zhao, J.; Meng, X.; Yang, Z.; Dong, H. Engineering Cu-$CuFe_2O_4$ nanoenzyme for hypoxia-relief and GSH-depletion enhanced chemodynamic/sonodynamic therapy. *Chem. Eng. J.* **2022**, *435*, 135083. [CrossRef]
83. Zhang, P.; Zhang, L.; Wang, J.; Zhu, L.; Li, Z.; Chen, H.; Gao, Y. An intelligent hypoxia-relieving chitosan-based nanoplatform for enhanced targeted chemo-sonodynamic combination therapy on lung cancer. *Carbohydr. Polym.* **2021**, *274*, 118655. [CrossRef]
84. Zhao, J.; Shi, J.; Meng, X.; Gong, C.; Wu, P.; Yang, Z.; Dong, H. ROS-Activated nanoscale coordination polymers for enhanced ultrasound-mediated therapy for the treatment of cancer. *Acta Biomater.* **2022**, *143*, 372–380. [CrossRef]
85. Sun, Y.; Wang, H.; Wang, P.; Zhang, K.; Geng, X.; Liu, Q.; Wang, X. Tumor targeting DVDMS-nanoliposomes for an enhanced sonodynamic therapy of gliomas. *Biomater. Sci.* **2019**, *7*, 985–994. [CrossRef]
86. Zhou, J.; Hou, J.; Liu, S.; Xu, J.; Luo, Y.; Zheng, J.; Li, X.; Wang, Z.; Ran, H.; Guo, D. Theranostic Nanoplatform with Sequential SDT and ADV Effects in Response to Well-Programmed LIFU Irradiation for Cervical Cancer. *Int. J. Nanomed.* **2021**, *16*, 7995–8012. [CrossRef]
87. Foglietta, F.; Panzanelli, P.; Serpe, L.; Canaparo, R. Exploiting Shock Waves to Trigger the Anticancer Sonodynamic Activity of 5-Aminolevulinc Acid-Derived Protoporphyrin IX on In Vitro 2D and 3D Cancer Models. *Biomedicines* **2022**, *10*, 615. [CrossRef] [PubMed]
88. Bosca, F.; Foglietta, F.; Gimenez, A.; Canaparo, R.; Durando, G.; Andreana, I.; Barge, A.; Peira, E.; Arpicco, S.; Serpe, L.; et al. Exploiting Lipid and Polymer Nanocarriers to Improve the Anticancer Sonodynamic Activity of Chlorophyll. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 605. [CrossRef]
89. Serpe, L.; Canaparo, R.; Varchi, G.; Ballestri, M.; Foglietta, F.F.; Sotgiu, G.; Guerrini, A.; Francovich, A.; Civera, P.; Frairia, R. Polymeric nanoparticles enhance the sonodynamic activity of meso-tetrakis (4-sulfonatophenyl) porphyrin in an in vitro neuroblastoma model. *Int. J. Nanomed.* **2013**, *8*, 4247–4263. [CrossRef] [PubMed]
90. Goel, S.; Duda, D.G.; Xu, L.; Munn, L.L.; Boucher, Y.; Fukumura, D.; Jain, R.K. Normalization of the Vasculature for Treatment of Cancer and Other Diseases. *Physiol. Rev.* **2011**, *91*, 1071–1121. [CrossRef]
91. Zhao, C.; Tong, Y.; Li, X.; Shao, L.; Chen, L.; Lu, J.; Deng, X.; Wang, X.; Wu, Y. Photosensitive Nanoparticles Combining Vascular-Independent Intratumor Distribution and On-Demand Oxygen-Depot Delivery for Enhanced Cancer Photodynamic Therapy. *Small* **2018**, *14*, e1703045. [CrossRef] [PubMed]
92. Presset, A.; Bonneau, C.; Kazuyoshi, S.; Nadal-Desbarats, L.; Mitsuyoshi, T.; Bouakaz, A.; Kudo, N.; Escoffre, J.-M.; Sasaki, N. Endothelial Cells, First Target of Drug Delivery Using Microbubble-Assisted Ultrasound. *Ultrasound Med. Biol.* **2020**, *46*, 1565–1583. [CrossRef]
93. Kip, B.; Tunc, C.U.; Aydin, O. Triple-combination therapy assisted with ultrasound-active gold nanoparticles and ultrasound therapy against 3D cisplatin-resistant ovarian cancer model. *Ultrason. Sonochemistry* **2022**, *82*, 105903. [CrossRef]
94. Camus, M.; Vienne, A.; Mestas, J.-L.; Pratico, C.; Nicco, C.; Chereau, C.; Marie, J.-M.; Moussatov, A.; Renault, G.; Batteux, F.; et al. Cavitation-induced release of liposomal chemotherapy in orthotopic murine pancreatic cancer models: A feasibility study. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* **2019**, *43*, 669–681. [CrossRef] [PubMed]
95. Lyon, P.C.; Mannaris, C.; Gray, M.; Carlisle, R.; Gleeson, F.V.; Cranston, D.; Wu, F.; Coussios, C.C. Large-Volume Hyperthermia for Safe and Cost-Effective Targeted Drug Delivery Using a Clinical Ultrasound-Guided Focused Ultrasound Device. *Ultrasound Med. Biol.* **2021**, *47*, 982–997. [CrossRef]

96. Di, J.; Kim, J.; Hu, Q.; Jiang, X.; Gu, Z. Spatiotemporal drug delivery using laser-generated-focused ultrasound system. *J. Control. Release* **2015**, *220*, 592–599. [CrossRef]
97. Fadera, S.; Chen, P.-Y.; Liu, H.-L.; Lee, I.-C. Induction Therapy of Retinoic Acid with a Temozolomide-Loaded Gold Nanoparticle-Associated Ultrasound Effect on Glioblastoma Cancer Stem-Like Colonies. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2021**, *13*, 32845–32855. [CrossRef] [PubMed]
98. Escoffre, J.-M.; Novell, A.; de Smet, M.; Bouakaz, A. Focused ultrasound mediated drug delivery from temperature-sensitive liposomes: In-Vitro characterization and validation. *Phys. Med. Biol.* **2013**, *58*, 8135–8151. [CrossRef]
99. Kim, Y.-S.; Rhim, H.; Choi, M.J.; Lim, H.K.; Choi, D. High-Intensity Focused Ultrasound Therapy: An Overview for Radiologists. *Korean J. Radiol.* **2008**, *9*, 291–302. [CrossRef]
100. Patel, P.R.; Luk, A.; Durrani, A.; Dromi, S.; Cuesta, J.; Angstadt, M.; Dreher, M.R.; Wood, B.J.; Frenkel, V. In vitro and in vivo evaluations of increased effective beam width for heat deposition using a split focus high intensity ultrasound (HIFU) transducer. *Int. J. Hyperth.* **2008**, *24*, 537–549. [CrossRef] [PubMed]
101. Song, C.W.; Park, H.J.; Lee, C.K.; Griffin, R. Implications of increased tumor blood flow and oxygenation caused by mild temperature hyperthermia in tumor treatment. *Int. J. Hyperth.* **2005**, *21*, 761–767. [CrossRef] [PubMed]
102. Ponce, A.M.; Vujaskovic, Z.; Yuan, F.; Needham, D.; Dewhirst, M.W. Hyperthermia mediated liposomal drug delivery. *Int. J. Hyperth.* **2006**, *22*, 205–213. [CrossRef] [PubMed]
103. Tashjian, J.A.; Dewhirst, M.W.; Needham, D.; Viglianti, B.L. Rationale for and measurement of liposomal drug delivery with hyperthermia using non-invasive imaging techniques. *Int. J. Hyperth.* **2008**, *24*, 79–90. [CrossRef]
104. Lao, Z.; Kelly, C.J.; Yang, X.-Y.; Jenkins, W.T.; Toorens, E.; Ganguly, T.; Evans, S.M.; Koch, C.J. Improved Methods to Generate Spheroid Cultures from Tumor Cells, Tumor Cells & Fibroblasts or Tumor-Fragments: Microenvironment, Microvesicles and MiRNA. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0133895. [CrossRef]
105. Yuhas, J.M.; Tarleton, A.E.; Molzen, K.B. Multicellular tumor spheroid formation by breast cancer cells isolated from different sites. *Cancer Res* **1978**, *38*, 2486–2491.
106. Farhat, J.; Pandey, I.; AlWahsh, M. Transcending toward Advanced 3D-Cell Culture Modalities: A Review about an Emerging Paradigm in Translational Oncology. *Cells* **2021**, *10*, 1657. [CrossRef] [PubMed]
107. Liu, Y.; Mohri, Z.; Alsheikh, W.; Cheema, U. The Role of Biomimetic Hypoxia on Cancer Cell Behaviour in 3D Models: A Systematic Review. *Cancers* **2021**, *13*, 1334. [CrossRef]
108. Henke, E.; Nandigama, R.; Ergün, S. Extracellular Matrix in the Tumor Microenvironment and Its Impact on Cancer Therapy. *Front. Mol. Biosci.* **2019**, *6*, 160. [CrossRef]
109. Nazemi, M.; Rainero, E. Cross-Talk Between the Tumor Microenvironment, Extracellular Matrix, and Cell Metabolism in Cancer. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 239. [CrossRef] [PubMed]
110. Crystal, A.S.; Shaw, A.T.; Sequist, L.V.; Friboulet, L.; Niederst, M.J.; Lockerman, E.L.; Frias, R.L.; Gainor, J.F.; Amzallag, A.; Greninger, P.; et al. Patient-derived models of acquired resistance can identify effective drug combinations for cancer. *Science* **2014**, *346*, 1480–1486. [CrossRef] [PubMed]
111. Bērziņa, S.; Harrison, A.; Taly, V.; Xiao, W. Technological Advances in Tumor-On-Chip Technology: From Bench to Bedside. *Cancers* **2021**, *13*, 4192. [CrossRef]
112. Hu, Z.; Cao, Y.; Galan, E.A.; Hao, L.; Zhao, H.; Tang, J.; Sang, G.; Wang, H.; Xu, B.; Ma, S. Vascularized Tumor Spheroid-on-a-Chip Model Verifies Synergistic Vasoprotective and Chemotherapeutic Effects. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2022**, *8*, 1215–1225. [CrossRef]
113. Ahn, J.; Kim, D.-H.; Koo, D.-J.; Lim, J.; Park, T.-E.; Lee, J.; Ko, J.; Kim, S.; Kim, M.; Kang, K.-S.; et al. 3D microengineered vascularized tumor spheroids for drug delivery and efficacy testing. *Acta Biomater.* **2022**. [CrossRef]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

III.III. Synthèse

Cette revue de littérature permet de mieux comprendre dans quelle mesure l'utilisation des sphéroïdes est une approche pertinente et prometteuse pour le développement et la validation de stratégies ultrasonores de délivrance de molécules thérapeutiques. Ces modèles cellulaires sont principalement utilisés pour (i) étudier l'influence des paramètres acoustiques sur la délivrance de molécules thérapeutiques, (ii) évaluer de nouvelles formulations de molécules anticancéreuses (chimiothérapeutiques, sonosensibilisateurs) et de MBs, (iii) mesurer la pénétration et la distribution de molécules au sein de sphéroïdes, (iv) étudier l'efficacité thérapeutique de la modalité ultrasonore utilisée et (v) explorer l'influence du microenvironnement tumoral sur la délivrance des molécules par ultrasons.

Plus précisément, les sphéroïdes ont permis d'optimiser les paramètres acoustiques (pression acoustique, rapport cyclique, temps d'exposition aux ultrasons) pour délivrer des NPs de taille (20 à 100 nm) et de charge variables (anionique, cationique ou neutre), et des marqueurs fluorescents de perméabilisation, comme l'iodure de propidium. L'utilisation des sphéroïdes a également permis de valider *in vitro* l'efficacité de la méthode de sonoporation à délivrer des molécules chimiothérapeutiques et à valider des nouvelles formulations de MBs (MBs chargées avec des molécules chimiothérapeutiques). L'utilisation d'un modèle de coculture de cellules tumorales et de fibroblastes a permis d'évaluer l'impact du micro-environnement tumoral sur la résistance aux traitements chimiothérapeutiques et de tester la capacité de la sonoporation à surmonter cette résistance en délivrant de manière active des molécules chimiothérapeutiques. Concernant la thérapie sonodynamique, les sphéroïdes se sont révélés utiles pour 1) valider de nouveaux sonosensibilisateurs, 2) étudier l'influence de l'hypoxie tumorale sur l'efficacité thérapeutique et 3) évaluer l'efficacité de la combinaison de la thérapie sonodynamique et de la chimiothérapie. Pour les autres thérapies ultrasonores, *i.e.*, la cavitation inertielle, les ultrasons de faible intensité acoustique et l'hyperthermie moyenne, les sphéroïdes ont été peu exploités à ce jour mais ils ont permis de valider partiellement l'efficacité de ces modalités.

Les paramètres biologiques majoritairement explorés sont la pénétration et la distribution des molécules au sein du sphéroïde par imagerie optique. Afin d'observer la pénétration des molécules au sein des sphéroïdes il est nécessaire d'utiliser soit des drogues émettant naturellement de la fluorescence comme la Dox, soit des marqueurs fluorescents comme l'iodure de propidium, soit des MBs chargées ou coadministrées avec des NPs fluorescentes. L'efficacité thérapeutique des modalités ultrasonores étudiées est également un paramètre

biologique fréquemment évalué. Les méthodes utilisées pour évaluer l'efficacité sont, d'une part, le suivi de la croissance du sphéroïde en mesurant l'évolution de son aire ou de son diamètre au cours du temps, et d'autre part, la viabilité cellulaire sur le sphéroïde entier ou après dissociation cellulaire par des tests métaboliques (*e.g.*, MTT) ou d'exclusion de marqueurs (*e.g.*, bleu trypan). Les données de la littérature montrent que 33 % des études se sont intéressées uniquement à la pénétration et à la distribution de molécules dans le sphéroïde sans étudier l'efficacité thérapeutique. A l'inverse, 67 % des études ont évalué l'efficacité thérapeutique de la délivrance de molécules par thérapies ultrasonores sans la corréler à une éventuelle augmentation de la pénétration/distribution de la molécule étudiée.

A ce jour, il existe de nombreuses possibilités pour complexifier les modèles 3D de sphéroïdes et notamment en cocultivant les cellules tumorales avec d'autres types cellulaires comme les fibroblastes, les adipocytes, et les cellules immunitaires. Ces cellules font partie du microenvironnement tumoral et jouent un rôle majeur dans le développement tumoral et la résistance aux traitements anticancéreux. Ces modèles sont alors définis sous le terme de sphéroïdes multi-cellulaires. Ces dernières années, des sphéroïdes ont été développés à partir de cellules tumorales dérivées de patient (Patient-derived cancer cell, PDC). Ils sont souvent utilisés pour mieux connaître la génétique de la tumeur du patient afin d'établir un traitement personnalisé. Pourtant, la majorité des études décrites dans la présente revue ont exploité principalement des sphéroïdes en monoculture. Une seule étude a utilisé des sphéroïdes à partir de cellules tumorales dérivées de patient.

L'une des principales limites des sphéroïdes pour l'étude de la délivrance de molécules par les thérapies ultrasonores est l'absence de vaisseaux sanguins. En effet, la délivrance de molécules thérapeutiques par sonoporation repose, dans la grande majorité des cas, sur une administration i.v. des molécules thérapeutiques et des MBs. L'exposition du tissu tumoral aux ultrasons induit alors une perméabilisation réversible de la barrière hémato-tumorale, facilitant ainsi l'extravasation des molécules thérapeutiques et leur pénétration au sein de la tumeur. L'absence de vascularisation au sein du sphéroïde permet uniquement d'étudier la perméabilisation des cellules tumorales et non de la barrière hémato-tumorale. Cependant, l'établissement de modèles de sphéroïdes vascularisés est possible en réalisant une coculture avec des cellules endothéliales. L'intégration de sphéroïdes vascularisés dans un système microfluidique permet de reproduire au mieux les conditions biochimiques et les contraintes mécaniques rencontrées *in vivo*. En effet, ces systèmes favorisent l'élimination des déchets métaboliques et l'apport de nutriments et permettent la diffusion des molécules thérapeutiques

dans un flux. Actuellement, aucune étude n'a exploité ce type de modèle pour développer et évaluer des thérapies ultrasonores, bien qu'ils pourraient s'avérer très pertinents pour étudier la sonoporation ou la thérapie sonodynamique.

Les sphéroïdes sont de plus en plus complexes sur le plan moléculaire et cellulaire afin de reproduire au mieux la structure et la physiologie d'une tumeur in vivo. Cependant, ils ne permettent pas d'étudier l'innocuité des thérapies ultrasonores sur les tissus sains environnants ni d'évaluer les propriétés pharmacologiques (pharmacocinétique, biodistribution, pharmacodynamique) des molécules thérapeutiques vectorisées ou non par ultrasons. Ces modèles comblent les limites des modèles cellulaires 2D (suspension et monoculture) mais ils ne peuvent actuellement pas remplacer l'utilisation de modèles animaux pour valider l'efficacité et l'innocuité de molécules et/ou protocoles thérapeutiques.

Chapitre IV. Délivrance de molécules chimiothérapeutiques par sonoporation dans un modèle 3D de sphéroïdes de cancer colorectal

Chapitre IV. Délivrance de molécules chimiothérapeutiques par sonoporation dans un modèle 3D de sphéroïdes de cancer colorectal

IV.I. Introduction

Comme décrit précédemment dans notre revue, seulement une dizaine de publications ont exploité les sphéroïdes tumoraux pour développer et valider des protocoles de délivrance de molécules thérapeutiques par sonoporation. Dans ce contexte, notre étude a pour objectif d'évaluer l'impact de la pression acoustique et de la concentration de MBs sur l'efficacité de la sonoporation à délivrer différentes molécules chimiothérapeutiques sur des sphéroïdes monocellulaires de CCR. Ainsi, dans un premier temps, nous avons évalué les effets de ces paramètres (pression acoustique et concentration en MBs) de sonoporation sur la perméabilisation, la croissance et la viabilité cellulaire. La perméabilisation des sphéroïdes par sonoporation a été étudiée par imagerie optique en exploitant un marqueur fluorescent, l'iodure de propidium, comme molécule modèle de composés chimiothérapeutiques de faible poids moléculaire. La croissance des sphéroïdes a été évaluée en mesurant leurs aires tous les 2 jours pendant 10 jours et en déterminant la viabilité cellulaire au 10ème jour par un test au bleu trypan. Puis, l'impact de la sonoporation sur l'ultrastructure des sphéroïdes a été analysé par histologie après marquage au bleu de toluidine et par microscopie électronique à transmission.

De plus, nous avons étudié, par imagerie optique et par un test de viabilité cellulaire, l'efficacité de la sonoporation à potentialiser les effets thérapeutiques de la bléomycine, de la Dox et de l'irinotécan sur nos sphéroïdes de CCR. Ces trois molécules chimiothérapeutiques possèdent des propriétés physicochimiques intrinsèques très différentes les unes des autres en termes de poids moléculaire, structure moléculaire, mécanisme d'entrée dans les cellules et de mécanisme d'action. Les effets cytotoxiques de ces 3 molécules délivrées par sonoporation ont été évalués sur la croissance et la viabilité des sphéroïdes comme décrit ci-dessus.

Référence : Roy, M.; Alix, C.; Burlaud-Gaillard, J.; Fouan, D.; Raoul, W.; Bouakaz, A.; Blanchard, E.; Lecomte, T.; Viaud-Massuard, MC.; Sasaki, N.; Serrière, S.; Escoffre, J.-M. Delivery of Anti-Cancer Drugs using Microbubble-Assisted Ultrasound in a 3D Spheroid Model. *Molecular Pharmaceutics* **2024**, *21*, *2*, *831–844*. https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.3c00921

IV.II. Publication

molecular pharmaceutics

pubs.acs.org/molecularpharmaceutics Article

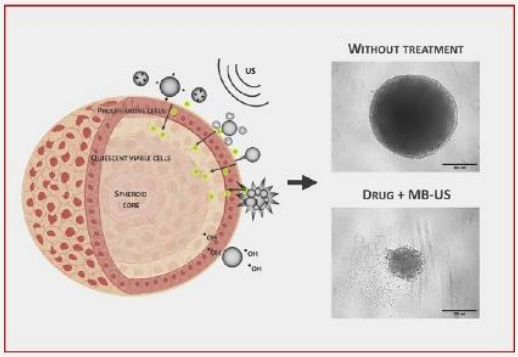
Delivery of Anticancer Drugs Using Microbubble-Assisted Ultrasound in a 3D Spheroid Model

Marie Roy, Corentin Alix, Julien Burlaud-Gaillard, Damien Fouan, William Raoul, Ayache Bouakaz, Emmanuelle Blanchard, Thierry Lecomte, Marie-Claude Viaud-Massuard, Noboru Sasaki, Sophie Serrière,*,○ and Jean-Michel Escoffre*,○

Cite This: *Mol. Pharmaceutics* 2024, 21, 831−844 Read Online

ACCESS | Metrics & More | Article Recommendations

ABSTRACT: Tumor spheroids are promising three-dimensional (3D) *in vitro* tumor models for the evaluation of drug delivery methods. The design of noninvasive and targeted drug methods is required to improve the intratumoral bioavailability of chemotherapeutic drugs and reduce their adverse off-target effects. Among such methods, microbubble-assisted ultrasound (MB-assisted US) is an innovative modality for noninvasive targeted drug delivery. The aim of the present study is to evaluate the efficacy of this US modality for the delivery of bleomycin, doxorubicin, and irinotecan in colorectal cancer (CRC) spheroids. MB-assisted US permeabilized the CRC spheroids to propidium iodide, which was used as a drug model without affecting their growth and viability. Histological analysis and electron microscopy revealed that MB-assisted US affected only the peripheral layer of the CRC spheroids. The acoustically mediated bleomycin delivery induced a significant decrease in CRC spheroid growth in comparison to spheroids treated with bleomycin alone. However, this US modality did not improve the therapeutic efficacy of doxorubicin and irinotecan on CRC spheroids. In conclusion, this study demonstrates that tumor spheroids are a relevant approach to evaluate the efficacy of MB-assisted US for the delivery of chemotherapeutics.



KEYWORDS: *microbubble, ultrasound, sonoporation, drug delivery, spheroid, colorectal cancer*

■ INTRODUCTION

Ethical considerations in animal experimentation have led researchers to consider and design new three-dimensional (3D) *in vitro* tumor models for drug screening, drug design, drug targeting, and drug toxicity, especially when the promising results obtained in two-dimensional (2D) *in vitro* tumor models (*e.g.*, cell monolayers, coculture systems, *etc.*) have not been reproduced in animal tumor models. Among these 3D models, tumor spheroids are the most exploited for the design and validation of anticancer strategies. As reported by Roy et al.,[1] tumor spheroids are 3D aggregates of tumor cells that may or may not be associated with other cell types, such as fibroblasts or immune cells. These cells interact not only with themselves but also with an extracellular matrix (*i.e.*, endogenous or exogenous), thus creating a dense molecular and cellular network, which limits drug access to tumor cells.[2,3] The main physiological consequence of such gradients is the establishment of a peripheral layer of proliferative cells, an intermediate layer of quiescent cells, and a necrotic core, as described for tumors *in vivo*.[4,5] Thus, these spheroids partially mimic *in vivo* tumor physiology, heterogeneity, microenvironment, and drug resistance.[6] These intrinsic properties of the tumor and its microenvironment restrict the extravasation, penetration, targeting, and retention of drugs into the tumor tissue, thus resulting in low therapeutic efficacy and severe off-target effects. To overcome these limitations, the design and evaluation of efficient and targeted drug delivery modalities are required to increase the local dose of anticancer drugs at the desired site while reducing the side effects to healthy tissues.

Among these modalities, microbubble-assisted ultrasound (MB-assisted US) is a promising physical method for the noninvasive and targeted delivery of various types of anticancer drugs, including chemotherapeutic drugs, nucleic acids (*e.g.*, plasmid DNA, mRNA, siRNA), immunotherapeutics, kinase inhibitors, tumor sensitizers, and oncolytic viruses.[7−10] These therapeutics and MBs (*i.e.*, bare or targeted ones) can be administered intratumorally and intravenously depending on the pharmacological properties of both agents and/or the

Received: October 3, 2023
Revised: December 18, 2023
Accepted: December 20, 2023
Published: January 4, 2024



ACS Publications © 2024 American Chemical Society

https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.3c00921
Mol. Pharmaceutics 2024, 21, 831−844

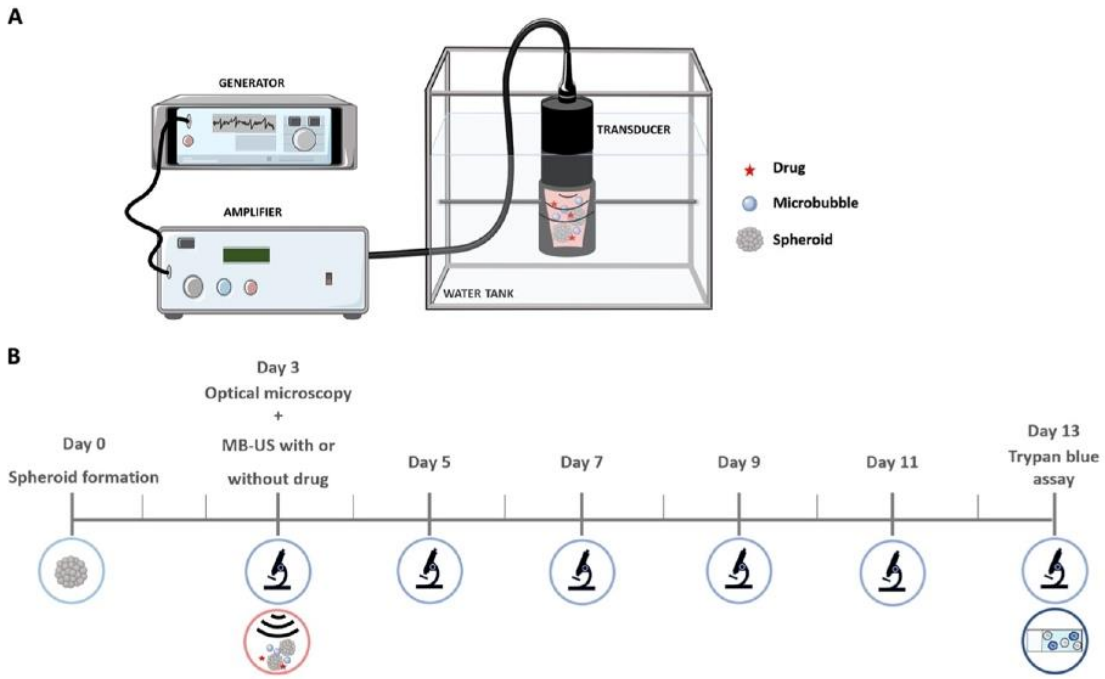


Figure 1. Setup and experimental timeline. (A) *In vitro* US setup. (B) Timeline of acoustically mediated drug delivery experiments on CRC spheroids.

desired therapeutic effect.[11] The therapeutics are either coadministered or administered successively with MBs *in vivo* and can also be charged on or into the MBs and administered together. Then, US is applied to the tumor tissue when a quantity of MBs and drugs are sufficiently accumulated.[12] In response to US waves, MBs oscillate close to biological barriers, such as the plasma membrane of tumor cells (after their intratumoral administration) or the blood−tumor barrier (after their intravenous administration), therefore promoting acoustic phenomena (*e.g.*, pulling/pushing processes, microstreaming, shock waves, microjet).[13] These phenomena transiently permeabilize these barriers to the therapeutics through the stimulation of intracellular (*e.g.*, formation of membrane pores and endocytosis), paracellular (*e.g.*, disruption of tight junctions), and transcellular (*e.g.*, transcytosis) pathways. Thus, this US modality enhances the therapeutic efficacy of anticancer drugs by improving their intratumoral bioavailability while minimizing their off-target effects.[14]

Since the advent of spheroids, fewer than ten published *in vitro* studies have used spheroids to either design and evaluate US protocols and new formulations of drugs and MBs or to investigate the influence of the tumor microenvironment on therapeutic efficacy.[1,15,16] In this context, the aims of the present study are (i) to evaluate the influence of acoustic pressure and MB concentration on the delivery of a drug model into colorectal cancer (CRC) spheroids and (ii) to investigate whether MB-assisted US is able to deliver different types of chemotherapeutic drugs in these CRC spheroids.

■ EXPERIMENTAL SECTION

Cell Culture. The IVISbrite HCT-116 Red F-luc tumor cell line (PerkinElmer, Codolet, France) is a bioluminescence-producing cell line derived from HCT-116 human colorectal carcinoma. These cells were stably transduced with the red-shifted firefly luciferase gene from *Luciola italica*. They were cultured in McCoy's 5A (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS; Eurobio, Courtaboeuf, France) and 1% penicillin/streptomycin (Thermo Fisher Scientific), and they were incubated at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO_2. This cell line has been chosen because it is the most common cell line used to generate CRC spheroids uniformly and reproducibly. In addition, the physiological properties of these spheroids are well documented[17,18]

Spheroid Formation. Adapted from Griseti et al.,[19] the cells were seeded at a density of 500 cells/well in a 96-well clear round-bottom ultralow attachment (ULA) microplate (Dutscher, Bernolsheim, France) and centrifuged at 500×*g* for 3 min. Then, the microplate was incubated at 37 °C under a humidified atmosphere in a 5% CO_2 incubator. The plastic surface of these wells is treated to prevent the attachment of cells to this surface and to promote their aggregation. This ULA surface enables uniform and reproducible 3D multicellular spheroid formation after 3 days. In a preliminary study, a groupwise analysis of the spheroid area using a Kruskal−Wallis test showed no significant difference in spheroid uniformity in microplates under our experimental conditions ($p > 0.05$; $n > 400$ spheroids from 6 independent experiments). In addition, the intragroup coefficients of variation of spheroid area for each experiment are small (4.6 to 4.8), indicating a greater reproducibility of spheroids in our experimental conditions. The spheroids are spherical and cohesive and have an average diameter of 300 ± 10 μm.

Anticancer Drugs and Microbubbles. Bleomycin sulfate (B1141000; Sigma−Aldrich, St Louis, MO) and doxorubicin (D2975000; Sigma-Aldrich, St Louis, MO) were dissolved in Dulbecco's phosphate-buffered saline solution (DPBS; Thermo Fisher Scientific) at a 1 mM stock solution. Irinotecan (Accord Healthcare AG, Bottmingen, Switzerland) was a generous gift from Dr. Virginie André (Regional Center of Cancerology, Henry Kaplan, CHRU de Tours, France), and its concentration was 20 mg/mL. Vevo MicroMarker contrast

https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.3c00921
Mol. Pharmaceutics 2024, 21, 831−844

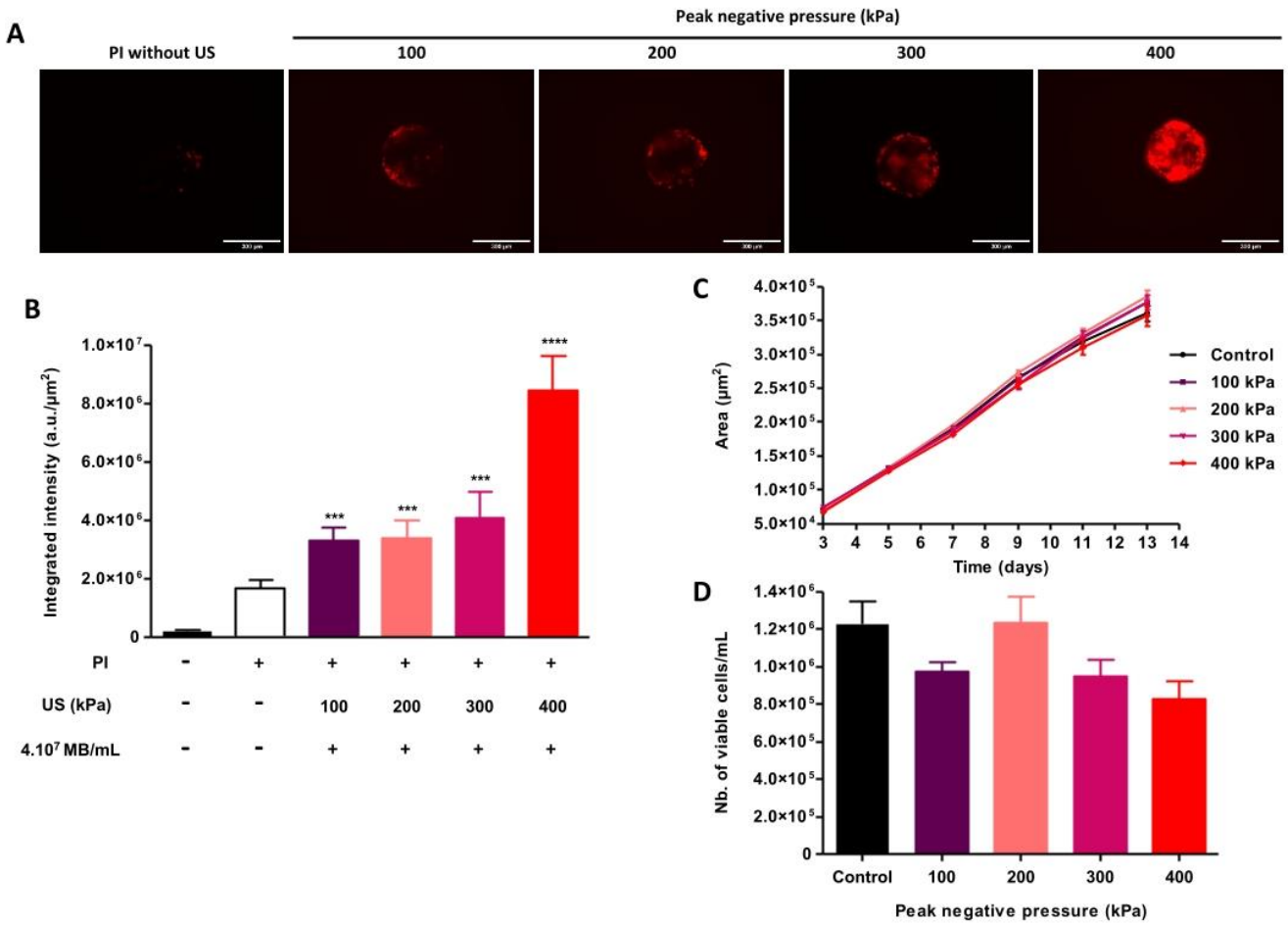


Figure 2. Influence of peak negative pressure (PNP) on CRC spheroid permeabilization, growth, and viability. CRC spheroids were incubated with 100 μM PI alone or with MB-assisted US at 100 to 400 kPa for 1 min. (A) Representative fluorescence images of permeabilized spheroids. The scale bar indicates 300 μm. (B) Quantification of PI fluorescence intensity of permeabilized spheroids. Data expressed as mean ± SEM was calculated from 18 CRC spheroids. Statistical analysis was performed using Kruskal−Wallis's test and Dunn's multiple comparison test. Significance was defined as $p < 0.05$ (***$p < 0.001$, ****$p < 0.0001$). Then, CRC spheroids were exposed to MB-assisted US at 100 to 400 kPa for 1 min. (C) Spheroid growth was assessed over time using optical imaging. Data expressed as mean ± SEM was calculated from 18 CRC spheroids. Statistical analysis was performed using two-way ANOVA test and Dunnett's test. Significance was defined as $p < 0.05$. (D) Spheroid viability was evaluated on the 13th day post-US exposure using a trypan blue dye exclusion assay. Data expressed as mean ± SEM was calculated from 18 CRC spheroids. Statistical analysis was performed using Kruskal−Wallis's test and Dunn's multiple comparison test. Significance was defined as $p < 0.05$.

agents were purchased from VisualSonics-Fujifilm Inc. (Toronto, Canada).[20,21] These agents are MBs consisting of a gaseous core of nitrogen and a perfluorobutane mixture encapsulated by a PEGylated phospholipid shell.[22] As previously reported in our *in vitro* and *in vivo* studies, these MBs are the most effective in delivering therapeutic molecules, including anticancer drugs and plasmid DNA.[21−23] They were prepared according to the manufacturer's instructions at a final concentration of 2×10^9 MB/mL.

Ultrasound Device. A 1 MHz single-element transducer (IBMF014; NDT Systems, Nashua, NH) was used for membrane permeabilization and drug delivery. The transducer had a diameter of 12.7 mm, a natural focal distance at 27 mm, and a focal spot of 6 mm. An arbitrary waveform generator (Agilent, Santa Clara, CA) was used to generate an electrical sinusoidal signal with a central frequency of 1 MHz, pulse repetition frequency (PRF) of 10 kHz, and a duty cycle of 40%. The signal was then amplified by using a power amplifier (AAP-500−0.2−6-D; ADECE, Veigné, France) before its transmission to the transducer. A separate system using a calibrated capsule hydrophone (HGL-0085; ONDA Corporation, Sunnyvale, CA) was used to determine the lateral and axial acoustic profiles and the sensitivity curve of the transducer. The peak negative pressures (PNP) measured in the cuvette on the axis of the transducer were 126, 252, 378, and 504 kPa, while these PNP were 100, 200, 300, and 400 kPa in water, respectively.

Spheroid Permeabilization. Propidium iodide (PI, P4864; Sigma−Aldrich) was used as a drug model (669.39 Da; hydrodynamic radius of 0.6 nm) to investigate the influence of peak negative pressure (PNP; 100, 200, 300, and 400 kPa) and MB concentration (2×10^7, 4×10^7, and 8×10^7 MB/mL) on spheroid permeabilization. This molecule is a nonpermeant and fluorescent DNA intercalating agent, which is commonly used as a membrane integrity marker to investigate the membrane permeabilization.[24−27] This fluorescent dye has a very low fluorescent intensity in an aqueous solution, while its quantum yield is 1000-fold enhanced after its intracellular uptake and binding to DNA. A suspension of 5 spheroids in 1.5 mL of McCoy's 5A medium supplemented

https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.3c00921
Mol. Pharmaceutics 2024, 21, 831−844

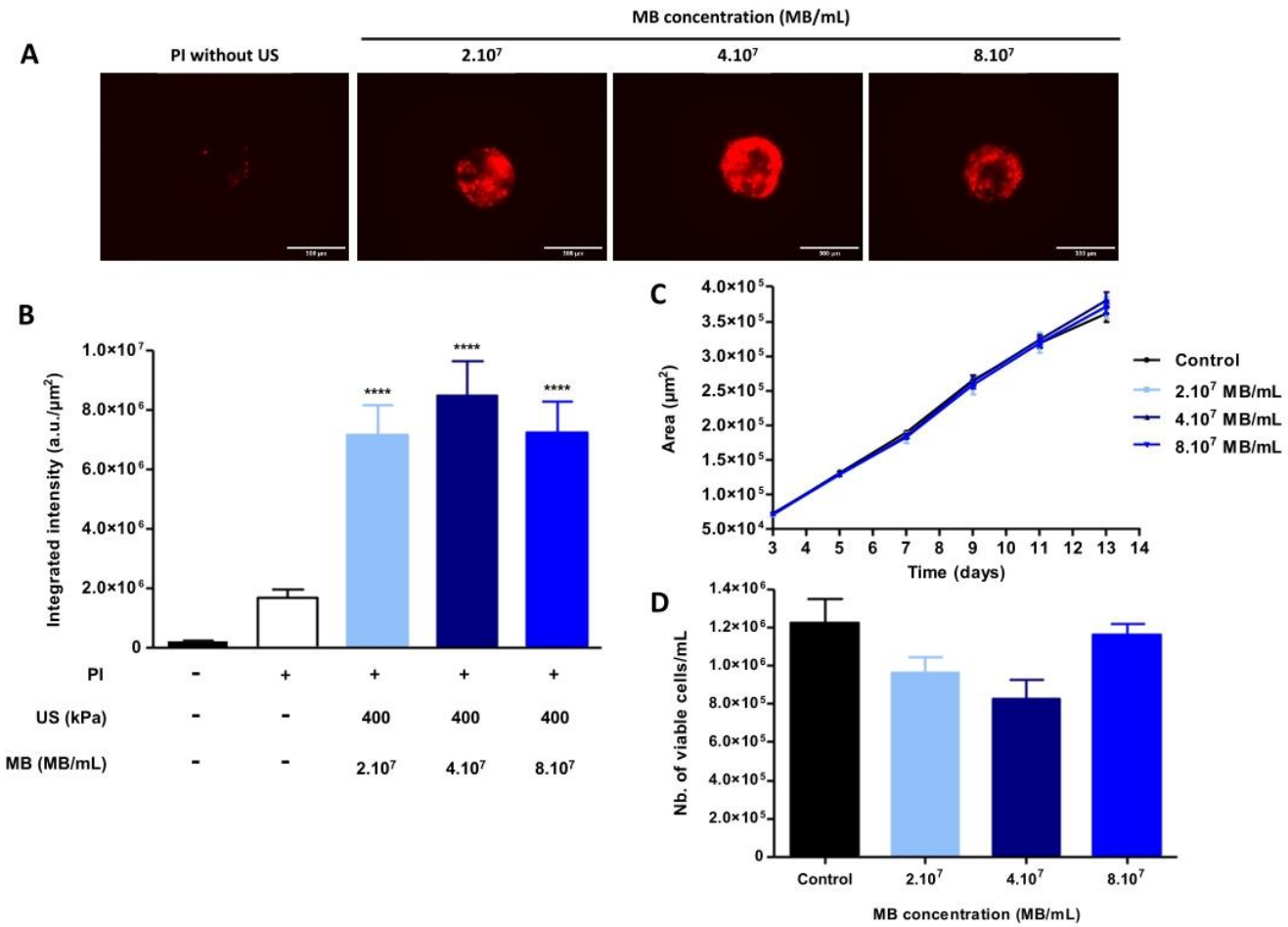


Figure 3. Influence of MB concentration on CRC spheroid permeabilization, growth, and viability. CRC spheroids were incubated with 100 μM PI alone or with MB-assisted US at 400 kPa for 1 min in the presence of 2×10^7, 4×10^7, or 8×10^7 MB/mL. (A) Representative fluorescence images of permeabilized spheroids. The scale bar indicates 300 μm. (B) Quantification of PI fluorescence intensity of permeabilized spheroids. Data expressed as mean ± SEM was calculated from 18 CRC spheroids. Statistical analysis was performed using Kruskal−Wallis's test and Dunn's multiple comparison test. Significance was defined as $p < 0.05$ (****$p < 0.0001$). CRC spheroids were incubated with 100 μM PI alone or with MB-assisted US at 400 kPa for 1 min in the presence of 2×10^7, 4×10^7, or 8×10^7 MB/mL. (C) Spheroid growth was assessed over time using optical imaging. Data expressed as mean ± SEM was calculated from 18 CRC spheroids. Statistical analysis was performed using two-way ANOVA test and Dunnett's test. Significance was defined as $p < 0.05$. (D) Spheroid viability was evaluated on the 13th day post-MB-assisted US exposure, using trypan blue dye exclusion assay. Data expressed as mean ± SEM was calculated from 18 CRC spheroids. Statistical analysis was performed using Kruskal−Wallis's test and Dunn's multiple comparison test. Significance was defined as $p < 0.05$.

with 1% FCS was placed in a dedicated plastic cuvette. Then, a solution of PI (100 μM final concentration) and MBs was added to the spheroid suspension just before US exposure. The center of the cuvette was immersed in a deionized and degassed water tank at 37 °C, and its center was positioned at the focal distance of the transducer (Figure 1). Subsequently, the spheroids were exposed to 1 MHz sinusoid US waves with a pulse repetition period (PRP) of 100 μs, 40 cycles per pulse (*i.e.*, 40% duty cycle), and for 1 min. Ten minutes later, the penetration and intracellular accumulation of PI into spheroids were assessed using a fluorescence microscope (EVOS, M5000, Thermo Fisher Scientific). A semiquantitative analysis of microscopic images was performed with ImageJ software (NIH, Bethesda, MA) in order to determine the integrated intensity of PI (a.u./μm^2). Representative confocal images of permeabilized spheroids were obtained using LEICA SP8 gSTED confocal microscope (Leica, Wetzlar, Germany).

The spheroids were exposed to MB-assisted US in the absence of PI in order to assess the effects of acoustically mediated membrane permeabilization on the spheroid growth and viability following the protocols described below.

Drug Delivery. Three chemotherapeutic drugs, including bleomycin (0.1 and 1 μM), doxorubicin (1 and 10 μM), and irinotecan (0.1 and 1 μg/mL), were acoustically delivered (1 MHz, 100 μs PRP, 40 cycles/pulse for 1 min in the presence of 4×10^7 MB/mL) into the spheroids using the same US protocol and setup described above for spheroid permeabilization. The concentrations of drugs were selected based on our *in vitro* preliminary studies. Ten minutes after US exposure, the spheroids were transferred to a 96-well ULA microplate. The final concentrations of FCS and antibiotics were increased to 10 and 1%, respectively. Finally, the microplate was incubated at 37 °C under a humidified atmosphere in a 5% CO_2 incubator for spheroid growth.

Spheroid Growth. Spheroid growth was monitored by optical microscopy (EVOS, M5000) every 2 days for 10 days after US exposure. Then, the spheroid area was measured by using ImageJ software.

https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.3c00921
Mol. Pharmaceutics 2024, 21, 831−844

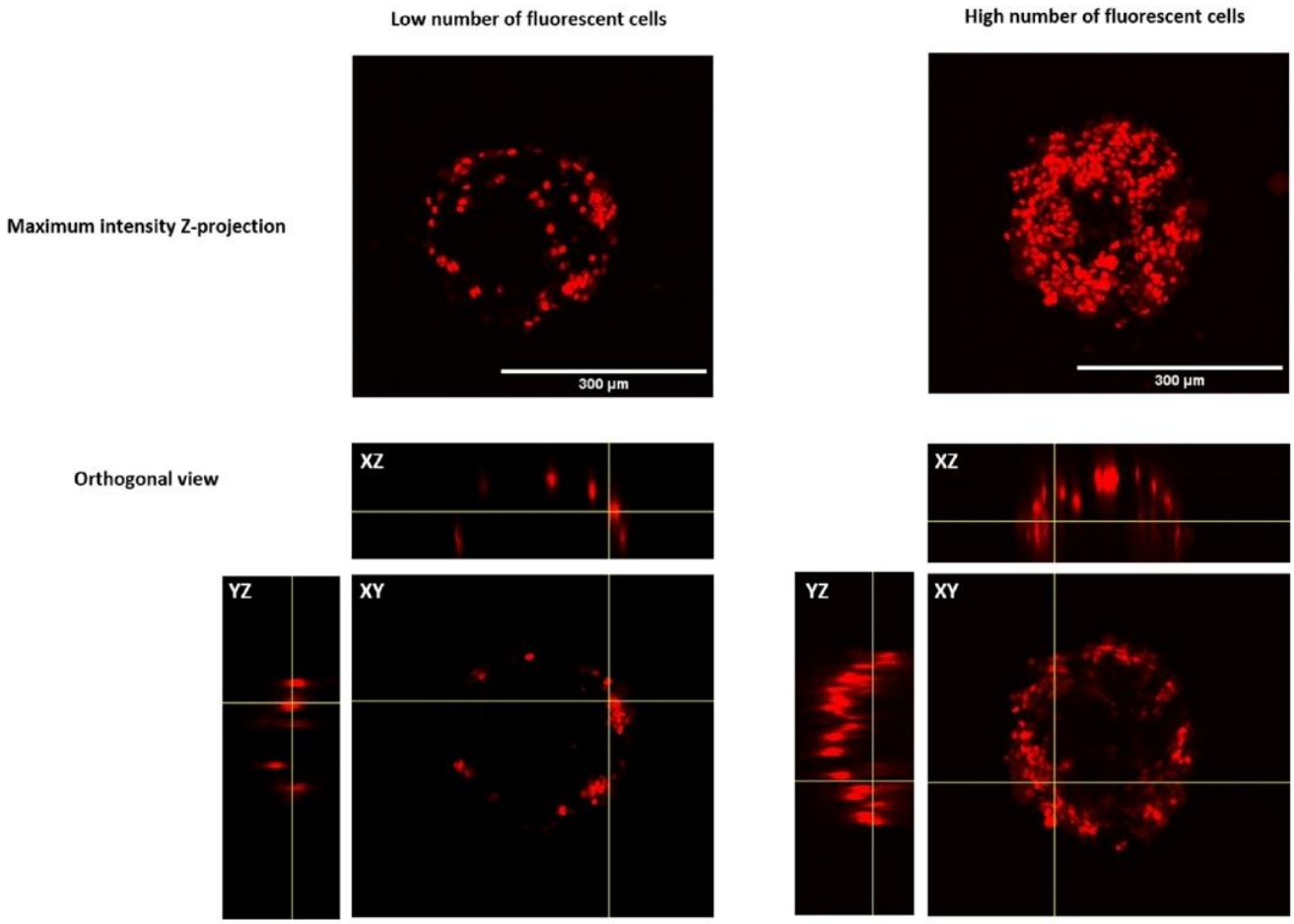


Figure 4. Representative confocal images of permeabilized spheroids. The scale bar indicates 300 μm.

Spheroid Viability. On the 13th day post-US exposure, spheroid viability was assessed using the trypan blue exclusion assay. Briefly, the spheroids were harvested and washed with phosphate-buffered saline (PBS). The spheroids were pooled in two groups and incubated with 50 μL of Accumax (Thermo Fisher Scientific) for 15 min at 37 °C in a humidified atmosphere in a 5% CO_2 incubator for enzymatic dissociation. Then, they were dissociated mechanically (rapid pipetting) to generate a cell suspension. One volume of cells was mixed with an equal volume of trypan blue. Finally, the concentration of viable cells was measured using a Countess automated cell counter (Invitrogen, Waltham, MA).

Transmission Electron Microscopy. As previously reported,[28] the spheroids were fixed in 1% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde (Sigma−Aldrich) in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2) for 24 h. Then, the samples were washed in PBS and postfixed in 2% buffered osmium tetroxide (Agar Scientific, Stansted, U.K.) for 1 h. After dehydration in a graded series of ethanol solutions (70 and 90% v/v) and propylene oxide (100%), an impregnation step was performed with a mixture of propylene oxide/Epon resin (1:1; Sigma−Aldrich) and then left overnight in pure resin. The samples were then embedded in Epon resin (Sigma−Aldrich), which was allowed to polymerize for 48 h at 60 °C. Thin (250 nm) and ultrathin sections (90 nm) of these blocks were generated with a Leica EM UC7 ultramicrotome (Leica, Wetzlar, Germany). Thin sections were stained with 0.5% toluidine blue (Sigma−Aldrich), and ultrathin sections were stained with 2% uranyl acetate (Agar Scientific Ltd., Stansted, U.K.) and 5% lead citrate (Sigma−Aldrich). The microscopic observations were made with a transmission electron microscope (JEOL 1011, Tokyo, Japan).

Statistical Analysis. All quantitative data were analyzed using Kruskal−Wallis's test and Dunn's multiple comparison test for spheroid permeabilization and viability and two-way ANOVA and Dunnett's test for spheroid growth (significance was defined as $p < 0.05$) with GraphPad Prism v.9.5.1 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA).

RESULTS

CRC Spheroid Permeabilization to Small Molecules. To evaluate the influence of PNP and MB concentrations on the permeabilization level of CRC spheroids, the membrane permeabilization of tumor cells was monitored using a small and nonpermeant drug model, PI, and the permeabilization level was assessed by epifluorescence microscopy.

As depicted in Figure 2A,B, the simple incubation of spheroids with PI revealed the presence of fluorescence labeling ($1.7 \pm 0.3 \times 10^6$ a.u./μm^2) inside the spheroids corresponding to the presence of dead cells. The exposure of spheroids to 100 kPa in the presence of MBs (4×10^7 MB/mL) significantly increased their permeabilization to PI compared to PI incubation alone (***$p < 0.001$; $3.3 \pm 0.4 \times 10^6$ *vs* $1.7 \pm 0.3 \times 10^6$ a.u./μm^2). The increase in the acoustic pressure from 200 to 300 kPa caused spheroid

https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.3c00921
Mol. Pharmaceutics 2024, 21, 831−844

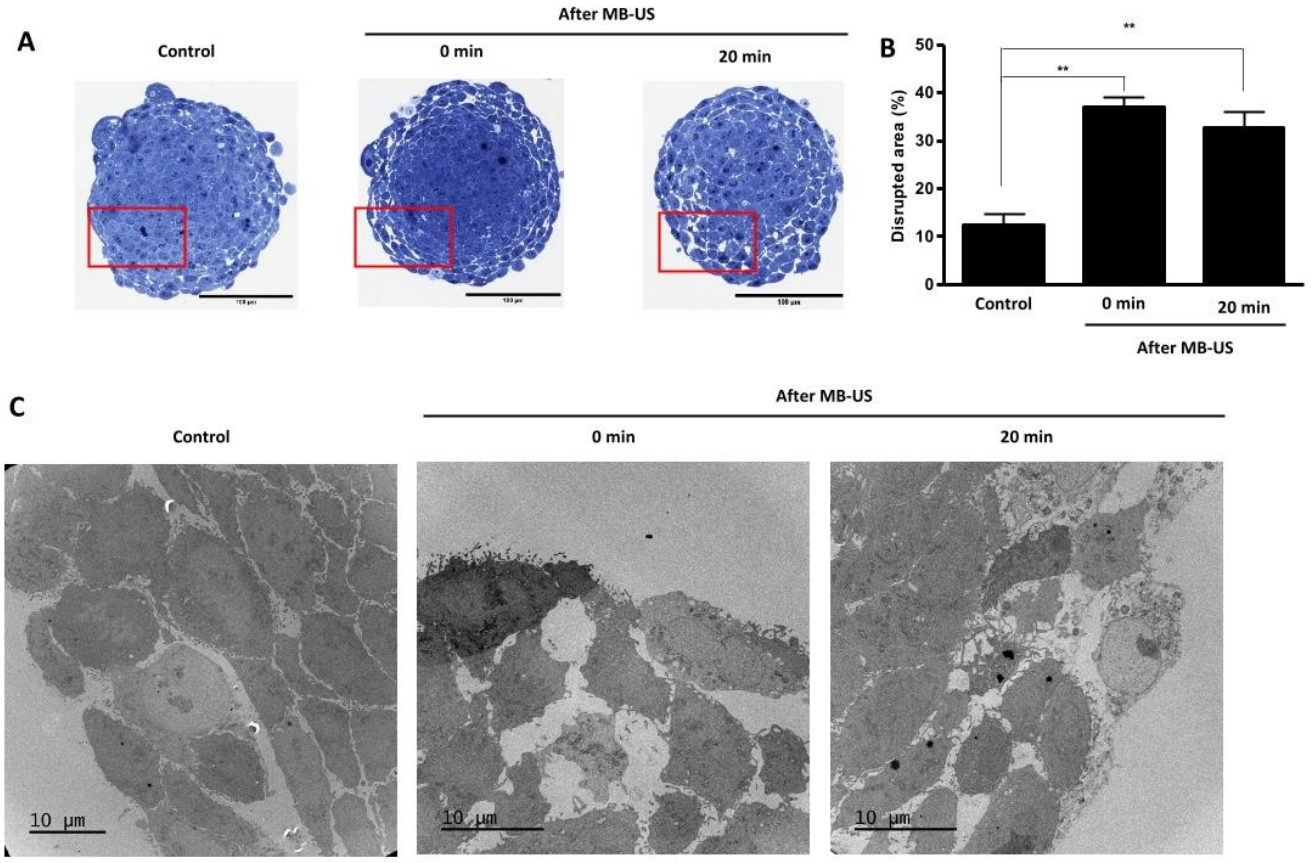


Figure 5. Effects of MB-assisted US on spheroid structure. (A) Representative optical images of CRC spheroid slices stained with toluidine blue, immediately or 20 min after MB-assisted US exposure (MB concentration: 4×10^7 MB/mL, US parameters: 400 kPa for 1 min). The scale bar indicates 100 μm. The red square shows the peripheral layer of CRC spheroids. (B) Percentage of the disrupted spheroid area after MB-assisted US exposure. Data expressed as mean ± SEM was calculated from 12 CRC spheroids. Statistical analysis was performed using Kruskal−Wallis's test and Dunn's multiple comparison test. Significance was defined as $p < 0.05$ (**$p < 0.01$). (C) Representative TEM images of the disrupted area of CRC spheroids. The scale bar indicates 10 μm.

permeabilization similar to that at an acoustic pressure of 100 kPa ($p > 0.05$; $3.4 \pm 0.6 \times 10^6$ and $4.1 \pm 0.9 \times 10^6$ a.u./μm^2, respectively). However, the exposure of spheroids to 400 kPa induced a 2.5-fold increase in their permeabilization in comparison to their exposure to 100 kPa (****$p < 0.0001$; $8.5 \pm 1.2 \times 10^6$ *vs* $3.3 \pm 0.4 \times 10^6$ a.u./μm^2).

The influence of this range of PNP (from 100 to 400 kPa) on spheroid growth and viability was investigated by optical microscopy over 13 days and using a trypan blue exclusion assay on the 13th day of spheroid growth, respectively. The increase in the PNP had no significant influence on spheroid growth (Figure 2C) or viability (Figure 2D).

Then, the influence of MB concentration (2×10^7, 4×10^7, and 8×10^7 MB/mL) on spheroid permeabilization to PI was investigated at the given PNP of 400 kPa using the same experimental strategy, as shown in Figure 3A,B. As described above, the coincubation of spheroids with PI stained the dead cells, thus causing an increase in the associated fluorescence intensity ($1.7 \pm 0.3 \times 10^6$ a.u./μm^2). The insonation of spheroids in the presence of MBs at 2×10^7 MB/mL led to a significant permeabilization of spheroids compared to PI incubation alone (****$p < 0.0001$; $7.1 \pm 1 \times 10^6$ *vs* $1.7 \pm 0.3 \times 10^6$ a.u./μm^2). Surprisingly, the doubling or quadrupling of the MB concentration resulted in similar permeabilization of spheroids as for an MB concentration of 2×10^7 MB/mL ($p > 0.05$; $8.5 \pm 1.1 \times 10^6$ and $7.2 \pm 1 \times 10^6$ a.u./μm^2, respectively). In addition, the increase in MB concentration from 2×10^7 to 8×10^7 MB/mL did not affect either spheroid growth over time (Figure 3C) or viability on the 13th day (Figure 3D). Altogether, these data show that MB-assisted US permeabilizes CRC spheroids without affecting their growth or viability under our experimental conditions.

In addition, our confocal microscopic observations of permeabilized spheroids revealed heterogeneous permeabilization between the spheroids and within each spheroid. Indeed, the spheroids showed a low or high number of fluorescent cells predominantly located in the outer cell layer of spheroids (Figure 4).

Impact of US-MB on Spheroid Structure. Using the same setup and experimental conditions (400 kPa PNP, 4×10^7 MB/mL) previously described for spheroid permeabilization, ultrastructural modifications of CRC spheroids were investigated using both histology after toluidine blue staining (Figure 5A,B) and transmission electron microscopy (TEM; Figure 5C) immediately and 20 min after MB-assisted US (in the absence of PI). Optical images of control spheroids (no MB-assisted US exposure) revealed no visually apparent effects on the spheroid morphology (Figure 5A). In the control condition, few intercellular disruptions were observed in the peripheral layers of tumor cells, which could be attributed to the putative artifactual effect of sample preparation and handling (Figure 5A,B). However, the spheroids appeared

https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.3c00921
Mol. Pharmaceutics 2024, 21, 831−844

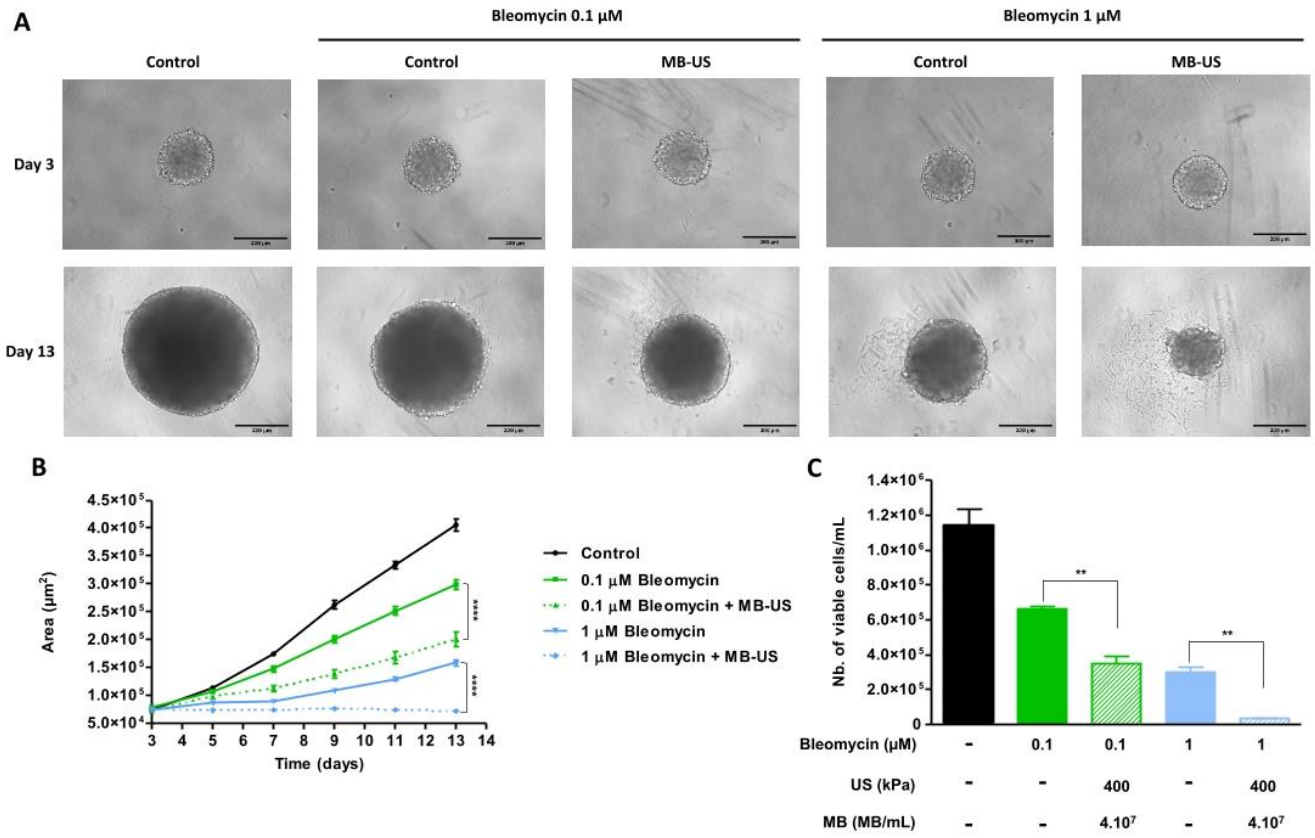


Figure 6. Bleomycin delivery using MB-assisted US. CRC spheroids were incubated with 0.1 or 1 μM bleomycin alone or with MB-assisted US at 400 kPa for 1 min in the presence of 4×10^7 MB/mL. (A) Representative optical images of CRC spheroids before (day 3) and 10 days after treatment (day 13). The scale bar indicates 300 μm. (B) Spheroid growth was assessed over time using optical imaging. Data expressed as mean ± SEM was calculated from 8 CRC spheroids. Statistical analysis was performed using Two-way ANOVA test and Dunnett's test. Significance was defined as $p < 0.05$ (****$p < 0.0001$). (C) Spheroid viability was evaluated on the 13th day post-MB-assisted US exposure, using trypan blue dye exclusion assay. Statistical analysis was performed using Kruskal–Wallis's test and Dunn's multiple comparison test. Significance was defined as $p < 0.05$ (**$p < 0.01$).

less cohesive in structure immediately after MB-assisted US exposure compared to the control spheroids (Figure 5A). The intercellular junctions of tumor cells located in the peripheral layers of spheroids were significantly disrupted in comparison to the control spheroids (**$p < 0.01$; 37 ± 2% vs 12 ± 2%; Figure 5B). A slight but nonsignificant decrease in this acoustically disrupted area was observed 20 min after US-assisted MB exposure ($p > 0.05$; 32 ± 3% vs 37 ± 2%; Figure 5B). It can be noticed that MB-assisted US did not seem to affect the structure of the intermediate layer or the core of spheroids under our experimental conditions. Moreover, TEM analysis confirmed these histological observations. The sonicated spheroids exhibited significant changes in cell morphology and organization (*i.e.*, wide intercellular gaps) in the peripheral layer of spheroids, which resulted in a loss of spheroid cohesion in this layer compared to the control (Figure 5C). These results demonstrate that MB-assisted US affects only the peripheral layer of the CRC spheroids.

Drug Delivery Using MB-Assisted US. Three anticancer drugs, bleomycin, doxorubicin, and irinotecan, were acoustically delivered at two different concentrations inside CRC spheroids using the US setup and parameters (400 kPa PNP, 4×10^7 MB/mL). The cytotoxic effects of such drugs were investigated by monitoring spheroid growth over 13 days under optical microscopy and by assessing spheroid viability on the 13th day using a trypan blue exclusion assay.

Figure 6A displays microscopy images of control spheroids (*i.e.*, no treatment) and spheroids treated once either with bleomycin alone or with bleomycin delivered using MB-assisted US (*i.e.*, 0.1 and 1 μM bleomycin). As shown in this figure, the spheroid size and morphology were highly uniform among all treatment groups on the third day (*i.e.*, images acquired before the treatment). This good reproducibility of our spheroid model enabled us to clearly assess their cytotoxic effects over time; here, only the last day of follow-up is shown. Control spheroids exhibited linear growth, and the spheroid-doubling time was close to 5 days (Figure 6B). The incubation of spheroids with 0.1 μM bleomycin significantly reduced spheroid growth over 13 days without inducing spheroid destruction compared to the control condition (****$p < 0.0001$). Consequently, the spheroid-doubling time increased to 6 days. The acoustically mediated delivery of bleomycin at 0.1 μM led to an additional and significant reduction in spheroid growth (without inducing spheroid destruction) in comparison with bleomycin treatment alone (****$p < 0.0001$). This reduction in spheroid growth was associated with the prolongation of the spheroid-doubling time, *i.e.*, 7 days. The increase in bleomycin concentration from 0.1 to 1 μM significantly accentuated the slowdown of spheroid growth (****$p < 0.0001$; Figure 6B) without causing spheroid destruction and increased the spheroid-doubling time to 9 days. It can be noticed that the therapeutic efficacy of

https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.3c00921
Mol. Pharmaceutics 2024, 21, 831−844

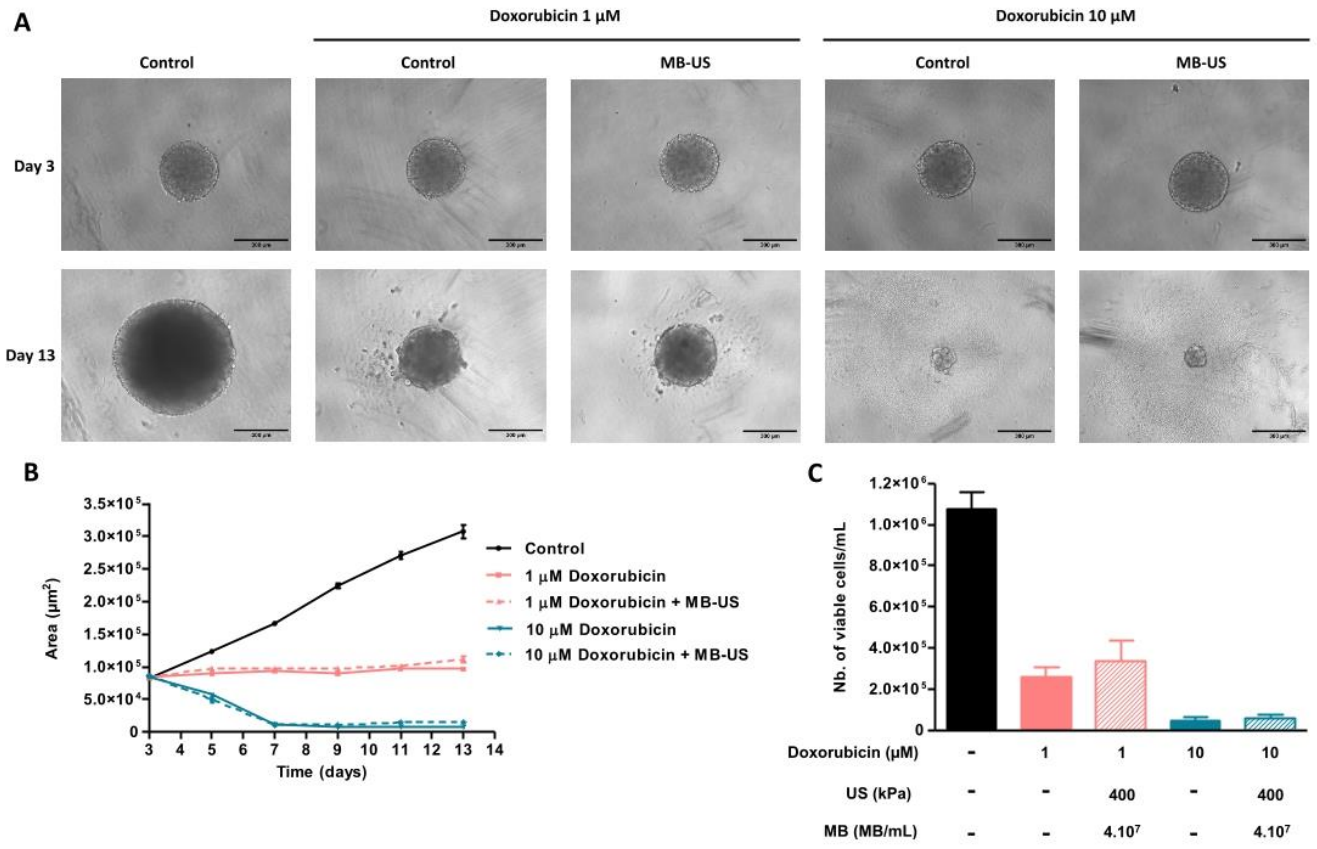


Figure 7. Doxorubicin delivery using MB-assisted US. CRC spheroids were incubated with 1 or 10 μM doxorubicin alone or with MB-assisted US at 400 kPa for 1 min in the presence of 4×10^7 MB/mL. (A) Representative optical images of CRC spheroids before (day 3) and 10 days after treatment (day 13). The scale bar indicates 300 μm. (B) Spheroid growth was assessed over time using optical imaging. Data expressed as mean ± SEM was calculated from 8 CRC spheroids. Statistical analysis was performed using Two-way ANOVA test and Dunnett's test. Significance was defined as $p < 0.05$. (C) Spheroid viability was evaluated on the 13th day post-MB-assisted US exposure, using trypan blue dye exclusion assay. Statistical analysis was performed using Kruskal–Wallis's test and Dunn's multiple comparison test. Significance was defined as $p < 0.05$.

acoustically mediated delivery of bleomycin at 0.1 μM is close to that obtained with bleomycin treatment alone at 1 μM ($p > 0.05$). The exposure of spheroids to MB-assisted US in the presence of 1 μM bleomycin completely inhibited their growth compared to the bleomycin treatment alone (****$p < 0.0001$). On the 13th day, the trypan blue exclusion assay confirmed these results (Figure 6C). The acoustically mediated delivery of 0.1 μM bleomycin induced a 2-fold decrease in spheroid viability compared to bleomycin treatment alone (**$p < 0.01$). This reduction in spheroid viability was similar to that caused by the treatment of spheroids with 1 μM bleomycin alone ($p > 0.05$). As expected, the delivery of 1 μM bleomycin using MB-assisted US significantly decreased spheroid viability compared to bleomycin treatment alone at 1 μM (**$p < 0.01$). These results show that MB-assisted US potentiates the cytotoxic effect of bleomycin on CRC spheroids.

As shown in Figure 7, the cytotoxic effect of the acoustically mediated delivery of doxorubicin (*i.e.*, 1 and 10 μM) was investigated following the same protocol reported above. As previously described, control spheroids displayed linear growth with a doubling time close to 5 days (Figure 7A,B). Doxorubicin treatment alone at 1 μM induced complete inhibition of spheroid growth (****$p < 0.0001$; Figure 7A,B), while treatment with a 10-fold higher concentration induced a significant reduction in spheroid area related to an almost complete destruction of the spheroid compared to control spheroids (****$p < 0.0001$; Figure 7A,B). Regardless of the doxorubicin concentration, its cytotoxic effect was not potentiated when this anticancer drug was delivered using MB-assisted US inside the spheroids ($p > 0.05$). These data were also confirmed by trypan blue exclusion assay on Day 13 (Figure 7C). Doxorubicin treatment alone at 1 μM led to a 3.8-fold decrease in spheroid viability compared to the control condition (***$p < 0.001$; $2.6 \pm 0.4 \times 10^5$ *vs* $1.0 \pm 0.08 \times 10^6$ viable cells/mL). The acoustically mediated delivery of 1 μM doxorubicin did not result in an additional reduction in spheroid viability in comparison to doxorubicin treatment alone ($p > 0.05$). Similarly, 10 μM doxorubicin delivered or not using MB-assisted US induced a comparable decrease in spheroid viability ($p > 0.05$; $6.0 \pm 1.2 \times 10^4$ *vs* $4.5 \pm 1.8 \times 10^4$ viable cells/mL). Altogether, these data reveal that under our experimental conditions, MB-assisted US does not increase the cytotoxic effect of doxorubicin on CRC spheroids at either selected concentration.

Moreover, the CRC spheroids were treated with irinotecan at 0.1 or 1 μg/mL alone or delivered using MB-assisted US. Once again, the spheroids exhibited linear growth with a doubling time close to 5 days under control conditions (Figure 8A,B). At a 0.1 μg/mL concentration, slower spheroid growth was observed compared to the control condition (****$p <$ 0.0001; Figure 8A,B). The acoustically mediated delivery of such an irinotecan concentration induced a slightly more

https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.3c00921
Mol. Pharmaceutics 2024, 21, 831−844

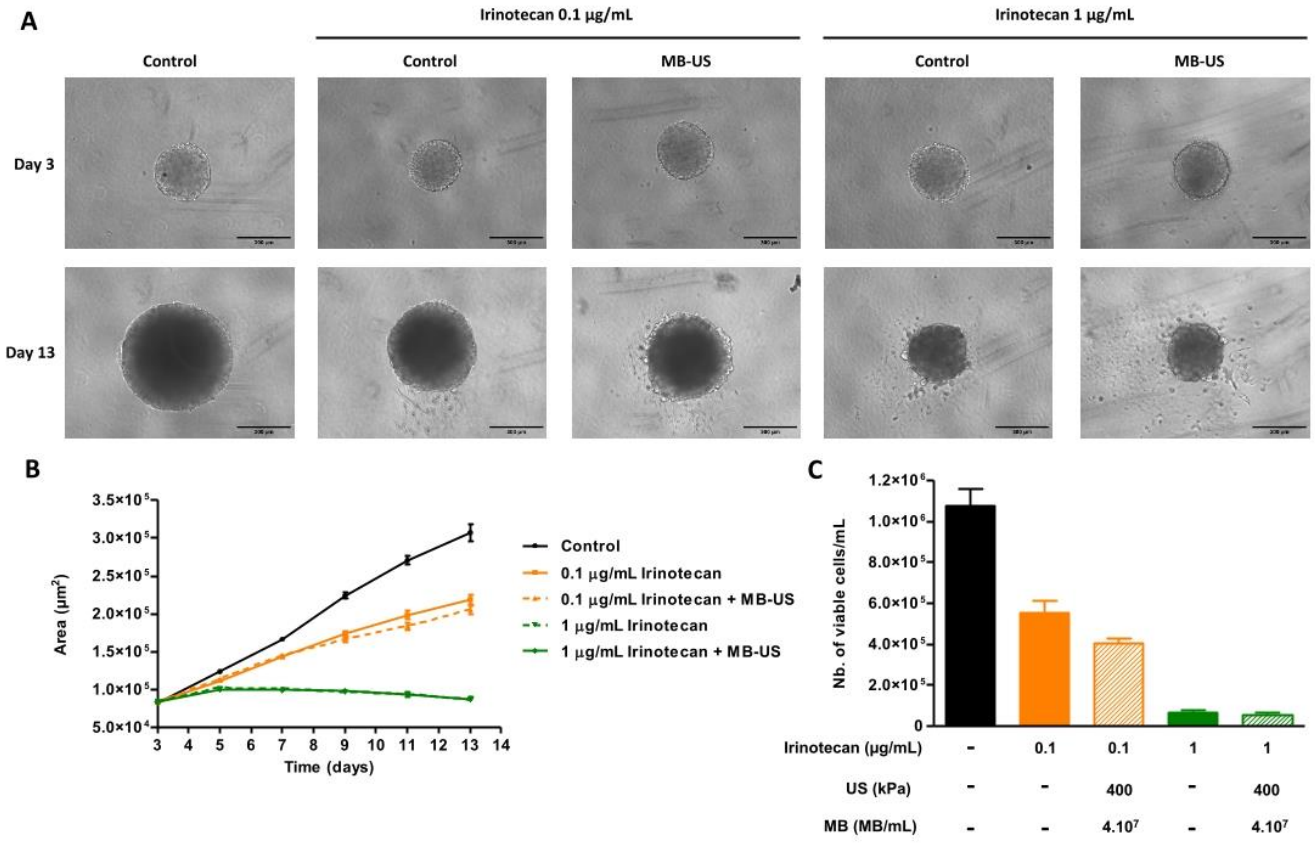


Figure 8. Irinotecan delivery using MB-assisted US. CRC spheroids were incubated with 0.1 or 1 μg/mL irinotecan alone or with MB-assisted US at 400 kPa for 1 min in the presence of 4×10^7 MB/mL. (A) Representative optical images of CRC spheroids before (day 3) and 10 days after treatment (day 13). The scale bar indicates 300 μm. (B) Spheroid growth was assessed over time using optical imaging. Data expressed as mean ± SEM was calculated from 8 CRC spheroids. Statistical analysis was performed using two-way ANOVA test and Dunnett's test. Significance was defined as $p < 0.05$. (C) Spheroid viability was evaluated on the 13th day post-MB-assisted US exposure, using trypan blue dye exclusion assay. Statistical analysis was performed using Kruskal–Wallis's test and Dunn's multiple comparison test. Significance was defined as $p < 0.05$.

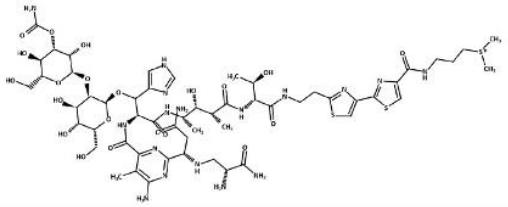
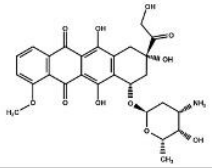
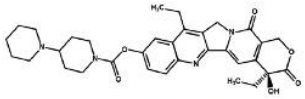
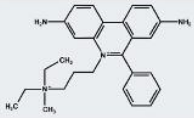
important reduction of spheroid growth compared to the 0.1 μg/mL irinotecan treatment alone, but this result was not significant ($p > 0.05$). The incubation of spheroids with 1 μg/mL irinotecan alone resulted in a complete inhibition of spheroid growth without generating their destruction in comparison to the control condition (****$p < 0.0001$; Figure 8A,B). Unfortunately, the delivery of such irinotecan concentrations using MB-assisted US did not lead to an additional and significant decrease in spheroid growth compared to irinotecan treatment alone ($p > 0.05$). The trypan blue exclusion assay supported these results (Figure 8C). The acoustically mediated delivery of 0.1 μg/mL irinotecan caused a slight but nonsignificant decrease in spheroid viability in comparison to 0.1 μg/mL irinotecan treatment alone ($p > 0.05$; $4.0 \pm 0.3 \times 10^5$ *vs* $5.5 \pm 0.6 \times 10^5$ viable cells/mL). No significant decrease in spheroid viability was observed between their treatment with 1 μg/mL irinotecan alone or delivered using MB-assisted US ($p > 0.05$; $6.0 \pm 1.5 \times 10^4$ *vs* $5.5 \pm 0.7 \times 10^4$ viable cells/mL). These results demonstrate that under our experimental conditions, MB-assisted US does not potentiate the cytotoxic effect of irinotecan on CRC spheroids regardless of its selected concentration.

DISCUSSION

The aim of the present study was to evaluate the efficacy of the MB-assisted US for the delivery of anticancer drugs to CRC spheroids. First, the influence of PNP and MB concentration on the permeabilization of these spheroids to small molecules was assessed using PI as a drug model. Our results show that MB-assisted US significantly increases the delivery of this drug model into CRC spheroids (Figure 2A,B). As previously reported for cell suspensions or *in vivo*, the permeabilization efficiency depends on PNP.[29−31] The increase in the PNP induces a gradual permeabilization of spheroids, and a maximum permeabilization efficiency is reached at a PNP of 400 kPa. In future experiments, it could be relevant to investigate in depth the influence of other US parameters on the permeabilization of spheroids. Surprisingly, the increase in MB concentration did not affect the permeabilization efficiency of spheroids (Figure 3A,B). The data available in the literature showed that the permeabilization of cells and tissues is dependent on the MB concentration.[32−34] In the near future, the influence of a wider range of MB concentrations as well as the type of MBs (*i.e.*, soft- *vs* hard-shelled MBs, bare *vs* targeted MBs, poly- *vs* monodisperse MBs, *etc.*) on spheroid permeabilization will be evaluated with our US setup. The 3D view of permeabilized spheroids using confocal fluorescence microscopy allowed accurate location of permeabilized cells in the peripheral layer of spheroids (Figure 4). Such a

https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.3c00921
Mol. Pharmaceutics 2024, 21, 831−844

Table 1. Description of Chemotherapeutic Drugs and Propidium Iodide

	Molecule	Structure	Molecular weight (g/mol)	Mechanisms of action
Therapeutic molecules	Bleomycin		1 415.551	• ROS generation • Intercalation into DNA • Topoisomerase II inhibition
	Doxorubicin		543.52	• ROS generation • Intercalation into DNA • Topoisomerase II inhibition
	Irinotecan		586.678	Topoisomerase I inhibition
Drug model	Propidium iodide		668.403	N/A

spheroid phenotype with a more or less significant number of permeabilized cells is the most frequently observed phenotype in previous studies. Nevertheless, Paškevičiūtė et al.[35] reported that MB-assisted US enhanced the permeabilization of peripheral and middle layers to doxorubicin (anticancer fluorescent drug, 544 Da) in lung and breast cancer spheroids. This difference observed between our study and those published may be related to the US setup and parameters, MBs (*e.g.*, type, dose, *etc.*), tumor cell line, and the dye used as the model drug.

Subsequently, we investigated the bioeffects of MB-mediated US on the architecture of spheroids using TEM and histology after toluidine blue staining. MB-assisted US strongly altered the peripheral cell layers of spheroids. The shape of the tumor cells was modified, and the intercellular junctions were disrupted from the spheroid surface to a depth of 70 nm immediately after US exposure as well as 20 min later (Figure 5). These results suggest that the mechanical actions of cavitating MBs take place on the surface and in the outer layers of the spheroids. Due to their micrometric size, the MBs would not diffuse inside the spheroids. To confirm this hypothesis, spheroid permeabilization in the presence of fluorescent MBs and PI could be conducted in real time under a confocal microscope. In addition, our TEM results confirmed our confocal microscopic observations of permeabilized spheroids. This preliminary electron microscopy study is, to the best of our knowledge, the first of its kind in the field of acoustically mediated drug delivery into spheroids.

Moreover, we assessed the ability of MB-assisted US to deliver chemotherapeutic drugs, including bleomycin, doxorubicin, and irinotecan, into CRC spheroids. These spheroids were treated with two different drug concentrations and then exposed or not to MB-assisted US. The results showed that the cytotoxic effect of bleomycin was potentiated when this drug was delivered using MB-assisted US (Figure 6). In agreement with published data, these results indirectly demonstrated that the increased cytotoxicity of bleomycin could be ascribed to an enhancement in its intracellular uptake through acoustically induced hydrophilic pores.[36,37] The transport of bleomycin across the plasma membrane of tumor cells is governed by the receptor-mediated endocytosis process.[38] The low number of these membrane receptors exposed at the cell surface limits the intracellular accumulation of bleomycin and, therefore, its cytotoxicity. The exposure of spheroids to MB-assisted US leads to an increased membrane permeability of tumor cells and enables the direct access of bleomycin to the cytoplasm, where its molecular targets are located. These results are in agreement with previous studies conducted *in vitro* on different human and murine tumor cell lines (*i.e.*, gingival squamous carcinoma, melanoma, glioblastoma, and colorectal cancer)[39−41] and *in vivo* (*i.e.*, gingival squamous carcinoma and melanoma).[39,40] The acoustically mediated delivery of bleomycin induces a 50 to 80% decrease in cell viability regardless of the cell line used and experimental conditions (*i.e.*, cell suspension versus adherent cells, type and dose of MBs, bleomycin concentration, and US parameters). *In vivo*, Iwanaga et al. reported that the repeated delivery of a low bleomycin dose (10 μg) using MB-assisted US led to a near disappearance of the tumor in a murine squamous carcinoma model without inducing severe side effects.[39] Altogether, these results suggest that spheroids could be a suitable predictive and complementary tumor model between *in vitro* and *in vivo* models.

Surprisingly, MB-assisted US did not potentiate the cytotoxic effects of doxorubicin and irinotecan on CRC spheroids under our experimental conditions (Figures 7 and 8). The first hypothesis, which could explain these results, relies on the intrinsic properties of these anticancer drugs (Table 1). Doxorubicin and irinotecan are low-molecular-weight molecules (<600 Da) that can passively cross the

https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.3c00921
Mol. Pharmaceutics 2024, 21, 831−844

plasma membrane of tumor cells, while bleomycin (>1400 Da) requires a receptor-mediated endocytosis process. In addition, the lipophilicity of these anticancer molecules is also a physicochemical parameter that must be considered because it plays a major role in their pharmacological properties (pharmacokinetics, pharmacodynamics, tissue biodistribution, *etc.*).[42] Doxorubicin and irinotecan are more lipophilic than bleomycin.[43,44] As a result, MB-assisted US would not significantly enhance the intracellular concentrations of doxorubicin and irinotecan under our experimental conditions. However, previous investigations reported that this US modality significantly increased the intracellular uptake of both drugs and their cytotoxic effects *in vitro* and *in vivo*.[20,22,45,46] If we consider doxorubicin first, the acoustically mediated delivery of free doxorubicin (as opposed to doxorubicin loaded in MBs or liposomes) enhances the membrane permeability of tumor cells to this drug, thus resulting in a significant increase in its cytotoxic effects on cell suspensions or monolayers.[47,48] The *in vitro* studies conducted on the tumor spheroids depicted contradictory results.[15,35,49] Indeed, Misra et al. showed that this US modality increased the penetration of doxorubicin (50 μM) inside mammary tumor (MDA-MB-231) spheroids and its intracellular uptake. Surprisingly, these results were not correlated with a significant inhibition of spheroid growth compared to doxorubicin treatment alone. The use of a high concentration of doxorubicin, *i.e.*, 50 μM, could explain these results. Bourn et al. described a positive correlation between an increase in the intracellular uptake of doxorubicin and a decrease in the viability of CRC/fibroblast (HCT-116/HFFF2) spheroids after acoustically mediated delivery of doxorubicin at 3 μM. This last study demonstrates that MB-assisted US can potentiate the therapeutic efficacy of low concentrations of doxorubicin (*i.e.*, <5 μM) on spheroids, thus partly explaining our results obtained at 10 μM doxorubicin. Indeed, we failed to improve the cytotoxic effects of low concentrations of doxorubicin (<1 μM) on CRC spheroids in the present study but also in preliminary studies (data not shown), suggesting that HCT-116 cells would be highly sensitive to doxorubicin. In their study, Bourn et al. exploited CRC spheroids made up of human colorectal cancer HCT-116 cells (as reported in the present study) and human HFFF2 fibroblasts. It is now widely known that such coculture decreases the sensitivity of tumor cells to anticancer drugs,[16,49−51] thus explaining why Bourn et al. succeeded in potentiating the therapeutic efficacy of low concentrations of doxorubicin on their spheroids and not us. In the present study, we can only conclude that MB-assisted US did not potentiate the cytotoxic effects of doxorubicin on HCT-116 spheroids. In the near future, these experiences will have to be reproduced on spheroids made up of different types of cancer cells cocultured with or without other cell lines such as fibroblast, in order to conclude on the efficacy of MB-assisted US to enhance the therapeutic efficacy of doxorubicin on tumor spheroids. We note that the efficacy of acoustically mediated delivery of free doxorubicin has only been described in a few *in vivo* tumor models.[46,52,53] Indeed, it is mainly the delivery of its liposomal formulation (Doxil or Caelyx) as well as doxorubicin-loaded MBs, which has been reported *in vivo* due to the strong cardiotoxicity of free doxorubicin.[54−56] The use of liposomal doxorubicin will be more relevant in our further investigations of tumor spheroids.

Regarding the acoustically mediated delivery of irinotecan, several proofs of concept showed that MB-assisted US efficiently delivered free irinotecan *in vitro*[20] and *in vivo* in healthy and tumor brain tissues.[20,45,57] We demonstrated that the therapeutic efficacy of a 500 μg/mL irinotecan concentration can be achieved by delivering a 1000 times lower concentration by MB-assisted US in human glioblastoma (U-87 MG) cells.[20] *In vivo*, the acoustically mediated delivery of free irinotecan in a glioblastoma (U-87 MG) murine model resulted in a significant decrease in tumor growth compared to irinotecan treatment alone. To the best of our knowledge, spheroids have never been exploited to evaluate the acoustically mediated delivery of free irinotecan. However, they are used to assess new formulations of therapeutic MBs in which irinotecan is loaded alone[58,59] or with other anticancer drugs.[59,60] Indeed, Gao et al. demonstrated that MB-assisted US using irinotecan-loaded MBs (50 μM) induced a significant decrease in the viability of pancreatic tumor spheroids compared with irinotecan-loaded MB treatment alone. As opposed to our irinotecan delivery strategy, the encapsulation of irinotecan inside MBs limits its intracellular uptake and, therefore, its cytotoxic effects. The exposure of tumor cells and irinotecan-loaded MBs to US induces the release of irinotecan from MBs and increases the membrane permeability of tumor cells to this drug, thus potentiating its therapeutic efficacy. Regardless of the type of tumor cells and drug delivery protocol, the loading of irinotecan inside the MBs is the main reason why these authors observed a significant difference in spheroid viability between their experimental and control conditions, contrary to our present study.

In addition to the further improvements described above, future developments would consist of the use of vascularized tumor spheroid-on-a-chip, where the spheroids will be formed from patient-derived cancer cells and have different sizes.[61−63] This strategy will be more relevant to design and to assess protocols (*e.g.*, US parameters, MB and drug-related parameters, therapeutic schemes, *etc.*) for acoustically mediated delivery of therapeutic molecules of different molecular weights in a pathophysiological context close to that encountered *in vivo*.

■ CONCLUSIONS

In summary, the present results suggest that MB-assisted US enhanced the therapeutic efficacy of bleomycin on CRC spheroids but not those of doxorubicin and irinotecan. Nevertheless, further improvements are required to potentiate their therapeutic efficacies. The exploitation of tumor spheroids should be a complementary approach to design and validate innovative protocols for acoustically mediated drug delivery.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

Sophie Serrière − *UMR 1253, iBrain, Université de Tours, Inserm, 37032 Tours, France; Département d'Imagerie Préclinique, Plateforme Scientifique et Technique Analyse des Systèmes Biologiques, Université de Tours, 37032 Tours, France*; Phone: +33(0)247366343; Email: sophie.serriere@univ-tours.fr

Jean-Michel Escoffre − *UMR 1253, iBrain, Université de Tours, Inserm, 37032 Tours, France*; orcid.org/0000-0003-1041-6950; Phone: +33(0)247366191; Email: jean-michel.escoffre@univ-tours.fr

https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.3c00921
Mol. Pharmaceutics 2024, 21, 831−844

Authors

Marie Roy − *UMR 1253, iBrain, Université de Tours, Inserm, 37032 Tours, France*

Corentin Alix − *UMR 1253, iBrain, Université de Tours, Inserm, 37032 Tours, France*

Julien Burlaud-Gaillard − *Inserm U1259, Université de Tours et CHRU de Tours & Plateforme IBiSA des Microscopies, PPF ASB, CHRU de Tours, 37032 Tours, France*

Damien Fouan − *UMR 1253, iBrain, Université de Tours, Inserm, 37032 Tours, France*

William Raoul − *Inserm UMR 1069, Nutrition Croissance et Cancer (N2C), Université de Tours, 37032 Tours, France*

Ayache Bouakaz − *UMR 1253, iBrain, Université de Tours, Inserm, 37032 Tours, France*

Emmanuelle Blanchard − *Inserm U1259, Université de Tours et CHRU de Tours & Plateforme IBiSA des Microscopies, PPF ASB, CHRU de Tours, 37032 Tours, France*

Thierry Lecomte − *Inserm UMR 1069, Nutrition Croissance et Cancer (N2C), Université de Tours, 37032 Tours, France; Department of Hepato-Gastroenterology & Digestive Oncology, CHRU de Tours, 37000 Tours, France*

Marie-Claude Viaud-Massuard − *UMR 1100, Centre D'Etude Des Pathologies Respiratoires, Université de Tours, Inserm, 37032 Tours, France*

Noboru Sasaki − *Laboratory of Veterinary Internal Medicine, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University, 060-0818 Sapporo, Japan*

Complete contact information is available at: https://pubs.acs.org/10.1021/acs.molpharmaceut.3c00921

Author Contributions

○S.S. and J.M.E. contributed equally to this work. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Funding

This work was supported, in part, by Inserm, Université de Tours and Ligue Contre le Cancer (S.S., J.M.E.). M.R. was the recipient of a Ph.D. fellowship from the Region Centre-Val de Loire.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge J.Y. Tartu (UMR 1253, iBrain, Université de Tours, Inserm, Tours, France) for the design of ultrasound setup, Dr. Virginie André (Regional Center of Cancerology, Henry Kaplan, CHRU de Tours, Tours, France) for providing the irinotecan, and the Electron Microscopy (EM) Facility (IBiSA) of Tours University (http://microscopies.med.univ-tours.fr) for technical support.

■ ABBREVIATIONS

2D, two-dimensional; 3D, three-dimensional; CRC spheroid, colorectal cancer spheroid; DPBS, Dulbecco's phosphate-buffered saline solution; FCS, fetal calf serum; MB-assisted US, microbubble-assisted ultrasound; MBs, microbubbles; PI, propidium iodide; PNP, peak negative pressure; PRP, pulse repetition period; SEM, mean standard deviation; TEM, transmission electron microscopy; ULA, ultralow attachment; US, ultrasound

■ REFERENCES

(1) Roy, M.; Alix, C.; Bouakaz, A.; Serrière, S.; Escoffre, J.-M. Tumor Spheroids as Model to Design Acoustically Mediated Drug Therapies: A Review. *Pharmaceutics* **2023**, *15*, No. 806.

(2) Torisawa, Y.-S.; Takagi, A.; Shiku, H.; Yasukawa, T.; Matsue, T. A Multicellular Spheroid-Based Drug Sensitivity Test by Scanning Electrochemical Microscopy. *Oncol. Rep.* **2005**, *13*, 1107−1112.

(3) Ward, J. P.; King, J. R. Mathematical Modelling of Drug Transport in Tumour Multicell Spheroids and Monolayer Cultures. *Math. Biosci.* **2003**, *181*, 177−207.

(4) Curcio, E.; Salerno, S.; Barbieri, G.; De Bartolo, L.; Drioli, E.; Bader, A. Mass Transfer and Metabolic Reactions in Hepatocyte Spheroids Cultured in Rotating Wall Gas-Permeable Membrane System. *Biomaterials* **2007**, *28*, 5487−5497.

(5) Browning, A. P.; Sharp, J. A.; Murphy, R. J.; Gunasingh, G.; Lawson, B.; Burrage, K.; Haass, N. K.; Simpson, M. Quantitative Analysis of Tumour Spheroid Structure. *eLife* **2021**, *10*, No. e73020.

(6) Pampaloni, F.; Reynaud, E. G.; Stelzer, E. H. K. The Third Dimension Bridges the Gap between Cell Culture and Live Tissue. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 839−845.

(7) Pu, C.; Chang, S.; Sun, J.; Zhu, S.; Liu, H.; Zhu, Y.; Wang, Z.; Xu, R. X. Ultrasound-Mediated Destruction of LHRHa Targeted and Paclitaxel Loaded Lipid Microbubbles for the Treatment of Intraperitoneal Ovarian Cancer Xenografts. *Mol. Pharmaceutics* **2014**, *11*, 49−58.

(8) 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. Pharmaceutics* **2015**, *12*, 3137−3145.

(9) Okunaga, S.; Takasu, A.; Meshii, N.; Imai, T.; Hamada, M.; Iwai, S.; Yura, Y. Ultrasound as a Method to Enhance Antitumor Ability of Oncolytic Herpes Simplex Virus for Head and Neck Cancer. *Cancer Gene Ther.* **2015**, *22*, 163−168.

(10) Sun, L.; Zhang, J.; Xu, M.; Zhang, L.; Tang, Q.; Chen, J.; Gong, M.; Sun, S.; Ge, H.; Wang, S.; et al. Ultrasound Microbubbles Mediated Sonosensitizer and Antibody Co-Delivery for Highly Efficient Synergistic Therapy on HER2-Positive Gastric Cancer. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2022**, *14*, 452−463.

(11) Kooiman, K.; Roovers, S.; Langeveld, S. A. G.; Kleven, R. T.; Dewitte, H.; O'Reilly, M. A.; Escoffre, J.-M.; Bouakaz, A.; Verweij, M. D.; Hynynen, K.; et al. Ultrasound-Responsive Cavitation Nuclei for Therapy and Drug Delivery. *Ultrasound Med. Biol.* **2020**, *46*, 1296−1325.

(12) Escoffre, J.-M.; Bouakaz, A. Minireview: Biophysical Mechanisms of Cell Membrane Sonopermeabilization. Knowns and Unknowns. *Langmuir* **2019**, *35*, 10151−10165.

(13) Lentacker, I.; De Cock, I.; Deckers, R.; De Smedt, S. C.; Moonen, C. T. W. Understanding Ultrasound Induced Sonoporation: Definitions and Underlying Mechanisms. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2014**, *72*, 49−64.

(14) Snipstad, S.; Vikedal, K.; Maardalen, M.; Kurbatskaya, A.; Sulheim, E.; Davies, C. de L. Ultrasound and Microbubbles to Beat Barriers in Tumors: Improving Delivery of Nanomedicine. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2021**, *177*, No. 113847.

(15) Misra, R.; Rajic, M.; Sathiyamoorthy, K.; Karshafian, R. Ultrasound and Microbubbles (USMB) Potentiated Doxorubicin Penetration and Distribution in 3D Breast Tumour Spheroids. *J. Drug Delivery Sci. Technol.* **2021**, *61*, No. 102261.

(16) Roovers, S.; Deprez, J.; Priwitaningrum, D.; Lajoinie, G.; Rivron, N.; Declercq, H.; De Wever, O.; Stride, E.; Le Gac, S.; Versluis, M.; et al. Sonoprinting Liposomes on Tumor Spheroids by Microbubbles and Ultrasound. *J. Controlled Release* **2019**, *316*, 79−92.

(17) Dominijanni, A.; Devarasetty, M.; Soker, S. Manipulating the Tumor Microenvironment in Tumor Organoids Induces Phenotypic Changes and Chemoresistance. *iScience* **2020**, *23*, No. 101851.

(18) Shi, W.; Kwon, J.; Huang, Y.; Tan, J.; Uhl, C. G.; He, R.; Zhou, C.; Liu, Y. Facile Tumor Spheroids Formation in Large Quantity with Controllable Size and High Uniformity. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, No. 6837.

(19) Griseti, E.; Kolosnjaj-Tabi, J.; Gibot, L.; Fourquaux, I.; Rols, M.-P.; Yousfi, M.; Merbahi, N.; Golzio, M. Pulsed Electric Field Treatment Enhances the Cytotoxicity of Plasma-Activated Liquids in a Three-Dimensional Human Colorectal Cancer Cell Model. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, No. 7583.
(20) Escoffre, J.-M.; Novell, A.; Serrière, S.; Lecomte, T.; Bouakaz, A. Irinotecan Delivery by Microbubble-Assisted Ultrasound: In Vitro Validation and a Pilot Preclinical Study. *Mol. Pharmaceutics* **2013**, *10*, 2667−2675.
(21) Bressand, D.; Novell, A.; Girault, A.; Raoul, W.; Fromont-Hankard, G.; Escoffre, J.-M.; Lecomte, T.; Bouakaz, A. Enhancing Nab-Paclitaxel Delivery Using Microbubble-Assisted Ultrasound in a Pancreatic Cancer Model. *Mol. Pharmaceutics* **2019**, *16*, 3814−3822.
(22) Escoffre, J. M.; Piron, J.; Novell, A.; Bouakaz, A. Doxorubicin Delivery into Tumor Cells with Ultrasound and Microbubbles. *Mol. Pharmaceutics* **2011**, *8*, 799−806.
(23) 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., Ferroelect. Freq. Control* **2013**, *60*, 46−52.
(24) Wang, M.; Zhang, Y.; Cai, C.; Tu, J.; Guo, X.; Zhang, D. Sonoporation-Induced Cell Membrane Permeabilization and Cytoskeleton Disassembly at Varied Acoustic and Microbubble-Cell Parameters. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, No. 3885.
(25) Potočnik, T.; Miklavčič, D.; Maček Lebar, A. Effect of Electroporation and Recovery Medium pH on Cell Membrane Permeabilization, Cell Survival and Gene Transfer Efficiency in Vitro. *Bioelectrochemistry* **2019**, *130*, No. 107342.
(26) Escoffre, J.-M.; Portet, T.; Favard, C.; Teissié, J.; Dean, D. S.; Rols, M.-P. Electromediated Formation of DNA Complexes with Cell Membranes and Its Consequences for Gene Delivery. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2011**, *1808*, 1538−1543.
(27) Memari, E.; Hui, F.; Yusefi, H.; Helfield, B. Fluid Flow Influences Ultrasound-Assisted Endothelial Membrane Permeabilization and Calcium Flux. *J. Controlled Release* **2023**, *358*, 333−344.
(28) Lacroix-Lamandé, S.; Bernardi, O.; Pezier, T.; Barilleau, E.; Burlaud-Gaillard, J.; Gagneux, A.; Velge, P.; Wiedemann, A. Differential Salmonella Typhimurium Intracellular Replication and Host Cell Responses in Caecal and Ileal Organoids Derived from Chicken. *Vet. Res.* **2023**, *54*, No. 63.
(29) Meijering, B. D. M.; Henning, R. H.; Van Gilst, W. H.; Gavrilovic, I.; Van Wamel, A.; Deelman, L. E. Optimization of Ultrasound and Microbubbles Targeted Gene Delivery to Cultured Primary Endothelial Cells. *J. Drug Targeting* **2007**, *15*, 664−671.
(30) Keller, S.; Bruce, M.; Averkiou, M. A. Ultrasound Imaging of Microbubble Activity During Sonoporation Pulse Sequences. *Ultrasound Med. Biol.* **2019**, *45*, 833−845.
(31) Eck, M.; Aronovich, R.; Ilovitsh, T. Efficacy Optimization of Low Frequency Microbubble-Mediated Sonoporation as a Drug Delivery Platform to Cancer Cells. *Int. J. Pharm.: X* **2022**, *4*, No. 100132.
(32) Kotopoulis, S.; Popa, M.; Mayoral Safont, M.; Murvold, E.; Haugse, R.; Langer, A.; Dimcevski, G.; Lam, C.; Bjånes, T.; Gilja, O. H.; et al. SonoVue vs. Sonazoid vs. Optison™: Which Bubble Is Best for Low-Intensity Sonoporation of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma? *Pharmaceutics* **2022**, *14*, No. 98.
(33) Wang, G.; Zhuo, Z.; Xia, H.; Zhang, Y.; He, Y.; Tan, W.; Gao, Y. Investigation into the Impact of Diagnostic Ultrasound with Microbubbles on the Capillary Permeability of Rat Hepatomas. *Ultrasound Med. Biol.* **2013**, *39*, 628−637.
(34) Pascal, A.; Li, N.; Lechtenberg, K. J.; Rosenberg, J.; Airan, R. D.; James, M. L.; Bouley, D. M.; Pauly, K. B. Histologic Evaluation of Activation of Acute Inflammatory Response in a Mouse Model Following Ultrasound-Mediated Blood-Brain Barrier Using Different Acoustic Pressures and Microbubble Doses. *Nanotheranostics* **2020**, *4*, 210−223.
(35) Paškevičiūtė, M.; Januškevičienė, I.; Sakalauskienė, K.; Raišutis, R.; Petrikaitė, V. Evaluation of Low-Intensity Pulsed Ultrasound on Doxorubicin Delivery in 2D and 3D Cancer Cell Cultures. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, No. 16161.
(36) Mehier-Humbert, S.; Bettinger, T.; Yan, F.; Guy, R. H. Plasma Membrane Poration Induced by Ultrasound Exposure: Implication for Drug Delivery. *J. Controlled Release* **2005**, *104*, 213−222.
(37) Meijering, B. D. M.; Juffermans, L. J. M.; van Wamel, A.; Henning, R. H.; Zuhorn, I. S.; Emmer, M.; Versteilen, A. M. G.; Paulus, W. J.; van Gilst, W. H.; Kooiman, K.; et al. Ultrasound and Microbubble-Targeted Delivery of Macromolecules Is Regulated by Induction of Endocytosis and Pore Formation. *Circ. Res.* **2009**, *104*, 679−687.
(38) Pron, G.; Mahrour, N.; Orlowski, S.; Tounekti, O.; Poddevin, B.; Belehradek, J.; Mir, L. M. Internalisation of the Bleomycin Molecules Responsible for Bleomycin Toxicity: A Receptor-Mediated Endocytosis Mechanism. *Biochem. Pharmacol.* **1999**, *57*, 45−56.
(39) 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*, No. e0185293.
(40) Sonoda, S.; Tachibana, K.; Uchino, E.; Yamashita, T.; Sakoda, K.; Sonoda, K.-H.; Hisatomi, T.; Izumi, Y.; Sakamoto, T. Inhibition of Melanoma by Ultrasound-Microbubble-Aided Drug Delivery Suggests Membrane Permeabilization. *Cancer Biol. Ther.* **2007**, *6*, 1276−1283.
(41) Lamanauskas, N.; Novell, A.; Escoffre, J.-M.; Venslauskas, M.; Satkauskas, S.; Bouakaz, A. Bleomycin Delivery into Cancer Cells in Vitro with Ultrasound and SonoVue or BR14 Microbubbles. *J. Drug Target* **2013**, *21*, 407−414.
(42) Lu, T.; Haemmerich, D.; Liu, H.; Seynhaeve, A. L. B.; van Rhoon, G. C.; Houtsmuller, A. B.; ten Hagen, T. L. M. Externally Triggered Smart Drug Delivery System Encapsulating Idarubicin Shows Superior Kinetics and Enhances Tumoral Drug Uptake and Response. *Theranostics* **2021**, *11*, 5700−5712.
(43) Gallois, L.; Fiallo, M.; Garnier-Suillerot, A. Comparison of the Interaction of Doxorubicin, Daunorubicin, Idarubicin and Idarubicinol with Large Unilamellar Vesicles: Circular Dichroism Study. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1998**, *1370*, 31−40.
(44) Xing, J.; Zhang, X.; Wang, Z.; Zhang, H.; Chen, P.; Zhou, G.; Sun, C.; Gu, N.; Ji, M. Novel Lipophilic SN38 Prodrug Forming Stable Liposomes for Colorectal Carcinoma Therapy. *Int. J. Nanomed.* **2019**, *14*, 5201−5213.
(45) Beccaria, K.; Canney, M.; Goldwirt, L.; Fernandez, C.; Piquet, J.; Perier, M.-C.; Lafon, C.; Chapelon, J.-Y.; Carpentier, A. Ultrasound-Induced Opening of the Blood-Brain Barrier to Enhance Temozolomide and Irinotecan Delivery: An Experimental Study in Rabbits. *J. Neurosurg.* **2016**, *124*, 1602−1610.
(46) Kovacs, Z.; Werner, B.; Rassi, A.; Sass, J. O.; Martin-Fiori, E.; Bernasconi, M. Prolonged Survival upon Ultrasound-Enhanced Doxorubicin Delivery in Two Syngenic Glioblastoma Mouse Models. *J. Controlled Release* **2014**, *187*, 74−82.
(47) Lee, N. G.; Berry, J. L.; Lee, T. C.; Wang, A. T.; Honowitz, S.; Murphree, A. L.; Varshney, N.; Hinton, D. R.; Fawzi, A. A. Sonoporation Enhances Chemotherapeutic Efficacy in Retinoblastoma Cells In Vitro. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* **2011**, *52*, 3868−3873.
(48) Yang, S.; Wang, P.; Wang, X.; Su, X.; Liu, Q. Activation of Microbubbles by Low-Level Therapeutic Ultrasound Enhances the Antitumor Effects of Doxorubicin. *Eur. Radiol.* **2014**, *24*, 2739−2753.
(49) Bourn, M. D.; Batchelor, D. V. B.; Ingram, N.; McLaughlan, J. R.; Coletta, P. L.; Evans, S. D.; Peyman, S. A. High-Throughput Microfluidics for Evaluating Microbubble Enhanced Delivery of Cancer Therapeutics in Spheroid Cultures. *J. Controlled Release* **2020**, *326*, 13−24.
(50) Leenhardt, R.; Camus, M.; Mestas, J. L.; Jeljeli, M.; Abou Ali, E.; Chouzenoux, S.; Bordacahar, B.; Nicco, C.; Batteux, F.; Lafon, C.; Prat, F. Ultrasound-Induced Cavitation Enhances the Efficacy of Chemotherapy in a 3D Model of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma with Its Microenvironment. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, No. 18916.

(51) Lee, J.-H.; Kim, S.-K.; Khawar, I. A.; Jeong, S.-Y.; Chung, S.; Kuh, H.-J. Microfluidic Co-Culture of Pancreatic Tumor Spheroids with Stellate Cells as a Novel 3D Model for Investigation of Stroma-Mediated Cell Motility and Drug Resistance. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2018**, *37*, No. 4.
(52) Park, J. H.; Lee, S.; Jeon, H.; Kim, J. H.; Kim, D. J.; Im, M.; Lee, B. C. A Novel Convex Acoustic Lens-Attached Ultrasound Drug Delivery System and Its Testing in a Murine Melanoma Subcutaneous Model. *Int. J. Pharm.* **2023**, *642*, No. 123118.
(53) Feng, S.; Qiao, W.; Tang, J.; Yu, Y.; Gao, S.; Liu, Z.; Zhu, X. Chemotherapy Augmentation Using Low-Intensity Ultrasound Combined with Microbubbles with Different Mechanical Indexes in a Pancreatic Cancer Model. *Ultrasound Med. Biol.* **2021**, *47*, 3221−3230.
(54) Lee, J. H.; Moon, H.; Han, H.; Lee, I. J.; Kim, D.; Lee, H. J.; Ha, S.-W.; Kim, H.; Chung, J. W. Antitumor Effects of Intra-Arterial Delivery of Albumin-Doxorubicin Nanoparticle Conjugated Microbubbles Combined with Ultrasound-Targeted Microbubble Activation on VX2 Rabbit Liver Tumors. *Cancers* **2019**, *11*, No. 581.
(55) Yu, F. T. H.; Chen, X.; Wang, J.; Qin, B.; Villanueva, F. S. Low Intensity Ultrasound Mediated Liposomal Doxorubicin Delivery Using Polymer Microbubbles. *Mol. Pharmaceutics* **2016**, *13*, 55−64.
(56) Treat, L. H.; McDannold, N.; Zhang, Y.; Vykhodtseva, N.; Hynynen, K. Improved Anti-Tumor Effect of Liposomal Doxorubicin after Targeted Blood-Brain Barrier Disruption by MRI-Guided Focused Ultrasound in Rat Glioma. *Ultrasound Med. Biol.* **2012**, *38*, 1716−1725.
(57) McDannold, N.; Zhang, Y.; Supko, J. G.; Power, C.; Sun, T.; Vykhodtseva, N.; Golby, A. J.; Reardon, D. A. Blood-Brain Barrier Disruption and Delivery of Irinotecan in a Rat Model Using a Clinical Transcranial MRI-Guided Focused Ultrasound System. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, No. 8766.
(58) Ingram, N.; McVeigh, L. E.; Abou-Saleh, R. H.; Maynard, J.; Peyman, S. A.; McLaughlan, J. R.; Fairclough, M.; Marston, G.; Valleley, E. M. A.; Jimenez-Macias, J. L.; et al. Ultrasound-Triggered Therapeutic Microbubbles Enhance the Efficacy of Cytotoxic Drugs by Increasing Circulation and Tumor Drug Accumulation and Limiting Bioavailability and Toxicity in Normal Tissues. *Theranostics* **2020**, *10*, 10973−10992.
(59) Charalambous, A.; Mico, V.; McVeigh, L. E.; Marston, G.; Ingram, N.; Volpato, M.; Peyman, S. A.; McLaughlan, J. R.; Wierzbicki, A.; Loadman, P. M.; et al. Targeted Microbubbles Carrying Lipid-Oil-Nanodroplets for Ultrasound-Triggered Delivery of the Hydrophobic Drug, Combretastatin A4. *Nanomedicine* **2021**, *36*, No. 102401.
(60) Gao, J.; Logan, K. A.; Nesbitt, H.; Callan, B.; McKaig, T.; Taylor, M.; Love, M.; McHale, A. P.; Griffith, D. M.; Callan, J. F. A Single Microbubble Formulation Carrying 5-Fluorouridine, Irinotecan and Oxaliplatin to Enable FOLFIRINOX Treatment of Pancreatic and Colon Cancer Using Ultrasound Targeted Microbubble Destruction. *J. Controlled Release* **2021**, *338*, 358−366.
(61) Ahn, J.; Kim, D.-H.; Koo, D.-J.; Lim, J.; Park, T.-E.; Lee, J.; Ko, J.; Kim, S.; Kim, M.; Kang, K.-S.; et al. 3D Microengineered Vascularized Tumor Spheroids for Drug Delivery and Efficacy Testing. *Acta Biomater.* **2023**, *165*, 153−167.
(62) Hu, Z.; Cao, Y.; Galan, E. A.; Hao, L.; Zhao, H.; Tang, J.; Sang, G.; Wang, H.; Xu, B.; Ma, S. Vascularized Tumor Spheroid-on-a-Chip Model Verifies Synergistic Vasoprotective and Chemotherapeutic Effects. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2022**, *8*, 1215−1225.
(63) Crystal, A. S.; Shaw, A. T.; Sequist, L. V.; Friboulet, L.; Niederst, M. J.; Lockerman, E. L.; Frias, R. L.; Gainor, J. F.; Amzallag, A.; Greninger, P.; et al. Patient-Derived Models of Acquired Resistance Can Identify Effective Drug Combinations for Cancer. *Science* **2014**, *346*, 1480−1486.

https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.3c00921
Mol. Pharmaceutics 2024, 21, 831−844

IV.III. Synthèse

Notre première étude démontre que l'efficacité de la perméabilisation de ces sphéroïdes augmente avec la pression acoustique pour atteindre une efficacité maximale à 400 kPa. D'autre part, il est intéressant de noter que les concentrations en MBs testées (2.10^7, 4.10^7 ou 8.10^7 MB/mL) n'influencent pas significativement l'efficacité de la perméabilisation des sphéroïdes. La sonoporation n'induit aucun effet délétère sur la croissance et la viabilité des sphéroïdes, quelle que soit la pression acoustique ou la concentration de MBs testées. Des études complémentaires sont nécessaires pour explorer les effets d'une gamme plus étendue de concentrations de MBs mais aussi l'influence des autres paramètres acoustiques tels que la fréquence de répétition des impulsions ultrasonores, le rapport cyclique ou encore la durée d'exposition aux ultrasons sur la perméabilisation des sphéroïdes.

La microscopie confocale à fluorescence a révélé que les cellules perméabilisées étaient principalement localisées dans la couche périphérique des sphéroïdes. De plus, l'analyse histologique des sphéroïdes après sonoporation a montré des perturbations significatives au niveau des couches cellulaires périphériques. En effet, les jonctions intercellulaires apparaissent moins cohésives comparativement aux sphéroïdes contrôles (non sonoporés) (37 ± 2 % *vs* 12 ± 2 %). Ces observations ont été confirmées par l'analyse des sphéroïdes en microscopie électronique à transmission. Une modification de la morphologie des cellules de la couche externe du sphéroïde est observée, ainsi que l'apparition de larges espaces intercellulaires. L'ensemble de ces résultats suggère que la sonoporation affecte la structure des sphéroïdes et principalement les couches cellulaires périphériques, sans atteindre les couches intermédiaires ni le centre du sphéroïde.

Enfin, l'efficacité de la délivrance de trois molécules chimiothérapeutiques, dont la bléomycine (0,1 µM et 1 µM), la Dox (1 µM et 10 µM) et l'irinotécan (0,1 µg/mL et 1 µg/mL) par sonoporation (400 kPa ; 4.10^7 MB/mL) a été étudiée sur nos sphéroïdes. La délivrance de la bléomycine par sonoporation à 0,1 µM a entraîné une réduction significative de la croissance des sphéroïdes, proche de celle obtenue avec un traitement à la bléomycine seule à 1 µM. De plus, le traitement à 1 µM de bléomycine par sonoporation a complètement inhibé la croissance des sphéroïdes. Le test de viabilité cellulaire a confirmé ces résultats. Étonnamment, la sonoporation n'a pas potentialisé l'efficacité thérapeutique de la Dox et de l'irinotécan sur les sphéroïdes de CCR. La première hypothèse, qui pourrait expliquer ces résultats, repose sur les propriétés intrinsèques de ces molécules, comme leur poids moléculaire, leur hydrophobicité

ou encore leur mécanisme d'entrée dans la cellule. En effet, la Dox et l'irinotécan sont des molécules lipophiles, de faible poids moléculaire (< 600 Da) qui pénètrent dans les cellules par diffusion passive, contrairement à la bléomycine (> 1400 Da) qui interagit avec un récepteur membranaire afin d'être internalisée par endocytose. Par conséquent, dans nos conditions expérimentales, il semblerait qu'augmenter la pénétration cellulaire et l'efficacité de la Dox et de l'irinotécan par sonoporation soient limitées étant donné que ces molécules pénètrent déjà efficacement dans les cellules. En revanche, l'internalisation de la bléomycine dans les cellules nécessite l'interaction avec un récepteur membranaire qui est peu exprimé à la surface des cellules tumorales, limitant considérablement son efficacité. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que la sonoporation favoriserait l'internalisation de la bléomycine dans les cellules, expliquant ainsi l'augmentation de l'efficacité thérapeutique de la bléomycine délivrée par sonoporation dans les sphéroïdes contrairement à l'irinotécan et la Dox.

Misra *et al.,* ont démontré que la sonoporation augmente l'accumulation intracellulaire de la Dox dans un modèle de sphéroïde de cancer du sein (MDA-MB-231) (Misra *et al.,* 2021). Cependant, ces résultats ne sont pas associés à une inhibition significative de la croissance des sphéroïdes par rapport au traitement à la Dox seule. Dans cette étude, l'utilisation d'une concentration élevée de Dox de 50 µM pourrait expliquer ces résultats. En effet, Bourn *et al.,* ont décrit une corrélation positive entre une augmentation de l'internalisation intracellulaire de la Dox dans des sphéroïdes multicellulaires CCR/fibroblastes (HCT-116/HFFF2) et une diminution de leur viabilité, après la délivrance par sonoporation de la Dox à une concentration de 3 µM (Bourn *et al.,* 2020). Cependant, la coculture de cellules tumorales avec des fibroblastes peut réduire la sensibilité des cellules tumorales aux molécules thérapeutiques, ce qui pourrait expliquer que Bourn *et al.,* aient pu améliorer l'efficacité thérapeutique de la Dox sur leurs sphéroïdes. Dans notre étude, nous n'avons pas réussi à améliorer, par sonoporation, les effets cytotoxiques de faible concentration de Dox sur les sphéroïdes, suggérant que les cellules HCT-116 seraient très sensibles à la Dox seule. Pour confirmer ces hypothèses, il serait intéressant de reproduire nos expérimentations sur des sphéroïdes multicellulaires composés de cellules de CCR et de fibroblastes.

Actuellement, aucune étude n'a exploré l'efficacité de la sonoporation à améliorer la délivrance de l'irinotécan sous sa forme libre dans un modèle de sphéroïdes de CCR. En effet, Gao *et al.,* ont démontré l'efficacité de la délivrance d'irinotécan encapsulé dans des MBs par sonoporation sur des sphéroïdes de cancer pancréatique (Gao *et al.,* 2021). L'intérêt d'encapsuler les molécules chimiothérapeutiques est de diminuer leur accumulation non

spécifique dans les tissus sains afin d'en diminuer les effets secondaires. Par conséquent, cette formulation limite la cytotoxicité de l'irinotécan et pourrait expliquer que Gao *et al.,* ont potentialisé les effets de l'irinotécan par sonoporation. En effet, les ultrasons permettent le relargage de l'irinotécan de la MB tout en perméabilisant les membranes cellulaires.

En conclusion, notre étude a mis en évidence l'intérêt d'exploiter des sphéroïdes tumoraux pour évaluer des protocoles de délivrance de molécules thérapeutiques par sonoporation. Pour des recherches ultérieures, il serait pertinent de 1) complexifier notre modèle de sphéroïde soit en réalisant des sphéroïdes multicellulaires composés de cellules de CCR et de fibroblastes, soit en formant des sphéroïdes à partir des cellules tumorales issues de biopsies de tumeurs de patients ; 2) évaluer l'efficacité de la délivrance de formulations cliniques de Dox et d'irinotécan par sonoporation.

Chapitre V. Délivrance de molécules thérapeutiques par sonoporation dans un modèle murin de métastases hépatiques de cancer colorectal

Chapitre V. Délivrance de molécules thérapeutiques par sonoporation dans un modèle murin de métastases hépatiques de cancer colorectal

V.I. Les modèles murins de métastases hépatiques de cancer colorectal

Les modèles murins de CCR permettent d'étudier sa physiopathologie, d'identifier des biomarqueurs de diagnostic, de pronostic et des cibles thérapeutiques, et de développer et d'évaluer des outils diagnostiques et des thérapies. En thérapie, ils sont utilisés pour évaluer les propriétés pharmacologiques (*i.e.,* pharmacocinétique, biodistribution, pharmacodynamie) et l'innocuité des médicaments, et pour développer des schémas thérapeutiques (*i.e.,* fréquence des traitements, durée du traitement, *etc.*) (Bürtin *et al.,* 2020; Céspedes *et al.,* 2006; Heijstek *et al.,* 2005). Différentes souches de souris sont alors exploitées pour développer des modèles murins immunocompétents (C57Bl6, Balb/c) ou immunodéficients (SCID, Nude) de CCR (de Jong *et al.,* 2009). Ces différents modèles sont classés en fonction de la nature des cellules tumorales utilisées (lignées cellulaires murines ou humaines, cellules issues d'une tumeur de patient), du site d'implantation de la tumeur (orthotopique ou ectopique) et du processus d'induction tumorale (transgénique, chimio-induite) (Bürtin *et al.,* 2020; Céspedes *et al.,* 2006).

Si les cellules de CCR implantées sont de la même espèce que l'hôte, alors le modèle sera qualifié de « modèle syngénique » par opposition aux modèles xénogéniques où dans ce cas les cellules greffées proviennent d'une autre espèce. Le principal avantage des modèles syngéniques est la présence de leur système immunitaire qui permet d'étudier le rôle de ce dernier dans l'efficacité thérapeutique des divers traitements anti-cancéreux, et d'évaluer l'efficacité et l'innocuité d'immunothérapies et des vaccins (Pothuraju *et al.,* 2024). Cependant, ces modèles murins présentent une physiopathologie tumorale, qui est parfois loin de refléter celle rencontrée dans les tumeurs humaines (McIntyre *et al.,* 2015). Dans les modèles xénogéniques, l'animal utilisé est immunodéficient afin de permettre le développement d'une tumeur d'une autre espèce. Dans ce cas, les cellules de CCR proviennent généralement de lignées cellulaires tumorales humaines (*e.g.,* HT-29, HCT-116, *etc.*) ou de cellules tumorales prélevées sur un patient (Neto *et al.,* 2023).

Le second critère de classification des modèles murins repose sur le site d'implantation ou de développement de la tumeur. La greffe est qualifiée d'orthotopique si la tumeur est implantée sur le site de développement de la tumeur d'origine (*e.g.,* côlon, rectum) et d'ectopique si le site d'implantation est différent de celui de la tumeur d'origine (*e.g.,* peau, foie, *etc.*). En effet,

les modèles les plus utilisés sont les modèles murins de xénogreffes sous-cutanées (xénogénique et ectopique), ce qui correspond à l'implantation de cellules humaines de CCR en sous-cutanée chez la souris (Pothuraju *et al.*, 2024). Ces modèles présentent un avantage certain dans la facilité et la rapidité d'implantation de la tumeur. Ce modèle permet un suivi facilité du développement tumoral par mesure de la croissance tumorale à l'aide d'un pied à coulisse ou par échographie. La principale limitation de ce modèle est son microenvironnement tumoral, qui est souvent peu représentatif du microenvironnement d'origine (Oliveira *et al.*, 2020). En effet, dans ce modèle, la tumeur se développe dans un microenvironnement différent du tissu d'origine. A l'inverse, les greffes orthotopiques permettent de suivre l'évolution des tumeurs au niveau de leur organe d'origine. Mais, ce suivi requiert l'utilisation de modalités d'imagerie (*e.g.*, IRM, scanner X, échographie, TEP au ^{18}F-FDG, *etc.*) (Oh *et al.*, 2017).

Concernant les modèles murins de métastases de CCR, différentes stratégies sont possibles, comme le développement de modèles génétiquement modifiés, de modèles de transplantation de lignées cellulaires humaines ou murines, des xénogreffes de cellules issues de patients (PDX ; Patient Derived Xenograft) ou des xénogreffes d'organoïdes (PDOX ; Patient Derived Organoid Xenograft) (**Figure 13**) (Bouchalova and Bouchal, 2022; de Jong *et al.*, 2009; Heijstek *et al.*, 2005; Neto *et al.*, 2023; Oh *et al.*, 2017).

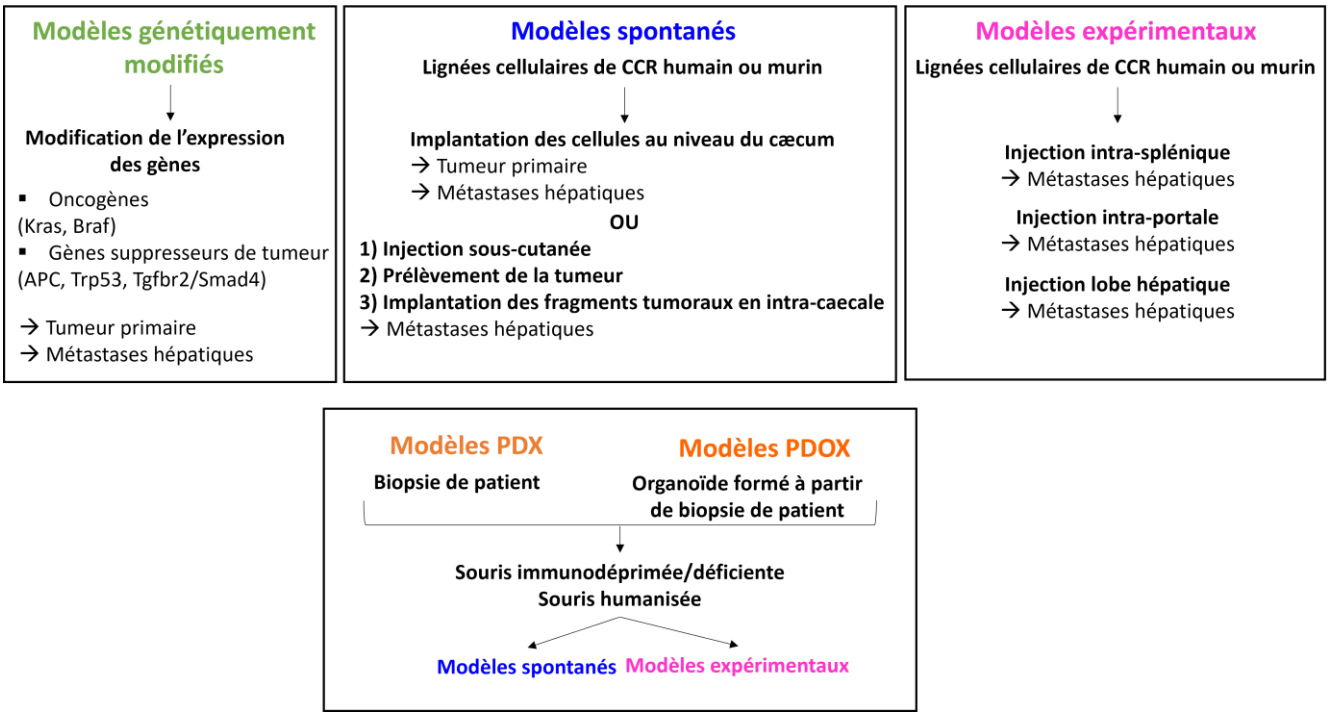


Figure 13. Principales méthodes pour la mise en place d'un modèle murin de métastases hépatiques de CCR.

I.1. Modèles spontanés de formation de métastases hépatiques de CCR

L'implantation de cellules de CCR ou de tissus directement dans le côlon et/ou dans le rectum (transplantation orthotopique) ou sous-cutanée (ectopique) est une technique couramment utilisée pour étudier le développement du CCR primaire et son processus métastatique. L'utilisation de lignées cellulaires humaines ou de tissus humains pour la transplantation nécessite l'utilisation de souris immunodéprimées ou immunodéficientes afin d'éviter le rejet des xénogreffes. Par exemple, les souris « nude » sont dépourvues de thymus, par conséquent elles ne produisent pas de lymphocytes T, ce qui permet d'éviter une réponse du système immunitaire contre les xénogreffes de cellules ou de tissus humains. Cependant, l'utilisation de souris immunodéficientes empêche l'évaluation de l'impact du système immunitaire sur le développement tumoral et métastatique, et sur l'efficacité des thérapies anti-cancéreuses. Si l'objectif est d'étudier la réponse immunitaire alors il est possible d'utiliser des cellules tumorales d'origine murine afin de les implanter chez des souris immunocompétentes.

Dans le cadre de la transplantation orthotopique, les cellules de CCR sont injectées directement dans la paroi colique, généralement au niveau du cæcum. Cette méthode permet le développement d'une tumeur primaire au site d'injection et l'apparition de métastases, principalement dans le foie. Les lignées cellulaires de CCR les plus couramment utilisées pour ces transplantations sont les cellules HCT-116 et HT-29, bien que d'autres lignées telles que les cellules SW480, SW620, LS174T et LoVo soient également utilisées (Oh *et al.*, 2017). Les tumeurs développées à la suite d'une transplantation orthotopique, présentent des caractéristiques histologiques, des profils d'expression génique, et un processus métastatique très proches de ceux observés chez les patients (Céspedes *et al.*, 2006). Par exemple, Kubota *et al.*, ont étudié le processus métastatique dans un modèle murin de xénogreffe orthotopique de cellules de CCR (Kubota, 1994). Tout d'abord, les cellules Co-3 ont été injectées en sous-cutané chez des souris nude. Lorsque les tumeurs étaient formées en sous-cutané, elles ont été prélevées et découpées en morceaux de 5-7 mm avant d'être implantées dans la séreuse du cæcum. Les résultats ont montré que toutes les souris présentaient une invasion de cellules tumorales dans les vaisseaux à proximité du site d'implantation et que 56 % des souris ont développé des métastases hépatiques. A travers cette étude, Kubota *et al.,* ont démontré la pertinence de l'utilisation de modèles orthotopiques pour modéliser l'ensemble du processus métastatique, allant de la croissance tumorale locale à l'invasion des vaisseaux sanguins et du réseau lymphatique, jusqu'à l'envahissement et la colonisation du site métastatique (Kubota, 1994). En revanche, l'implantation ectopique, qui consiste à injecter les cellules tumorales sous

la peau est peu efficace pour mener à la formation de métastases (Giavazzi *et al.*, 1986; Kubota, 1994).

L'utilisation de ces modèles de transplantation permet d'étudier toutes les étapes du développement tumoral, de reproduire le microenvironnement et l'hétérogénéité tumorale, et offre une meilleure prédiction des réponses thérapeutiques. Cependant, le taux de souris développant des métastases après l'implantation des cellules tumorales varie entre 0 et 75 % (de Jong *et al.*, 2009). Afin d'améliorer cette efficacité, une approche consiste à augmenter le potentiel métastatique des cellules en les implantant dans le cæcum ou en sous-cutané, puis en les prélevant et en les réimplantant sur une ou plusieurs générations (Sun *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2023). Cette méthode accroît la capacité des cellules à former des métastases. Le second point critique de cette méthode est l'injection intracæcale qui est un geste technique complexe, pouvant mener à la dispersion des cellules tumorales dans la lumière intestinale. De plus, le développement des métastases peut être long, nécessitant parfois la résection de la tumeur primaire pour permettre le développement des métastases tout en évitant la mort prématurée de l'animal due à la progression de la tumeur primaire (Lee *et al.*, 2014).

I.2. Modèles expérimentaux de métastases hépatiques de CCR

Les modèles expérimentaux d'induction de métastases hépatiques de CCR consistent à injecter directement les cellules tumorales dans la circulation sanguine, par voie intra-splénique ou via la veine porte. L'injection intra-splénique ou portale permet aux cellules tumorales d'atteindre directement la microcirculation hépatique. Par conséquent, les cellules tumorales subissent uniquement l'étape d'extravasation vers le parenchyme hépatique. À la suite d'une injection intra-splénique, il est souvent nécessaire de procéder à une ablation de la rate afin d'éviter le développement tumoral au niveau du site d'injection. Cette approche présente l'avantage d'un développement rapide de métastases avec un taux de développement de métastases relativement élevé allant de 30 à 100 % (de Jong *et al.*, 2009). De plus, cette méthode permet de cibler la colonisation des cellules tumorales dans le foie, tandis que les injections de cellules de CCR en i.v. via la veine caudale des souris mènent principalement au développement de métastases pulmonaires (Szabo *et al.*, 2015). Cependant, un inconvénient majeur de ce modèle intra-splénique est qu'il ne reproduit que les étapes d'extravasation et de colonisation du site

métastatique. En effet, les premières étapes du processus métastatique, telles que l'invasion locale au niveau du site primaire et les étapes d'intravasation ne sont pas représentées.

L'étude de Bae *et al.,* présente et compare deux méthodes d'établissement d'un modèle de métastases hépatiques de CCR chez la souris et met en évidence les avantages et inconvénients de chaque méthode (Bae *et al.,* 2020). Le premier groupe de souris est un modèle de métastases hépatiques établi après une injection intra-splénique de cellules HCT-116 (2.10^6 / 100 µL) de CCR (sans splénectomie) dans des souris nude. Le second groupe est un modèle de transplantation orthotopique. Pour cela, les cellules HCT-116 (5.10^6 / 200 µL) sont injectées en sous-cutané chez une première souris. Lorsque le volume tumoral atteint 1 cm^3 (environ 2 à 6 semaines après l'inoculation des cellules), la tumeur est prélevée puis coupée en morceaux d'environ 1 mm^3, avant d'être implantée au niveau du cæcum des souris. Les résultats ont montré que la durée d'observation avant que les animaux atteignent la cachexie était significativement différente entre les deux groupes. La durée moyenne d'observation était de 33 jours pour le modèle intra-splénique et de 41 jours pour le modèle de transplantation. Le nombre de souris présentant des métastases hépatiques était plus élevé pour le modèle intra-splénique comparativement au modèle de transplantation (10/13 *vs* 5/13). Le modèle intra-splénique a conduit à la formation d'une tumeur dans la rate, de métastases hépatiques, mais également d'une dissémination des cellules tumorales au niveau du péritoine (mésentère) et des parois intestinales. Concernant le modèle de transplantation, les tumeurs primaires localisées dans le côlon étaient très volumineuses, la dissémination des cellules tumorales a également atteint le péritoine (mésentère, intestin grêle), le foie et les poumons. Dans le modèle de transplantation, le processus d'invasion locale, observé par une analyse anatomopathologique, a démontré un envahissement des différentes couches comme la *muscularis propia*, la sous-muqueuse et muqueuse du côlon, de façon très similaire à ce qui est observé dans les CCR humains. Pour conclure, le modèle intra-splénique permet d'obtenir rapidement et efficacement un taux élevé (30 à 100 %) de souris développant des métastases hépatiques, comparativement au modèle de transplantation. Cependant, uniquement le modèle de transplantation permet de modéliser l'ensemble du processus métastatique, ainsi, le choix du modèle dépend de son application.

Han *et al.,* ont souhaité développer un modèle de métastases hépatiques de CCR en clampant la veine porte hépatique à différents endroits durant l'injection des cellules tumorales dans la rate afin de favoriser la colonisation sélective des cellules tumorales dans les différents lobes hépatiques (Han *et al.,* 2023). En effet, le pronostique et les approches chirurgicales peuvent

varier en fonction du lobe hépatique atteint chez les patients, par conséquent, ils ont proposé un modèle permettant d'étudier les caractéristiques du processus métastatique en fonction des différents lobes. Ils ont utilisé des souris mâles BALB/c et la lignée cellulaire CT26 de CCR transfectée avec un plasmide codant la GFP. Avant l'injection des cellules dans la rate, soit la branche droite de la veine porte hépatique, soit la branche milieu/gauche a été clampée. Ensuite, les cellules (4.10^6 cellules/mL ; 200 µL) ont été injectées dans la rate, suivie d'une splénectomie une minute après l'injection des cellules. Le clamp a été retiré une minute après l'ablation de la rate. Quatorze jours après la chirurgie, ils ont observé la formation de métastases dans tous les lobes sauf dans le lobe droit lorsque la branche droite de la veine porte hépatique avait été clampée durant l'injection des cellules. A l'inverse, pour les souris dont la branche centrale/gauche de la veine porte hépatique avait été clampée durant l'injection des cellules tumorales, les lobes droit et caudé présentaient des métastases mais pas les lobes gauche et médian. Cette approche chirurgicale a permis d'établir un modèle murin de métastases hépatiques de CCR pour étudier ensuite l'impact de la localisation des métastases dans les différents lobes hépatiques sur l'efficacité des traitements et de la chirurgie.

L'injection intra-hépatique de cellules CCR ou l'implantation de tissu tumoral dans le parenchyme hépatique permet de produire efficacement des métastases. En effet, Robinson *et al.,* ont utilisé cette méthode pour étudier les effets indésirables causés par la chimiothérapie FOLFOX (acide folinique, 5-flurouracil et oxaliplatine) sur le foie de souris présentant des métastases hépatiques (Robinson *et al.,* 2013). Les cellules de CCR murines MCA38, exprimant de manière stable la luciférase (Luc), ont été injectées (1.10^5 cellules) dans le lobe hépatique gauche de souris C57Bl/6. Après l'injection des cellules, une compression manuelle a été réalisée au niveau du site d'injection suivi par l'application de colle au butylcyanoacrylate. Les métastases hépatiques ont été traitées 5 jours après la chirurgie. Cette technique est intéressante car elle permet d'obtenir rapidement un modèle de métastases, de maîtriser leur nombre et leur localisation.

I.3. Modèles modifiés génétiquement

Les modèles de souris génétiquement modifiées de CCR (GEMM ; Genetically Engineered Mouse Models) consistent à modifier l'expression des gènes en activant des oncogènes (*KRAS, BRAF*) et/ou en inhibant des gènes suppresseurs de tumeur (*APC, TRP53, TGFBR2/SMAD4*) (Oh *et al.,* 2017). Ces modèles sont principalement utilisés pour étudier le rôle de mutations génétiques dans les processus de carcinogenèse et métastatique. Cependant, la plupart de ces

modèles sont représentatifs des formes héréditaires de CCR, représentant seulement 10-15 % des cas de CCR, et ne conduisent que très rarement à la formation de métastases. Hung *et al.*, ont développé un modèle de GEMM de CCR sporadique capable de mener au développement de métastases hépatiques (Hung *et al.*, 2010). Les auteurs ont utilisé la technique de recombinaison Cre-LoxP afin d'inhiber l'expression du gène suppresseur de tumeur *Apc* (Adenomatous polyposis coli) et d'activer l'expression de l'oncogène *Kras*. Ces modifications génétiques ont entrainé l'apparition soit d'adénomes (64 %) soit de carcinomes (36 %) environ 20 semaines après l'induction de la modification de l'expression des gènes *Apc* et *Kras*. La formation des métastases hépatiques a été observée 24 semaines après l'induction uniquement pour 20 % des souris. Ces modèles sont principalement utilisés pour étudier le rôle d'un gène dans la carcinogenèse et la progression tumorale. Ils permettent de reproduire fidèlement toutes les étapes du développement du CCR, avec des tumeurs génétiquement et histologiquement proches des tumeurs humaines. Cependant, leur principal inconvénient est que le développement des tumeurs primaires et des métastases est long et peu reproductible.

I.4. Modèles PDX (Patient-Derived Xenograft)

Les lignées cellulaires humaines ou murines couramment utilisées pour établir des modèles *in vivo* de CCR métastatique présentent de nombreux avantages comme leur facilité de culture, leur caractérisation précise et permettent de produire des modèles de manière reproductible. Cependant, ces lignées cellulaires ne sont pas représentatives de l'hétérogénéité tumorale. L'établissement de modèles de xénogreffes dérivées de tumeurs de patients permet de modéliser plus fidèlement les caractéristiques tumorales des patients (Inoue *et al.*, 2019; Surdez and Daudigeos-Dubus, 2016). Les modèles PDX de CCR consistent à implanter en sous-cutané ou dans le cæcum des fragments de biopsie de patient (Brown *et al.*, 2018; Jian *et al.*, 2020). Ces modèles impliquent l'utilisation de souris immunodéficientes, telles que les souris nude, SCID, et NOD/SCID (souris humanisée) (Saxena and Christofori, 2013). Les modèles PDX conservent les caractéristiques propres à la tumeur du patient, incluant une hétérogénéité cellulaire et génétique (Bertotti *et al.*, 2011; Cho *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2012). Ces modèles permettent d'effectuer des études génomiques et d'élaborer des traitements personnalisés (Abdolahi *et al.*, 2022; Jian *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2012). De plus, les PDX offrent la possibilité d'étudier l'initiation et la progression du CCR jusqu'au stade métastatique. Toutefois, l'efficacité du développement tumoral avec les PDX est parfois très faible (Brown *et al.*, 2016; Puig *et al.*, 2013). De plus, les modèles sous-cutanés de PDX développent rarement des métastases hépatiques (Brown *et al.*, 2016). Les modèles les plus couramment utilisés

impliquent une implantation orthotopique dans le cæcum. Par exemple, Puig *et al.,* ont développé un modèle PDX à partir de cellules tumorales prélevées sur 5 patients et injectées en intracæcale. Le taux de formation des métastases hépatiques était d'environ 27 %, représentatif du taux d'incidence relevé chez les patients (Puig *et al.,* 2013). Cependant, la mise en place des modèles PDX peut être longue, coûteuse et complexe. De plus, l'utilisation de souris immunodéficientes empêche l'étude de l'impact du système immunitaire sur la progression tumorale et l'efficacité des thérapies anti-cancéreuses. Ce point peut être partiellement amélioré par l'utilisation d'un modèle de souris humanisé. Pour cela, des souris, sévèrement immunodéprimées (NOD/SCID), reçoivent une greffe de cellules mononucléées du sang périphérique humain ou des cellules hématopoïétiques humaines leur conférant un système immunitaire humain fonctionnel (Abdolahi *et al.,* 2022).

I.5. Modèles PDOX (Patient-Derived Organoids Xenografts)

Des modèles murins de métastases hépatiques de CCR ont également été établis en implantant, directement dans la muqueuse du côlon ou du cæcum ou en injectant dans la rate, des organoïdes créés à partir de prélèvements de cellules tumorales chez les patients (Fujii *et al.,* 2016; Jian *et al.,* 2020; Neto *et al.,* 2023). Jian *et al.,* ont développé un modèle PDOX de métastases hépatiques de CCR afin d'étudier les caractéristiques communes entre les métastases hépatiques obtenues par xénogreffe et celles des patients donneurs (Jian *et al.,* 2020). Ils ont étudié et comparé les caractéristiques histologiques, génétiques, transcriptomiques ainsi que la réponse aux traitements anti-cancéreux. Le tissu tumoral de chaque patient a été cultivé *in vitro* afin d'obtenir des organoïdes. Ensuite, les organoïdes ont été re-suspendus dans du Matrigel® à une concentration de 1.10^5 cellules/mL puis 200 µL ont été injectés dans la rate de souris BALB/c. Les prélèvements provenaient de 12 patients dont 6 présentaient des métastases hépatiques. Les souris ont été sacrifiées 7 semaines après la transplantation afin de mener les différentes analyses. Les principaux résultats montrent que la culture d'organoïdes *in vitro* avant l'implantation *in vivo* permet de conserver l'hétérogénéité génétique de la tumeur d'origine tout en accélérant le processus métastatique par rapport aux modèles PDX (7 semaines *vs* 6 à 8 mois). De plus, leurs modèles PDOX de métastases hépatiques reproduisent majoritairement les altérations génomiques et les profils transcriptomiques des métastases hépatiques des donneurs permettant de prédire l'efficacité thérapeutique d'un protocole de chimiothérapie FOLFOX. Les modèles PDOX reproduisent davantage les caractéristiques des tumeurs de patient, et sont des modèles robustes pour prédire la réponse thérapeutique aux traitements, et plus rapidement que les modèles PDX (Fujii *et al.,* 2016). De plus, les capacités métastatiques

des organoïdes avant leur implantation peuvent être augmentées en utilisant la technologie d'édition de l'ADN CRISPR-cas9 afin de modifier, *in vitro*, l'expression de gènes favorisant la formation des métastases (Matano *et al.*, 2015; O'Rourke *et al.*, 2017).

V.II. Caractérisation des modèles et suivi du développement des métastases hépatiques de CCR

Comme décrit précédemment, les modèles murins de métastases hépatiques sont complexes à mettre en œuvre, ils nécessitent des compétences chirurgicales ou l'induction de modifications génétiques. Parfois l'établissement du modèle nécessite l'utilisation de plusieurs générations de souris avant d'aboutir. De plus, le taux de développement de métastases peut être long et variable en fonction de la technique utilisée. Cependant, ces modèles reproduisent plus fidèlement le processus métastatique, la physiopathologie et le microenvironnement tumoral comparativement aux modèles de xénogreffes sous-cutanées majoritairement utilisés en cancérologie. Ces modèles de métastases sont principalement utilisés pour (i) étudier les mécanismes fondamentaux impliqués dans le processus métastatique, (ii) créer et valider des outils diagnostiques, (iii) développer et évaluer l'efficacité de nouvelles thérapies, (iv) prédire la réponse clinique au traitement dans un contexte de médecine personnalisée. Après la mise en place du modèle, un second défi demeure ; la caractérisation du modèle et le suivi du développement des métastases hépatiques. En effet, les modèles de xénogreffes sous-cutanées offrent la possibilité d'accéder directement au volume tumoral par des mesures au pied à coulisse ou par échographie, contrairement aux modèles métastatiques où les lésions, localisées dans un organe profond, sont difficiles à détecter et à mesurer. Par conséquent, de nombreuses études ont évalué la présence de métastases après sacrifice de l'animal par des observations macroscopiques (localisation et nombre des métastases, poids du foie) et histologiques. Cependant, ces approches invasives ne permettent pas un suivi longitudinal du développement des métastases, ni l'évaluation de la réponse thérapeutique au cours temps chez un même animal, ce qui nécessite l'utilisation d'un grand nombre d'animaux. Afin d'évaluer le développement des métastases par des approches non invasives s'inscrivant dans le respect de la règle des 3R (réduire), différentes modalités d'imagerie précliniques ont été développées. Les méthodes précliniques d'imagerie sont, pour la plupart, issues des modalités d'imagerie clinique chez l'homme, et ont dû être adaptées à l'imagerie du petit animal, telles que la tomodensitométrie (scanner X), la TEP, l'IRM et l'imagerie ultrasonore (Deroose *et al.*, 2007; Puaux *et al.*, 2011; Serkova *et al.*, 2021). Quant aux techniques d'imageries optiques, telles que l'imagerie de bioluminescence (BLI) et de fluorescence incluant également la microscopie intravitale, elles

ont été développées spécifiquement pour l'imagerie préclinique (Henriquez *et al.*, 2007; Klerk *et al.*, 2007).

II.1. Le scanner X

Un scanner X est composé de trois éléments principaux, un générateur, un tube à rayons X et une couronne de détecteurs. Ainsi, lorsque le faisceau de rayon X traverse le corps, il subit une atténuation en fonction de la densité des structures anatomiques rencontrées, le rayonnement résultant pourra être capté par les détecteurs et converti en signal électrique (Masson *et al.*, 2011). Le scanner est couplé à un ordinateur qui analyse les données recueillies et attribue à chaque pixel de l'image une valeur d'échelle de gris correspondant à une valeur d'atténuation des rayons X ou de densité. Les coefficients de densité sont propres à chaque tissu et sont exprimés en unités Hounsfield (UH) allant de - 1000 pour l'air (noir) à + 1000 pour l'os (blanc), les tissus mous se situent entre -100 et 100 (nuance de gris). Durant l'acquisition des images, la couronne de détecteurs et la source de rayon X sont en rotation autour de l'objet à imager, ce qui permet d'obtenir une multitude de coupes. La reconstruction des images par ordinateur fournit des informations anatomiques en trois dimensions à haute résolution (quelques µm). Cette modalité d'imagerie permet de visualiser principalement les os et les poumons. Cependant, l'utilisation d'agent de contraste, le plus souvent à base d'iode, offre la possibilité de visualiser les compartiments extra-cellulaire et sanguin, ou des tissus spécifiques comme le foie ou le tractus gastrointestinal (Mannheim *et al.*, 2016; Pietsch, 2011). Quelques études ont rapporté l'utilisation d'agents de contraste afin d'évaluer la croissance de métastases hépatiques. Boll *et al.*, ont établi un modèle de métastases hépatiques par injection intra-splénique de cellules MC38 et C15A3 chez la souris (Boll *et al.*, 2011). L'ExiTron™ nano utilisé dans cette étude est un agent de contraste qui s'accumule spécifiquement dans les macrophages du foie, appelés cellules de Kupffer, après une injection i.v.. Deux formulations différentes ont été étudiées, l'ExiTron nano 6000 (adapté pour l'imagerie du foie et de la rate ; densité non diluée de 6000 HU) et l'ExiTron nano 12000 (optimisé pour l'angiographie ; densité non diluée de 12000 HU). Un volume de 100 µL d'ExiTron est injecté par souris correspondant à une dose équivalente de 640 mg ou 1200 mg d'iode/kg de poids corporel pour l'ExiTron nano 6000 et l'ExiTron nano 12000, respectivement. Les résultats obtenus sur des souris contrôles sans métastase, ont montré qu'à court terme (4 h après injection) les deux formulations permettent de rehausser le contraste des vaisseaux sanguins. Après ce délai, le produit s'accumule spécifiquement dans les cellules de Kupffer, rehaussant le contraste hépatique pendant plus de 200 jours après une injection unique du produit. L'ExiTron ne s'accumule pas dans les métastases hépatiques, ces lésions

apparaissent sans agent de contraste, permettant de les distinguer du tissu hépatique sain. Ainsi, la plus petite métastase qu'ils ont pu observer mesurait environ 300 µm de diamètre. D'autres agents de contraste ont été étudiés *in vivo* comme le Fenestra LC ou l'ITG ((1,3-bis [7-(3-amino-2,4,6-triiodophenyl) heptanoyl]-2-oleoyl-glycerol) et s'accumulent également spécifiquement dans les cellules hépatiques saines (Mannheim *et al.,* 2016; Tan *et al.,* 2022; Weber *et al.,* 2004). Cependant, ces agents de contraste sont éliminés plus rapidement, ainsi le contraste hépatique et la qualité des images diminuent fortement quelques heures/jours après l'injection. Pour conclure, le scanner X est une modalité d'imagerie adaptée pour le suivi longitudinal du développement des métastases hépatiques. L'utilisation d'un produit de contraste tel que l'ExiTron permet un rehaussement du contraste hépatique, persistant plusieurs semaines après une seule injection. De plus, le temps d'acquisition des images est rapide (< 2 min), ce qui permet réaliser un suivi efficace du développement des métastases.

II.2. La tomographie par émission de positons (TEP)

L'imagerie nucléaire, ou scintigraphie, repose sur la détection de molécules marquées avec un radioisotope, appelées « radiotraceurs », injectées par voie i.v.. Les deux principales modalités d'imagerie sont la TEP et la tomographie d'émission monophotonique. Ces deux techniques se différencient par le rayonnement émis par le radioisotope utilisé (positons ou photons gamma). En ce qui concerne la TEP, le radioisotope le plus utilisé est le fluor-18 (^{18}F), lors de sa désintégration due à son instabilité, il émet un positon. Lorsque ce positon rencontre un électron environnant, ils s'annihilent mutuellement, produisant ainsi deux rayonnements gamma (photons de 511 keV) émis dans des directions diamétralement opposées (**Figure 14**) (Vodovar *et al.,* 2019). Ces photons sont ensuite détectés par une caméra composée d'une couronne de détecteurs. Cette modalité d'imagerie est souvent couplée au scanner X ou à l'IRM afin de fournir des informations sur la localisation anatomique du signal détecté. De nombreux traceurs ont été développés et permettent d'étudier des processus cellulaires et moléculaires très spécifiques (Mier and Haberkorn, 2011).

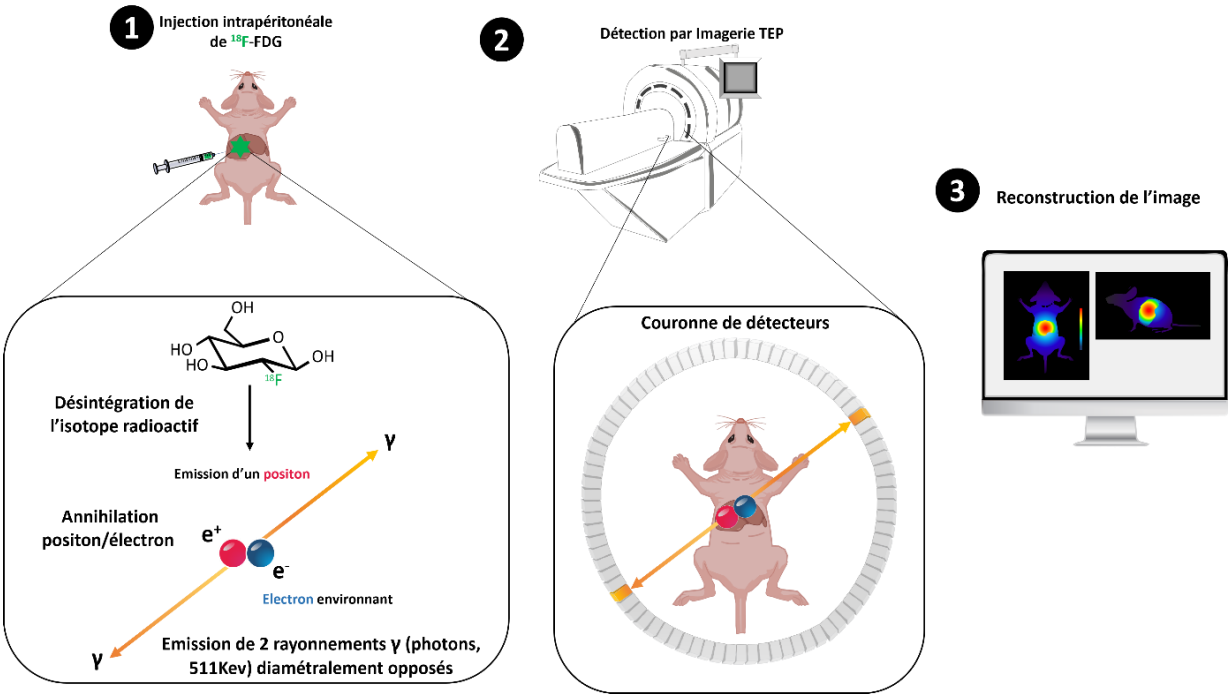


Figure 14. Principe de l'imagerie TEP. 1) Le radiotraceur, par exemple, le ^{18}F-FDG, est injecté par voie i.p.. Le radioisotope se désintègre en émettant un positon. Lorsque le positon rencontre un électron environnant, ils s'annihilent et émettent deux rayonnements ɣ diamétralement opposés. 2) Détection des photons émis par les détecteurs. 3) Calcul par l'ordinateur de la localisation exacte de l'annihilation et reconstruction de l'image.

En cancérologie, l'imagerie TEP au ^{18}F-FDG est très utilisée en préclinique et en clinique afin d'évaluer la réponse thérapeutique à la suite d'un traitement anticancéreux (Mier and Haberkorn, 2011; Vodovar *et al.*, 2019). En effet, les cellules tumorales présentent une activité métabolique élevée, augmentant leur consommation en glucose. L'administration d'un analogue du glucose marqué avec un radioisotope fluoré (^{18}F) permet de détecter l'accumulation du radiotraceur dans les cellules tumorales et de quantifier le métabolisme du glucose dans la tumeur (**Figure 15**). De plus, au-delà des informations métaboliques quantitatives données par cette modalité, il est possible de réaliser des acquisitions dynamiques afin d'étudier la cinétique de fixation du radiotraceur au niveau de sa cible.

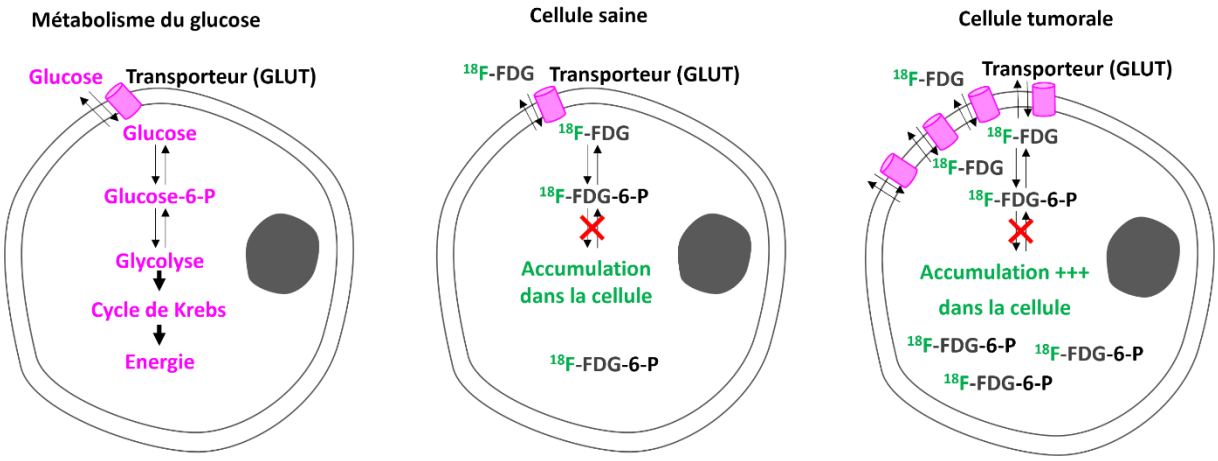


Figure 15. Cibler le métabolisme du glucose des cellules tumorales avec le radiotraceur ^{18}F-FDG.

Un nombre limité d'articles rapportent l'utilisation de l'imagerie TEP comme méthode d'évaluation du développement de métastases hépatiques de CCR chez la souris (Jiang *et al.*, 2021; Kawai *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2024; Zhang *et al.*, 2018). De plus, l'imagerie TEP au ^{18}F-FDG présente certaines limites comme son accumulation non-spécifique dans les tissus sains (cerveau, cœur) et inflammatoires. Dans ce contexte, Jian *et al.*, ont évalué la capacité de trois radiotraceurs (^{18}F-FDG ; ^{18}F-FLT et ^{18}F-FMISO) à cibler les métastases hépatiques de CCR. Le ^{18}F-FMISO est un radiotraceur couramment utilisé pour évaluer l'hypoxie tumorale et le ^{18}F-FLT est un marqueur de prolifération cellulaire (Jiang *et al.*, 2021). De plus, l'implication de deux oncogènes (*MACC1* et *SPON2*) a récemment été associée à un risque de développement de métastases hépatiques de CCR. Dans ce contexte, les auteurs ont étudié la corrélation entre l'accumulation spécifique des radiotraceurs et l'expression de ces oncogènes dans un modèle murin de métastases hépatiques de CCR. Le modèle a été établi en injectant des cellules de CCR LoVo (fort potentiel métastatique) ou HCT8 (faible potentiel métastatique) dans la rate des souris. Les imageries TEP ont été réalisées 8 semaines après l'injection des cellules tumorales. Des analyses immunohistochimiques et par Western blot ont été menées afin d'étudier l'expression des oncogènes *MACC1* et *SPON2* dans les métastases hépatiques. Tout d'abord les résultats de l'immunohistochimie et de Western blot, ont montré que les métastases hépatiques formées à partir des cellules LoVo expriment fortement les deux oncogènes *MACC1* et *SPON2* par rapport aux métastases issues des cellules HCT8. Dans un second temps, les résultats ont révélé que l'augmentation de l'accumulation spécifique du ^{18}F-FLT est significativement corrélée à l'expression des deux oncogènes dans les métastases hépatiques, tandis que l'accumulation du ^{18}F-FMISO n'est corrélée qu'avec l'expression de *MACC1* dans les métastases. Cependant, d'après leurs résultats, l'imagerie TEP au ^{18}F-FDG n'a pas permis

de visualiser distinctement les métastases hépatiques à cause de l'accumulation du radiotraceur au niveau du cerveau et du cœur de la souris. Ainsi, bien que le ^{18}F-FDG soit plus sensible que le ^{18}F-FLT et le ^{18}F-FMISO, son manque de spécificité complique la détection des métastases hépatiques dans un modèle murin. Il semblerait que les radiotraceurs ^{18}F-FLT et ^{18}F-FMISO soient des marqueurs plus spécifiques des métastases hépatiques de CCR.

Plus récemment, un nouveau radiotraceur, le ^{68}Ga-FAPI, (Gallium-68–labeled Fibroblast Activation Protein Inhibitor) a démontré une capacité importante à détecter les cellules tumorales, et plus précisément les fibroblastes associés au cancer (Kratochwil *et al.*, 2019). Ces fibroblastes sont particulièrement présents dans le microenvironnement tumoral et régulent de nombreux processus biologiques impliqués dans l'immunosuppression tumorale et dans le processus métastatique, par conséquent, ils sont associés à un pronostic défavorable (Liang *et al.*, 2023). Li *et al.*, ont démontré l'intérêt d'utiliser ce radiotraceur pour évaluer la réponse thérapeutique à la suite d'un traitement combiné à base d'inhibiteur de TGF-βR (Transforming Growth Factor β Receptor ; inhibe l'effet immunosuppresseur des fibroblastes associés au cancer) et d'une immunothérapie (inhibiteur de check-point immunitaire) dans un modèle murin de métastases hépatiques de CCR (Li *et al.*, 2024).

II.3. L'imagerie par résonance magnétique (IRM)

Le principe de l'IRM repose sur la résonance magnétique nucléaire des noyaux d'hydrogène, principalement des protons, présents dans les molécules d'eau du corps humain (**Figure 16**) (Jakob, 2011). Tout d'abord, sous l'influence d'un champ magnétique (B0), les protons des atomes d'hydrogène s'alignent dans une direction spécifique, parallèle ou antiparallèle au champ. Ensuite, une impulsion radiofréquence est appliquée, basculant l'aimantation longitudinale dans le plan transversal. Lorsque l'onde de radiofréquence est arrêtée, les protons retournent dans leur état d'aimantation initial sous l'influence du champ magnétique B0. Le temps de relaxation longitudinale (T1) correspond au temps que mettent les protons pour revenir à leur alignement avec le champ magnétique principal (B0), principalement dû à l'interaction proton/tissus environnants. Le temps de relaxation transverse (T2) correspond à la décroissance de l'aimantation transverse, principalement due à l'interaction proton/proton. Les temps de relaxation T1 et T2 sont spécifiques aux propriétés de chaque tissu. En modifiant légèrement le champ magnétique à l'aide de gradients de champ, il est possible de localiser précisément les signaux dans l'espace, permettant ainsi de créer des images en coupes des organes et des tissus.

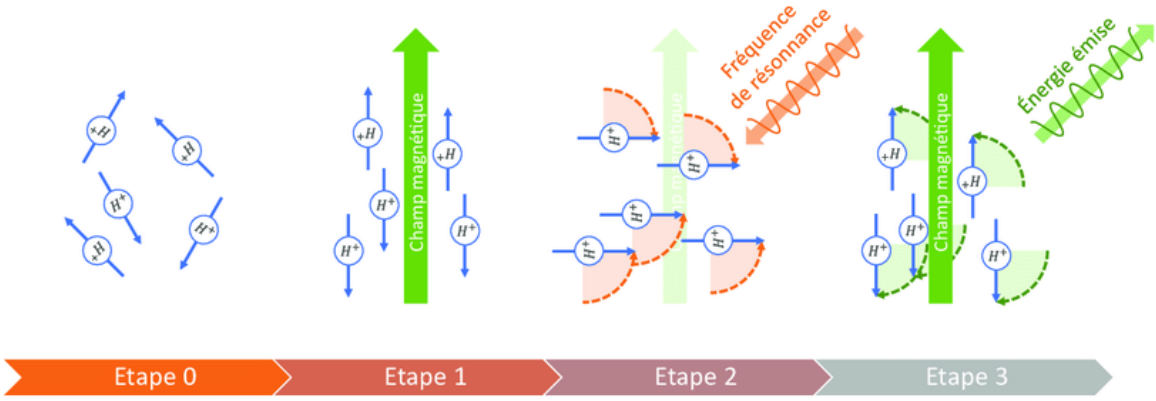


Figure 16. Principe de l'IRM. L'application d'un champ magnétique aligne les protons des atomes d'hydrogène (H^+) dans une direction. Ensuite, l'impulsion radiofréquence bascule l'alignement des protons du plan transversal. L'arrêt de l'onde de radiofréquence, permet aux protons de retourner dans leur état d'aimantation initial sous l'influence du champ magnétique principal. Le temps de relaxation est mesuré et permet de caractériser les tissus. D'après la thèse de (Cendre, 2021).

Pandit *et al.*, ont mené une étude comparative entre l'IRM et le scanner X pour évaluer le développement de métastases hépatiques de CCR dans un modèle murin (Pandit *et al.*, 2013). Le modèle a été établi par une injection intra-splénique de cellules HT-29 dans des souris nude suivi d'une ablation de la rate. Neuf jours après la chirurgie, le suivi du développement des métastases hépatiques a été réalisé deux fois par semaine pendant un mois. De plus, une analyse histologique, après une coloration des tissus à l'hématoxyline et à l'éosine, a été menée aux jours 17, 24 et 31 après l'inoculation des cellules tumorales. Afin de rehausser le contraste du foie en scanner X, une solution d'iopamidol (concentration en iode de 123 mg/mL ; 0,4 mL / 25g) a été injectée 24 h avant chaque acquisition au scanner X. Le tissu hépatique sain apparait en hypersignal par rapport aux lésions hépatiques. Les résultats de cette étude ont mis en avant les avantages et inconvénients de ces deux modalités d'imagerie pour un suivi longitudinal du développement des métastases hépatiques. En effet, le scanner X présente une résolution spatiale élevée (quelques µm), un rapport signal/bruit élevé, et un temps d'acquisition très court (< 2 min). Cependant, en scanner X, les souris sont exposées à des radiations répétées. De plus, l'injection d'un agent de contraste est indispensable afin de visualiser les lésions hépatiques et la majorité de ces agents s'accumule dans les cellules de Kupffer (macrophages). L'analyse histologique a démontré que ces cellules présentaient d'importantes vacuoles ce qui augmentait leur volume et pouvait comprimer les hépatocytes sains. Les auteurs suggèrent que la perfusion hépatique pourrait être altérée, cependant, aucune toxicité hépatique n'a été rapportée. D'autre part, l'IRM s'est avérée être une modalité d'imagerie, moins invasive (pas d'injection d'agent de contraste), non ionisante et permettant d'observer les métastases hépatiques avec un

contraste satisfaisant. Contrairement au scanner X, les lésions hépatiques apparaissent en hypersignal, ce qui facilite l'interprétation des images et la mesure des lésions. De plus, l'IRM fournit des informations supplémentaires sur l'hétérogénéité des tissus, notamment, la présence d'une zone nécrotique au centre des lésions hépatiques a pu être observée en IRM et pas en scanner X. Cependant, le temps d'acquisition des images est plus long (30 min) et la résolution spatiale est plus faible.

II.4. L'imagerie ultrasonore

L'échographie est une technique d'imagerie qui repose sur la propagation d'ondes ultrasonores, émises par une sonde ultrasonore, à travers les tissus biologiques (Foster and Theodoropoulos, 2011). Ces ondes ultrasonores interagissent avec les tissus en fonction de leur impédance acoustique. Cette impédance traduit la résistance d'un milieu traversé par une onde ultrasonore, elle est fonction de la densité du milieu et de la vitesse de l'onde ultrasonore à travers celui-ci. Une partie des ondes est réfléchie sous forme d'échos et est captée par la sonde, permettant ainsi la création d'images. Cette modalité d'imagerie est non invasive, peu coûteuse et facile à mettre en œuvre. L'échographie en mode B (Brightness mode) est la plus couramment utilisée pour obtenir des informations sur la taille et la structure des tumeurs (Serkova *et al.,* 2021). Cependant, d'autres techniques d'imagerie ultrasonore existent et peuvent fournir des informations complémentaires pour caractériser un tissu tumoral. L'échographie Doppler permet d'évaluer la vascularisation des tumeurs en mesurant le flux sanguin. L'échographie de contraste permet de visualiser et de quantifier la microvascularisation des tissus tumoraux, en utilisant des agents de contraste ultrasonores (MBs de gaz) (Hyvelin *et al.,* 2013; Schneider, 2011). Enfin, les techniques d'élastographie évaluent les propriétés mécaniques des tissus en mesurant leur élasticité. Ces propriétés sont utilisées pour évaluer des changements dans la composition du microenvironnement tumoral et permettent de mieux caractériser les tumeurs (Ahmed *et al.,* 2020; Elyas *et al.,* 2017; Riegler *et al.,* 2018).

Plusieurs études ont utilisé cette modalité d'imagerie pour mesurer le volume de métastases hépatiques de CCR chez la souris (Graham *et al.,* 2005; Roque *et al.,* 2019; Wei *et al.,* 2022). Par exemple, Wei *et al.,* ont étudié la capacité de l'imagerie ultrasonore à haute résolution à évaluer le développement des métastases hépatiques de CCR chez la souris (Wei *et al.,* 2022). Le modèle a été établi après une injection de cellules CT26 de CCR murin (1.10^2 ou 1.10^3 ou 1.10^4 cellules/40 µL) dans le lobe hépatique gauche de souris BALB/c nude. Les images échographiques du tissu hépatique ont été acquises 6 jours après l'inoculation des cellules et

tous les jours pendant 3 semaines, avec un système échographique haute résolution à une fréquence de 24 MHz et une résolution spatiale de 75 µm. Afin de caractériser les tumeurs par imagerie ultrasonore, plusieurs critères ont été déterminés comme la présence ou l'absence de lésions hépatiques, leur nombre, leur localisation, leur taille (longueur, largeur et épaisseur), leur forme, l'aspect des marges délimitant la tumeur ainsi que leur échogénicité. Les résultats montrent que le nombre, la taille et la localisation des lésions sont variables. Cette modalité d'imagerie ultrasonore a permis de détecter des tumeurs d'une taille supérieure à 2 mm avec une sensibilité de 94,1 % et une spécificité de 88,7 %. Les métastases hépatiques apparaissaient principalement hypoéchogènes. Cette échogénicité diminuait au cours du développement tumoral. La majorité des marges tumorales n'apparaissaient pas nettement à l'examen échographique. Il est difficile de différencier clairement les bordures des lésions et le tissu hépatique sain en raison de la faible différence d'impédance acoustique entre ces deux tissus. Une diminution de la sensibilité (53 %) de la technique est observée lorsque le nombre de cellules injectées initialement est de 1.10^4. En effet, les auteurs ont observé, par une analyse histologique, la présence de nodules < 2 mm, qui n'ont pas pu être détectés en échographie. De plus, le groupe de souris ayant reçu une injection avec un nombre de cellules plus faible présentait un nombre limité de lésions (1 à 3 métastases) rendant leur détection plus facile. Ainsi, la taille, la localisation des lésions les unes par rapport aux autres et leur nombre peuvent influencer la sensibilité et la fiabilité de la détection des métastases hépatiques par imagerie échographique. Cette modalité permet donc de suivre l'évolution des métastases hépatiques de manière non invasive avec une grande sensibilité et spécificité et une résolution spatiale proche voire meilleure que l'IRM ou le scanner X (Graham *et al.*, 2005). Cependant, l'inconvénient majeur de cette technique est son opérateur-dépendance.

II.5. L'imagerie de bioluminescence (BLI)

La BLI, appliquée au suivi du développement tumoral dans des modèles précliniques, consiste à détecter les cellules tumorales exprimant de manière stable le gène codant la luciférase. En effet, cette enzyme catalyse l'activation de son substrat, la luciférine, en formant du luciféryl-adénylate lié à l'enzyme et libérant du pyrophosphate inorganique (PPi). La luciféryl-adénylate est ensuite oxydée par l'O_2, présent dans le milieu, produisant un peroxyde instable. Ce peroxyde se transforme rapidement en oxyluciférine après la libération d'AMP. L'oxyluciférine,

dans un état électronique excité, retourne à son état fondamental en émettant un photon (pic d'émission à 560 nm) et produit du CO_2 (**Figure 17**).

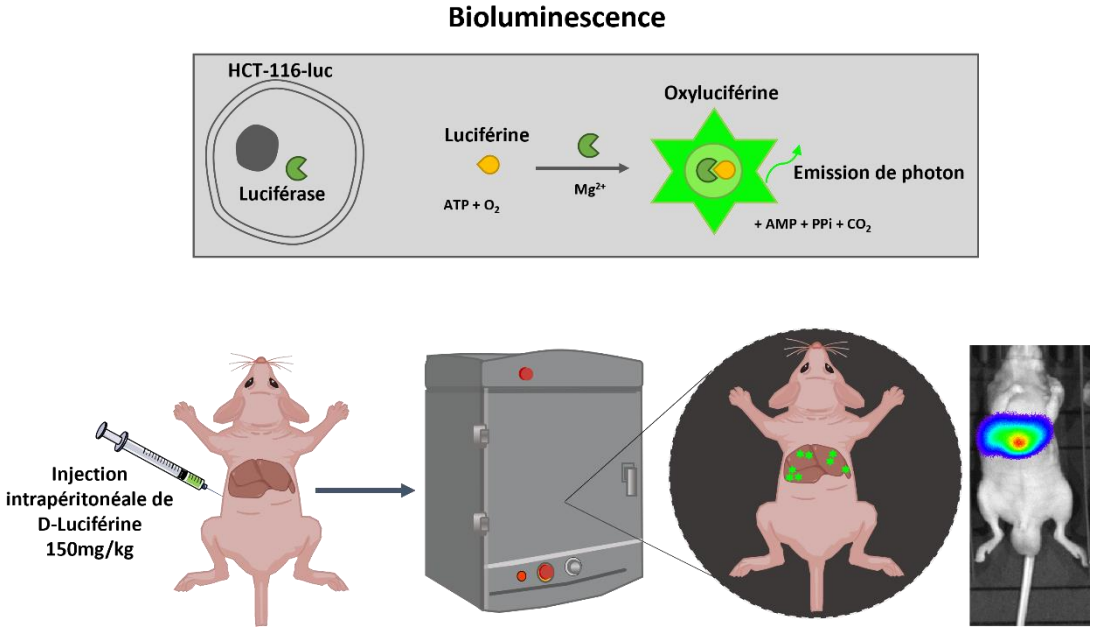


Figure 17. Principe de l'imagerie de bioluminescence pour la détection de métastases hépatiques.

Cette modalité d'imagerie est largement utilisée pour détecter et évaluer la progression des métastases hépatiques de CCR dans des modèles précliniques (Lavaud *et al.*, 2020; Lee *et al.*, 2014; Magistri *et al.*, 2019; Nyati *et al.*, 2002; Oshima *et al.*, 2015; Sarraf-Yazdi *et al.*, 2004; Smakman *et al.*, 2004; Zabala *et al.*, 2009). Notamment, Zabala *et al.*, ont comparé les informations obtenues en BLI à celles obtenues par des mesures directes des dimensions de la tumeur au pied à coulisse et par imagerie échographique, dans un modèle murin de métastases hépatiques de CCR (Zabala *et al.*, 2009). Les cellules de CCR murin MC38 ont été transfectées avec le plasmide pCDNA3-luc. Les cellules (5.10^5 / 50 µL) ont ensuite été injectées dans le lobe hépatique gauche de souris C57BL/6J. Afin de mesurer les métastases hépatiques au pied à coulisse, les souris ont subi deux laparotomies. Les résultats montrent que la BLI est une méthode sensible et permet la détection des cellules tumorales deux jours seulement après leur injection, tandis qu'en échographie, les lésions sont détectées 2 semaines après l'injection des cellules tumorales. Les résultats ont démontré également que le volume tumoral obtenu en échographie semble être sous-estimé en comparaison aux volumes tumoraux obtenus par mesure au pied à coulisse. Malgré cela, la corrélation entre les volumes mesurés au pied à coulisse et ceux obtenus en imagerie ultrasonore est correcte ($r^2 = 0,85$). Deux semaines après l'injection des cellules tumorales, le signal mesuré en BLI est fortement corrélé ($r^2 = 0,84$) aux

volumes tumoraux obtenus par mesure directe au pied à coulisse. Cependant, après 3 semaines, cette corrélation diminue fortement (r^2 = 0,41). En effet, le signal obtenu en BLI semble atteindre un plateau et ne permet plus de traduire la croissance tumorale. Cette étude met en évidence les avantages et les limites de chaque technique et la nécessité de combiner ces modalités afin de suivre l'évolution des métastases hépatiques de CCR chez la souris. Plus généralement, la BLI est une technique facile à mettre en œuvre, peu coûteuse, rapide, et très sensible. Cependant, la principale limite est liée à la faible résolution spatiale qui ne permet pas d'accéder au volume tumoral. De plus, la réaction de bioluminescence est dépendante de la présence d'ATP et d'oxygène, ainsi seules les cellules tumorales métaboliquement actives et non localisées dans des zones hypoxiques sont détectables.

II.6. L'imagerie de fluorescence

Le principe de la fluorescence repose sur l'utilisation d'une molécule qui absorbe de l'énergie à la suite d'une excitation lumineuse. Cette molécule passe alors à un état excité, puis retourne à son état fondamental en émettant un photon. Pour étudier le développement de métastases hépatiques de CCR par imagerie de fluorescence, il est nécessaire de modifier génétiquement les cellules tumorales avant injection afin qu'elles expriment une protéine fluorescente, le plus souvent la GFP (Henriquez *et al.,* 2007; Hoffman, 2002; Refaat *et al.,* 2022; Serkova *et al.,* 2021). Plusieurs approches sont possibles : les métastases peuvent être observées *ex vivo* ou par imagerie intravitale (Okigami *et al.,* 2016; Oshima *et al.,* 2015; Tanaka *et al.,* 2012b; Yang *et al.,* 2002). En effet, l'imagerie de fluorescence *in vivo* est limitée d'une part, par l'auto-fluorescence des tissus biologiques environnants et d'autre part, par la diffusion de la lumière à travers les tissus biologiques, ainsi la profondeur maximale possible pour l'imagerie intravitale à fluorescence est de 1 mm (Frangioni, 2003; Serkova *et al.,* 2021). Par conséquent, la visualisation des organes est limitée aux tissus superficiels, ou aux organes exposés chirurgicalement à l'extérieur du corps. Ces procédures invasives limitent la répétition des expériences d'imagerie, ainsi un suivi longitudinal du développement métastatique est restreint. Cette modalité d'imagerie est principalement utilisée afin d'étudier les mécanismes cellulaires impliqués dans le processus métastatique ou pour étudier l'effet d'un traitement par chimiothérapie sur les cellules tumorales. Par exemple, Tanaka *et al.,* ont observé en temps réel, par microscopie biphotonique intravitale, la réponse cellulaire après un traitement de chimiothérapie (5-FU à 50 mg/kg ou irinotécan à 20 mg/kg) dans un modèle de métastases hépatiques de CCR (Tanaka *et al.,* 2012b). Le modèle a été établi après une injection intra-splénique de 2.10^6 cellules HT-29 exprimant la « red fluorescent protein » dans des souris nudes

transgéniques exprimant la GFP. La microscopie intravitale a été réalisée trois fois pour chaque souris. La première imagerie a été réalisée 2 h après l'inoculation des cellules tumorales pour confirmer leur présence dans les sinusoïdes hépatiques. La deuxième imagerie a été réalisée 6 à 8 semaines après l'inoculation pour observer la formation des métastases et le microenvironnement tumoral. Enfin, la dernière imagerie a été faite après l'administration de 5-FU ou d'irinotécan pour évaluer la réponse des cellules tumorales à la chimiothérapie en temps réel. Cette modalité d'imagerie nécessite de réaliser une laparotomie (<15 mm) afin d'isoler le lobe hépatique d'intérêt et de le placer dans un système dédié à la stabilisation des organes pour l'imagerie intravitale. Dans cette étude, l'imagerie intravitale a permis de visualiser, en temps réel et en 3D, la réponse des cellules tumorales métastatiques après un traitement avec le 5-FU ou l'irinotécan. Cette réponse cellulaire inclut des phénomènes tels que la fragmentation des cellules, la condensation des noyaux cellulaires et la présence de vacuoles intracellulaires. De plus, des métastases de différentes tailles ont pu être observées, chacune présentant des caractéristiques distinctes. Par exemple, les métastases de plus grande taille, étaient composées d'une zone centrale acellulaire, entourée de cellules tumorales viables en périphérie et de cellules stromales. Cette zone centrale acellulaire pourrait être due à une nécrose ou à une apoptose induite par l'hypoxie tumorale ou par la chimiothérapie. Bien que ces approches d'imagerie soient performantes et apportent des informations dynamiques sur le comportement des cellules tumorales et leur interaction avec le microenvironnement tumoral, la nécessité de réaliser des laparotomies répétées limite leur utilisation. Récemment, des fenêtres d'imagerie abdominales ont été développées pour étudier des processus cellulaires en temps réel, nécessitant une seule étape de chirurgie et permettant de suivre le développement tumoral sur un temps plus long (Ritsma *et al.*, 2013, 2012; Tanaka *et al.*, 2012a). Dans les études utilisant des modèles murins de métastases hépatiques de CCR, l'imagerie de fluorescence est particulièrement utile pour explorer les mécanismes impliqués dans le processus métastatique, tandis qu'elle est rarement utilisée pour évaluer l'efficacité thérapeutique *in vivo*.

Ces modalités d'imagerie sont particulièrement utiles pour caractériser les métastases, suivre leur développement et pour étudier l'efficacité d'un traitement sur la croissance tumorale. Dans la majorité des études citées ci-dessus, la combinaison de modalités d'imagerie est souvent nécessaire pour accéder à des informations diverses, complémentaires et fiables. De plus, des analyses histologiques complémentaires, avec des marquages classiquement utilisés en clinique comme la coloration à l'hématoxyline et l'éosine, sont

souvent menées pour caractériser les tumeurs. Des immunomarquages plus spécifiques permettent d'évaluer des paramètres comme la prolifération cellulaire, la transition épithélio-mésenchymateuse, la vascularisation, etc. De plus, un autre paramètre qui est pris en compte pour évaluer la réponse thérapeutique est la survie des animaux après le traitement.

V.III. Matériel et méthodes

III.1. Lignée cellulaire

La lignée cellulaire IVISbrite HCT-116 Red F-luc (PerkinElmer, Codolet, France) est dérivée de la lignée cellulaire HCT-116 de carcinome colorectal humain. Ces cellules expriment de manière stable le gène de la luciférase (*Luciola Italica*). Elles sont cultivées dans le milieu de culture McCoy's (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) complémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (Eurobio, Courtaboeuf, France) dans un incubateur à 37°C sous atmosphère humide et 5 % de CO_2. Le jour de la chirurgie, le tapis cellulaire est lavé au DPBS (Dulbecco's Phosphate-buffered saline ; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) afin de permettre l'action de la trypsine pour décoller les cellules. La suspension cellulaire est centrifugée à 800 × g pendant 5 min. Le culot cellulaire est re-suspendu à une concentration de 2.10^6 cellules /mL dans du DPBS/Matrigel® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) à 50 % (v/v). La suspension cellulaire est ensuite maintenue à 4°C.

III.2. Les animaux

Toutes les procédures expérimentales ont été réalisées en accord avec la Directive Européenne 2010/60/EU et ont été validées par le Comité d'éthique Centre Val de Loire (Numéro saisine : 2021113009132023). Les souris utilisées dans cette étude sont des mâles BALB/cAnNRj-Foxn1nu (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) âgés de 5 semaines à la réception. Les animaux sont hébergés en groupe en animalerie conventionnelle, avec un cycle de jour/nuit de 12h/12h, en cages ventilées et stériles. La nourriture et l'eau de boisson sont fournies *ad libitum*. Les animaux ont une semaine d'acclimatation avant le début de la chirurgie. Les points limites sont définis par une perte de poids de 15 % du poids total de la souris, un volume tumoral supérieur à 300 mm^3 (mesuré par échographie), une détérioration générale de l'état de santé de l'animal et une altération sévère des comportements physiologiques (prostration, refus de s'alimenter et de boire, réduction de la locomotion, dos voûté et yeux enfoncés).

III.3. Présentation des plans expérimentaux

III.3.1 Session 1

Le plan expérimental de la session 1 est présenté dans la **Figure 18**. Les objectifs principaux de cette session sont (i) de se former à la chirurgie pour établir le modèle de métastases hépatiques de CCR, (ii) d'évaluer la capacité de l'imagerie de bioluminescence à détecter les métastases et (iii) de suivre le volume des métastases par échographie en mode B. Le modèle

est obtenu par une injection intra-splénique d'une suspension de cellules cancéreuses humaines HCT-116 exprimant de manière stable la luciférase dans des souris BALB/c nude. Après un délai de 7 minutes, une splénectomie est réalisée. La présence de métastases hépatiques de CCR est détectée par imagerie de bioluminescence (IVIS, Lumina II, Perkin Elmer) à 7 et 14 jours après la chirurgie. Ensuite, le suivi du développement des métastases est réalisé par imagerie ultrasonore en mode B grâce à la plateforme échographique Vevo F2 (Visualsonics/Fujifilm) dédiée au petit animal. Les échographies sont réalisées 17, 23, 28 et 31 jours après l'injection intra-splénique des cellules tumorales. Enfin, lorsque le volume total de métastases est d'environ 50 mm^3, le foie est prélevé puis les tissus sont colorés à l'hématoxyline, éosine, safran et une analyse de la vascularisation est réalisée avec un immunomarquage du CD31.

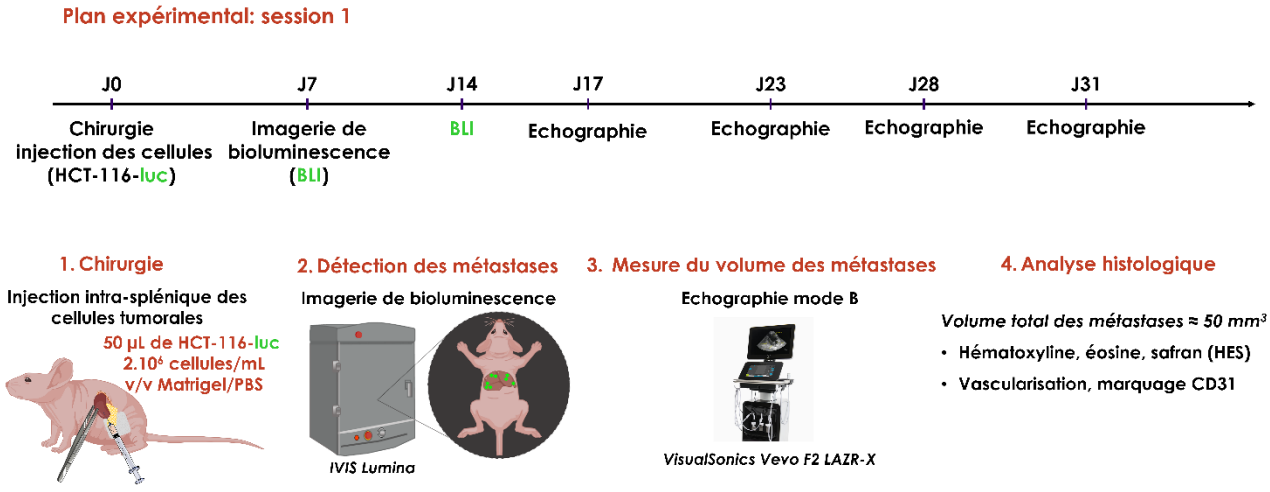


Figure 18. Plan expérimental de la session 1.

III.3.2 Session 2

Le plan expérimental de la session n°2 est présenté dans la **Figure 19**. L'objectif principal de cette session est de mettre au point l'imagerie par scanner X pour le suivi de la croissance des métastases hépatiques. Le scanner X se situe au département Imagerie Préclinique de la PST-ASB, tandis que l'imageur de bioluminescence se situe dans un autre bâtiment. Pour éviter le transfert des souris, ce qui entraînerait du stress pour les animaux et nécessiterait une semaine d'acclimatation, l'imagerie par BLI n'a pas été réalisée lors de cette session. Pour le scanner X, l'agent de contraste, l'ExiTron nano 12000, a été utilisé afin d'améliorer la visualisation du foie par rapport aux autres organes. Ainsi, 12 jours après la chirurgie les souris ont reçu une injection i.v. d'ExiTron nano 12000 dans une des veines caudales. Le premier scanner X a été effectué 2 h après l'injection du produit de contraste, puis les suivants ont été faits à 24 h, 48 h et 72 h. Ensuite, d'autres scanners X ont été réalisés 19, 21 et 26 jours après la chirurgie. En parallèle du scanner X, nous avons également réalisé des échographies afin de suivre l'évolution des

métastases hépatiques avec les deux modalités d'imagerie.

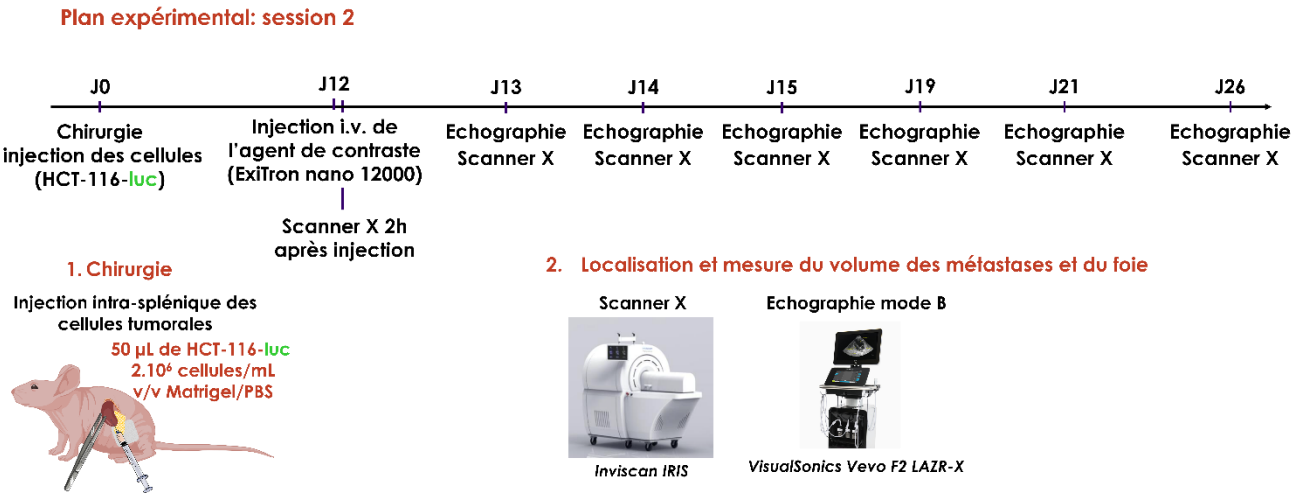


Figure 19. Plan expérimental de la session 2.

III.3.3 Session 3

Le plan expérimental de la session 3 est illustré dans la **Figure 20**. L'objectif principal de cette session est de mettre au point un schéma thérapeutique pour la délivrance de l'irinotécan par sonoporation. L'objectif secondaire est d'évaluer, par imagerie TEP, l'accumulation du radiotraceur, le ^{18}F-FDG, dans les métastases hépatiques de CCR afin d'évaluer l'efficacité thérapeutique de notre protocole de traitement. Sept jours après la chirurgie, une imagerie de BLI est réalisée afin de détecter la présence de métastases hépatiques. Après cette imagerie, les animaux sont transférés au Département d'Imagerie préclinique de la PST-ASB, ce qui nécessite une semaine d'acclimatation à leur nouvel environnement. Après ce délai, les souris reçoivent une injection i.v. (veine caudale) d'ExiTron nano 12000. Le scanner X et l'imagerie échographique sont réalisés deux jours après afin de localiser et de mesurer les volumes des métastases hépatiques. Lorsque les volumes tumoraux atteignent environ 50 mm^3, les souris sont réparties en 2 groupes ; un groupe recevant uniquement l'irinotécan et un groupe recevant l'irinotécan délivré par sonoporation. Le traitement est répété 3 fois à 3 jours d'intervalle et le suivi du développement des métastases hépatiques se poursuit jusqu'à 30 jours après la chirurgie. Deux jours après le dernier traitement, une imagerie TEP au ^{18}F-FDG est réalisée afin de déterminer si cette modalité d'imagerie permet d'évaluer la réponse au traitement.

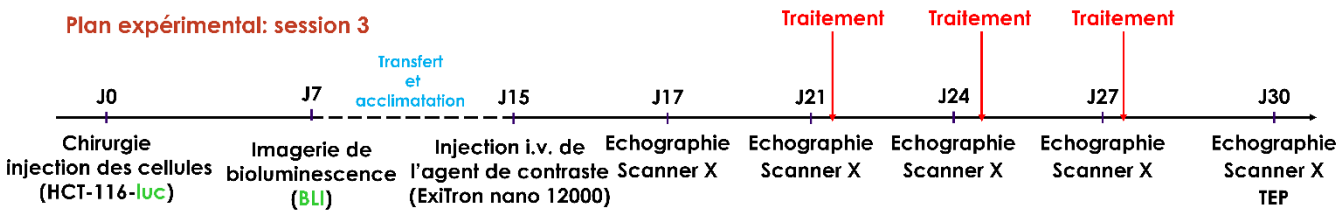


Figure 20. Plan expérimental de la session 3.

III.3.4 Session 4

Le plan expérimental de la session n°4 est illustré dans la **Figure 21**. L'objectif principal de cette session est de mettre au point un schéma thérapeutique pour la délivrance de l'irinotécan par sonoporation. Ainsi, sept jours après la chirurgie, une imagerie de BLI est réalisée afin de détecter la présence de métastases hépatiques. Après cette imagerie, les animaux sont transférés au sein du Département d'Imagerie préclinique de la PST-ASB. Après une semaine d'acclimatation, les souris reçoivent une injection i.v. d'ExiTron nano 12000. Dès le lendemain de l'injection du produit de contraste, le scanner X et l'imagerie échographique sont réalisés afin de répartir les souris en 2 groupes en fonction de leur volume tumoral ; un groupe recevant uniquement l'irinotécan et un groupe recevant l'irinotécan délivré par sonoporation. Le traitement est répété 3 fois, avec un intervalle de 3 jours entre chaque séance, et le suivi du développement des métastases hépatiques est poursuivi jusqu'à 29 jours après la chirurgie.

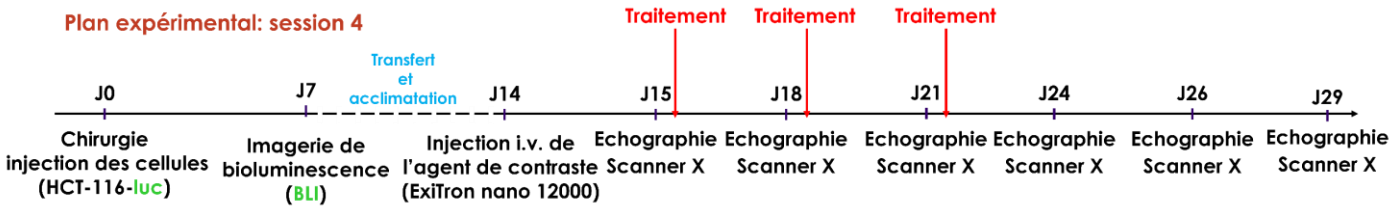


Figure 21. Plan expérimental de la session 4.

III.4. La chirurgie

La chirurgie (**Figure 22**) se déroule sous un poste de sécurité microbiologique, dans des conditions stériles. Les souris sont anesthésiées dans une cage à induction saturée à 3 % de vetflurane (anesthésique gazeux, Centravet, Plancoët, France) avec un débit de 3 L/min O_2 (concentrateur en oxygène, Minerve, Esternay, France). Une fois l'endormissement constaté, elles sont placées sur un tapis chauffant afin de les maintenir autour des 37°C et l'anesthésie est poursuivie au masque avec un débit de 0,8 L/min O_2 et 1,5 % de vetflurane. Une pré-médication est réalisée par les injections, en sous-cutané, d'un antalgique (buprénorphine, 0,075 mg/kg,

Centravet, Plancoët, France) au niveau du dos, et d'un anesthésique local (lidocaïne, 4 mg/kg, Centravet, Plancoët, France) au niveau de la future incision (flanc gauche). Ensuite, l'animal est posé sur le flanc droit et le flanc gauche est désinfecté avec une solution antiseptique (Vétédine 10%, Centravet, Plancoët, France). Cinq minutes après la pré-médication, une incision d'environ 0,5 cm des plans cutané et musculaire est réalisée à l'aide de ciseaux. La rate est repérée puis déposée sur une compresse sèche afin de maintenir la rate avant l'injection des cellules tumorales. Ces dernières (50 µL à 2.10^6 cellules /mL) sont injectées manuellement avec une aiguille 26 G (Terumo, Centravet, Plancoët, France). Une compresse hémostatique (Algostéril®, Laboratoire Brothier, Nanterre, France) est déposée au niveau du site d'injection splénique afin de limiter le saignement potentiel induit par l'injection. Sept minutes après l'inoculation des cellules, une splénectomie est réalisée à l'aide d'un cautère (Herli Medical, Kontich, Belgique) permettant de brûler les tissus et ainsi de limiter le saignement induit par la résection de la rate. Après s'être assuré de l'absence de saignement résiduel, la plaie est désinfectée (Vétédine, 10 %, Centravet, Plancoët, France) et le plan musculaire est refermé à l'aide d'un fil chirurgical PDS II 6.0 (Ethicon, Centravet, Plancoët, France) puis le plan cutané est également suturé avec un fil PDS II 5.0 (Ethicon, Centravet, Plancoët, France). Les animaux sont ensuite placés individuellement dans une cage de réveil, et surveillés afin d'identifier d'éventuels saignements ou des signes de douleur nécessitant des soins adaptés (injection de buprénorphine). Un fois bien réveillés, les animaux retournent en hébergement en groupe et sont surveillées quotidiennement.

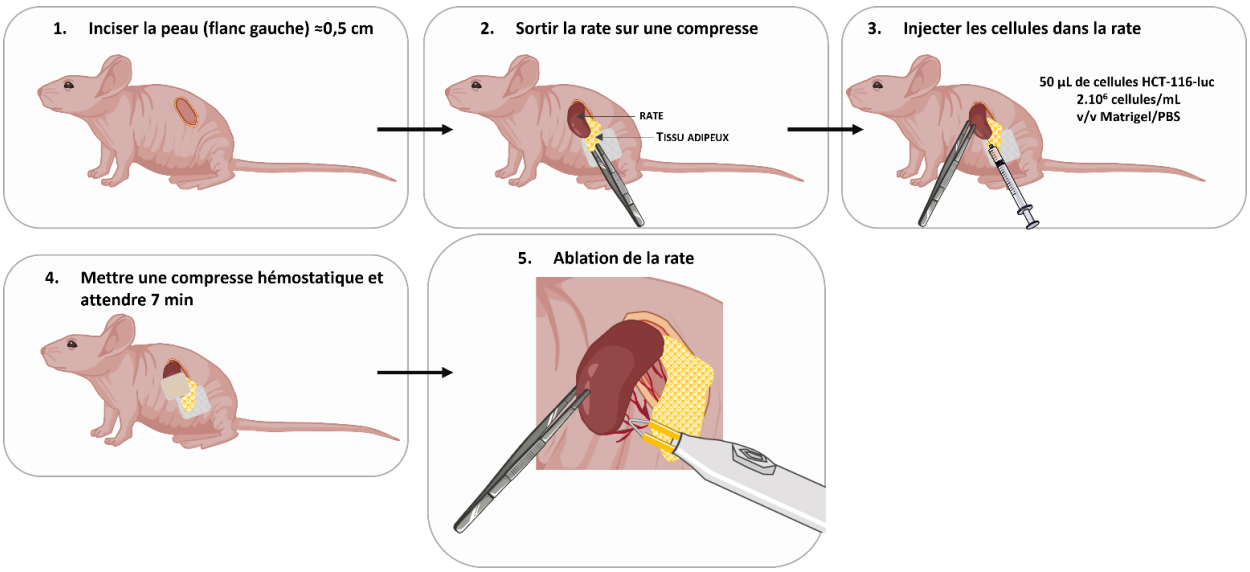


Figure 22. Protocole de chirurgie pour la mise en place d'un modèle murin de métastases hépatiques de CCR.

III.5. L'imagerie de bioluminescence

La présence de métastases hépatiques de CCR est détectée par imagerie de BLI, soit 7 et 14 jours après la chirurgie (session 1), soit uniquement 7 jours après la chirurgie (session 3 et 4). Pour cela, les souris vigiles reçoivent une injection i.p. de D-Luciférine (150 mg/kg ; XenoLight D-Luciferin, PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, USA). Dix minutes après l'injection, temps nécessaire à la production d'oxyluciférine par les cellules tumorales, les souris sont anesthésiées en gazeux dans une cage à induction (vetflurane à 1,5 % à 0,8 L/min O_2) pendant 5 min. Ensuite, elles sont placées en décubitus dorsal dans l'imageur IVIS Lumina XR (PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, USA). Cet appareil permet d'acquérir les images de 3 souris simultanément et chaque acquisition dure environ 5 minutes.

III.6. Le scanner X

Le scanner X est réalisé à différents temps après la chirurgie (**Figures 19, 20 & 21**). Tout d'abord, les souris sont anesthésiées dans une cage à induction (vetflurane à 1,5 % dans 0,8 L/min d'air ; concentrateur en air, Minerve, Esternay, France) pendant 5 min. Ensuite, elles sont placées au niveau d'un masque d'anesthésie sur un tapis chauffant permettant de maintenir leur température autour de 37°C. Une injection i.v. unique d'ExiTron nano 12000 (100 µL correspondant à 1200 mg d'iode/kg ; Viscover, NanoPET Pharma GmbH, Berlin, Allemagne) est effectuée via un cathéter en polyéthylène équipé d'une aiguille 30G (PE10 et 30G, Phymep Paris, France) inséré au niveau d'une des veines caudales. Pour l'acquisition des images, les souris sont placées en décubitus dorsal sur un lit chauffant, (Cellule d'imagerie Minerve, Esternay, France) sous anesthésie gazeuse dans l'imageur IRIS (Coll. Plateforme ASB – Département Imagerie Préclinique – Imageur IRIS, Inviscan, Strasbourg, France). Les paramètres d'imagerie de scanner X utilisés sont : une tension de 65 kV, une intensité de 0,9 mA, 1280 projections, un temps d'exposition de 70 ms en rotation continue pour une durée d'acquisition de 90 s par souris. Les images reconstruites permettent d'obtenir une résolution de 80 µm.

III.7. L'imagerie échographique en mode B

L'échographie est réalisée à différents temps après la chirurgie (**Figures 18, 19, 20 & 21**). Pour ce suivi, les souris sont anesthésiées par inhalation (vetflurane à 1,5 % dans 0,8 L/min d'air) puis placées en décubitus dorsal sur un tapis chauffant. Un gel échographique (Gel écho Neo Jelly US ; Consomed ; Rognac, France) est appliqué au niveau de l'abdomen de la souris, en veillant à éviter la formation de bulles d'air entre la sonde et la peau de l'animal, puis les

acquisitions sont réalisées avec le système Vevo F2 (VisualSonics Inc., Toronto, Canada). L'intégralité du foie de la souris est balayée manuellement avec une sonde de fréquence de 57-25 MHz (UHF-57x ; VisualSonics Inc., Toronto, Canada) spécialement conçue pour l'imagerie abdominale chez la souris. L'acquisition échographique consiste à localiser, dénombrer et mesurer les métastases. Cette acquisition dure entre 5 à 30 minutes par souris.

III.8. Analyse anatomopathologique

Lorsque le volume total de métastases, obtenu à partir des données échographiques, atteint environ 50 mm^3, les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale afin de prélever les foies. Les analyses histologiques ont été réalisées par le service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques de l'hôpital Bretonneau, CHRU de Tours. Les foies sont lavés avec du liquide physiologique (NaCl, 0,9 %) puis ils sont fixés pendant 24 h dans du formol à 4 %. Ensuite, les foies sont inclus en paraffine et des coupes de 4 µm sont réalisées. Une partie des coupes est colorée à l'hématoxyline-éosine-safran (HES), fournissant des informations sur la localisation et les dimensions des métastases. L'autre partie des coupes est utilisée pour visualiser la vascularisation des métastases après un immunomarquage du CD-31 (1/2000 ; ab124432 ; Abcam, Paris, France). L'immunomarquage est réalisé conformément aux instructions du fournisseur à l'aide du kit de révélation ZytoChem-Plus HRP Broad Spectrum (Zytomed Systems GmbH, Berlin, Allemagne). Brièvement, les coupes sont déparaffinées puis un démasquage des épitopes est réalisé selon la méthode HIER (Heat-Induced Epitope Retrieval) avec un tampon citrate (0,1 M citrate de sodium, pH 6). Les péroxydases endogènes sont inactivées par une incubation avec de l'H_2O_2 à 3 % pendant 10 min. Les sites de liaison non spécifiques de l'anticorps primaire sont bloqués pendant 5 min à l'aide de la solution de blocage fournie. L'anticorps primaire anti-CD31 (1/2000) est incubé pendant 1 h à température ambiante en chambre humide puis les coupes sont lavées avec un tampon TBS-T 0,05% (Tris Buffered Saline- Tween ; TBS 20 mM, NaCl 150 mM, Tween20 à 0,05 %, pH 7,6). L'anticorps secondaire biotinylé est incubé pendant 15 min à température ambiante puis les coupes sont lavées avec le tampon TBS-T 0,05 %. Le conjugué Streptavidine-HRP (HorseRadish Peroxidase) est incubé pendant 15 min à température puis deux lavages avec le tampon TBS-T 0,05 % sont réalisés. Le DAB (3,3'-Diaminobenzidine), substrat chromogène de la HRP, est incubé pendant 10 min puis la réaction est arrêtée par un lavage à l'eau distillée. Les coupes sont contre-colorées à l'aide de l'hématoxyline. Le montage entre lame et lamelle est réalisé avec le milieu Pertex® à base de xylène (Microm Microtech, Brignais, France). Les lames sont

ensuite observées avec un scanner de lame (Nanozommer S360 ; Hamamatsu Photonics, Massy, France).

III.9. L'imagerie TEP

L'imagerie TEP au ^{18}F-FDG a été réalisée deux jours après le dernier traitement afin de tester la capacité de cette modalité d'imagerie à évaluer la réponse thérapeutique à la suite du traitement par irinotécan seul ou administré par sonoporation. Les animaux sont mis à jeun la veille de l'imagerie TEP. Une heure avant l'acquisition des images, les souris vigiles reçoivent une injection i.p. de ^{18}F-FDG (Curium, Tours, France) à une dose d'environ 7 MBq. Elles sont ensuite replacées dans leur cage, maintenue à 37°C dans un bain-marie. Cinq minutes avant l'acquisition des images, les souris sont anesthésiées dans une cage à induction (vetflurane à 1,5 % dans 0,8 L/min d'air ; concentrateur en air, Minerve, Esternay, France). Pour l'acquisition des images, les souris sont positionnées en décubitus dorsal sur un lit chauffant à 37°C (Cellule d'imagerie Minerve, Esternay, France) sous anesthésie gazeuse dans l'imageur IRIS (Coll. Plateforme ASB – Département Imagerie Préclinique, Imageur IRIS, Inviscan, Strasbourg, France). Un scanner X est réalisé (tension de 80 kV, intensité de 0,9 mA, 576 projections, temps d'exposition de 34 ms en rotation continue, pendant 20 s par souris) suivi d'une imagerie TEP statique de 20 min. Puis les images sont reconstruites en 3D-OSEM.

III.10. Chimiothérapie et traitement des animaux

L'irinotécan (20 mg/mL ; Accord Health care AG, Bottmingen, Suisse) a été fourni par le Dr Virginie André (Centre régional de cancérologie, Henry Kaplan, CHRU de Tours, France). Trente minutes avant la sonoporation, les souris sont anesthésiées puis un volume de 100 µL d'irinotécan (20 mg/kg) est injecté en i.v. (veine pénienne) à l'aide d'une aiguille 26 G (Terumo, Centravet, Plancoët, France) et une seringue 1 mL (Terumo, Centravet, Plancoët, France). Après cette injection, les souris sont immédiatement réveillées permettant ainsi à l'irinotécan d'être métabolisé en SN-38, son métabolite actif, qui atteint un pic plasmatique dans le sang des souris 30 minutes après injection (Kaneda *et al.*, 1990).

III.11. Protocole de sonoporation

Les MBs Vevo Micromarker®, (Fujifilm-VisualSonics, Amsterdam, Pays-Bas) ont été utilisées pour la sonoporation. Ces MBs contiennent un mélange d'azote et de perfluorobutane encapsulé par une paroi de phospholipides PEGylés. Elles sont remises en suspension 10 minutes avant l'injection, conformément aux indications du fournisseur, à une concentration de 2.10^9 MB/mL.

Les souris sont de nouveau anesthésiées (Vetflurane 1,5 % dans 0,8 mL/min d'oxygène), puis un volume de 70 µL de MBs est injecté par voie i.v. via la veine pénienne à l'aide d'une aiguille 26 G (Terumo, Centravet, Plancoët, France) et une seringue 1mL (Terumo, Centravet, Plancoët, France) juste avant la sonoporation. Le transducteur dédié à la sonoporation a été développé au laboratoire. Sa fréquence centrale est de 1 MHz, avec un diamètre de 19 mm, une distance focale de 28 mm et une tache focale de 28 mm. Un adaptateur dédié rempli d'eau dégazée est inséré à l'extrémité du transducteur pour ajuster la focale à la profondeur du foie. De plus, l'eau dégazée permet d'éliminer les bulles d'air entre le transducteur et la peau de la souris optimisant ainsi la propagation des ultrasons. La souris est placée sur un tapis chauffant, recouvert d'un absorbeur d'ondes acoustiques, et maintenue sous anesthésie gazeuse au masque. Le gel échographique est appliqué au niveau de l'abdomen de la souris, puis le transducteur est placé au niveau du foie, en contact avec le gel échographique. Pour la sonoporation, la séquence ultrasonore suivante est utilisée : Fréquence de 1 MHz, avec une période de répétition des impulsions de 100 µs, 40 cycles par impulsion à une pression négative de 400 kPa. Cette séquence est appliquée pendant 3 min. Le traitement est répété 3 fois à 3 jours d'intervalle. Le scanner X et l'échographie sont réalisés la veille de chaque traitement. Après le dernier traitement, l'évolution des métastases hépatiques est suivie par scanner X et par imagerie échographique deux fois par semaine jusqu'au sacrifice des animaux.

III.12. Analyse des images et exploitation des résultats

III.12.1 Imagerie de bioluminescence

Dans la session 1, une analyse semi-quantitative de chaque image est réalisée en sélectionnant une région d'intérêt (ROI) au niveau du foie à l'aide du logiciel Living Image® (PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, USA). La radiance moyenne de cette ROI (photons/s/cm^2/sr) est ainsi obtenue 7 jours et 14 jours après la chirurgie pour chaque souris. Les résultats sont exprimés en moyenne ± erreur standard de la moyenne. Dans les sessions 3 et 4, une analyse qualitative est réalisée afin de définir les souris positives (+) en BLI présentant des métastases hépatiques et les souris négatives (-).

III.12.2 Echographie

Pour l'échographie en mode B, l'analyse des images consiste à mesurer la longueur et la largeur de chaque métastase observée à l'aide du logiciel VevoLab (VisualSonics Inc., Toronto, Canada). Pour chaque souris, le volume tumoral de chaque métastase est calculé selon la

formule : $\text{Volume d'une métastase} = \frac{\text{longueur} \times \text{largeur}^2}{2}$. Puis, pour chaque souris, les volumes de toutes les métastases sont additionnés pour obtenir le volume total de métastases par souris. Ainsi, l'échographie permet de déterminer le nombre de métastases par souris et de mesurer le volume total de métastases par souris au cours du temps. Pour la session 2, le volume total des métastases est exprimé en moyenne ± erreur standard de la moyenne. Pour la session 3, l'effectif d'animaux étant faible, le volume total des métastases est exprimé en médiane, quartiles 1 et 3 (Q1 et Q3). Enfin, pour la session 4, les résultats sont exprimés en pourcentage de variation du volume total de métastases normalisé par rapport au jour 15 (avant traitement) ± erreur standard de la moyenne. Le temps de doublement du volume total de métastases pour chaque souris est calculé selon la formule suivante (sessions 3 et 4) :

$$Temps\ de\ doublement = \frac{t \times \ln(2)}{\ln\left(\frac{Vf}{Vi}\right)}$$

où t correspond au nombre de jours entre les deux mesures du volume de métastases, Vi est le volume de métastases initial et Vf le volume total de métastases final (Schwartz, 1961). Les résultats sont exprimés en médiane, quartiles 1 et 3 pour la session 3 et en moyenne ± erreur standard de la moyenne pour la session 4.

III.12.3 Scanner X

Pour la session 2, les images sont analysées afin de déterminer les variations du volume du foie au cours du temps, exprimées en moyenne ± erreur standard de la moyenne. Ce volume est obtenu après une segmentation manuelle à l'aide du logiciel Slicer 3D (développé au Brigham and Women's Hospital, Boston, Massachusetts, USA). De plus, l'intensité de l'ExiTron nano 12000 dans le foie des souris après injection a été évaluée en mesurant l'intensité moyenne (UH) dans le volume de foie segmenté. Les variations de l'intensité du contraste de l'ExiTron nano 12000 sont exprimées en moyenne ± erreur standard de la moyenne. Pour la session 3, nous avons utilisé une méthode de segmentation, semi-automatique, développée au sein du laboratoire à l'aide du logiciel MATLAB (Version R2021a, The MathWorks, Natick, MA, USA). Le volume du foie des métastases est exprimé en médiane, Q1 et Q3. Pour la session 4, ce volume est obtenu après segmentation semi-automatique avec le programme développé sous MATLAB. Les résultats sont exprimés en pourcentage de variation du volume du foie par rapport au jour 15 (avant traitement) ± erreur standard de la moyenne.

III.12.4 Imagerie TEP

Les images sont analysées avec le logiciel PMOD (version 3.4, PMOD Technologies Ltd., Zürich, Switzerland). Les images TEP et scanner X sont recalées pour visualiser le foie. Tout d'abord, les images sont analysées qualitativement afin de repérer l'accumulation du radiotraceur dans les métastases hépatiques. Ensuite, la quantification de l'accumulation du radiotraceur est obtenue en calculant le SUV max (Standardized Uptake Value), selon la formule suivante : $SUV\ \max = \frac{Fixation\ dans\ la\ tumeur\ \left(\frac{kBq}{mL}\right)}{dose\ injectée\ (kBq) \Big/ poids\ de\ l'animal(g)}$.

III.12.5 Analyses statistiques

Les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel GraphPad Prism v.9.5.1 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). Pour la session 1, la comparaison de l'intensité du signal de bioluminescence entre le jour 7 et le jour 14 après la chirurgie est analysée avec le test non paramétrique de Mann-Whitney, le seuil de significativité est fixé à 5 %. Pour la session 4, les volumes normalisés de métastases hépatiques et leur temps de doublement sont comparés entre le groupe irinotécan + sonoporation et irinotécan seul avec le test non paramétrique de Mann-Whitney, le seuil de significativité est fixé à 5 %. Les courbes de survie sont établies selon la méthode de Kaplan-Meier et les différences de survie sont analysées par le test du log-rank (Mantel-Cox). Une analyse de la variance à mesures répétées est réalisée sur les volumes normalisés de métastases hépatiques pour les animaux encore en vie 29 jours après l'inoculation des cellules tumorales. La corrélation entre les variations du volume du foie et la croissance des métastases hépatiques est établie après une régression linéaire puis une analyse de Pearson.

V.IV. Résultats

IV.1. Caractérisation du modèle murin de métastases hépatiques de CCR

IV.1.1 Session 1

Le principal objectif de cette session expérimentale était de se former aux gestes techniques chirurgicaux nécessaires pour l'établissement du modèle de métastases hépatiques de CCR chez la souris. Ce modèle a déjà été développé au laboratoire. Cependant, le taux de souris qui développaient des métastases hépatiques était seulement de 30 %. Ainsi, afin d'améliorer ce taux, certains paramètres expérimentaux ont été modifiés par rapport au protocole original. Dans le protocole précédent, 1.10^6 cellules dans 30 µL étaient mélangées avec 25 % de Matrigel®. Nous avons, ici, augmenté le nombre de cellules injectées à 2.10^6 dans 50 µL avec

50 % de Matrigel®. Le second objectif de cette session expérimentale était de réaliser une imagerie de bioluminescence 7 et 14 jours après la chirurgie afin d'évaluer la capacité de la BLI à détecter les métastases hépatiques. Enfin, le dernier objectif était de réaliser un suivi par échographie en mode B afin d'obtenir le volume des métastases hépatiques.

Pendant cette session expérimentale, deux étapes critiques ont été identifiées : l'injection des cellules tumorales et l'ablation de la rate. En effet, il est primordial de positionner l'aiguille parallèlement à la rate afin de maitriser et de vérifier l'injection intra-splénique des cellules tumorales (décoloration temporaire de la rate). Il est également important de garder l'aiguille dans la rate quelques secondes après l'injection afin d'éviter que la suspension de cellules tumorales ne ressorte et se disperse dans l'abdomen de l'animal. Le deuxième point critique est la splénectomie, qui nécessite de repérer correctement les vaisseaux qui irriguent la rate et de bien les séparer de l'organe avant d'initier l'ablation sinon le risque d'hémorragie est important. En effet, lors de l'ablation de la rate, 7 souris ont fait des hémorragies importantes et n'ont pas survécu. Ainsi sur un effectif de 20 souris initialement, 13 animaux ont été exploités pour la détection des cellules tumorales par BLI.

Sept jours après la chirurgie, 12 souris sur 13 présentaient un signal de bioluminescence au niveau du foie (**Figure 23A**). La valeur moyenne de la radiance pour ces souris était de $7{,}97.10^5 \pm 1{,}98.10^5$ photons/s/cm^2/sr (**Figure 23B**). En revanche, 14 jours après la chirurgie, seulement 10 souris sur 13 étaient positives en BLI avec une radiance moyenne de $2{,}65.10^8 \pm 1{,}94.10^8$ photons/s/cm^2/sr. Ainsi, le signal de BLI a été multiplié par plus de 300 entre le jour 7 et le jour 14 dans les métastases hépatiques, démontrant une forte croissance tumorale ($p < 0{,}05$).

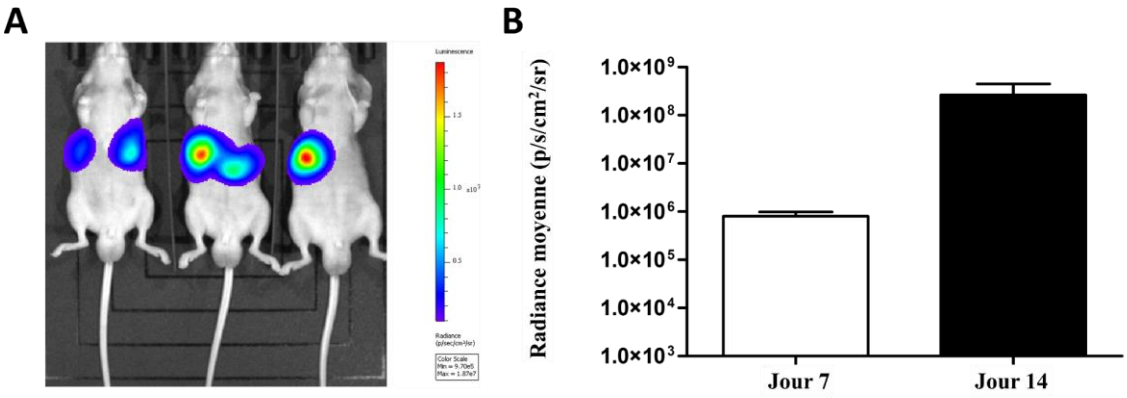


Figure 23. Détection des métastases hépatiques de CCR par imagerie de bioluminescence. A) Images représentatives du signal obtenu en BLI, B) Quantification du signal de BLI 7 et 14 jours après l'inoculation des cellules tumorales.

La première échographie a été réalisée 10 jours après la chirurgie, et n'a pas permis d'identifier la présence de métastases hépatiques. Comme illustré dans la **Figure 24**, sur l'image « foie sain », le tissu hépatique ne présente aucune lésion apparente, le contraste échographique apparait homogène dans l'ensemble du tissu.

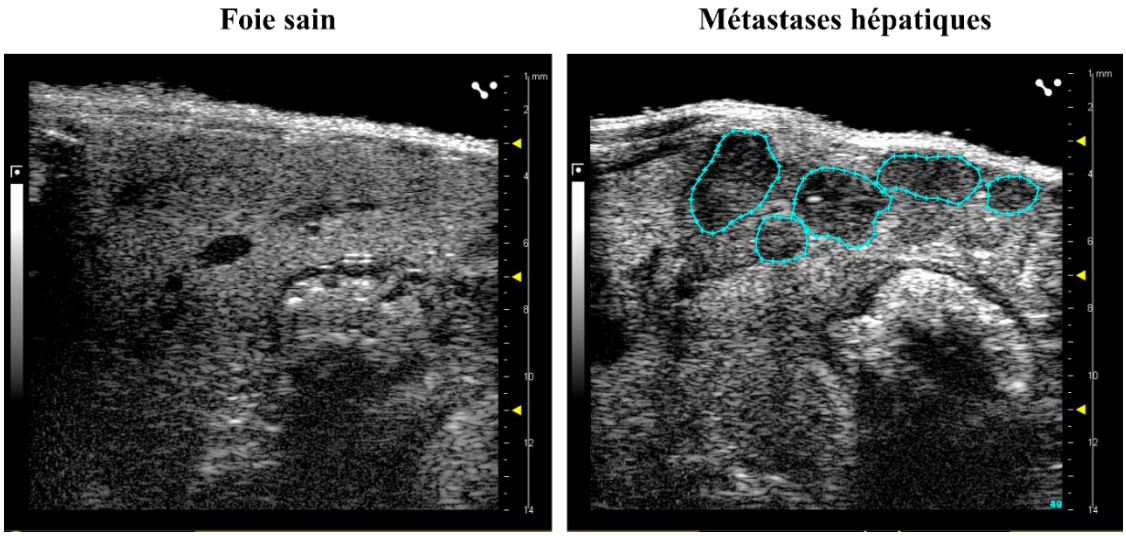


Figure 24. Exemples d'échographies du foie sain et de métastases hépatiques.

L'ensemble des résultats de la BLI (souris + ou -), ainsi que le volume et le nombre de métastases par souris au cours du temps sont résumés dans le **Tableau 3**. Nous avons détecté la présence de métastases hépatiques 17 jours après la chirurgie. En effet, 7 /13 souris présentaient entre 1 à 4 métastases hépatiques visibles en échographie. Ces métastases apparaissent hypoéchogènes avec des bordures bien définies comme illustré dans la **Figure 24**. Vingt-trois jours après la chirurgie, 10/13 souris présentaient entre 2 et 9 lésions hépatiques. Le volume total de métastases par souris était très variable, allant de 6,2 à 284,5 mm^3. Ainsi, 23 jours après la chirurgie, les souris n°12 et n°13 avaient un nombre important de lésions et/ou un volume tumoral total ≥ 230 mm^3. Elles présentaient une altération majeure de leur état général. Par conséquent, elles ont été euthanasiées. Ensuite, 28 jours après la chirurgie, 9 souris sur les 11 restantes ont développé des métastases hépatiques (entre 1 à 8 lésions) dont le volume tumoral total variait de 2,3 à 146,6 mm^3. A cette date, les souris n°4 et n°5 ont été euthanasiées afin de prélever les foies pour les analyses histologiques. De plus, les souris n°7, 8, 9 et 11 avaient atteint les points limites précédemment évoqués et ont dû être sacrifiées. Trente et un jours après la chirurgie, les souris n°3 et n°6 ont été sacrifiées afin de prélever les foies pour les analyses histologiques.

Tableau 3. Volume et nombre de métastases hépatiques par souris obtenus en échographie.

	BLI J7	BLI J14	J17		J23		J28		J31	
			Volume (mm^3)	Nb de lésions	Volume (mm^3)	Nb de lésions	Volume (mm^3)	Nb de lésions	Volume (mm^3)	Nb de lésions
Souris n°1	-	-	-	0	-	0	-	0	-	0
Souris n°2	+	-	-	0	-	0	-	0	-	0
Souris n°3	+	+	-	0	-	0	2,3	1	14,2*	3
Souris n°4	+	-	-	0	6,2	4	11,1*	5	/	
Souris n°5	+	+	-	0	15,8	3	17,1*	3	/	
Souris n°6	+	+	-	0	6,6	2	4,9	3	67*	6
Souris n°7	+	+	2,1	1	133,3	7	80,3	8	/	
Souris n°8	+	+	3,6	1	85,1	5	70,7	5	/	
Souris n°9	+	+	4,2	1	38,1	9	20,2	7	/	
Souris n°10	+	+	5,6	1	57,4	4	6,4	2	85	7
Souris n°11	+	+	11,3	3	66,7	2	146,6	3	/	
Souris n°12	+	+	58,3	2	227	3	/		/	
Souris n°13	+	+	79,2	4	284,5	6	/		/	

** = prélèvement du foie pour analyse histologique ; / = sacrifice de l'animal (point limite atteint ou prélèvement du foie)*

Nous avons remarqué qu'il était difficile de distinguer le nombre de métastases lorsque celles-ci avaient un volume important. En effet, il n'est pas évident de différencier les métastases en étroite proximité de plusieurs petites métastases qui ont fusionnées. Ces résultats influencent donc le volume tumoral calculé pouvant mener à de fortes variations du volume et du nombre de métastases d'un jour à l'autre pour une même souris, comme observé pour les souris n°6, 7, 8, 9 et 10. De plus, les lésions situées en bord du foie ne sont pas toujours accessibles en échographie lorsque la souris est placée en décubitus dorsal. Ce dernier point peut être amélioré en plaçant la souris légèrement sur le flanc droit puis sur le flanc gauche afin d'avoir accès à ces métastases. Cependant, il existe un risque de visualiser et de mesurer des métastases déjà prises en compte en décubitus dorsal.

La coloration HES du tissu hépatique confirme la présence des métastases, localisées principalement en périphérie du foie (**Figure 25A)**. Sur cette coupe histologique, nous avons identifié 8 lésions tumorales de différentes tailles. Pour les lésions n°2, 3, 4 et 5, nous avons observé la présence de zones nécrotiques (rose pâle). La lésion n°8 est située au niveau de la paroi d'un vaisseau, tandis que les lésions n°5, 6 et 7 sont localisées proches de structures vasculaires. Sur la **Figure 25 A & B**, nous avons observé des métastases bien délimitées, entourées d'hépatocytes sains, à proximité de vaisseaux sanguins. L'immunomarquage anti-CD31, biomarqueur de la microvascularisation tumorale, a mis en évidence la présence de capillaires sinusoïdes et de vaisseaux sanguins au sein des métastases hépatiques (marquage brun, **Figure 25 C & D)**.

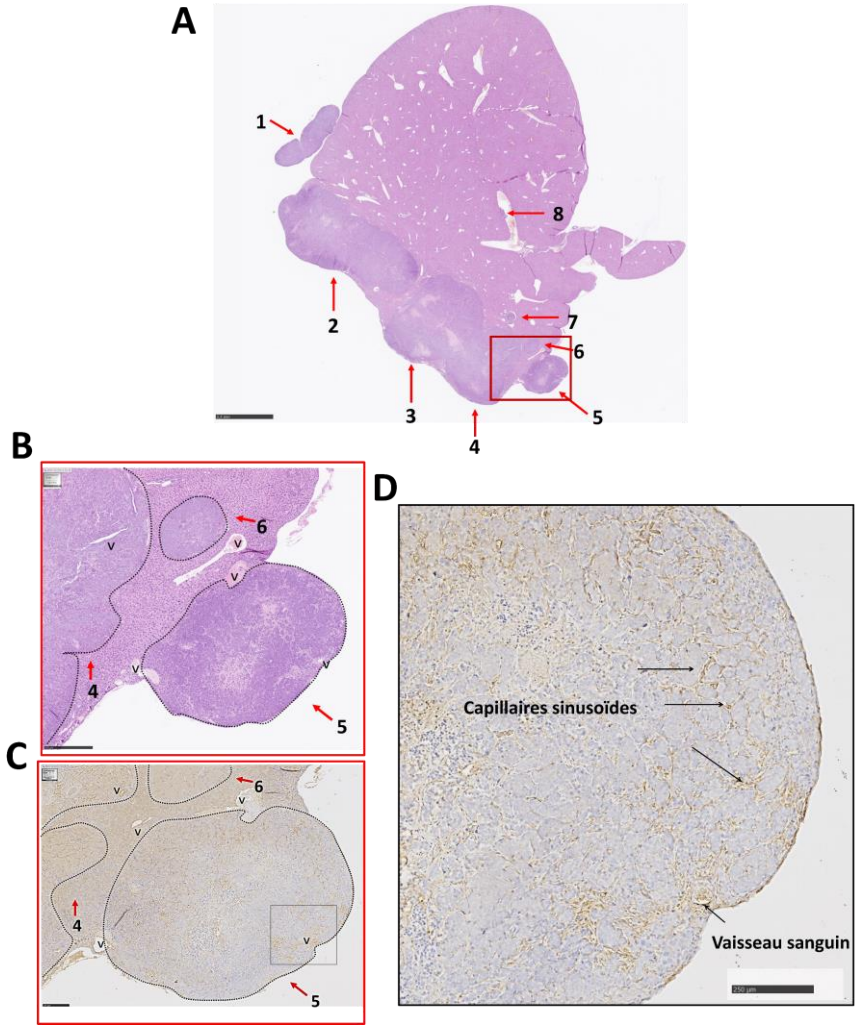


Figure 25. Observation histologique des métastases hépatiques après une coloration HES et mise en évidence de la vascularisation tumorale par un immunomarquage du CD31. A) Observation d'une coupe d'un lobe hépatique entier, après une coloration HES des tissus, les métastases sont indiquées par les chiffres et les flèches, la barre d'échelle correspond à 2,5 mm. B) Agrandissement sur la métastase n°5 (coloration HES) la barre d'échelle correspond à 500 µm. C) et D) Mise en évidence des capillaires sinusoïdes, après un immunomarquage du CD31, les barres d'échelle correspondent à 250 µm. Les annotations « v » indiquent les vaisseaux sanguins.

IV.1.2 Session 2

L'objectif principal de cette 2ème session était de mettre au point l'imagerie par scanner X. Pour cette session, nous avions 20 souris, dont 13 ont reçues une injection intra-splénique de cellules tumorales comme précédemment décrit, et 7 souris ont été utilisées comme contrôle, afin de repérer la structure anatomique du foie sain. Trois souris n'ont pas survécu à la suite d'hémorragies lors de la chirurgie.

Comme présenté dans la **Figure 26**, il est difficile de distinguer les organes les uns des autres chez la souris en scanner X sans agent de contraste. De ce fait, il était nécessaire d'utiliser un agent de contraste, comme l'Exitron Nano 12000, qui s'accumule spécifiquement dans les cellules de Kupffer du tissu hépatique, afin de rehausser le contraste de ce tissu par rapport à celui des autres organes. Les métastases hépatiques se distinguent du tissu hépatique sain par l'absence d'accumulation de cet agent de contraste. Ainsi, les métastases hépatiques ne sont visibles que lorsqu'elles sont délimitées par du tissu hépatique sain (**Figure 26**).

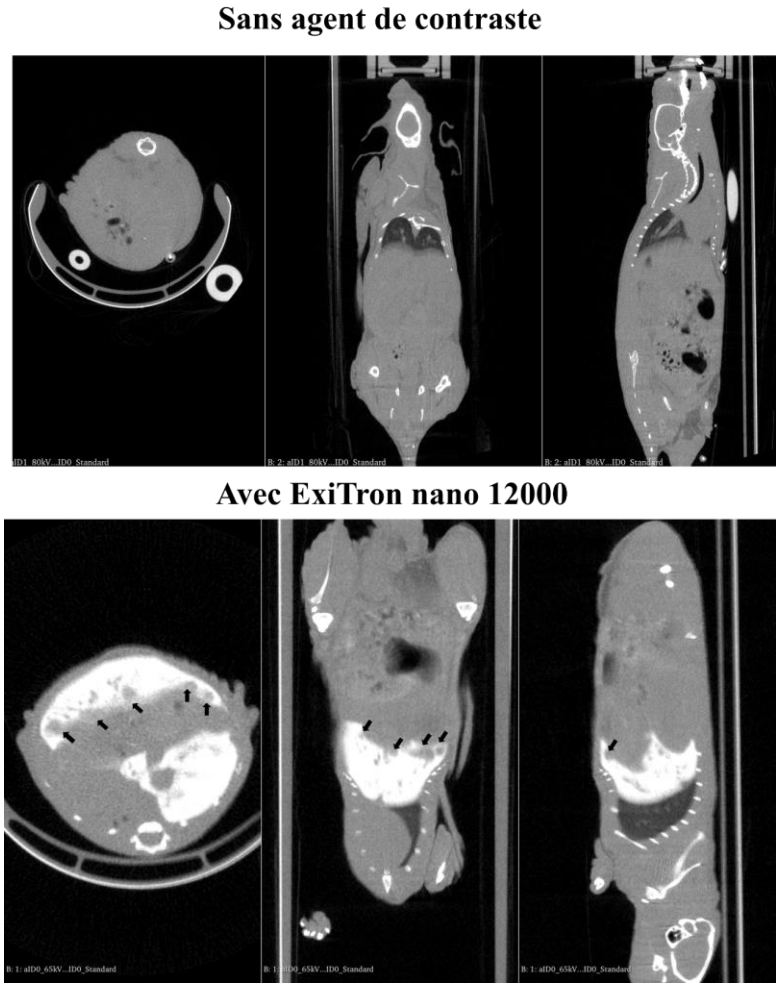


Figure 26. Visualisation par scanner X du foie et des métastases hépatiques après injection i.v. de l'agent de contraste ExiTron nano 12000. Les flèches noires indiquent la localisation des métastases. Les images à gauche représentent la vue axiale, celles du milieu correspondent à la vue coronale et les images à droite montrent la vue sagittale.

Nous avons injecté 5 souris, dont une souris contrôle n'ayant pas reçu d'injection intra-splénique de cellules tumorales, avec l'ExiTron nano 12000. Puis, nous avons réalisé des scanners X à différents temps après l'injection de l'agent de contraste (**Figure 19)**. Le contraste hépatique est réhaussé dès 2 h après l'injection de l'ExiTron et l'intensité du signal dans le foie augmente de 40 % en 24 h (**Figure 27**). Ensuite, l'intensité du signal diminue de 16 % à 72 h avant de se stabiliser jusqu'au 14ème jour après injection de l'agent de contraste. Nous avons observé que l'ExiTron s'accumule également dans la rate des souris. Par conséquent, pour la souris contrôle (sans métastase, sans splénectomie), nous n'avons pas mesuré le volume du foie car il n'était pas possible de segmenter le foie et la rate séparément. Les images obtenues en scanner X sur la souris contrôle nous ont permis d'observer l'anatomie du foie sain.

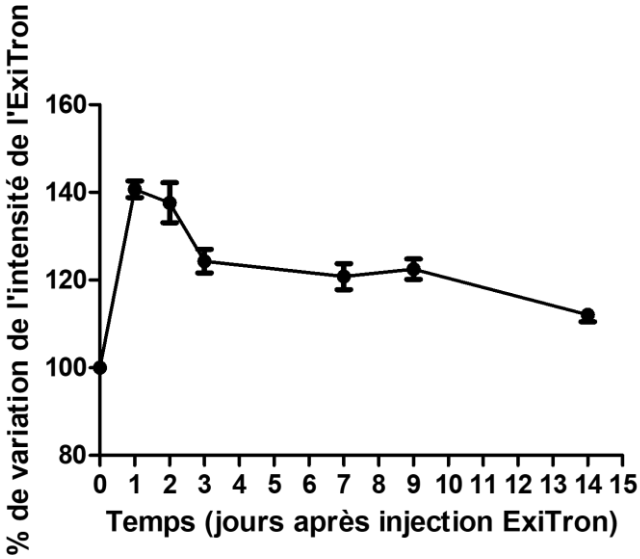


Figure 27. Variations de l'intensité du contraste de l'ExiTron nano 12000 dans le foie, obtenues après analyses des images de scanner X.

Chez les souris injectées avec les cellules HCT-116, le scanner X, réalisé après l'injection du produit de contraste, a confirmé que les métastases étaient principalement localisées en périphérie du foie. Il a également révélé que les métastases ne sont pas toujours délimitées par du tissu sain, rendant ainsi impossible la mesure directe de leur volume ainsi que leur dénombrement précis. Cependant, comme illustré dans la **Figure 28**, nous avons observé une dégradation importante de la structure du foie entre le jour 19 et le jour 26 après chirurgie.

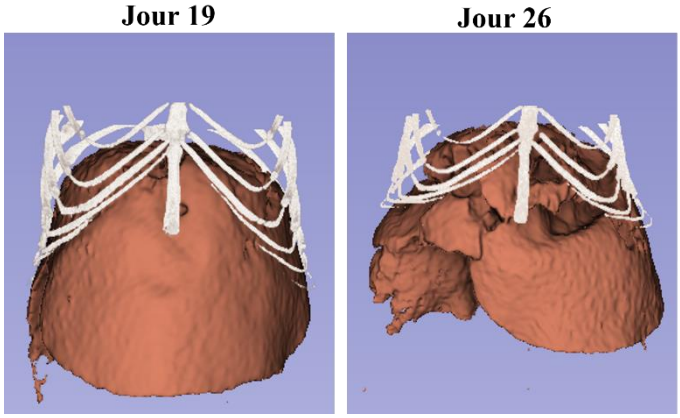


Figure 28. Dégradation de la structure du foie entre le J19 et le J26 après l'injection intra-splénique des cellules tumorales. Les images sont obtenues après la segmentation du foie à partir des images de scanner X.

Par conséquent, nous avons mesuré les variations du volume du foie au cours du temps afin de vérifier si cette mesure pouvait refléter la croissance des métastases. Les résultats présentés dans la **Figure 29** montrent que le volume du foie varie très peu jusqu'à J3 après injection de l'ExiTron. Une diminution d'environ 12 % du volume du foie est observée entre J3 et J14 après injection de l'ExiTron, correspondant à 15 et 26 jours post-chirurgie.

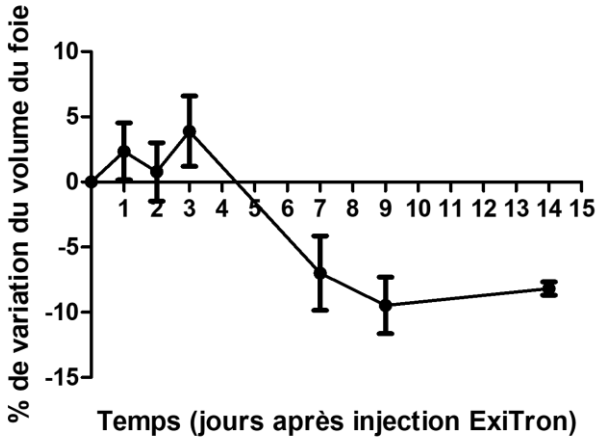


Figure 29. Variations du volume du foie obtenues après analyses des images de scanner X.

Le **Tableau 4** récapitule les données obtenues en échographie (volume total de métastases et leur nombre par souris par jour) et la **Figure 30** montre l'évolution du volume moyen des métastases au cours du temps. Dix-neuf jours après la chirurgie, nous avons détecté des métastases hépatiques en échographie pour 6/10 souris avec un volume moyen de métastases de 58,6 ± 31, 3 mm^3. Ensuite, 21 jours après la chirurgie nous avons identifié 8/10 souris présentant des métastases hépatiques avec un volume moyen de 72,2 mm^3 ± 30,7 mm^3. Enfin, 26 jours après la chirurgie, une souris a été sacrifiée (point limite atteint), par conséquent, sur les 9 souris restantes, 7 présentaient des métastases avec un volume moyen de 92,5 mm^3 ± 35,5 mm^3. Nous avons également remarqué que la souris n°1 ne semblait pas présenter de métastases hépatiques en échographie alors qu'une métastase était pourtant visible en scanner X.

Tableau 4. Récapitulatif du volume des métastases hépatiques et de leurs nombres obtenus en échographie.

	J19		J21		J26	
	Volume (mm^3)	Nb de lésions	Volume (mm^3)	Nb de lésions	Volume (mm^3)	Nb de lésions
Souris n°1	-	0	-	0	-	0
Souris n°2	-	0	-	0	-	0
Souris n°3	-	0	0,69	1	106,6	6
Souris n°4	-	0	3,4	2	41,3	9
Souris n°5	21,2	6	17,4	2	26,9	4
Souris n°6	190,6	12	142,4	5	149,5	14
Souris n°7	1,96	2	24,6	12	43,2	10
Souris n°8	53,5	3	219,8	4	241,7	11
Souris n°9	11,6	5	39,3	6	38,8	6
Souris n°10	72,8	15	130,4	10	/	/

/ = sacrifice de l'animal (point limite atteint)

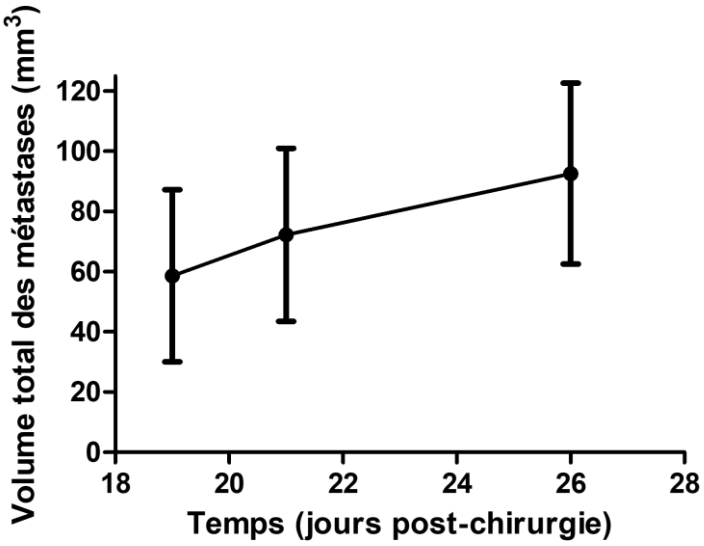


Figure 30. Évolution du volume total des métastases hépatiques obtenu par échographie.

En conclusion, sur l'ensemble de ces deux expérimentations (n = 37), 62 % des animaux ont survécu à la chirurgie et parmi eux 83 % ont développé des métastases hépatiques. La BLI est une imagerie très sensible qui nous assure une détection précoce, 7 jours après la chirurgie, des métastases hépatiques et un criblage rapide des souris positives. L'échographie nous permet de localiser et de dénombrer la majorité des métastases hépatiques environ 15 jours après la chirurgie (17ème jour session n°1 et 19ème jour session n°2). Cette modalité permet ainsi d'obtenir une mesure directe des dimensions des métastases et donc de calculer leur volume pour chaque souris (**Figure 30**). De plus, l'utilisation de l'ExiTron nano 12000 comme agent de contraste en scanner X nous a permis, après seulement une injection i.v., de rehausser le contraste hépatique pendant au moins 14 jours et son intensité est restée stable dans le temps (**Figure 27**). Cette modalité a permis de localiser les métastases hépatiques environ 15 jours après la chirurgie et de mesurer les variations du volume du foie au cours du temps (**Figure 29**). Les données obtenues en scanner suggèrent que la diminution du volume du foie observée est due à la croissance des métastases hépatiques, fournissant ainsi une mesure indirecte de la progression tumorale. Enfin, l'analyse histologique a mis en évidence la présence de métastases hépatiques vascularisées (**Figure 25**). Cette vascularisation est nécessaire pour une accumulation suffisante des MBs et de l'irinotécan dans la microvascularisation des métastases pour la délivrance de ce dernier par sonoporation. Nous avons défini que le traitement sera initié lorsque le volume moyen de métastases aura atteint 50 mm^3. D'après nos résultats, ce volume tumoral est atteint environ 15 jours après la chirurgie. Ainsi, l'ensemble de ces résultats nous a

permis de mettre au point les méthodes d'imagerie et de démontrer leur complémentarité afin d'évaluer la progression tumorale lors de notre protocole de traitement avec l'irinotécan.

IV.2. Protocole de délivrance de l'irinotécan par sonoporation dans un modèle murin de métastases hépatiques de CCR

IV.2.1 Session 3

L'objectif de cette session était de mettre au point un protocole de délivrance de l'irinotécan par sonoporation. L'inoculation des cellules tumorales a été réalisée sur 25 souris, la détection des métastases hépatiques par BLI a été réalisée 7 jours après l'inoculation. Après une semaine d'acclimatation, les animaux ont été imagés par imageries scanner X et échographique. Les souris ont été réparties en deux groupes expérimentaux : le groupe irinotécan seul (20 mg/kg) et le groupe irinotécan (20 mg/kg) + sonoporation. Le traitement a été répété 3 fois à 3 jours d'intervalle. À l'issue de l'inoculation des cellules tumorales, 16 souris sur 25 ont survécu. Les résultats de BLI et le volume des métastases avant traitement sont présentés dans le **Tableau 5**.

Tableau 5. Résultats de la détection des métastases hépatiques par bioluminescence et du volume des métastases par souris avant le traitement.

	BLI J7	J17		J21	
		Volume (mm^3)	Nb de lésions	Volume (mm^3)	Nb de lésions
Souris n°1	-	-	0	-	0
Souris n°2	-	/	/	/	/
Souris n°3	-	52	2	150,8	5
Souris n°4	+	37,8	10	18,8	14
Souris n°5	+	-	0	-	0
Souris n°6	+	-	0	-	0
Souris n°7	+	-	0	6,9	6
Souris n°8	+	-	0	49,7	7
Souris n°9	+	0,23	2	12,3	5
Souris n°10	+	2,1	3	69,9	9
Souris n°11	+	2,2	7	70,2	15
Souris n°12	+	0,5	2	10,4	5
Souris n°13	+	3,5	5	31,2	8
Souris n°14	+	10,3	3	49,5	8
Souris n°15	+	10,5	9	100,9	17
Souris n°16	+	11,7	6	185,8	3

/ = sacrifice de l'animal (point limite atteint ou prélèvement du foie) ; en rouge = souris exclues de l'étude car le volume tumoral est > 50 mm^3.

Sept jours après la chirurgie, la BLI nous a permis de détecter 13 souris positives sur les 16. Nous avons réalisé la première échographie 17 jours après la chirurgie. Une souris a été sacrifiée car elle avait atteint les points limites. Nous avons détecté des métastases hépatiques pour 10 souris sur les 15 restantes, avec un volume moyen de métastases de 13,1 ± 5,9 mm^3. En raison de la différence entre le nombre de souris détectées positives en BLI (n = 13) et en échographie (n = 10), ainsi que le volume total de métastases qui était inférieur à 50 mm^3, une seconde échographie a été réalisée 21 jours après la chirurgie. Ce délai devait permettre aux métastases de se développer afin que le volume tumoral atteigne environ 50 mm^3 et qu'un maximum de souris soient détectées en échographie. Les résultats ont montré que 12 souris sur 15 présentaient des métastases hépatiques, avec un volume moyen de 63,0 ± 19,1 mm^3. Cependant, nous avons exclu 5 souris qui présentaient des volumes tumoraux supérieurs à 50 mm^3. Ainsi, deux groupes ont été constitués pour lesquels le volume moyen de métastases hépatiques était d'environ 25 mm^3 ; 4 souris dans le groupe irinotécan + sonoporation et 3 souris dans le groupe irinotécan seul. Les effectifs des animaux dans chaque groupe étant très faibles nous avons choisi de présenter les médianes du volume de métastases et du volume du foie, **Tableaux 6 & 7**, respectivement. Ainsi, avant traitement, le groupe irinotécan + sonoporation a un volume total des métastases de 21,7 mm^3 (Q1= 11,8 et Q3= 35,8 mm^3) et le groupe irinotécan seul présente un volume de 18,8 mm^3 (Q1= 12,8 et Q3= 34,2 mm^3). Deux jours après le dernier traitement (J30), le groupe irinotécan + sonoporation a un volume total de métastases de 102,5 mm^3 (Q1= 79,8 et Q3= 111,3 mm^3) alors que le groupe irinotécan seul présente un volume de 197,1 mm^3 (Q1= 148,7 et Q3= 223,3 mm^3). Ainsi, ces résultats suggèrent que les souris traitées avec l'irinotécan délivré par sonoporation présentent un volume de métastases plus faible que les souris traitées avec l'irinotécan seul. En revanche, les variations du volume du foie avant et après traitement sont très proches entre les deux groupes expérimentaux, avec – 9 % (Q1= – 12 et Q3 = – 9 %) pour le groupe irinotécan + sonoporation et – 8 % (Q1= – 8 et Q3= 2 %) pour le groupe irinotécan seul. Le temps de doublement médian des métastases hépatiques s'allonge dans le groupe traité avec l'irinotécan délivré par sonoporation (6,0 jours avec Q1 = 3,2 et Q3 = 8,8 jours) comparativement au groupe irinotécan seul (2,4 jours avec Q1 = 2,3 et Q3 = 4,5 jours) (**Tableau 8**).

Tableau 6. Médiane du volume des métastases hépatiques.

	Irinotécan + sonoporation			Irinotécan		
	Médiane (mm^3)	**Q1**	**Q3**	**Médiane (mm^3)**	**Q1**	**Q3**
21 jours	21,7	11,8	35,8	18,8	12,8	34,2
24 jours	85,4	55,8	143,5	38,9	29,8	66,2
27 jours	135,6	72,2	213,6	109,7	83,8	171,6
30 jours	102,5	79,8	111,3	197,1	148,7	223,3

Tableau 7. Médiane du volume du foie.

	Irinotécan + sonoporation			Irinotécan		
	Médiane (mm^3)	**Q1**	**Q3**	**Médiane (mm^3)**	**Q1**	**Q3**
21 jours	1162,9	1103,9	1233,9	1206,3	1103,3	1228,3
24 jours	1099,2	1026,3	1186,1	1148,5	1144,8	1152,3
27 jours	1086,5	1039,8	1125,2	1119,3	1101,6	1124,9
30 jours	1044,9	992,5	1093,5	1124,8	1115,4	1135,4

Tableau 8. Temps de doublement médian des métastases hépatiques de CCR.

	Irinotécan + Sonoporation			Irinotécan		
	Médiane	**Q1**	**Q3**	**Médiane**	**Q1**	**Q3**
Temps de doublement (jours)	6,0	3,2	8,8	2,4	2,3	4,5

A la fin du protocole de traitement, soit 30 jours après la chirurgie, nous avons réalisé une imagerie TEP au ^{18}F-FDG afin d'évaluer les effets des traitements sur le métabolisme des métastases hépatiques. Le recalage des images en scanner X avec celles des images de TEP permettent de localiser l'accumulation du radiotraceur et d'évaluer le métabolisme des métastases hépatiques. Comme illustrée dans la **Figure 31A**, l'accumulation du radiotraceur est très hétérogène (zone entourée sur l'image de gauche). L'image de droite montre également que le signal obtenu en TEP se situant en bordure du foie ne permet pas d'affirmer que la métastase soit bien localisée dans le foie. A partir de l'image de la **Figure 31B**, nous avons repéré trois métastases hépatiques en scanner X et nous avons calculé le SUV max pour chacune d'entre elles. Les métastases entourées en bleu, en vert et en rose ont un SUV max de 1,13 ; 0,90 et de 0,58, respectivement. Ces valeurs confirment une accumulation métastatique hétérogène, suggérant ainsi des différences dans leur taille, leur activité métabolique, et/ou leur vascularisation. De plus, les métastases localisées dans la partie haute du foie, à proximité du cœur, ne peuvent pas être mises en évidence à cause de l'importante accumulation du

radiotraceur au niveau du cœur (**Figure 31C**). Ainsi, la variabilité dans l'accumulation du radiotraceur et les interférences dues à des structures anatomiques adjacentes (*e.g.*, le cœur) démontrent que l'utilisation de l'imagerie TEP au ^{18}F-FDG présente de nombreuses limites pour détecter l'ensemble des métastases hépatiques de CCR chez la souris. Par conséquent, en raison des limitations observées, nous n'avons pas continué à exploiter l'imagerie TEP au ^{18}F-FDG pour évaluer la réponse thérapeutique après traitement dans notre modèle.

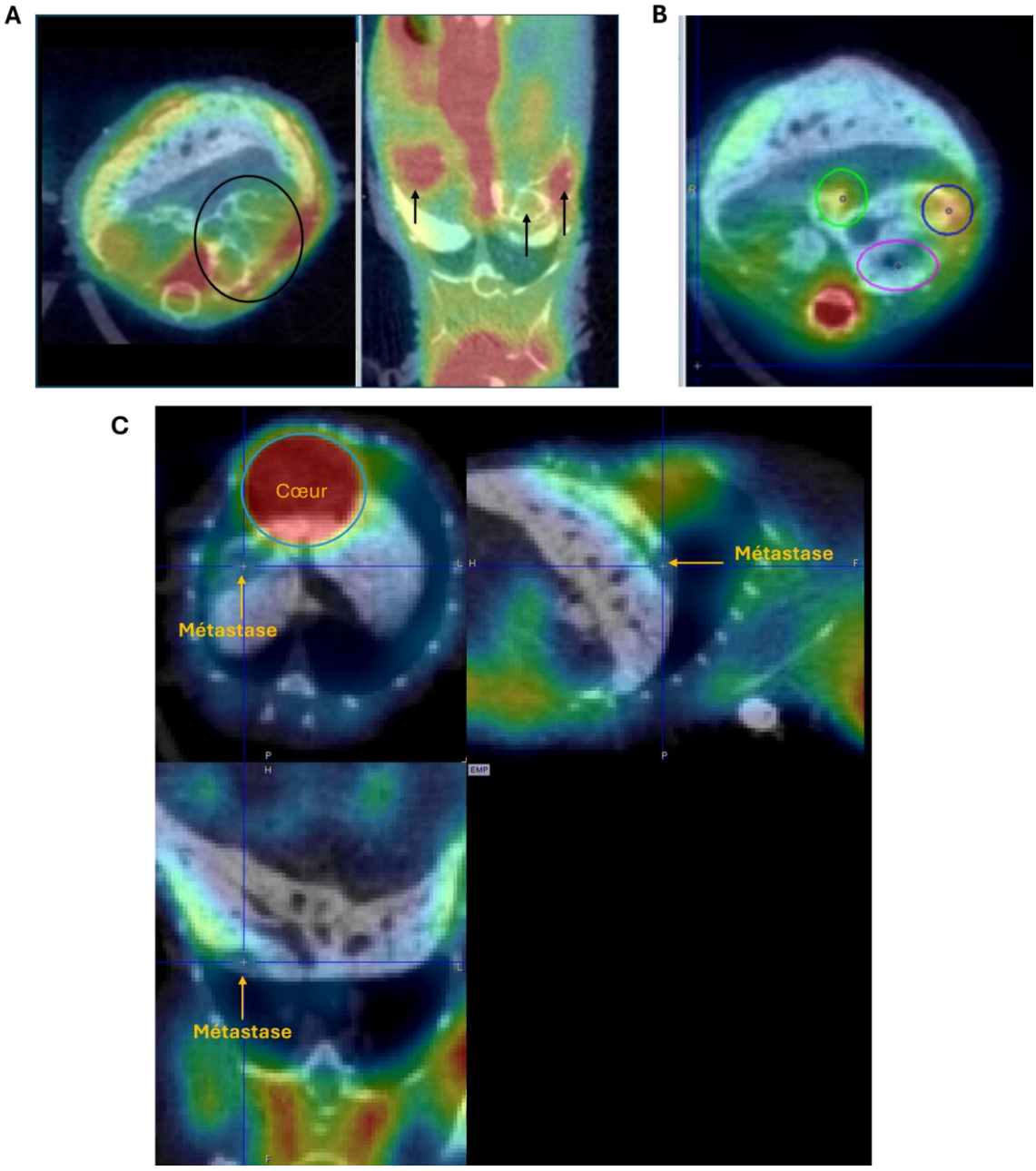


Figure 31. Évaluation de l'imagerie TEP au ^{18}F-FDG pour la détection des métastases hépatiques de CCR chez la souris. A) Accumulation non homogène du radiotraceur dans les métastases hépatiques (plan axial à gauche et plan coronal à droite), B) Régions d'intérêt utilisées pour le calcul du SUV max dans les trois métastases identifiées (plan axial), C) Illustration de l'accumulation du radiotraceur au niveau du cœur, à proximité d'une métastase hépatique observée dans le plan axial (en haut à gauche), sagittal (en haut à droite) et coronal (en bas à gauche).

IV.2.2 Session 4

L'objectif de cette session était d'améliorer le précédent protocole de la délivrance de l'irinotécan par sonoporation dans le modèle de métastases hépatiques de CCR. Les résultats de la session 3 ont démontré la nécessité d'augmenter l'effectif initial des animaux pour garantir un nombre suffisant d'individus dans notre protocole de traitement, afin de réduire la variabilité interindividuelle observée dans la croissance des métastases hépatiques. De plus, en raison de la forte croissance des métastases hépatiques dans notre modèle, nous avons décidé de traiter les métastases hépatiques plus précocement. Ainsi, le traitement a débuté 16 jours après l'inoculation des cellules tumorales au lieu de 22 jours avec le protocole précédent. Trente et un animaux sur trente-trois ont survécu à la suite de l'inoculation des cellules tumorales. Les résultats de la BLI et les volumes de métastases hépatiques avant le traitement sont répertoriés dans le **Tableau 9**. La BLI a révélé la présence de métastases hépatiques chez 29 souris sur 31. Une souris avait un signal de BLI localisé dans l'ensemble de l'abdomen, suggérant une dissémination des cellules tumorales dans la cavité abdominale. Par conséquent, elle a été sacrifiée. La première échographie a été réalisée 15 jours après la chirurgie, nous avons détecté des métastases chez 21 souris, dont une qui était négative en BLI au J7. Nous avons constitué deux groupes d'animaux avec des volumes de métastases homogènes ($p > 0,05$). Le groupe irinotécan + sonoporation est composé de 11 souris avec un volume moyen de métastases de 12,4 ± 3,8 mm^3 et le groupe irinotécan seul est composé de 10 souris avec un volume moyen de métastases de 13,2 ± 5,3 mm^3.

Tableau 9. Résultats de la détection des métastases hépatiques par bioluminescence et du volume des métastases par souris avant le traitement.

	BLI J7	J15	
		Volume (mm^3)	Nb de lésions
Souris n°1	-	-	-
Souris n°2	-	28,2	7
Souris n°3	+	/	/
Souris n°4	+	-	-
Souris n°5	+	-	-
Souris n°6	+	-	-
Souris n°7	+	-	-
Souris n°8	+	-	-
Souris n°9	+	-	-
Souris n°10	+	-	-

Souris n°11	+	-	-
Souris n°12	+	54,9	31
Souris n°13	+	33,4	22
Souris n°14	+	25,7	14
Souris n°15	+	25,5	13
Souris n°16	+	16,9	9
Souris n°17	+	16,5	3
Souris n°18	+	14,7	4
Souris n°19	+	13,4	13
Souris n°20	+	9,6	8
Souris n°21	+	7,3	3
Souris n°22	+	5,2	8
Souris n°23	+	5,9	6
Souris n°24	+	3,1	7
Souris n°25	+	2,0	2
Souris n°26	+	1,6	2
Souris n°27	+	1,3	1
Souris n°28	+	1,1	1
Souris n°29	+	0,9	1
Souris n°30	+	0,4	2
Souris n°31	+	0,3	4

D'après la **Figure 32**, la croissance des métastases hépatiques dans le groupe traité avec l'irinotécan + sonoporation diminue par rapport à celle des métastases du groupe traité avec l'irinotécan seul. Pour le groupe irinotécan seul, la croissance des métastases augmente fortement dès l'arrêt du traitement, comparativement au groupe traité avec l'irinotécan délivré par sonoporation. En effet, 29 jours après la chirurgie, le volume total des métastases hépatiques dans le groupe irinotécan seul augmente de 10290 ± 6161 % par rapport au jour avant traitement, tandis que ce volume augmente de 2328 ± 909 % pour le groupe irinotécan + sonoporation. Cependant, l'analyse statistique de ces données n'a démontré aucune différence significative entre les deux groupes (test de Mann-Whitney ; $p > 0,05$). L'analyse de la survie a révélé que la survie médiane n'était pas statistiquement différente entre les deux groupes expérimentaux (29 jours pour le groupe irinotécan *versus* contre 26 jours pour le groupe irinotécan + sonoporation ; $p = 0,7156$) (**Figure 33**). Ainsi, l'administration de l'irinotécan par sonoporation

n'améliore pas significativement la survie des animaux comparativement à l'administration d'irinotécan seul.

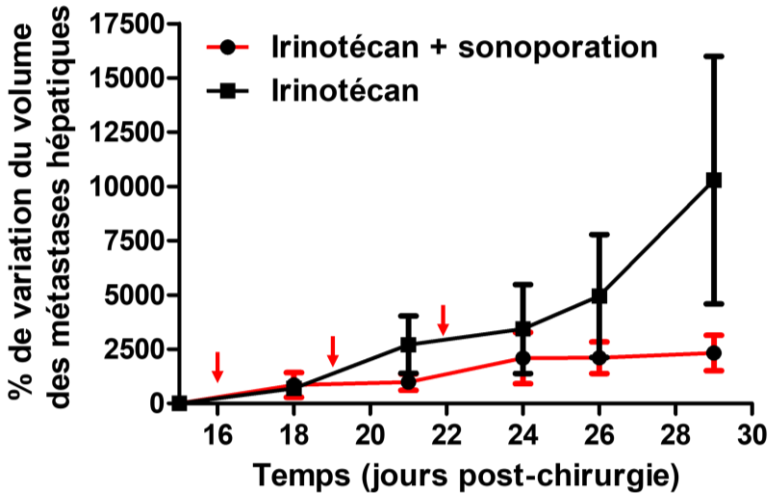


Figure 32. Variations du volume des métastases hépatiques, obtenues à partir des images échographiques. Les flèches rouges indiquent les jours de traitement.

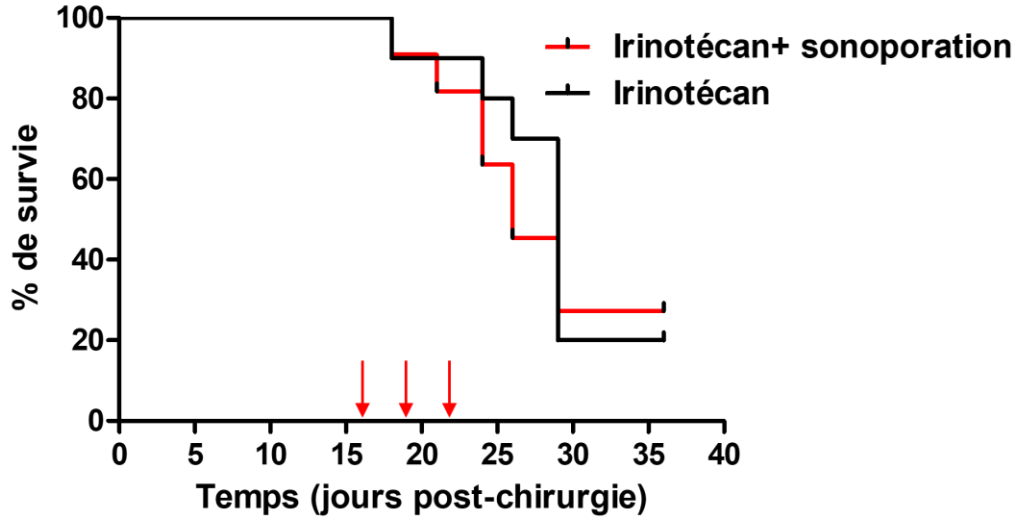


Figure 33. Courbes de Kaplan-Meier décrivant le pourcentage de survie. Les flèches rouges indiquent les jours de traitement.

En prenant en compte les résultats obtenus sur l'analyse de la comparaison des moyennes des volumes de métastases entre les groupes ainsi que les données obtenues sur la survie des animaux, une analyse de la variance (ANOVA ; ANalysis Of VAriance) à mesures répétées a été réalisée sur les animaux qui ont survécu 29 jours après l'inoculation des cellules tumorales. Cette analyse a confirmé les résultats obtenus avec le test de Mann-Whitney, il n'y a pas de différence significative sur la variation du volume des métastases entre les deux groupes expérimentaux au cours du temps (p = 0,28). En revanche, cette analyse a montré d'importantes

variations interindividuelles significatives ($p < 0{,}0001$). Dans ce contexte, et plus précisément au regard de la dispersion des valeurs dans le groupe irinotécan au jour 29, nous avons analysé la variation du volume des métastases, par une ANOVA, entre les souris d'un même groupe de traitement. Ainsi, les résultats montrent que l'effet « sujet » est significatif dans les deux groupes ; mais il est d'autant plus important dans le groupe irinotécan seul (44 % ; $p = 0{,}0004$) que dans le groupe sonoporation + irinotécan (28 % ; $p = 0{,}0029$). Afin de mieux comprendre et décrire les différentes variations du volume des métastases au sein des groupes, nous avons choisi de représenter les données de chaque souris (**Figures 34, 35 & 36**) pour mettre en évidence les différents profils d'évolution de la croissance tumorale.

La **Figure 34A** représente le pourcentage de variation du volume de métastases pour chaque souris du groupe irinotécan et la **Figure 34B** celles du groupe irinotécan + sonoporation. Sur la **Figure 34A**, nous pouvons observer deux individus, IRT6 et IRT7, qui présentent un pourcentage de variation largement supérieur (> 30000 % au jour 29) aux autres individus du groupe irinotécan. Nous pouvons donc expliquer que l'importante dispersion des données dans le groupe irinotécan est principalement liée à ces deux individus. Sur la **Figure 34B**, nous pouvons remarquer qu'un individu (sono7) présente également un pourcentage de variation plus important (> 5000 % au jour 26) que les autres individus du groupe irinotécan + sonoporation. En revanche, cette variation est bien moins prononcée que les variations des deux individus IRT 6 et IRT7 du groupe irinotécan, ce qui se traduit par une dispersion des données moins marquée dans ce groupe. Ces résultats expliquent, en partie, la dispersion des données dans chaque groupe.

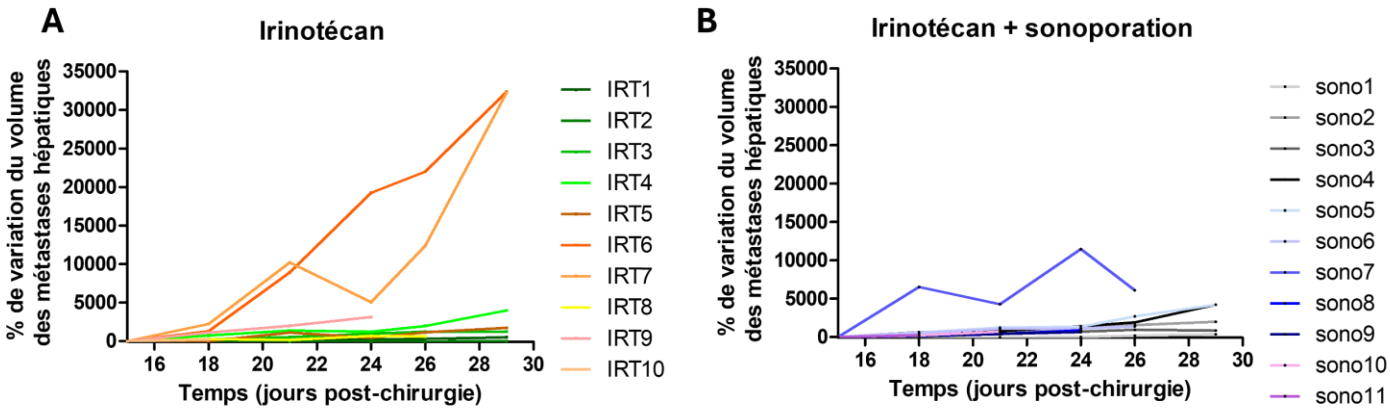


Figure 34. Variations du volume de métastases hépatiques par souris en fonction du groupe de traitement. (A) Souris du groupe irinotécan et (B) souris du groupe Irinotécan + sonoporation.

Afin de visualiser les variations du volume de métastases des autres souris, la **Figure 35**, représente les variations du volume de métastases sans les individus aux variations extrêmes présentés précédemment (IRT6, IRT7 et sono7). Ainsi, sur la **Figure 35A**, nous pouvons identifier différents profils : les souris IRT1 et IRT2 présentent un pourcentage de variations du volume de métastases compris entre – 0,5 % et 500 % ; les souris IRT3 et IRT5 présentent un pourcentage de variations du volume de métastases compris entre 1200 % et 1750 % ; et enfin pour la souris IRT4, ce pourcentage de variation est proche de 3900 %. Dans le groupe irinotécan + sonoporation, différents profils sont également observés pour les souris ayant survécu jusqu'au jour 29 après l'inoculation des cellules tumorales (**Figure 35B**). Les souris sono1 et sono3 présentent un pourcentage de variations du volume de métastases compris entre 360 % et 850 % ; la souris sono2 présente un pourcentage de variations du volume de métastases proche de 2000 % ; et enfin pour les souris sono4 et sono5, ce pourcentage de variation est proche de 4000 %.

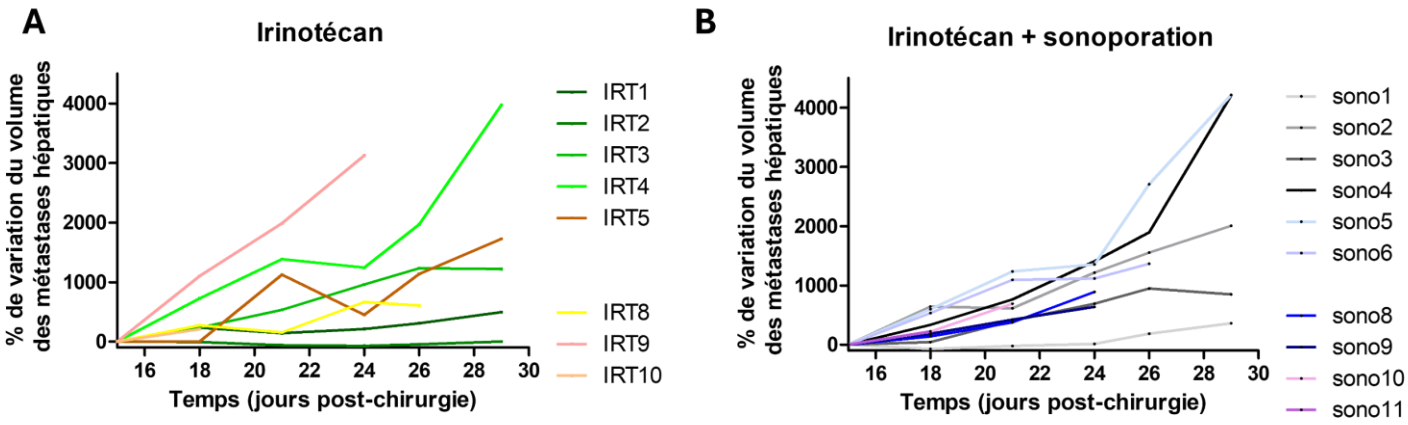


Figure 35. Variations du volume de métastases hépatiques comprises entre 0 et 4500 % (sans les valeurs extrêmes). (A) Souris du groupe irinotécan et (B) souris du groupe Irinotécan + sonoporation.

Après avoir décrit et identifié différents profils au sein des deux groupes de traitement, nous avons combiné les données du groupe irinotécan (en noir) et du groupe irinotécan + sonoporation (en rouge) sur un même graphique (**Figure 36**). La **Figure 36A**, représente le pourcentage de variation du volume des métastases pour chaque souris dans chaque groupe. La **Figure 36B**, représente le pourcentage de variation du volume des métastases pour chaque souris ayant survécu jusqu'à la fin de l'expérimentation dans chaque groupe, sans les valeurs extrêmes (IRT6, IRT7 et sono7).

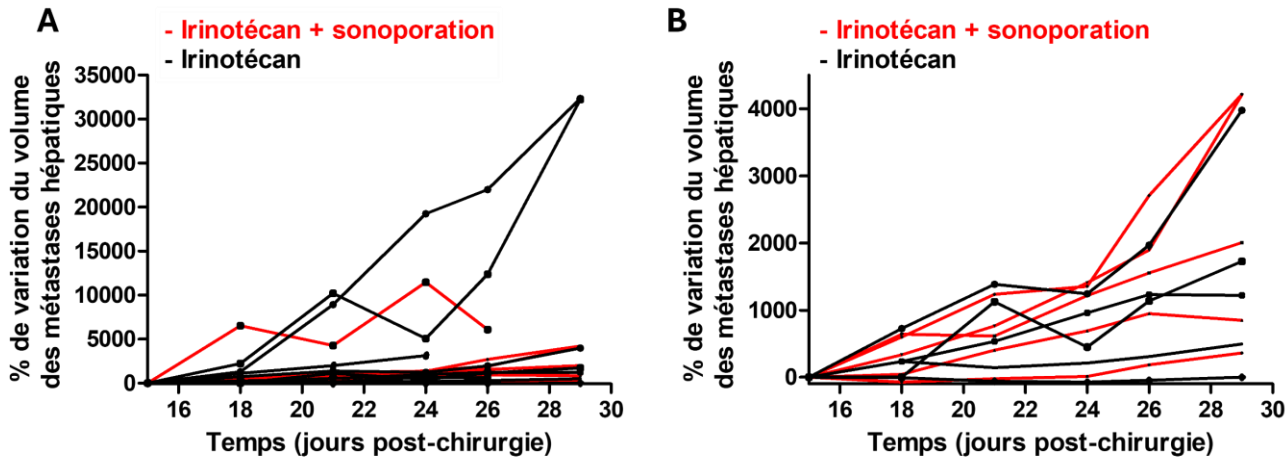


Figure 36.Variations du volume de métastases hépatiques par souris en fonction du groupe de traitement. (A) avec les valeurs comprises entre 0 et 35000 et (B) sans les valeurs supérieures à 4500.

Ces représentations permettent d'identifier et de classer les différents profils de variation du volume de métastases entre les deux groupes de traitement, pour les souris ayant survécu jusqu'au 29ème jour post-inoculation (n=7 dans le groupe irinotécan seul et n=5 dans le groupe irinotécan + sonoporation) :

- Pourcentage de variation du volume de métastases supérieur à 30000 : n=2 dans le groupe irinotécan et n=0 dans le groupe irinotécan + sonoporation ;
- Pourcentage de variation du volume de métastases compris entre 3000 et 4000 : n=1 dans le groupe irinotécan et n=2 dans le groupe irinotécan + sonoporation ;
- Pourcentage de variation du volume de métastases compris entre 1000 et 2000 : n=2 dans le groupe irinotécan et n=1 dans le groupe irinotécan + sonoporation ;
- Pourcentage de variation du volume de métastases inférieur à 1000 : n=2 dans le groupe irinotécan et n=2 dans le groupe sonoporation.

Pour conclure, cette analyse descriptive permet de mieux comprendre les résultats sur les variations du volume des métastases observées entre les groupes de traitement et au sein de chaque groupe. Dans le groupe irinotécan, la présence de deux individus (IRT6 et IRT7) avec des variations du volume des métastases exceptionnellement élevées (> 30000 %) a fortement influencé les résultats dans ce groupe. Cette variabilité extrême est responsable de la dispersion importante des données observée dans ce groupe. En revanche, dans le groupe irinotécan + sonoporation, la variation extrême (sono7) est beaucoup moins importante (> 5000 %), ce qui se traduit par une dispersion des données plus faible. La comparaison des profils de variation entre les groupes indique que, bien que les traitements aient des effets globalement similaires

sur la croissance des métastases, les individus réagissent de manière distincte. Toutefois, les différences de pourcentage de variation entre les deux groupes ne sont pas suffisamment distinctes pour conclure à une supériorité ou une infériorité de la délivrance de l'irinotécan par sonoporation.

Les temps de doublement des métastases hépatiques de CCR sont équivalents (p = 0,76) entre les deux groupes de traitement avec un temps de doublement moyen de 3,0 ± 0,4 jours pour le groupe irinotécan + sonoporation et de 2,9 ± 0,4 jours pour le groupe irinotécan seul (**Tableau 10**). Ainsi, la délivrance de l'irinotécan par sonoporation ne semble pas ralentir la dynamique de croissance des métastases hépatiques de CCR dans notre modèle.

Tableau 10. Temps de doublement des métastases hépatiques de CCR.

	Irinotécan + Sonoporation	Irinotécan
Temps de doublement (jours)	3,0 ± 0,4	2,9 ± 0,4

Deux semaines après le début du traitement (29 jours après la chirurgie), le volume du foie a diminué de 16,0 % ± 2,3 pour le groupe irinotécan + sonoporation et de 17,0 ± 2,7% pour le groupe irinotécan seul (**Figure 37**).

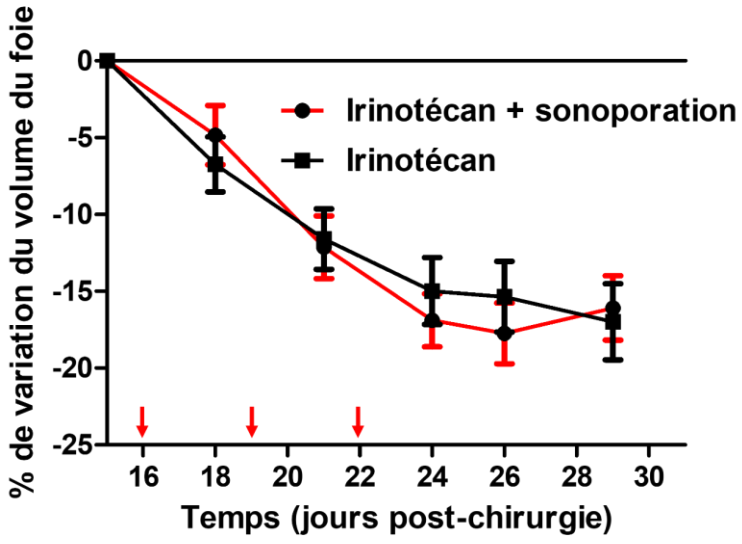


Figure 37. Variations du volume du foie obtenues après analyses des images de scanner X.

D'après ces résultats, les variations du volume du foie mesurées en scanner X ne reflètent pas la croissance des métastases mesurée en échographie. Par conséquent, nous avons évalué la corrélation entre le volume du foie et le volume des métastases hépatiques afin de mieux

comprendre la relation entre ces deux paramètres mesurés. Les résultats de la régression linéaire démontrent qu'il existe un lien entre les variations du volume du foie et du volume des métastases hépatiques (**Figure 38**). En effet, une augmentation du volume des métastases est associée à une diminution du volume du foie, avec un coefficient de régression négatif dans les deux groupes étudiés : -3,0877 pour le groupe traité uniquement avec l'irinotécan et -2,6654 pour le groupe traité avec l'irinotécan + sonoporation. L'analyse de la corrélation fournit des coefficients de corrélation de Pearson de r = - 0,95 pour le groupe irinotécan seul et r = - 0,92 pour le groupe irinotécan + sonoporation, démontrant une forte corrélation négative entre le volume des métastases et les variations du volume du foie. Bien qu'il existe une forte corrélation entre le volume du foie et le volume des métastases, la différence de taille entre ces deux volumes est telle que les variations du volume des métastases ne se traduisent pas par des variations proportionnelles du volume du foie. Par conséquent, il est important d'interpréter la relation entre le volume du foie et celui des métastases en tenant compte des échelles différentes entre ces deux volumes. Les variations significatives des volumes des métastases ne se traduisent pas en des variations notables du volume hépatique.

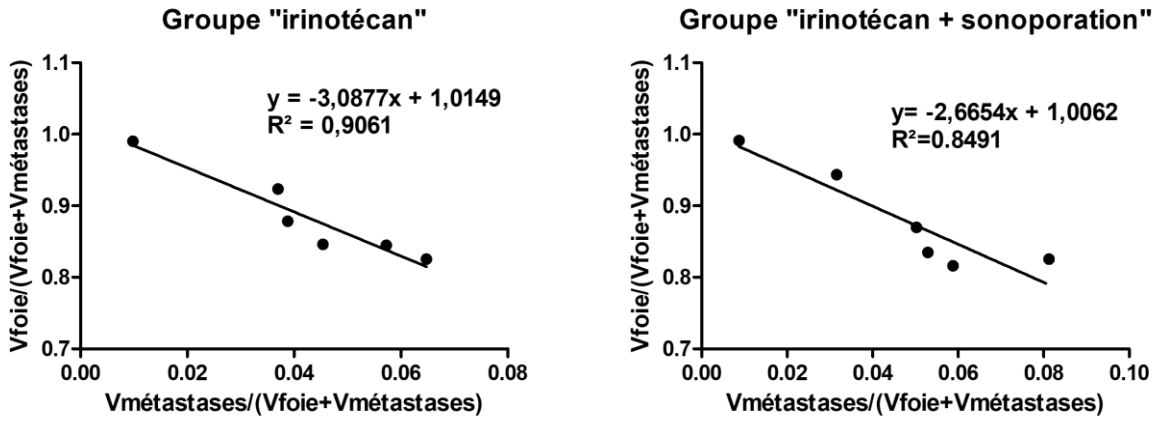


Figure 38. Corrélation entre le volume du foie obtenu à partir des images de scanner X et le volume des métastases hépatiques mesuré à partir des échographies.

En conclusion, les résultats montrent que la mesure du volume du foie ne permet pas de quantifier de manière suffisamment précise la croissance des métastases hépatiques. En revanche, l'imagerie par scanner X est efficace pour localiser les métastases, améliorant ainsi la précision des mesures du volume des métastases effectuées par échographie. L'ensemble des résultats de la session 4 suggère que la délivrance de l'irinotécan par sonoporation n'améliore pas significativement son efficacité thérapeutique dans notre modèle murin de métastases hépatiques de CCR en comparaison avec l'administration d'irinotécan seul.

V.V. Discussion

Les objectifs des deux premières sessions *in vivo* étaient d'une part d'améliorer le modèle de métastases hépatiques de CCR préétabli au laboratoire, et d'autre part de mettre au point les différentes modalités d'imagerie (BLI, scanner X, échographie, imagerie TEP au ^{18}F-FDG) afin d'évaluer la croissance des métastases hépatiques de CCR dans ce modèle. Dans un second temps, l'objectif était d'exploiter ce modèle pour mettre au point un protocole de délivrance de l'irinotécan par sonoporation pour le traitement des métastases hépatiques de CCR.

V.1. Établissement du modèle

Afin d'améliorer le taux de souris développant des métastases hépatiques de CCR, le nombre de cellules tumorales injecté dans le protocole initial a été augmenté de 1.10^6 cellules dans 30 µL à 2.10^6 cellules dans 50 µL. La proportion de Matrigel® a également était également augmentée de 25 % à 50 %. De plus, il était nécessaire de se former aux gestes chirurgicaux, notamment à l'injection des cellules tumorales et à la splénectomie qui sont des étapes critiques de cette chirurgie. Le pourcentage d'animaux ayant survécu à l'ablation de la rate a évolué au cours des expérimentations démontrant la nécessité de s'entrainer afin de maitriser les étapes de la chirurgie pour l'établissement du modèle. En effet, ce pourcentage était de 65 % lors de la session 1, de 77 % à la session 2, de 64 % à la session 3 et enfin de 94 % à la session 4. A ma connaissance, ce pourcentage de souris qui survit après inoculation des cellules tumorales et splénectomie n'est pas systématiquement rapporté dans les publications actuelles. Dans notre cas, parmi les souris ayant survécu à la chirurgie, 84 % (session 1), 80 % (session 2), 75 % (session 3) et 93 % (session 4) ont développé des métastases hépatiques de CCR durant les 30 jours de suivi après l'inoculation des cellules tumorales (**Tableaux 3, 4, 5 & 9**). Les données de la littérature démontrent que l'injection de cellules HCT-116 à différentes concentrations ($1{,}5.10^6$ à 5.10^6 cellules) conduit à un pourcentage très variable de souris avec des métastases, allant de 30 % à 100 % (Bouvet *et al.*, 2006; Cui *et al.*, 2014; Fleten *et al.*, 2017; Lavilla-Alonso *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2014). La seconde difficulté liée à l'utilisation de ce modèle est due à la forte variabilité interindividuelle du volume des métastases hépatiques de CCR. Cette variabilité complexifie la formation de groupes homogènes en termes de volume de métastases avant le début du traitement, ce qui a conduit à l'utilisation d'un faible effectif d'animaux (n=7, soit 44 %) lors de la session 3. Cependant, avec un effectif initial plus important avant la chirurgie et un taux de survie postopératoire plus élevé lors de la session 4, nous avons pu disposer d'un nombre plus élevé d'animaux (n=21, soit 67 %) pour étudier l'efficacité du protocole de délivrance de l'irinotécan par sonoporation dans notre modèle. Ainsi, l'utilisation

d’un modèle métastatique de CCR chez la souris nécessite de prévoir un effectif important afin de disposer d’un nombre suffisant d’animaux développant des métastases hépatiques pour étudier l’efficacité d’un protocole thérapeutique.

V.2. Les modalités d’imagerie

Afin d’évaluer le développement des métastases hépatiques dans ce modèle, nous avons mis au point plusieurs modalités d’imagerie. La BLI a été utilisée pour la détection précoce des métastases hépatiques et le criblage rapide des animaux (**Figure 23**), le scanner X (**Figures 26 & 29**) pour localiser ces métastases et obtenir une mesure indirecte de leur croissance en mesurant les variations du volume du foie, et l’échographie en mode B pour dénombrer les métastases, mesurer leurs dimensions et ainsi calculer leur volume (**Figures 24 & 30**).

V.2.1 La BLI

Concernant la BLI, cette modalité, très sensible, permet en effet une acquisition rapide d’environ 5 min et d’imager trois souris en même temps. Cette technique d’imagerie nous a permis de déterminer rapidement les animaux positifs mais également d’exclure des souris présentant un signal de bioluminescence au niveau de l’ensemble de l’abdomen, lié à la dissémination des cellules tumorales dans le péritoine lors d’une injection mal réalisée. Cependant, certaines souris étaient négatives en BLI alors que des métastases ont été détectées, plus tardivement, par échographie ou scanner X. Plusieurs explications peuvent justifier ces faux négatifs. En effet, un facteur potentiel, contribuant à la diminution de la détection de la bioluminescence dans les tumeurs, est la perte d'émission de photons due à l'absorption et à la dispersion associées à l'augmentation de la profondeur des tissus (Sarraf-Yazdi *et al.,* 2004). Les caméras détectent la bioluminescence jusqu'à une profondeur de 3 cm chez les petits animaux (Sarraf-Yazdi *et al.,* 2004). Cependant, certaines métastases hépatiques sont de petites tailles et/ou situées en profondeur, ainsi si la souris est positionnée légèrement sur le côté, la détection du signal peut être limitée. De plus, le taux d'échec des injections i.p. de luciférine est compris entre 3 et 10 %. Une des principales causes d’échec est l’injection de la luciférine dans l'intestin (Khalil *et al.,* 2013a). Dans ce cas, la quantité de substrat disponible au niveau de la tumeur est limitée, réduisant ainsi la détection du signal de bioluminescence. Par exemple, lors de la session 1, une souris qui était positive 7 jours après l’inoculation des cellules est devenue négative 7 jours plus tard (**Tableau 3**). Cependant, chez cette même souris, quatre métastases ont été détectées en échographie 23 jours post-inoculation, avec un volume total de 6,2 mm^3

(**Tableau 3**). Ce résultat peut s'expliquer par plusieurs hypothèses : soit l'injection de la luciférine durant la deuxième BLI a été effectuée dans l'intestin plutôt que dans la cavité péritonéale, entraînant une quantité insuffisante de substrat au niveau des métastases, soit la petite taille des métastases et le positionnement inadéquat de la souris ont empêché la détection du signal. Il aurait été pertinent de réaliser une seconde injection de luciférine pour les souris négatives en BLI afin de confirmer leur statut et d'éliminer une erreur d'injection i.p.. Comme décrit par Fleten *et al.,* il aurait été également approprié d'imager les souris d'abord en décubitus ventral, puis en décubitus dorsal afin d'améliorer la détection des métastases situées en profondeur (Fleten *et al.,* 2017). Cette approche aurait été particulièrement utile pour confirmer que les souris négatives ne présentaient réellement aucune métastase détectable en BLI.

Un autre paramètre pouvant influencer les résultats de la BLI est l'hypoxie tumorale car l'oxygène est nécessaire à la réaction de bioluminescence (Khalil *et al.,* 2013b). Cependant, 7 jours après l'inoculation des cellules tumorales, il paraît peu probable que les métastases hépatiques de CCR dans notre modèle présentent des caractéristiques hypoxiques. Concernant les résultats de la BLI de la session 4 (**Tableau 9**), il est important de noter que les souris positives en BLI à 7 jours post-inoculation et qui étaient négatives en échographie au 15ème jour, ont effectivement développé des métastases. Ainsi, la BLI s'est révélée suffisamment sensible pour détecter la majorité des métastases hépatiques et cribler rapidement les animaux à un stade plus précoce (7 jours post-inoculation) du développement tumoral comparativement à l'échographie et au scanner X. En effet, la majorité des métastases hépatiques a été détectée en moyenne 15 jours post-inoculation en échographie et en scanner X.

V.2.2 L'échographie

L'échographie a permis de mesurer directement les dimensions des métastases et de calculer le volume total des métastases hépatiques pour chaque souris. Comme décrit par Wei *et al.,* nous avons également observé que les métastases hépatiques apparaissent principalement comme hypoéchogènes, et leur échogénicité diminue à mesure que leur volume augmente (**Figure 24**) (Wei *et al.,* 2022). La taille, le nombre et la localisation des métastases représentent des limitations majeures dans leur détection par échographie. En effet, les métastases de moins de 2 mm peuvent être difficiles à détecter, et lorsque leur nombre et/ou leur volume augmentent, leur dénombrement et leur délimitation exacts deviennent complexes, ce qui réduit la fiabilité des mesures (Wei *et al.,* 2022). De plus, les métastases situées en bordure du foie ou près des côtes sont particulièrement difficiles à repérer (Ramasawmy *et al.,* 2016). Pour améliorer leur

détection, la position des souris a été ajustée au cours des expérimentations, les souris initialement positionnées en décubitus dorsal ont également été placées alternativement sur chaque flanc, ce qui a permis de mieux cibler les métastases en bordure du foie. De plus, l'utilisation des images obtenues par scanner X a facilité le repérage des métastases et a permis de mieux les localiser en échographie, améliorant ainsi la fiabilité des mesures au cours des différentes sessions d'imagerie. Néanmoins, certaines métastases situées sous les côtes n'ont pas été visualisées par échographie. Une des principales limites de l'échographie est son opérateur-dépendance. Nous étions ainsi toujours deux manipulateurs à réaliser les échographies et à repérer les métastases hépatiques. Enfin, la durée d'acquisition était d'environ 20 min par souris, nécessitant des anesthésies plus longues et fréquentes des animaux comparativement à la BLI et au scanner X.

V.2.3 Le scanner X

Le scanner X est une modalité d'imagerie rapide (5 min /souris anesthésie comprise) avec une résolution spatiale élevée (quelques µm), permettant d'obtenir des informations précises sur la localisation et le nombre des métastases hépatiques délimitées par du foie sain (**Figure 26**). Nous avons évalué les variations du volume du foie, après une injection i.v. unique d'Exitron nano 1200, afin d'obtenir une mesure indirecte de la progression des métastases hépatiques (Lavaud *et al.,* 2020) (**Figure 29**). En effet, Lavaud *et al.,* ont établi un modèle de métastases hépatiques de CCR à partir d'une injection intra-splénique de cellules HT-29rvluc2 puis une splénectomie a été réalisée 2 semaines après l'inoculation des cellules. Pour évaluer la progression des métastases hépatiques à l'aide du scanner X dans leur modèle, ils ont réalisé une injection i.v. d'ExiTron Nano 6000 (100 µL contenant 640 mg d'iode/kg). Après une segmentation des foies basée sur le contraste hépatique rehaussé par l'ExiTron, ils ont comparé les variations du volume du foie entre trois groupes de souris : un groupe sans métastase, un groupe avec des métastases à un stade précoce, et un groupe avec des métastases à un stade avancé (volumes tumoraux et temps après inoculation des cellules tumorales non renseignés). Les auteurs ont observé une augmentation significative de 50 % du volume hépatique dans le groupe de souris au stade avancé du développement des métastases comparativement au groupe contrôle sans métastase. Cependant, la sensibilité de cette méthode d'évaluation indirecte de la progression des métastases est relativement faible. En effet, elle permet uniquement d'observer des variations significatives du volume hépatique que lorsque les métastases étaient à un stade très avancé de développement par rapport au groupe contrôle. Dans notre étude, lors de la session 2 de la mise au point du scanner X avec l'ExiTron Nano 12000, nous avons observé une

diminution de 12 % du volume du foie entre le 15ème et le 26ème jour post-inoculation (**Figure 29Figure 29**). Les différences observées dans les variations de volume entre notre étude et celle de Lavaud *et al.,* peuvent s'expliquer en partie par la localisation des métastases dans le foie, dues à l'utilisation de deux lignées cellulaires différentes, influençant ainsi la segmentation et le volume hépatique mesuré. En effet, dans notre modèle, les métastases hépatiques se développent principalement en périphérie du foie, remplaçant progressivement le tissu hépatique sain comme l'ont montré les analyses histologiques et le scanner X (**Figures 25 & 28**). Ce développement tumoral ne permet plus de délimiter les métastases de la bordure du foie. La segmentation basée sur un seuil pour sélectionner le contraste du foie rehaussé par l'ExiTron, est affectée par les métastases qui rognent les bordures du foie, ce qui conduit à une perte de contraste principalement en périphérie du foie et donc à une diminution du volume hépatique. En revanche, dans l'étude de Lavaud *et al.,* les métastases se situent principalement en intrahépatique. Leur croissance entraîne une diminution du contraste de l'ExiTron dans le tissu hépatique, mais les bordures du foie restent bien délimitées. Ainsi, dans leur étude, la croissance des métastases engendre une augmentation du volume du foie, contrairement à ce que nous observons dans notre modèle. Des observations similaires ont été faites dans l'étude de Fleten *et al.,* qui visait à comparer la réponse à un traitement anti-angiogénique dans deux modèles de métastases hépatiques de CCR établi après une injection intra-splénique de cellules tumorales HCT-116 ou HT-29 suivie d'une splénectomie (Fleten *et al.,* 2017). L'évolution des métastases hépatiques de CCR a été évaluée par IRM en utilisant l'agent de contraste Primovist™, injecté en i.v. avant chaque imagerie. L'IRM a permis de décrire les caractéristiques des métastases propres à chaque modèle. Dans le modèle HCT-116, les métastases hépatiques ont été initialement détectées sous forme de lésions distinctes à la périphérie du foie 8 jours post-inoculation. Au fur et à mesure de leur croissance, elles ont progressivement fusionné et englobé l'ensemble du foie. Certaines d'entre elles présentaient une zone nécrotique. En revanche, dans le modèle HT-29, de petites métastases ont été observées dans l'ensemble du foie 10 jours post-inoculation des cellules et leur développement était principalement intrahépatique. Puis, elles ont occupé la majorité du foie. Ainsi, les auteurs ont défini que le modèle HCT-116 présentait des métastases qui semblaient pousser et comprimer le tissu hépatique sain tandis que les métastases dans le modèle HT-29 semblaient plutôt infiltrer et remplacer le parenchyme hépatique sain. Ces différentes organisations des cellules tumorales dans les tissus hépatiques ont également été observées chez les patients atteints de métastases hépatiques de CCR, dont trois principaux schémas de croissance des métastases ont été définis (Fernández Moro *et al.,* 2023; Latacz *et al.,* 2022). La forme

« desmoplastique » caractérise des métastases entourées par une capsule fibreuse, séparant les cellules tumorales des hépatocytes. Dans la forme dite de « remplacement », les cellules tumorales infiltrent directement le foie et remplacent progressivement les hépatocytes, alors que le schéma de croissance par « poussée » est caractérisé par un tissu tumoral qui comprime le tissu hépatique sain sans remplacer les hépatocytes. Ainsi, l'ensemble de ces informations sont concordantes avec nos observations sur la croissance et les caractéristiques des métastases hépatiques de CCR observées en scanner X et en histologie dans notre modèle. Elles permettent d'expliquer les différences observées entre les variations du volume du foie mesurées dans l'étude de Lavaud *et al.,* et la nôtre.

Cependant, malgré une forte corrélation entre la diminution du volume du foie et la croissance des métastases (**Figure 38**), nous avons également démontré que la mesure du volume du foie obtenue en scanner X ne permettait pas de traduire l'augmentation du volume des métastases mesurées par échographie **(Figures 32 & 37)**. Ces résultats sont concordants avec l'étude de Lavaud *et al.,* qui souligne le manque de sensibilité de la mesure du volume du foie pour traduire la croissance des métastases hépatiques. Dans leur étude, l'augmentation du volume du foie, par rapport à la condition contrôle sans métastase, n'était significative qu'à des stades très avancés du développement des métastases hépatiques de CCR (Lavaud *et al.*, 2020).

V.2.4 Imagerie TEP au ^{18}F-FDG

Nous avons évalué la capacité de l'imagerie TEP au ^{18}F-FDG à détecter les métastases hépatiques de CCR dans notre modèle afin d'évaluer les effets des traitements (irinotécan et irinotécan + sonoporation) sur le métabolisme des métastases hépatiques. Pour atteindre cet objectif, nous avons réalisé une imagerie TEP à la fin du protocole de traitement, soit 30 jours après la chirurgie (session 3). Les résultats montrent une accumulation hétérogène du ^{18}F-FDG dans les métastases hépatiques au sein d'une même souris et également entre les souris (**Figure 31**). Pour autant, plusieurs études ont démontré la capacité de ce radiotraceur à détecter les métastases hépatiques de CCR chez la souris (Kawai *et al.,* 2013; Zhang *et al.,* 2018). En effet, Kawai *et al.,* ont utilisé l'imagerie TEP au ^{18}F-FDG couplée au scanner X (sans agent de contraste) afin de détecter les lésions hépatiques après implantation de cellules HCT-116 de CCR dans la rate de souris NOG (Kawai *et al.,* 2013). Ils démontrent que l'accumulation du ^{18}F-FDG au niveau du tissu hépatique est plus importante chez les souris ayant reçu une injection de 1.10^5 cellules avec des valeurs de SUV moyen de 0,853 ± 0,087 et de SUV max de 1,254 ± 0,237 par rapport aux souris contrôles sans métastase (SUV moyen de 0,450 ± 0,033, SUV max 0,635 ± 0,017). Ainsi, dans leurs conditions expérimentales, cette méthode

d'imagerie permet de détecter et d'évaluer la croissance des métastases hépatiques de CCR dans un modèle murin. Cependant, Kawai *et al.*, ont réalisé l'imagerie TEP couplée au scanner X sans agent de contraste, ne leur permettant pas de visualiser précisément les métastases hépatiques. Ainsi, bien qu'ils aient détecté l'accumulation du radiotraceur dans certaines métastases, ils ne disposaient pas de méthode de référence pour s'assurer que le radiotraceur s'accumulait dans l'ensemble des lésions hépatiques et également que ces lésions étaient bien situées dans le foie. Pourtant, les facteurs limitant la fixation du ^{18}F-FDG sur les métastases hépatiques chez les patients sont bien décrits (García Vicente *et al.*, 2013; Mainenti *et al.*, 2010; Tahtabasi *et al.*, 2021; Zirakchian Zadeh, 2023). Tout d'abord, la taille des lésions est un paramètre pouvant limiter leur détection en imagerie TEP (Foubert *et al.*, 2018; Mainenti *et al.*, 2010; Ruers *et al.*, 2002). Par exemple, pour des patients présentant des métastases hépatiques de CCR, Ruers *et al.*, rapportent que seulement 14 % des métastases hépatiques inférieures à 15 mm sont détectées par imagerie TEP au ^{18}F-FDG (Ruers *et al.*, 2002). Ensuite, l'activité métabolique des cellules tumorales évolue souvent après un traitement de chimiothérapie, entraînant un « shutdown » métabolique qui réduit la captation du radiotraceur par les cellules tumorales (Akhurst *et al.*, 2005; Glazer *et al.*, 2010; Kostakoglu and Goldsmith, 2003). Dans notre étude, l'imagerie TEP a été réalisée après un traitement avec l'irinotécan, ce qui pourrait expliquer nos résultats concernant l'hétérogénéité de l'accumulation du ^{18}F-FDG dans les métastases. De plus, la forte fixation basale de ce radiotraceur dans le foie sain et les tissus sains consommateurs en glucose (cœur et graisse brune) peut masquer son accumulation dans les métastases et perturber leur détection (Foubert *et al.*, 2018; García Vicente *et al.*, 2013; Lalire *et al.*, 2019; Mahmud *et al.*, 2015; Ozaki *et al.*, 2020). En effet, la graisse brune assure la thermogénèse et engendre un hypermétabolisme glucidique lorsque l'organisme est exposé à des températures froides. Afin de limiter l'accumulation du ^{18}F-FDG dans la graisse brune, nous avons maintenu les souris à 37°C durant l'ensemble de l'expérimentation. Cependant, nous avons, malgré cela, observé un signal important au niveau de la graisse brune. Les souris ont également été mises à jeun la veille de l'examen afin de limiter la consommation du ^{18}F-FDG par les tissus sains. Cette étape permet d'augmenter la différence de captation entre les cellules tumorales et les autres tissus, facilitant ainsi la visualisation des métastases. Cependant, malgré la mise à jeun, la fixation du radiotraceur au niveau du cœur a perturbé la visualisation des métastases localisées dans la partie supérieure du foie, à proximité du cœur (**Figure 31C**). De plus, la mise à jeun a entraîné une perte de poids importante chez certaines souris, qui a pu aggraver l'état général de santé chez certains animaux. Enfin, la présence de métastases nécrotiques, limite également la fixation du radiotraceur (García Vicente *et al.*, 2013; Ozaki *et*

al., 2020). La coloration HES des métastases hépatiques de CCR dans notre modèle a montré la présence de zones nécrotiques dans certaines métastases, pouvant expliquer l'absence de fixation du ^{18}F-FDG dans les métastases hépatiques (**Figure 25**). Ainsi, l'imagerie TEP au ^{18}F-FDG n'est pas particulièrement adaptée à notre modèle.

En conclusion, la BLI permet la détection précoce des métastases hépatiques alors que le scanner X permet la localisation des métastases et facilite la réalisation des échographies. L'échographie en mode B permet une mesure directe des dimensions des métastases hépatiques et de déterminer leur volume. L'utilisation combinée de ces modalités d'imagerie nous a permis de suivre la croissance des métastases afin d'évaluer l'efficacité thérapeutique du protocole de délivrance de l'irinotécan par sonoporation dans notre modèle.

V.3. Mise au point du protocole de délivrance de l'irinotécan par sonoporation

Dans notre modèle, la majorité des métastases hépatiques est détectée en échographie environ 15 jours post-inoculation, permettant ainsi de déterminer leur volume. Initialement, nous avons défini que le volume total des métastases hépatiques devait atteindre environ 50 mm^3 pour débuter le traitement. En effet, il a été démontré que la taille des tumeurs jouait un rôle important dans l'efficacité de la délivrance de molécules chimiothérapeutiques par sonoporation dans des modèles *in vivo* de xénogreffes sous-cutanées de CCR (Lin *et al.*, 2012a, 2012b). Cependant lors de la première échographie de la session 3, les métastases étaient trop petites et la majorité n'a pas été détectée en échographie (**Tableau 5**). Quatre jours après, le volume des métastases était très variable entre les souris, certaines métastases avaient largement dépassé la limite des 50 mm^3. Dans ce contexte, nous avons choisi de traiter les souris avec un volume total de métastases inférieur à 50 mm^3, restreignant considérablement l'effectif des animaux pour cette étude avec 4 souris dans le groupe irinotécan + sonoporation et 3 souris dans le groupe irinotécan seul. Deux jours après le dernier traitement, nous avons observé que le volume total de métastases était plus faible pour le groupe irinotécan + sonoporation (102,5 mm^3, Q1= 79,8 et Q3= 111,3 mm^3) par rapport au groupe irinotécan seul (197,1 mm^3, Q1= 148,7 et Q3= 223,3 mm^3) (**Tableau 6**). De plus, le temps de doublement des tumeurs est plus long pour le groupe irinotécan + sonoporation (6,0 jours, Q1 = 3,2 et Q3 = 8,8 jours) par rapport au groupe irinotécan seul (2,4 jours, Q1 = 2,3 et Q3 = 4,5 jours) (**Tableau 8**). D'après ces résultats, il semble que le traitement irinotécan + sonoporation est potentiellement plus efficace que l'irinotécan seul. Cependant, avec un effectif aussi limité, il est difficile de conclure de manière définitive sur l'efficacité de l'irinotécan délivré par sonoporation. Plusieurs

observations complémentaires ont été faites au cours de cette session. D'une part, le nombre, la taille, la croissance et la localisation des métastases dans notre modèle sont très variables d'un animal à un autre. Et d'autre part, après la détection des métastases en échographie, leur croissance s'accélère de manière exponentielle. C'est pourquoi à l'issu de la session 3, plusieurs pistes d'amélioration ont été proposées : (i) augmenter le nombre d'animaux, (ii) initier le traitement plus tôt, (iii) adapté le protocole de sonoporation en fonction de la localisation des métastases pour chaque souris afin de les cibler plus spécifiquement et (iv) définir une méthodologie pour l'analyse des données adaptée au modèle. Par conséquent, pour la session 4, nous avons augmenté l'effectif de nos souris à 33 afin d'avoir 11 souris dans le groupe irinotécan + sonoporation et 10 souris dans le groupe irinotécan seul (**Tableau 9**). Le traitement a été initié 6 jours plus tôt que dans la précédente session. Le protocole de sonoporation a été adapté en localisant les métastases hépatiques sur les images obtenues en scanner X pour chaque souris, puis en appliquant le transducteur sur la zone du foie correspondante. Enfin, la méthodologie employée pour l'analyse des données est discutée dans la section suivante.

V.3.1 Analyses des données

En effet, le faible nombre d'animaux, les difficultés rencontrées pour détecter et dénombrer les métastases par imagerie, ainsi que la grande variabilité interindividuelle des volumes tumoraux, soulèvent des interrogations sur la méthodologie à employer pour analyser et interpréter les données obtenues. Tout d'abord, la variabilité interindividuelle des volumes de métastases hépatiques que nous avons observé est également retrouvée dans d'autres études (Graham *et al.*, 2005; Kalber *et al.*, 2008; Lavilla-Alonso *et al.*, 2011; Ramasawmy *et al.*, 2016). *Dans ce contexte, comment représenter fidèlement la croissance tumorale lorsque cette croissance varie entre les individus ?* Plusieurs approches sont ainsi reportées dans la littérature, notamment le calcul du temps de doublement des tumeurs, le calcul de la charge tumorale, la normalisation des volumes tumoraux avant le traitement et la représentation des données propres à chaque animal. Par exemple, l'étude de Ramasawmy *et al.*, s'avère pertinente pour illustrer une méthodologie de représentation de données dans un modèle de métastases hépatiques de CCR dont leur croissance a été évaluée via plusieurs modalités d'imagerie (BLI, échographie 3D, IRM) (Ramasawmy *et al.*, 2016). Pour caractériser la croissance des métastases hépatiques, ils ont déterminé l'intensité de la bioluminescence au cours du temps, calculé la charge tumorale, et le temps de doublement des tumeurs. Ils ont choisi de représenter les courbes de la charge tumorale et l'évolution de l'intensité du signal de bioluminescence pour chaque animal. Cette représentation met en évidence une forte variabilité interindividuelle, ce qui est plus

représentatif des données par rapport à des représentations basées sur des moyennes. L'étude de Kalber *et al.*, présente une approche similaire dans la représentation des données (Kalber *et al.*, 2008). En effet, ils ont développé un modèle murin de métastases hépatiques de CCR et ils ont réalisé une caractérisation longitudinale de la croissance des métastases par IRM. À partir des images obtenues, ils ont calculé le volume total des métastases, leur nombre, ainsi que la charge tumorale. Ces données sont présentées à la fois individuellement pour chaque souris à chaque point temporel, et sous forme de moyennes ± erreur standard de la moyenne pour l'ensemble des animaux. Cette double représentation permet de visualiser la variabilité interindividuelle, un aspect souvent absent dans d'autres études. Ainsi, le point fort de ces deux études réside dans la représentation des données, qui ne se limite pas à des valeurs moyennes pour l'ensemble des animaux, mais qui inclut une analyse descriptive pour chacun d'entre eux, permettant d'appréhender les contraintes liées à la variabilité interindividuelle propre aux modèles murins métastatiques. Il est intéressant de noter que dans ces deux études plusieurs paramètres (signal de BLI, charge tumorale, volume tumoral, temps de doublement, nombre de métastases) ont été utilisés pour décrire et évaluer la croissance des métastases. Ces paramètres se sont révélés complémentaires, et leurs avantages et inconvénients ont été discutés. Dans notre étude, nous avons utilisé des approches différentes entre la session 3 et la session 4 qui étaient justifiées par le nombre d'animaux par groupe dont nous disposions. Dans les deux sessions, nous avons normalisé les volumes de métastases et le volume du foie par rapport au jour avant traitement, et calculé le temps de doublement des tumeurs. En revanche, dans la session 3 l'effectif était très faible, par conséquent, il n'était pas pertinent de présenter les données individuelles. Dans la session 4, nous avons dans un premier temps représenté les données en moyenne ± erreur standard de la moyenne du pourcentage de variation du volume tumoral pour les deux groupes de traitement, et la courbe de survie associée (**Figures 32 & 33**). D'après la **Figure 32**, représentant les valeurs moyennes pour chaque groupe, il semblerait que le traitement avec l'irinotécan délivré par sonoporation ralentisse la croissance des métastases par rapport au groupe irinotécan seul. Cependant, il est clairement identifiable que la dispersion des données est plus importante dans le groupe irinotécan que dans le groupe irinotécan + sonoporation. Il était nécessaire de mener une analyse plus approfondie pour comprendre la dispersion des valeurs au sein des groupes. Dans ce contexte, nous avons représenté les variations du volume des métastases pour chaque souris (**Figures 34, 35 & 36**). Cette représentation nous a permis d'identifier différents profils d'évolution de la croissance des métastases à la suite du traitement. Notamment, deux individus dans le groupe irinotécan avaient des pourcentages de variation du volume métastatique extrêmement élevés (> 30000)

par rapport aux autres animaux (< 4000), expliquant en grande partie l'importante dispersion des données dans ce groupe. Cependant, cette analyse a été réalisée uniquement sur les animaux ayant survécu 30 jours post-inoculation. Pour des raisons éthiques, certains animaux ont dû être sacrifiés avant la fin de l'expérimentation, conduisant à une réduction considérable du nombre d'animaux utilisé pour l'analyse statistique avec un effectif final de 5 animaux dans le groupe irinotécan + sonoporation et 7 dans le groupe irinotécan seul, par rapport à l'effectif initial de 33 souris avant la chirurgie.

De plus, une seconde question se pose ; *Quel(s) test(s) statistique(s) choisir dans ce contexte ?* Tout d'abord, dans la session 3, nous n'avons pas réalisé d'analyses statistiques en raison du faible nombre d'animaux. Concernant la session 4, plusieurs analyses statistiques étaient envisageables. En effet, certaines études rapportent l'utilisation de tests de comparaison de moyennes (test-t ou Mann-Whitney) (Huang *et al.,* 2023; Lavilla-Alonso *et al.,* 2011). Ainsi, nous avons comparé les volumes normalisés entre les deux groupes à chaque point temporel avec un test de Mann-Whitney. Les résultats n'ont montré aucune différence significative entre les deux groupes. Cependant, ces tests ne sont pas toujours adaptés dans des études comportant des décès et des mesures répétées. De plus, la multiplication des tests à chaque point temporel augmente le risque d'erreurs statistiques (erreur résiduelle) ce qui peut introduire un biais potentiel. Le recours à l'analyse de la variance à mesures répétées est le plus adapté afin d'identifier l'effet d'un traitement sur les données recueillies dans notre étude. Cependant, la mortalité des animaux au cours du temps génère des données manquantes, excluant les animaux morts avant la fin de l'expérimentation de l'analyse statistique. La combinaison de l'ANOVA et d'une analyse de la survie, permet de mieux décrire l'évolution des volumes tumoraux et de l'effectif au cours du temps (Fleten *et al.,* 2017).

A ma connaissance, l'étude qui se rapproche le plus de notre plan expérimental est celle de Fleten *et al*. En effet, leur objectif est de développer un modèle de métastases hépatiques de CCR établi à partir de cellules HCT-116 ou HT-29 et d'évaluer l'efficacité thérapeutique de l'aflibercept par IRM dans ces deux modèles (Fleten *et al.,* 2017). Pour le modèle HCT-116, l'effectif initial était de 18 souris par groupe (un groupe sans traitement et un groupe traité avec l'abflibercept). Concernant le modèle HT-29, chaque groupe était composé de 14 animaux. Notons que les expérimentations ont été réalisées en plusieurs sessions afin de limiter le nombre d'animaux par expérimentation et de faciliter la gestion des effectifs, ce qui pourrait être envisageable dans nos futures expérimentations. De plus, il est intéressant de noter que pour la randomisation des animaux dans les différents groupes, leur approche diffère de la nôtre. En effet, leur répartition des animaux dans les groupes n'est pas basée sur le volume des métastases

avant le traitement mais sur la présence d'un signal en BLI. Cette approche aurait pu être utilisée dans notre étude pour inclure les animaux positifs en BLI 7 jours post-inoculation, dont les métastases n'étaient pas encore détectées en échographie à cette date. Elle aurait permis d'augmenter notre effectif pour les analyses statistiques. Cependant, nous avons jugé important de constituer des groupes homogènes en termes de volume de métastases, notamment en raison des grandes variations interindividuelles et de l'impact du volume tumoral initial sur la réponse au traitement. Une autre solution pour inclure ces animaux aurait été d'adapter le calendrier de traitement, afin de traiter ces souris lorsque les métastases étaient détectées, augmentant ainsi notre effectif. Cependant, pour des raisons organisationnelles et techniques, cette approche n'a pas pu être mise en place.

Ensuite, pour évaluer l'efficacité thérapeutique de leur protocole, Fleten *et al.,* ont étudié plusieurs paramètres comme le volume des métastases, la charge tumorale, et la survie. La survie a été analysée par la méthode de Kaplan-Meier, suivie d'un test log rank. Les courbes de croissance tumorale ont été analysées par une ANOVA. Cette approche est similaire à la nôtre, où nous avons utilisé l'ANOVA pour analyser les variations du volume des métastases chez les animaux en vie jusqu'au 29ème jour post-inoculation, avec une courbe de survie associée. En revanche, d'après leur courbe de survie, des animaux meurent au cours du temps mais ils ne précisent pas la méthodologie utilisée pour gérer les données manquantes pour réaliser l'ANOVA. Contrairement à l'étude de Ramasawmy *et al.,* où ils ont sélectionné des points temporels où l'ensemble des animaux étaient encore vivants, démontrant une meilleure transparence méthodologique. Les résultats de l'étude de Fleten *et al.,* montrent que le traitement avec l'aflibercept est plus efficace dans le modèle HCT-116 que dans le modèle HT-29. En effet, le traitement a significativement amélioré la survie des animaux et ralenti la croissance des métastases dans le modèle HCT-116, malgré les variations interindividuelles liées à l'utilisation d'un modèle murin métastatique. En revanche, l'efficacité de l'aflibercept est moins marquée dans le modèle HT-29 : la survie des animaux n'a pas été significativement améliorée, bien que la croissance des métastases ait été ralentie ($p < 0,05$) dans le groupe traité par rapport au groupe non traité. De plus, la différence de poids des métastases entre les groupes traité et non traité n'était pas significative lors de la première série d'expérimentation ($p = 0,32$, n=7 par groupe), mais elle est devenue significative dans la deuxième série ($p = 0,03$, n=7 par groupe). Pour conclure, ces résultats soulignent l'importance du nombre d'animaux nécessaires pour détecter des différences statistiques significatives. Le second point essentiel est l'efficacité du traitement, comme observé dans le modèle HT-29 qui est moins sensible au traitement, les différences entre les deux groupes sont moins identifiables, surtout en présence de variations

interindividuelles importantes. Dans le cadre de notre étude, nous avons utilisé une méthodologie similaire à la leur, en prenant en compte plusieurs paramètres (volume des métastases, volume du foie, temps de doublement), et en analysant les données avec une ANOVA. Ainsi, dans la session 4, l'optimisation de la méthodologie pour représenter et analyser nos données, nous permet de conclure que, dans nos conditions expérimentales, la délivrance de l'irinotécan par sonoporation n'a pas amélioré significativement son efficacité thérapeutique par rapport à son administration seul.

V.3.2 Modèle métastatique et sensibilité au traitement

Comparativement aux modèles de xénogreffes sous-cutanées, les modèles murins métastatiques de CCR reproduisent mieux les caractéristiques des métastases hépatiques de CCR observées chez l'homme et permettent d'étudier l'efficacité de molécules chimiothérapeutiques dans des conditions pathophysiologiques plus en adéquation avec la clinique humaine (Hackl *et al.,* 2013; Sato *et al.,* 2024). En effet, Hackl *et al.,* ont étudié l'efficacité d'un traitement à base d'oxaliplatine, d'acide folinique et d'une pro-drogue du 5-FU sur différents modèles de CCR *in vivo* (Hackl *et al.,* 2013). Pour leur étude, ils ont injecté 5.10^5 cellules HT-29 soit dans le cæcum (modèle orthotopique et métastatique) soit en intra-splénique (modèle métastatique), soit en sous-cutané (modèle de xénogreffe, non métastatique). L'efficacité thérapeutique a été évaluée sur les xénogreffes sous-cutanées par BLI et par mesure de la taille des tumeurs au pied à coulisse. Les résultats ont montré que le traitement a induit une diminution significative de la croissance des tumeurs dans ce modèle sous-cutané comparativement au groupe non traité. Le modèle établi avec une injection intracæcale a montré une croissance tumorale plus lente comparativement aux autres modèles (xénogreffe sous-cutanée et injection intra-splénique). Le traitement a induit une forte diminution du signal en BLI comparativement au groupe contrôle sans traitement dans ce modèle. En revanche, dans le modèle intra-splénique, la croissance tumorale était plus rapide que dans le modèle intracæcal et le traitement n'a induit aucune diminution du signal en BLI, suggérant une forte croissance tumorale malgré le traitement. Cette étude démontre que, pour un même traitement, les réponses thérapeutiques varient selon les modèles utilisés. Il semble que le modèle de xénogreffes sous-cutanées présente une sensibilité accrue au traitement, mais cette sensibilité pourrait ne pas refléter la réalité clinique. En revanche, le modèle intra-splénique apparaît plus agressif et peu sensible au traitement comparativement au modèle intracæcal. Ce dernier semble être le plus représentatif du processus métastatique et sa réponse thérapeutique est plus proche des résultats observés en clinique. C'est pourquoi, dans notre étude nous avons choisi d'évaluer l'efficacité de notre

protocole thérapeutique sur un modèle métastatique de CCR et non sur un modèle de xénogreffes sous-cutanées afin de se rapprocher des conditions pathophysiologiques rencontrées en clinique. Par conséquent, la différence de sensibilité au traitement entre les modèles métastatiques et les xénogreffes sous-cutanées pourrait nécessiter un ajustement de la dose d'irinotécan administrée et/ou de la fréquence de son administration pour obtenir une efficacité thérapeutique optimale.

De plus, dans l'étude clinique de Haram *et al.*, les résultats ont montré des différences de réponse au traitement entre les métastases chez un même patient (Haram *et al.*, 2023). Dans ce contexte, il aurait été intéressant dans notre modèle de suivre la réponse thérapeutique des différentes métastases chez une même souris. Cependant, les animaux présentaient un nombre important de métastases qui ne peuvent être suivies séparément au cours du temps car elles fusionnent entre elles et ne sont plus clairement identifiables individuellement.

V.3.3 Paramètres acoustiques et non acoustiques

L'ensemble des résultats obtenus pendant les expérimentations de mise au point du protocole thérapeutique démontre qu'il est nécessaire de l'améliorer afin d'obtenir un effet thérapeutique de la délivrance de l'irinotécan par sonoporation dans notre modèle murin métastatique de CCR. Comme illustré dans la **Figure 39**, de nombreux paramètres, acoustiques et non acoustiques, peuvent influencer l'efficacité de la sonoporation *in vitro* et *in vivo*.

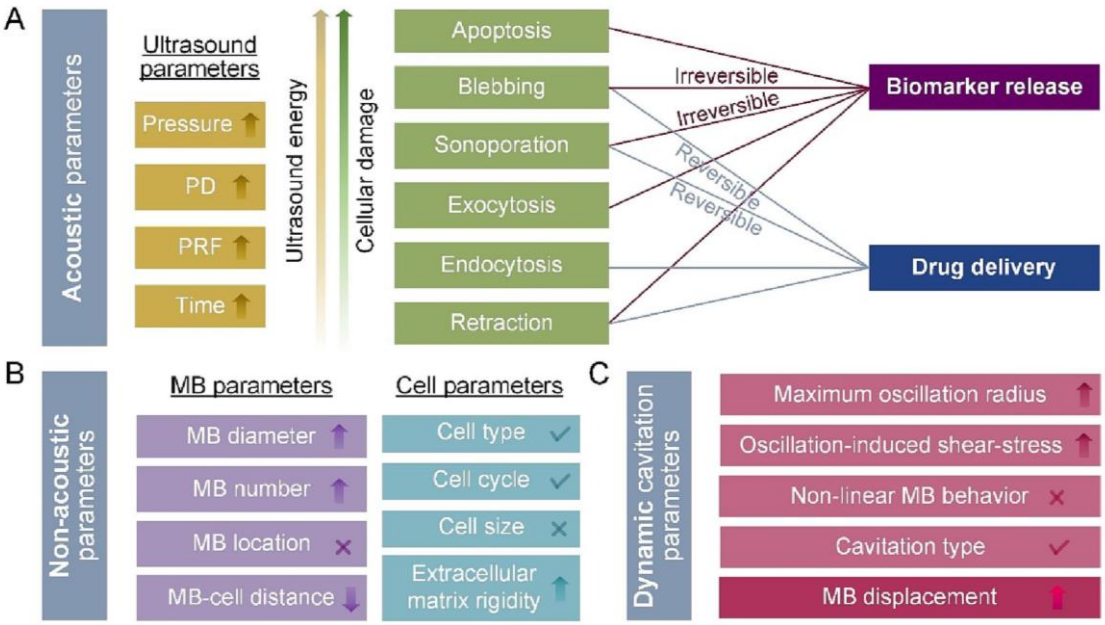


Figure 39. Les principaux paramètres acoustiques et non acoustiques impliqués dans la délivrance de molécules thérapeutiques par sonoporation. (A) Paramètres acoustiques, (B) Paramètres non-acoustiques, (C) Paramètres de cavitation. D'après Hu *et al.*, 2023

Les paramètres ultrasonores déterminants sont la fréquence, la pression acoustique, la durée des impulsions ultrasonores, la fréquence de répétition des impulsions, l'intensité ainsi que la durée d'exposition aux ultrasons (Hu *et al.*, 2023). Ces facteurs impactent directement l'énergie acoustique délivrée dans le milieu, en particulier au contact de barrières biologiques (*e.g.*, membrane plasmique, barrière hémato-tumorale, *etc.*), et influencent leurs réponses biologiques (*e.g.*, formation de pores membranaires, perturbation des jonctions serrées, stimulation de l'endocytose, *etc.*). Par exemple, plusieurs études ont démontré que la pression acoustique était un paramètre clé influençant directement l'efficacité de la sonoporation *in vivo*. Cependant, la majorité des études a été menée sur d'autres types de cancer (*e.g*, glioblastome, cancer du sein) que le CCR (Carpentier *et al.*, 2016; Snipstad *et al.*, 2017; Sta Maria *et al.*, 2015). Ainsi, Snipstad *et al.*, ont étudié l'influence de la pression acoustique en la faisant varier de 0,1 à 1 MPa (PRF 0,5 Hz, DC = 25 %, 2 min d'exposition) sur la délivrance de NPs de poly(2ethyl-butyl cyanoacrylate) dans des tumeurs sous-cutanées de cancer du sein (MDA-MB-231) chez la souris nude (Snipstad *et al.*, 2017). Leur étude a démontré que l'utilisation de faibles pressions acoustiques comprises entre 0,1 et 0,25 MPa, n'augmentait pas la pénétration i.t. des NPs. A des pressions acoustiques plus élevées, comprises entre 0,5 et 1 MPa, une augmentation significative de la pénétration des NPs a été observée dans les tumeurs, avec une quantité i.t. de NPs 2,3 fois supérieures à la condition non traitée. En utilisant les paramètres ultrasonores optimaux préalablement définis (pression acoustique de 0,5 MPa, PRF 0,5 Hz, DC

= 25 %, 2 min d'exposition), ils ont étudié l'efficacité de la délivrance du cabazitaxel par sonoporation dans leur modèle. Les résultats ont montré que le traitement cabazitaxel + sonoporation a réduit significativement la taille des tumeurs jusqu'à une rémission complète de l'ensemble des animaux 100 jours après le dernier traitement. Les résultats de cette étude montrent que la pression acoustique est un facteur important pour garantir une sonoporation efficace. Par conséquent, pour optimiser notre protocole de sonoporation dans ce modèle, l'étude de l'influence de la pression acoustique sur la délivrance de l'irinotécan semble être une approche pertinente à mener.

La durée d'exposition aux ultrasons et la fréquence de répétition des impulsions sont des paramètres pouvant influencer l'efficacité de la sonoporation (Hu *et al.,* 2023; Roovers *et al.,* 2019; Tu and Yu, 2022). La fréquence de répétition des impulsions détermine le temps dont disposent les MBs pour se redistribuer dans le tissu cible entre les impulsions ultrasonores, tandis que la durée totale d'exposition est la durée pendant laquelle les MBs activées par les ultrasons agissent sur les barrières biologiques. Dans ce contexte, plusieurs études ont examiné le comportement des MBs en réponse à une séquence ultrasonore afin d'optimiser la délivrance de molécules thérapeutiques par sonoporation *in vivo* dans des modèles de cancer du sein, du foie et de mélanome (Bazan-Peregrino *et al.,* 2013; Choi *et al.,* 2014; Graham *et al.,* 2014). Par exemple, Choi *et al.,* ont utilisé la technique de « cartographie acoustique passive » *in vivo* pour étudier l'influence des paramètres ultrasonores sur la dynamique de la cavitation des MBs (Choi *et al.,* 2014). A travers cette approche, ils ont corrélé spatialement la cavitation des MBs et la délivrance de molécules thérapeutiques. Ils ont utilisé un modèle de xénogreffe sous-cutanée de cellules de cancer du foie HepG2 exprimant la luciférase et un second modèle de xénogreffe sous-cutanée de cellules de cancer du sein ZR75.1. Le premier modèle a été utilisé pour étudier la libération de la luciférine contenue dans des liposomes sensibles aux ultrasons en présence de MBs (SonoVue®). Le second modèle a été utilisé pour étudier la délivrance d'un virus oncolytique codant la luciférase en présence de MBs et d'ultrasons. Les tumeurs ont été exposées à la séquence ultrasonore suivante : fréquence centrale de 0,5 MHz, PNP de 1,2 MPa, longueur d'impulsion de 25 ou 50 000 cycles, intervalle de répétition des impulsions de 0,02, 0,2, 1 ou 3 s, 80 impulsions). Dans les deux modèles, le signal de BLI a été détecté traduisant soit la libération de la luciférine des liposomes et sa pénétration intracellulaire, soit l'expression de la luciférase par les cellules tumorales après une vectorisation du virus par sonoporation. Les auteurs ont démontré que la cavitation inertielle était nécessaire pour induire la libération de la luciférine des liposomes et son accumulation dans les cellules tumorales. Des résultats

similaires ont été démontrés sur le second modèle. L'expression de la luciférase est corrélée avec la localisation spatiale des MBs et leur régime de cavitation inertielle. De plus, l'étude de la dynamique de la cavitation des MBs *in vivo* en fonction de différentes fréquences de répétition d'impulsions a également été menée. Les résultats montrent qu'une fréquence de répétition d'impulsion plus faible (1 Hz) induit une cavitation plus efficace qu'à une fréquence plus élevée de 50 Hz. Ce délai plus long entre les impulsions permet aux MBs de se redistribuer dans le tissu tumoral et de maintenir un régime de cavitation inertielle des MBs. De plus, sur les 100 ms d'impulsions, l'amplitude de la cavitation diminue à 50 % de son amplitude initiale en 4,3 ms, démontrant qu'une durée d'impulsion trop longue n'est pas nécessaire. Ainsi, l'ensemble de ces résultats démontrent que la cavitation inertielle des MBs est nécessaire pour la délivrance ciblée de molécules (liposomes chargés et virus oncolytique) dans les cellules tumorales. Dans notre étude, nous avons utilisé une fréquence de 1 MHz, avec une période de répétition des impulsions de 100 µs, 40 cycles par impulsion à une pression négative de 400 kPa. Cette séquence a été appliquée pendant 3 minutes. Ces paramètres acoustiques se sont montrés efficaces lors des précédentes études menées par notre équipe, pour la délivrance de molécules chimiothérapeutiques (irinotécan et Nab-paclitaxel) par sonoporation dans des modèles de xénogreffes sous-cutanées de glioblastome et de cancer du pancréas (Bressand *et al.*, 2019; Escoffre *et al.*, 2013). Cependant, comme mentionné précédemment, la sensibilité aux traitements peut varier entre les modèles de xénogreffes sous-cutanées et les modèles métastatiques, ces derniers étant moins sensibles. Ainsi, nous supposons que cette différence de sensibilité peut également influencer l'efficacité de la sonoporation. L'utilisation de la technique de cartographie acoustique présentée ci-dessus, apparait pertinente pour établir les paramètres acoustiques optimaux dans notre modèle.

Les paramètres non acoustiques sont principalement liés aux MBs et aux tissus biologiques cibles. La composition (paroi et gaz), la taille, le nombre des MBs mais également la pharmacocinétique et la biodistribution des MBs dans les tissus biologiques cibles influencent significativement la réponse acoustique de ces MBs à une stimulation ultrasonore et donc leurs effets sur ces tissus. Ainsi, l'étude des interactions entre le tissu cible, les MBs et les ultrasons est essentielle pour optimiser l'efficacité de la sonoporation. De plus, l'efficacité de la délivrance des molécules thérapeutiques par sonoporation est également influencée par la physiologie de la tumeur (*e.g.*, prolifération, nécrose, pression interstitielle, vascularisation, *etc.*) et son microenvironnement (*e.g.*, matrice extracellulaire). Il est donc crucial de considérer l'ensemble de ces paramètres pour établir un schéma thérapeutique rationnel, *i.e.*, efficace et sûr. De plus,

l’efficacité et l’innocuité de ce schéma thérapeutique dépendent également des propriétés physico-chimiques et pharmacologiques (*i.e.,* pharmacocinétique, biodistribution et pharmacodynamie) des molécules anti-cancéreuses. Ainsi, l'efficacité de la délivrance de molécules thérapeutiques par sonoporation repose sur un ensemble complexe de paramètres qui ont rarement fait, à ce jour, l’objet d’une standardisation comme en témoigne le **Tableau 2**.

Dans ce contexte, les perspectives d’amélioration de notre protocole de sonoporation pourraient se baser sur une évaluation de la perfusion tumorale avant et après le traitement. Cette analyse fournirait des informations sur la distribution des MBs dans le tissu et dans les métastases hépatiques avant la sonoporation afin de s’assurer que la concentration en MBs soit optimale avant la sonoporation. D’autre part, elle permettrait d’identifier les métastases peu vascularisées qui devraient être théoriquement moins sensibles à la délivrance de l’irinotécan par sonoporation (Bazan-Peregrino *et al.,* 2013; Haram *et al.,* 2023). De plus, l’étude de la cavitation en fonction de différents paramètres ultrasonores comme présentés ci-dessus permettrait de mieux comprendre et de contrôler l’effet de ces paramètres sur la délivrance de l’irinotécan par sonoporation dans notre modèle métastatique. Enfin, il serait pertinent de mesurer la concentration d'irinotécan après sonoporation dans les métastases et dans les tissus sains comme le cœur, le foie, les poumons et les reins, afin de déterminer si l'effet thérapeutique observé est corrélé avec une augmentation de la concentration i.t. d'irinotécan et une réduction de l'accumulation non spécifique dans les tissus sains (Chen *et al.,* 2018; Ingram *et al.,* 2020).

En conclusion, lors de la mise au point du protocole de délivrance de l'irinotécan dans notre modèle, nous avons observé une importante variabilité interindividuelle dans la croissance des métastases hépatiques. Il était nécessaire d’établir une méthodologie rigoureuse pour la représentation des données et leur analyse statistique. Nous avons utilisé une double représentation des données, à la fois individuelle et par groupe de traitement, permettant ainsi une meilleure compréhension des profils de croissance des métastases et de la réponse au traitement. À l'issue des analyses statistiques, nous pouvons conclure que le protocole de délivrance de l'irinotécan par sonoporation dans notre modèle n'a pas montré d'efficacité supérieure à celle de l'administration de l'irinotécan seul. Il est nécessaire d'optimiser les paramètres ultrasonores utilisés, ce qui implique une caractérisation précise des interactions entre les métastases hépatiques, les MBs et les paramètres acoustiques, afin d'améliorer l'efficacité de la sonoporation dans notre modèle.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

Parmi les patients atteints de cancer colorectal (CCR), 40 à 60 % développent des métastases, principalement au niveau du foie. Pour ces patients, la chirurgie représente le seul traitement curatif. Cependant, seulement 20 % d'entre eux peuvent en bénéficier. Par conséquent, la chimiothérapie reste le principal traitement disponible pour les CCR métastatiques. Bien que les molécules chimiothérapeutiques soient efficaces, elles manquent de spécificité et entraînent de nombreux effets secondaires, altérant la qualité de vie des patients. De plus, l'efficacité de ces molécules est souvent limitée par la présence de barrières biologiques et les caractéristiques du microenvironnement tumoral, qui restreignent leur pénétration dans les tissus tumoraux. Dans ce contexte, il est nécessaire de développer de nouvelles stratégies afin d'optimiser l'administration des traitements chimiothérapeutiques. Parmi ces méthodes, l'utilisation combinée de MBs et d'ultrasons s'est montrée efficace pour améliorer la délivrance de molécules chimiothérapeutiques dans plusieurs modèles de CCR, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Cependant, le développement et la validation de protocoles de sonoporation ont principalement été menés sur des modèles cellulaires en 2D et sur des modèles murins de xénogreffes sous-cutanées de CCR. Ces modèles ne reflètent pas fidèlement les contextes physiopathologiques rencontrés en clinique, en particulier dans le cadre du CCR métastatique. Dans ce contexte, le développement de modèles cellulaires et murins, plus représentatifs et pertinents cliniquement est nécessaire.

Les sphéroïdes tumoraux

Le développement de modèles cellulaires 3D, tels que les sphéroïdes tumoraux, connaît un essor important. Ces modèles offrent une alternative plus pertinente que les cultures cellulaires en 2D, en reproduisant de manière plus fidèle les propriétés physiopathologiques des tumeurs *in vivo*. La revue de la littérature publiée au cours de ces travaux de thèse, met en évidence que les sphéroïdes sont particulièrement utiles pour étudier et optimiser des protocoles de thérapies ultrasonores, notamment ceux liés à la délivrance de molécules par sonoporation. Cependant, seulement une dizaine de publications rapportent leur utilisation pour étudier cette modalité de traitement. Au cours de ces travaux de thèse, nous avons développé un modèle de sphéroïde de CCR afin d'étudier l'influence de la pression acoustique et de la concentration en MBs sur la perméabilisation des sphéroïdes. Nous avons ensuite évalué l'impact de la sonoporation sur leur structure. Enfin, nous avons étudié l'efficacité de la délivrance de trois molécules chimiothérapeutiques, la bléomycine, la doxorubicine et l'irinotécan par sonoporation dans ce

modèle cellulaire 3D. L'augmentation de la pression acoustique induit une perméabilisation efficace des sphéroïdes avec un maximum de perméabilisation à 400 kPa, sans affecter leur croissance et leur viabilité. En revanche, l'utilisation de différentes concentrations en MBs n'a pas eu d'impact significatif sur la perméabilisation des sphéroïdes. Nous avons démontré que la sonoporation affecte principalement la couche cellulaire périphérique des sphéroïdes, en induisant des modifications dans l'organisation des cellules et en créant des espaces intercellulaires. Enfin, la délivrance de la bléomycine par sonoporation a induit une diminution significative de la croissance des sphéroïdes par rapport aux sphéroïdes traités avec la bléomycine seule. Cependant, l'efficacité thérapeutique de la doxorubicine et de l'irinotécan n'a pas été potentialisée par la sonoporation. Cette étude démontre que les sphéroïdes tumoraux constituent un modèle pertinent pour étudier l'influence des paramètres ultrasonores et pour évaluer l'efficacité de la sonoporation pour la délivrance de molécules chimiothérapeutiques *in vitro*.

Afin de mieux comprendre la différence d'efficacité entre les molécules chimiothérapeutiques délivrées par sonoporation dans notre modèle, il serait pertinent d'approfondir l'étude des mécanismes cellulaires impliqués dans la perméabilisation de la membrane plasmique induite par la sonoporation. Cela pourrait inclure une analyse, après sonoporation des sphéroïdes, sur la stimulation de l'endocytose via l'immunomarquage de la clathrine et de la cavéoline-1, ainsi que l'évaluation de la formation de pores dans la membrane plasmique par microscopie électronique à balayage. De plus, la délivrance de molécules thérapeutiques par sonoporation peut être influencée par le type cellulaire utilisé (*e.g.*, sensibilité au traitement, propriétés de la membrane plasmique, *etc.*). Il serait donc pertinent de poursuivre cette étude sur d'autres lignées cellulaires de CCR (*e.g.*, HT-29, LoVo, SW620, *etc.*). Le modèle de sphéroïde que nous avons développé et étudié est composé uniquement de cellules tumorales. Or, il est bien établi que le microenvironnement tumoral peut considérablement influencer l'efficacité des molécules thérapeutiques. Dans ce contexte, les modèles 3D de sphéroïdes tumoraux sont de plus en plus complexes afin de refléter plus fidèlement les caractéristiques d'une tumeur *in vivo*. Pour rendre notre modèle plus pertinent cliniquement, il serait intéressant d'introduire des fibroblastes en coculture avec les cellules tumorales. Les fibroblastes associés au cancer jouent un rôle important dans le développement tumoral et la résistance aux traitements dans le CCR. Une autre alternative, pour améliorer notre modèle de sphéroïde, serait d'utiliser des cellules tumorales dérivées de patients. Une des limitations majeures des modèles cellulaires 3D pour étudier la délivrance de molécules

thérapeutiques par sonoporation c'est l'utilisation de sphéroïdes avasculaires. En effet, *in vivo*, les molécules thérapeutiques et les microbulles sont principalement administrées par voie intraveineuse. Certaines études ont développé des sphéroïdes vascularisés, cultivés dans des puces de microfluidique. Ce type de modèle serait particulièrement pertinent pour étudier à la fois la perméabilisation de la barrière endothéliale et celle des cellules tumorales dans un environnement reproduisant les contraintes mécaniques exercées par la circulation des fluides *in vivo*. Cependant, l'utilisation de ces puces de microfluidique nécessite le développement de matériaux compatibles avec les ultrasons et une caractérisation acoustique de ces dispositifs.

Les modèles 3D de sphéroïdes constituent un outil considérable pour mieux prédire les réponses aux traitements et contribuent à réduire partiellement l'utilisation des modèles animaux. En revanche, ce modèle ne permet pas d'évaluer la biodistribution et la pharmacocinétique des molécules thérapeutiques, et l'innocuité de ces dernières, limitant ainsi leur capacité à remplacer complètement les modèles animaux.

Un modèle murin de métastases hépatiques de CCR

À ce jour, aucune étude n'a décrit l'utilisation d'un modèle murin de CCR métastatique pour étudier l'efficacité de la délivrance de molécules thérapeutiques par sonoporation. C'est pourquoi, dans un premier temps, nous avons développé et caractérisé un modèle murin de métastases hépatiques de CCR. Le développement et l'étude de modèles orthotopiques et métastatiques est plus complexe que celui de modèles de xénogreffes sous-cutanées. Ainsi, la croissance des métastases hépatiques a été évaluée grâce à plusieurs modalités d'imagerie. Ce modèle a été ensuite exploité pour élaborer un schéma thérapeutique de la délivrance de l'irinotécan par sonoporation pour le traitement de ces métastases.

Dans ces travaux de thèse, le modèle murin de métastases hépatiques de CCR a été optimisé en injectant des cellules de CCR en intra-splénique, suivie d'une splénectomie. La BLI a permis de détecter la présence de métastases hépatiques 7 jours après l'inoculation des cellules tumorales. Par la suite, la croissance des métastases hépatiques a été évaluée par scanner X après une injection unique d'un produit de contraste, l'ExiTron nano 12000, et par échographie. Le scanner X a été principalement utilisé pour les localiser et les identifier tandis que l'échographie permet d'accéder à une mesure directe des dimensions des métastases hépatiques. La combinaison de ces modalités d'imagerie a permis de caractériser la croissance des métastases hépatiques dans ce modèle. Les métastases se situent principalement à la périphérie

du foie, rendant leur détection parfois complexe en scanner X et en échographie. De plus, au cours de leur croissance, certaines métastases fusionnent entre elles, empêchant ainsi leur dénombrement précis au cours du temps. Nous avons également observé que ces métastases hépatiques présentent un schéma de croissance par « poussée », comprimant le tissu hépatique sans remplacer les hépatocytes, entraînant ainsi une diminution du volume hépatique mesuré par scanner X. Cependant, nous avons conclu que la mesure des variations du volume du foie ne permettait pas de traduire fidèlement et sensiblement la croissance des métastases hépatiques par rapport à la mesure des dimensions des métastases obtenues en échographie.

Lors de la mise au point du protocole thérapeutique de la délivrance de l'irinotécan, nous avons mis en évidence des variations interindividuelles significatives dans la croissance des métastases, ce qui souligne l'importance de prendre en compte ces variations pour élaborer un protocole expérimental adapté (*i.e.,* nombre d'animaux suffisant) et analyser les données de manière pertinente. Par exemple, une approche inspirée de l'analyse clinique, prenant en compte la réponse individuelle de chaque animal au traitement, a permis d'identifier des sous-populations au sein des groupes de traitement et de les classer selon leur réponse thérapeutique. Ainsi, la comparaison des profils de la croissance des métastases entre les souris traitées par l'irinotécan seul et celles traitées avec l'irinotécan délivré par sonoporation démontre que les deux traitements ont un effet similaire sur la croissance des métastases dans notre modèle. De plus, l'administration de l'irinotécan par sonoporation n'a pas amélioré la survie des animaux comparativement à l'administration de l'irinotécan seul. Nous pouvons donc conclure que, dans nos conditions expérimentales, ce protocole de délivrance par sonoporation ne s'est pas révélé plus efficace que l'administration de l'irinotécan seul.

Le modèle murin de métastases hépatiques de CCR développé et caractérisé au cours de ces travaux de thèse semble pertinent pour étudier l'efficacité de protocoles thérapeutiques. Cependant, les caractéristiques des tumeurs de modèles orthotopiques ou métastatiques diffèrent considérablement des tumeurs sous-cutanées, ce qui peut influencer la sensibilité au traitement. Dans ce contexte, il serait pertinent d'ajouter un groupe contrôle sans traitement afin de s'assurer de l'efficacité du l'irinotécan seul et d'ajuster la dose administrée et/ou la fréquence d'administration du traitement. Bien que les paramètres ultrasonores utilisés dans notre étude aient montré leur efficacité pour la délivrance de molécules thérapeutiques dans d'autres modèles de xénogreffes sous-cutanées, il est nécessaire d'optimiser les paramètres pour les adapter spécifiquement à notre modèle. Ainsi, afin d'améliorer notre protocole thérapeutique, il serait pertinent, dans un premier temps, de mener une étude plus approfondie sur la

distribution des MBs dans les métastases hépatiques dans notre modèle. En effet, l'analyse histologique des métastases a démontré qu'elles étaient vascularisées, cependant, il reste à déterminer si cette vascularisation est suffisante pour garantir une distribution optimale des MBs à proximité des métastases. Ensuite, il serait pertinent d'étudier le comportement des MBs en fonction de leur concentration, de la fréquence de répétition des impulsions ultrasonores et de la pression acoustique. Ainsi, le protocole de sonoporation pourrait être amélioré à l'aide d'une étude préliminaire de cartographie acoustique passive. Cette étude permettrait d'identifier les paramètres optimaux pour atteindre un régime de cavitation efficace et améliorer l'efficacité de la sonoporation au sein des métastases hépatiques dans notre modèle.

Annexes

1. **Liste des publications**
2. **Liste des congrès**
3. **Liste des enseignements et encadrements**
4. **Article**

1. Liste des publications

Article – Chen J, Escoffre JM, Romito O, Iazourene T, Presset A, **Roy M**, Potier Cartereau M, Vandier C, Wang Y, Wang G, Huang P, Bouakaz A. *Enhanced macromolecular substance extravasation through the blood-brain barrier via acoustic bubble-cell interactions*. Ultrason Sonochem, **2024**, 103:106768.

Article – **Roy M**, Alix C, Burlaud-Gaillard J, Fouan D, Raoul W, Bouakaz A, Blanchard E, Lecomte T, Viaud-Massuard MC, Sasaki N, Serrière S, Escoffre JM. *Delivery of Anti-Cancer Drugs using Microbubble-Assisted Ultrasound in a 3D Spheroid Model*. Mol. Pharm, **2024**, 21, 2, 831–844.

Revue – **Roy M**, Alix C, Bouakaz A, Serrière S, Escoffre JM. *Tumor Spheroids as Model to Design Acoustically Mediated Drug Therapies: A Review.* Pharmaceutics, **2023**, 1;15(3):806.

2. Liste des congrès

Poster – Acoustically mediated delivery of anti-cancer drugs in a 3D spheroid model, *IEEE International Ultrasonics Symposium*, 2024, Taipei, Taiwan.

Communication orale – Vectorisation *in vivo* d'un plasmide codant l'interleukine-12 par sonoporation dans un modèle murin de mélanome, *20ème Journée scientifique du réseau « Vectorisation, Imagerie, Radiothérapies », 2024, Rennes, France*

Prix de la meilleure communication orale – Vectorisation de molécules chimiothérapeutiques par sonoporation dans des sphéroïdes de cancer colorectal humain ; *1ère journée thématique - Organoïdes, tumoroïdes et sphéroïdes : Mise en place, Avantages/Limites & Applications en recherche biomédicale,* 2024, Tours, France

Poster – Multimodal imaging for the characterization of colorectal cancer liver metastases mouse model, *19th European Molecular Imaging Meeting, 2024, Porto, Portugal*

Poster – Delivery of anti-cancer drugs using microbubble-assisted ultrasound in a 3D spheroid model, *29th European Symposium on Ultrasound Contrast Imaging, 2024, Rotterdam, Pays-Bas*

Poster – Protocol design for the formation of melanoma spheroids for acoustically mediated drug delivery studies, *Journée de la Recherche Biomédicale de la Faculté de Médecine de Tours, 2023, Tours, France*

Poster – Enhancing bleomycin delivery using microbubble-assisted ultrasound in colorectal cancer spheroid, *Journée de la Recherche Biomédicale de la Faculté de Médecine de Tours, 2023, Tours, France*

Poster – *In vivo* IL-12 plasmid delivery using microbubble-assisted ultrasound in a mouse melanoma model, *Journée de la Recherche Biomédicale de la Faculté de Médecine de Tours, 2023, Tours, France*

Poster – Enhancing bleomycin delivery using microbubble-assisted ultrasound in colorectal cancer spheroid, IEEE International Ultrasonics Symposium, 2023, Montréal, Canada (visioconférence)

Poster – Acoustically mediated bleomycin delivery in 3D spheroid model, *22nd International Symposium on Therapeutic Ultrasound, International Society for Therapeutic Ultrasound (ISTU), 2023, Lyon, France*

Poster – Acoustically mediated dye/drug delivery in 3D spheroid model, *28th European Symposium on Ultrasound Contrast Imaging, 2023, Rotterdam, Pays-Bas*

3. Liste des enseignements et encadrements

Enseignements

Travaux pratiques de biochimie des étudiants en 2ème année Licence Science de la vie, *Département de Biochimie, Faculté des Sciences, Université de Tours :*

- TP Métabolisme et introduction à l'enzymologie (28 h)
- Méthodes d'analyses moléculaires et cellulaires (16 h)

Encadrements

Février - Mars 2024 – Étudiant (R. Boiteau) BUT Génie Biologique, *Université de Tours*, « Délivrance de molécules thérapeutiques par sonoporation dans des modèles de métastases hépatiques de cancer colorectal »

Juillet 2023 – Étudiante (M. Turner) Licence de Biologie et Sciences Biomédicales, *Université de Birmingham*, « Délivrance de gènes thérapeutiques par sonoporation dans un modèle de sphéroïde de mélanome »

Janvier - Avril 2023 – Étudiant (A. Choisy) Licence 2ème année, Sciences de la vie, *Université de Tours*, « Conception d'un protocole pour la formation de sphéroïdes de mélanome pour étudier la délivrance de gènes thérapeutiques par sonoporation »

4. Article

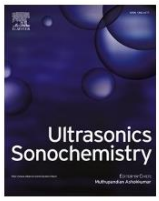
Ultrasonics Sonochemistry 103 (2024) 106768



Contents lists available at ScienceDirect

Ultrasonics Sonochemistry

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





Enhanced macromolecular substance extravasation through the blood-brain barrier via acoustic bubble-cell interactions

Jifan Chen [a,b], Jean-Michel Escoffre [b], Oliver Romito [c], Tarik Iazourene [b], Antoine Presset [b], Marie Roy [b], Marie Potier Cartereau [c], Christophe Vandier [c], Yahua Wang [b], Guowei Wang [a], Pintong Huang [a,d,1,*], Ayache Bouakaz [b,1,*]

[a] Department of Ultrasound in Medicine, The Second Affiliated Hospital of Zhejiang University, School of Medicine, Zhejiang University, Zhejiang, China
[b] Inserm UMR 1253, iBrain, Université de Tours, Inserm, Tours, France
[c] Inserm UMR 1069 Nutrition, Croissance et Cancer (N2C), Faculté de Médecine, Université de Tours, F-37032, France
[d] Research Center for Life Science and Human Health, Binjiang Institute of Zhejiang University, Hangzhou 310053, China

ARTICLE INFO

Keywords:
Ultrasound
Microbubbles
Bubble-cell mechanical interaction
Blood-brain barrier
Macromolecular substance
Transcytosis
Drug delivery
In-vitro

ABSTRACT

The blood–brain barrier (BBB) maintains brain homeostasis, regulates influx and efflux transport, and provides protection to the brain tissue. Ultrasound (US) and microbubble (MB)-mediated blood–brain barrier opening is an effective and safe technique for drug delivery *in-vitro* and *in-vivo*. However, the exact mechanism underlying this technique is still not fully elucidated. The aim of the study is to explore the contribution of transcytosis in the BBB transient opening using an in-vitro model of BBB. Utilizing a diverse set of techniques, including Ca^{2+} imaging, electron microscopy, and electrophysiological recordings, our results showed that the combined use of US and MBs triggers membrane deformation within the endothelial cell membrane, a phenomenon primarily observed in the US + MBs group. This deformation facilitates the vesicles transportation of 500 kDa fluorescent Dextran via dynamin-/caveolae-/clathrin- mediated transcytosis pathway. Simultaneously, we observed increase of cytosolic Ca^{2+} concentration, which is related with increased permeability of the 500 kDa fluorescent Dextran *in-vitro*. This was found to be associated with the Ca^{2+}-protein kinase C (PKC) signaling pathway. The insights provided by the acoustically-mediated interaction between the microbubbles and the cells delineate potential mechanisms for macromolecular substance permeability.

1. Introduction

In the brain and spinal cord of mammals, including humans, the permeability of blood–brain barrier (BBB) is controlled by tight junctions between endothelial cells, which restrict the diffusion of pathogenic microorganisms and large hydrophilic molecules (>400 Da) from the bloodstream into the brain parenchyma [1]. The primary functions of BBB are maintaining brain homeostasis, regulating influx and efflux transport, and protecting brain tissue from harm [2]. Besides, endothelial cells of CNS exhibit low levels of vesicle trafficking, which is generally assumed to limit transcellular transport [3]. These physiological phenomenon prevent therapeutic molecules from passing through the capillary and diffusing freely and deeply into brain tissue or lesions. Several drug delivery methods including direct brain infusion [4], convection-enhanced delivery [5], and biophysical methods have been developed in order to enhance the intracerebral bioavailability of therapeutic molecules [6,7]. The macromolecules such as proteins, antibodies, and nanomedicines can be delivered into brain through the transcytosis effect by using specific endothelial receptors or membrane structures [8]. Unfortunately, the expression of the major facilitator superfamily domain containing protein 2a (Mfsd2a) in the human brain endothelial cells has been identified as a negative regulation factor for transcytosis of BBB. Specifically, when Mfsd2a is overexpressed, it significantly inhibits the process of transcytosis within the endothelial cells of the central nervous system (CNS). Compared with wide type mice, the traffic vesicles in the endothelial cells of Mfsd2a knock-out mice exhibited a significant elevation [3,9,10]. The key vesicular structures involved in transcytosis such as clathrin-coated pits and

* Corresponding authors at: Department of Ultrasound in Medicine, The Second Affiliated Hospital of Zhejiang University, School of Medicine, Zhejiang University, Zhejiang, China (P. Huang).
E-mail addresses: huangpintong@zju.edu.cn (P. Huang), ayache.bouakaz@univ-tours.fr (A. Bouakaz).
[1] These authors contributed equally to this work.

https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2024.106768
Received 28 July 2023; Received in revised form 1 January 2024; Accepted 14 January 2024
Available online 17 January 2024
1350-4177/© 2024 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

caveolae, which are responsible for the internalization of macromolecules or nanoparticles and their transport across the endothelial cell from one side to the other side [11]. These findings emphasize the critical role of Mfsd2a expression in modulating the intricate mechanisms underlying transcytosis within the BBB.

As one of the promising approaches, the BBB opening (BBBO) using microbubble-assisted ultrasound (MB-assisted US) has been investigated in *in-vitro* studies [12], preclinical studies [13], and being currently evaluated in a few clinical trials [14]. By employing low intensity pulsed US, it is possible to induce MBs oscillations characterized by expansions and contractions. These oscillations result in a transient opening of endothelial tight junctions [15]. In addition, it has been reported that in-vivo, there is an increase in caveolae-mediated transcytosis following the application of US + MBs for larger cargo (>500 kDa). But the phenomena were not found in smaller cargo (3 or 70 kDa). These results shed light on an additional mechanism of acoustically-mediated macromolecule transport [16,17]. It has been also reported that the MBs-cell mechanical interactions stimulate the formation of transient pits, ranging from a few nanometers to 150 nm *in-vitro* [18]. Furthermore, in an *in-vivo* scenario, it has been reported that the group treated with US + MBs exhibited increased number of pinocytotic vesicles and higher levels of caveolin-1 expression compared to the groups not exposed to US [17]. Moreover, the influx of Ca^{2+} into the cytosol during the acoustically mediated pore formation might enhance the cellular physiological responses, including calcium-related signal pathway activation, elevated endocytosis and increased vascular permeability [19,20]. Additionally, the generation of reactive oxygen species (ROS) resulting from cavitation-induced sonochemistry may contribute to the permeabilization of the cell membrane using MB-assisted US. This can occur through the oxidation of lipid membrane [21,22].

Until now, the biophysical mechanism behind the transcytosis induced by the combination of US + MBs remains unclear. In the current research study, our hypothesis explores the potential role of mechanical interactions between microbubbles and cells, facilitated by the application of ultrasound in promoting the enhanced extravasation of large molecules across the BBB. To investigate this hypothesis, we utilize an *in vitro* model of the BBB and employ various techniques such as calcium imaging, electron microscopy, and electrophysiological recordings. Through these experimental approaches, we aim to unravel the mechanisms underlying the increased transcytosis observed during the use of US + MBs and gain valuable insights into this phenomenon.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Fluorescent dextrans of 3 kDa (D3306) and 500 kDa (D7136) were purchased from Thermo Fisher Scientific Inc (USA).

2.2. Microbubbles

Vevo MicroMarker™ contrast agents were purchased from Fujifilm-VisualSonics (Toronto, Canada). These agents were prepared according to the manufacturer's instructions. The final concentration of microbubbles (MBs) was 2×10^9 MBs/mL.

2.3. Cell culture

Human microvascular brain endothelial cell line (hCMEC/D3; SCC066) were purchased from Merck Millipore (Fontenay sous Bois, France). These cells were cultured as a monolayer in EndoGRO-MV medium (Merck Millipore).

2.4. Acoustic equipment

Ultrasound waves were generated using a single-element transducer (Sofranel, Sartrouville, France) with a center frequency of 1 MHz. The transducer had a diameter of 15 mm and was naturally focused at 27 mm. It was driven by an arbitrary waveform generator (33250A, Agilent Scientific Instruments, USA), then amplified by a 500 W power amplifier (AAP-500–0.2–6-D; ADECE, Vallauris, France). The peak negative pressure of the acoustic wave was measured in a separate setup using a calibrated hydrophone (HGL-0200, ONDA Corporation) at the natural focal distance of the transducer.

2.5. Sonoporation device

A custom-made device for ultrasound application in viability and transcytosis experiment has been designed by AP (Figure S1). A Transwell® insert (Corning, Shanghai, China) of hCMEC/D3 cells was inverted and fixed in the device. The transducer was placed at the bottom of the device at a 27 mm distance from the insert surface. The MBs were injected into the device and they floated in contact to the cell monolayer. An acoustic absorber was placed on the top of the device in order to avoid acoustic reflections. Besides, in endocytosis, exocytosis, calcium imaging, and electron microscope experiment, the other custom-made device designed by JME was used as previously reported [18].

2.6. In-vitro BBB permeability

A hCMEC/D3 monolayer was cultured in the apical compartment of the Transwell® insert. The transendothelial electrical resistance (TEERs, EVOM2, Sarasota, USA) of the *in-vitro* BBB reached 50 Ω/cm^2, demonstrating the barrier integrity compared to the insert without endothelial cells. To investigate the effect of the MB, a MB:cell ratio of 50:1 was used. The *in-vitro* BBB was then subjected to 1 MHz sinusoidal US waves, consisting of pulses of 50 cycles and repeated every 1 ms and at a peak negative pressure $\lesssim$ 0.5 MPa. The total exposure time to the US waves was 2 min. The insert was immediately placed in suitable culture plate. Besides, fluorescent dextrans (3 kDa or 500 kDa) were immediately added into the upper chamber. A volume of 1.5 mL of phosphate buffered saline (PBS; Thermo Fisher, USA) solution was added into the bottom chamber. Then, this chamber was sampled at 0 and 1 h. The difference between pre- and post-US + MBs treatments in TEER values and fluorescent intensities were measured to monitor the BBB permeability. The positive control group was defined as experiment group without adherent cell.

2.7. Cell viability assessment

The influence of peak negative pressures (0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 MPa) on the viability of BBB was assessed using a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide colorimetric assay (MTT; ThermoFisher Scientific, USA) assay. After incubating with MTT reagent for 1 h, 10 μL sample was added in transparent 96-well plate per group. Afterwards, the optical density (OD) was measured at 570 nm.

2.8. Endocytosis and transcytosis analysis for macromolecules

2.8.1. Endocytosis analysis

To investigate the endocytosis process, the adherent *in-vitro* BBB were incubated with 500 kDa fluorescent Dextran and treated with US + MBs synchronously. Then, the samples of fluorescent suspensions were collected at different incubating times and measured using a fluorescent plate reader (FLUOstar OPTIMA, BMG Lab tech, Germany). Besides, the adherent cells digested by trypsin were collected at 2 h post-treatment and the cell suspension was measured by flow cytometer (FCM) (CytoFLEX, Beckman Coulter, Inc., USA).

2.8.2. Transcytosis analysis

To investigate the relationship between US + MBs and the transcytosis pathway, Dynasore hydrate (Dy, 50 μM, an inhibitor of dynamin-

mediated pathway), Methyl-β-cyclodextrin (Mβc, 800 μM, an inhibitor of Caveolae-mediated pathway), and Pitstop2 (PP2, 20 μM, an inhibitor of clathrin-mediated pathway) were pre-incubated with the monolayer for 1 h separately. Then, 500 kDa fluorescent Dextran was added into the upper chamber after US + MBs treatment. The PBS solution in the bottom chamber was sampled at 0 and 2 h and the fluorescent intensity was measured using fluorescent plate reader.

2.9. Cell electrophysiology

2.9.1. Protocol

The patch-clamp technique in the whole-cell configuration was used to monitor the modification of electrical plasma membrane properties induced by US + MBs [23]. A custom device was designed by JC to perform patch-clamp experiments. An inverted microscope (Eclipse® TE300, Nikon, Champigny sur Marne, France) was used on an anti-vibration table (TMC, Peabody, MA). hCMEC/D3 cells were cultured on 35-mm culture dishes (CELLSTAR® Greiner bio-one, Germany) at 1500 cells/cm^2. Two or three days later, the cell monolayer was washed and the medium was replaced with standard bath solution (SBS) (in mM): 130 NaCl, 5 KCl, 8 D-glucose, 10 HEPES, 1.2 $MgCl_2$, and 1.5 $CaCl_2$ (set to pH 7.4 with NaOH) before the patch-clamp experiments. Patch pipettes were prepared from nonheparinized hematocrit tubes (Vitrex, Paris, France) to a resistance of 4–10 MΩ using a puller (Sutter Instrument Co., Novato, CA). The pipette solution was prepared as below: (in mM): 130 KCl, 10 NaCl, 0.5 $MgCl_2$, 5 Mg-ATP, 0.5 EGTA, 10 HEPES, and 0.4 GTPTris (set to pH 7.2 with KOH). At room temperature, whole-cell membrane potentials were recorded under a current-clamp mode with no current injected (I = 0) using an Axopatch® 200B patch clamp amplifier (Axon Instrument, Burlingame, CA). Analog signals were filtered at 5 kHz using a five-pole low pass Bessel filter and sampled at 10 kHz using a 1322A Digidata converter (Axon Instrument, Burlingame, CA). PClamp® software (v.9.2, Axon Instrument, Burlingame, CA) was used for the current-clamp, acquisition, and analysis of results.

2.9.2. Patch-clamp data post-processing

In order to remove the systematic noise originating from the transducer and power amplifier, a low pass filter was implemented using the fast Fourier transform (FFT) using Matlab software (Mathworks, USA). Then, both the systematic noise (resulting from the transducer and power amplifier) and random noise were filtered out, enabling the extraction of the electrical signal generated by acoustically stimulated cells.

2.10. Cytosolic Ca^{2+} and Ca^{2+} related pathway

Fluo-4-AM (HY-101896; MedChemExpress, USA) was used to detect the relative cytosolic Ca^{2+} concentration change. The working concentration and incubating time of Fluo-4-AM were 1 mM and 20 min respectively. The cell was washed thrice by PBS before US + MBs. For fluorescent images, the cells were fixed using 4 % paraformaldehyde (PFA) immediately after exposing to US + MB. To investigate the relationship between Ca^{2+} related pathways and the transcytosis, Rottlerin (20 μM, an inhibitor of Protein kinase C pathway, PKC) and KN-93 (100 nM, an inhibitor of Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase II, CaMKII) were pre-incubated with the cell monolayer for 1 h in the transcytosis experiment separately.

2.11. Electron microscope experiment

The effects of MB-assisted US on the cell ultrastructure and specifically, on plasma membrane were investigated using scanning electron microscopy (SEM). Briefly, hCMEC/D3 cells were cultured on coverslip. After US + MBs, they were fixed with a solution of 4 % PFA and 1 % glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2) at 4 ℃ for 48 h. SEM specimens were dehydrated in a graded series of ethanolic solution (50 % – 100 %) and critical points dried in liquid carbon dioxide. The coverslips were attached to sample stubs and sputtered coating with platinum (5 nm). SEM of our samples were performed using a LEO DSM 982 SEM (Zeiss, Germany).

2.12. Statistical analysis

The GraphPad Prism 8.0 software was used in this study. Data were presented as mean ± standard deviations. One-way ANOVA and Tukey correction were used to test the difference's statistical significance among groups. Statistical significance was defined as $p < 0.05$ (NS, non-significance, *$p < 0.05$, **$p < 0.01$ and ***$p < 0.001$).

3. Results

3.1. The viability analysis

The influence of peak negative pressures (from 0 to 0.7 MPa) on BBB viability was assessed using MTT colorimetric assay after US + MBs exposure. No statistically significant difference in BBB viability was observed for the PNPs of 0, 0.1, 0.3 and 0.5 MPa compared to the control condition. However, the exposure of BBB to a PNP of 0.7 MPa induced a significant decrease of the BBB viability in comparison to the control condition (Fig. 1A).

3.2. The role of extracellular Ca^{2+} ions on the acoustically-mediated opening of BBB

To investigate the role of Ca^{2+} on the US + MBs-mediated opening of the BBB *in-vitro*, various experimental groups were examined for changes in the TEERs and the transport of fluorescent dextrans (3 kDa and 500 kDa) in the presence or absence of Ca^{2+}. When Ca^{2+} were present, the application of US + MBs at 0.5 MPa resulted in a significant decrease in TEERs compared to when Ca^{2+} were absent (Fig. 1B). In addition, exposure of the BBB to US + MBs led to a much higher fluorescent intensity at the bottom of the chamber for both dextran molecular weights when Ca^{2+} ions were present (Fig. 1C and D), confirming the findings of the TEER experiments. Also, in the absence of Ca^{2+}, the US + MBs treatment induced a significant increase in fluorescent intensity at the bottom of the chamber for both molecular weights of fluorescent dextrans compared to control groups.

3.3. Effects of US + MBs on cellular electrophysiology and cytosol Ca^{2+} concentration

During the patch clamp measurement, the hCMEC/D3 cellular monolayer was exposed to US + MBs. Membrane potential were acquired using the whole-cell configuration approach in current clamp mode, followed by post-processing to remove the background noise. As shown in Fig. 2A, the hyperpolarization during US + MBs was recorded, occurred during the exposure to US + MBs followed by a return to baseline once the US was discontinued.

In addition, the impact of US + MBs on the cytosolic Ca^{2+} concentration in hCMEC/D3 monolayers was assessed through Ca^{2+} fluorescence imaging (Fig. 2B and 2C). The results indicate that the US + MBs treatment engendered a higher Ca^{2+} fluorescent intensity than the control conditions. In addition, the exposure of cell monolayer to US + MBs in the presence of ascorbic acid (AA, ROS scavenger) induced a lower Ca^{2+} fluorescent intensity than that of cell monolayer treated with US + MBs alone. These findings reveal that the combined effect of US + MBs results in alterations in the cell membrane potentials and in the cytosolic Ca^{2+} concentration via both mechanical and sonochemical effects. The increased cytosolic Ca^{2+} caused by US + MBs can be explained by mechanical interplay between oscillating MBs and the cell's plasma membrane, directly affecting the membrane integrity by the pushing and pulling of the plasma membrane. Besides, the

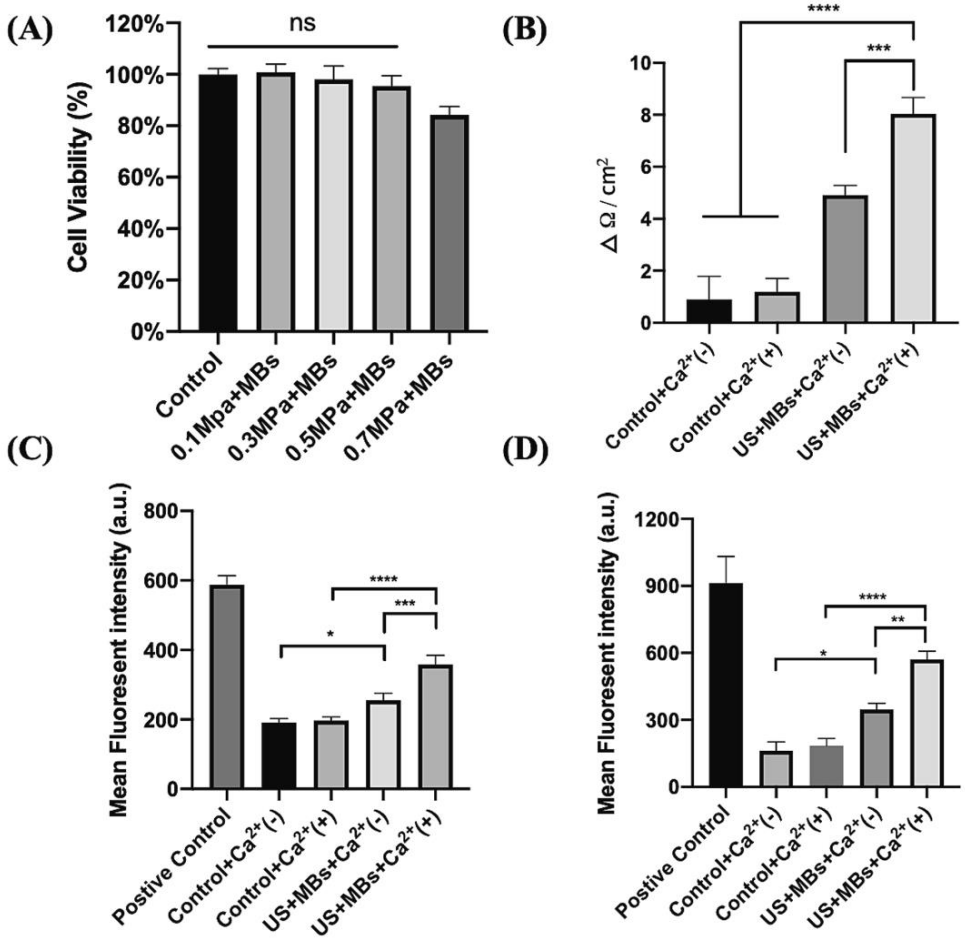


Fig. 1. The role of extracellular Ca^{2+} on the acoustically-mediated opening of BBB *in-vitro* (A) cell viability experiment (B) TEERs value (C) Mean 3 kDa dextran fluorescence intensity at the bottom of the chamber (D) Mean 500 kDa dextran fluorescent intensity at the bottom of the chamber; Positive Control: group without hCMEC/D3 cell (3 independent replicates).

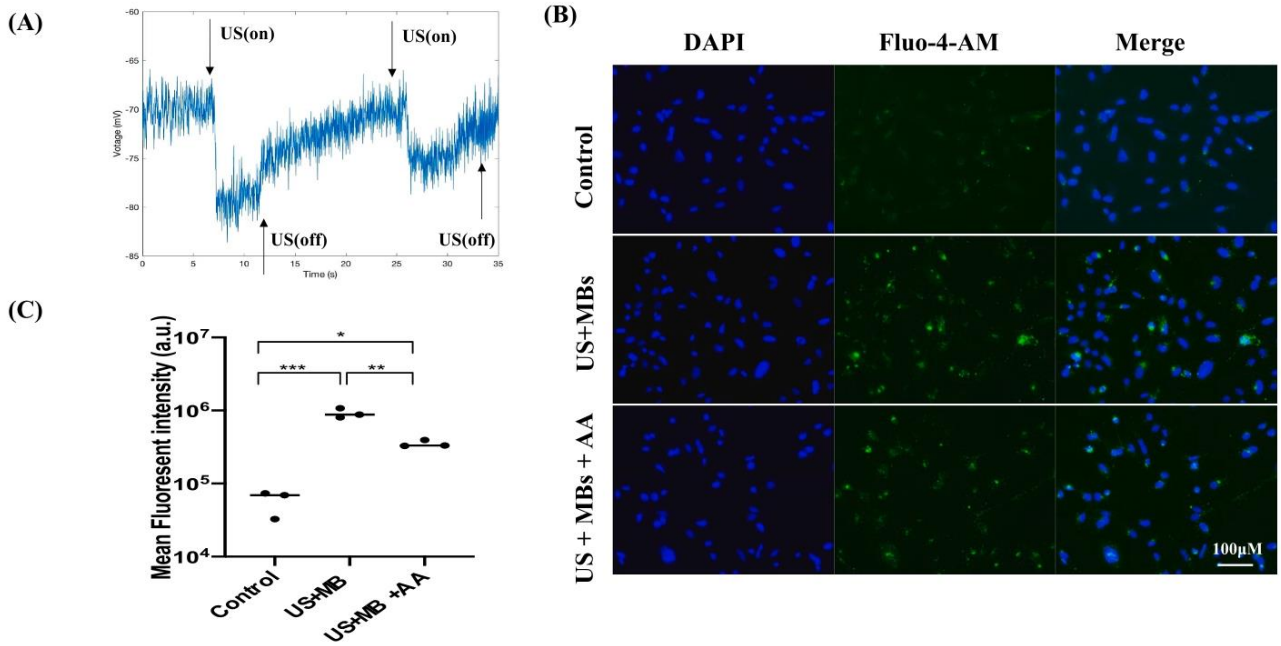


Fig. 2. US + MBs mediated cellular electrophysiology change and Ca^{2+} influx (A) Membrane potential during US + MBs by real-time patch clamp recording (5 independent replicates); (B) Cytosolic calcium fluorescence imaging; (C) Mean fluorescence intensity of Cytosolic calcium ion in the different groups (3 independent replicates).

sonochemical reactions triggered by cavitation microbubbles can produce reactive oxygen species (ROS). These ROS can induce excessive oxidation of the plasma membrane, and hence compromising its structural integrity.

3.4. Enhanced transport of 500 kDa fluorescent dextran across the BBB by US + MBs

The effects of MB-assisted US on the transport of 500 kDa fluorescent dextran through a hCMEC/D3 barrier were investigated using scanning electron microscopy (SEM). SEM images revealed the presence of 0.5–1 μm pits on the surface of cell membrane of hCMEC/D3 barrier exposed to US + MBs. This observation provides direct evidence of the direct interaction between the membrane and the MBs (Fig. 3A). Concurrently, an increasing number of smaller 50–100 nm pits was also noted, indicating an increase in membrane permeability. The transcellular transport of 500 kDa fluorescent dextran was investigated by introducing a transcytosis inhibitor, Dynasore hydrate (Dyn). Prior to exposure to US + MB and fluorescent dextran, the hCMEC/D3 barrier was preconditioned with Dyn for 1 h. Post-treatment, the fluorescence intensity at the bottom of the chamber was significantly decreased compared to the hCMEC/D3 barrier treated solely with US + MBs (Fig. 3B).

In addition, to investigate the role of acoustically generated ROS, the hCMEC/D3 barrier was incubated with AA for ROS scavenging purposes. There was no significant difference in fluorescence intensity observed at the bottom chamber of hCMEC/D3 barriers treated with US + MBs in the presence or in absence of AA (Fig. 3C). However, when the hCMEC/D3 barrier was treated either with MBs or with H_2O_2 or a combination of H_2O_2 and AA, the fluorescent intensity was lower compared to the group exposed to US + MBs with or without AA. These findings demonstrate the significance of the mechanical interaction between MBs and plasma membrane of hCMEC/D3 cells, surpassing the impact of ROS in facilitating this transcellular process.

3.5. Internalization mechanisms of 500 kDa Dextran: Involvement of Ca^{2+} and Caveolae/Clathrin-mediated endocytosis

In order to elucidate the involvement of Ca^{2+} in the intracellular transports of 500 kDa dextran, we conducted an experiment to determine the role of Ca^{2+} in the process of endocytosis. After incubating with 500 kDa Dextran and exposing to US + MBs, we sampled the fluorescence intensity of cell-free supernatant, representing the residual 500 kDa dextran, at different time points. In addition, we used flow cytometry to measure the cellular fluorescence intensity, which refers to the cellular endocytosis of 500 kDa dextran, in different control and experimental groups after a 2-hour incubation period.

As shown in Fig. 4A, the US + MBs + Ca^{2+} group exhibited significant decrease in fluorescence intensity compared to the control groups. Besides, the flow cytometry analysis showed that the 500 kDa dextran-intake positive cell rate in US + MBs + Ca^{2+} group is higher than in the other groups (Fig. 4B). In addition, the intracellular internalization of 500 kDa fluorescent dextran was found to be inhibited by Dy, Mβc, and PP2, thus demonstrating the vital role of the caveolae- or clathrin-mediated pathways in the endocytosis of 500 kDa fluorescent dextran (Fig. 4C).

3.6. Involvement of Caveolae-/Clathrin-mediated and Ca2 + -Dependent pathways in transcytosis induced by US + MBs

When the hCMEC/D3 barrier is incubated with specific transcytosis inhibitors (Mβc and PP2), the fluorescence intensity at the bottom chamber decreased significantly indicating the involvement of both the caveolae- and clathrin-mediated transcytosis pathways in the trans-endothelial transport of 500 kDa dextran (Fig. 5A). To further investigate the calcium-related pathway, we conducted pretreatement experiment using Rotterin and KN93 in the transcytosis experiment respectively. The fluorescence intensity at the bottom chamber in the US + MBs + Rotterin group was partially decreased. However, no obvious decrease was observed in the US + MBs + KN93 group (Fig. 5B).

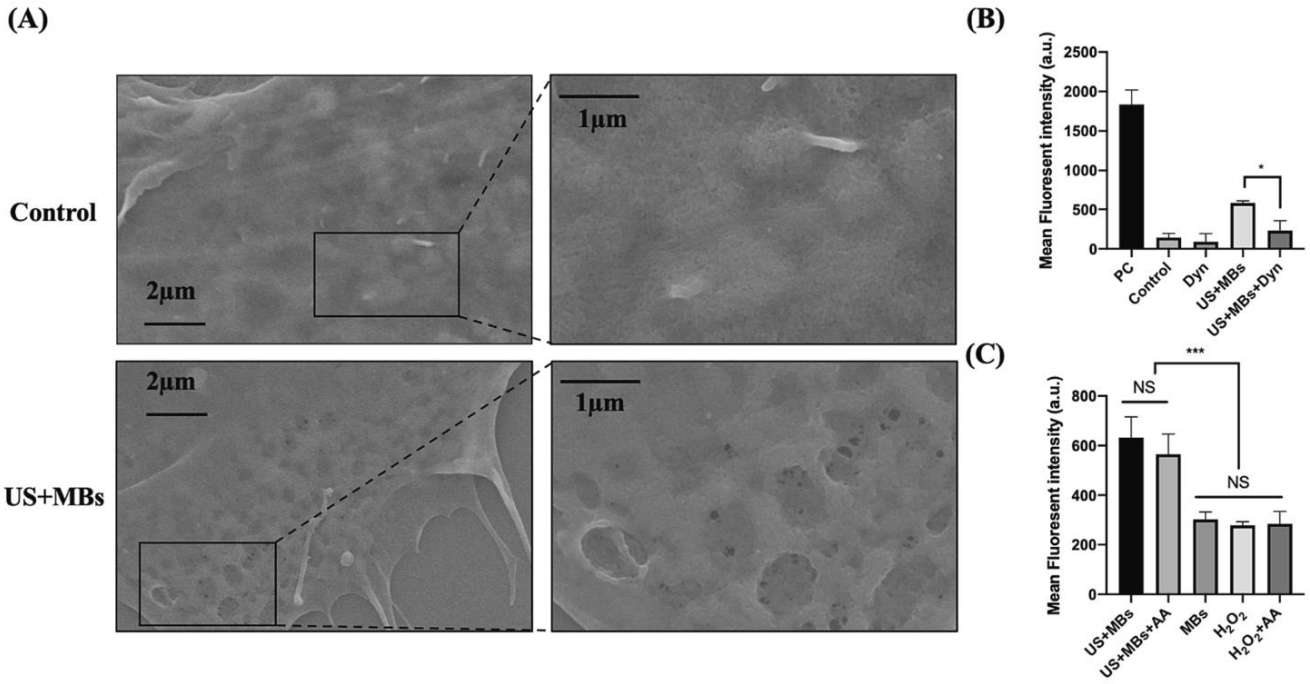


Fig. 3. The US + MBs mediated leakage of 500 kDa Dextran through the transcellular pathway (A)The non-US + MBs treatment group (The top figure), The US + MBs treatment group (The bottom figure); (B)Mean fluorescence intensity in bottom chamber among different groups; (C) Mean fluorescence intensity in bottom chamber among different groups (3 independent replicates).

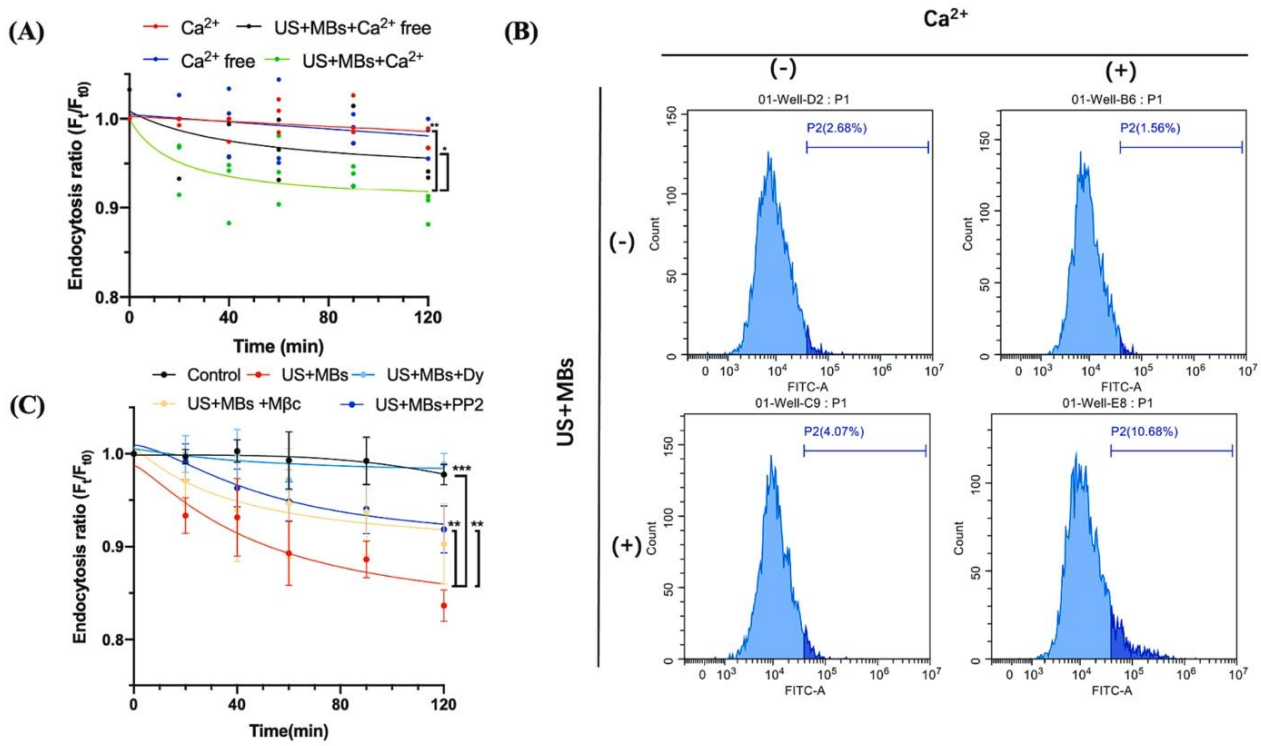


Fig. 4. Ca^{2+} assisted and Caveolae-/Clathrin-mediated Endocytosis of 500 kDa Dextran (A) Fluorescence intensity in suspensions after different time point with/without calcium ions. (B) The cellular fluorescence intake after different time point with/without calcium ions. (C) Fluorescence intensity in suspensions after different time point with different inhibitors (3 independent replicates).

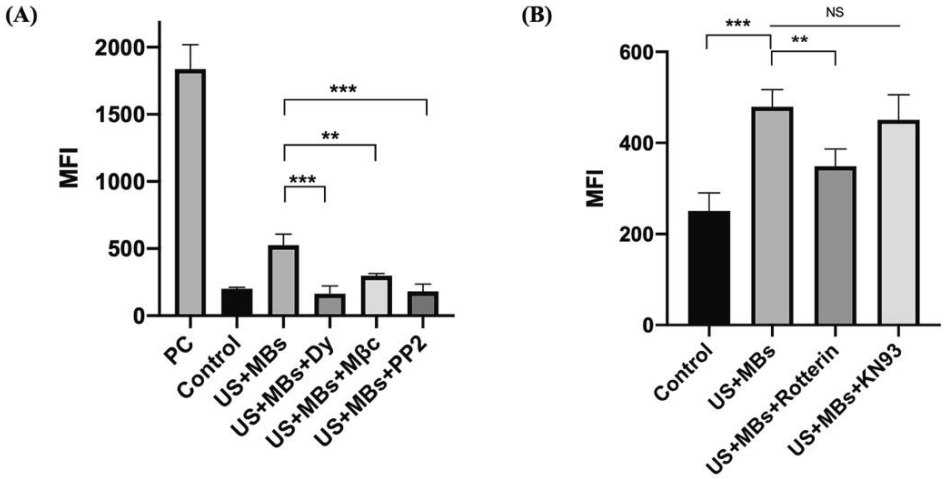


Fig. 5. Caveolae-/Clathrin-mediated and a Ca^{2+}-dependent pathway participate in the US + MBs induced transcytosis (A)The mean fluorescence intensity in the bottom chamber with different transcytosis inhibitors; (B) The mean fluorescence intensity in the bottom chamber with different calcium-related pathway inhibitors (3 independent replicates).

4. Discussion

This study investigates the mechanical interactions between bubbles and cells. Our experimental results demonstrate that the deformation of the cell membrane plays a crucial role in facilitating the necessary bubble-cell interactions necessary for inducing transendothelial transport of 500 kDa fluorescent dextran in an in-vitro BBB model using hCMEC/D3. Additionally, the formation of the membrane pores through acoustic exposure leads to increase the membrane hyperpolarization, elevate cytosolic Ca^{2+} thus accelerating the transcytosis of 500 kDa dextran. According to our hypothesis, the mechanical interaction between cell membrane and oscillating MBs is necessary to trigger this transcytosis process. The formation of pits on the surface of cellular membrane, induced by the combination of US + MBs, may enhance the transcytosis effect of 500 kDa dextran. Meanwhile, the increased cytosolic Ca^{2+} concentration accelerates the acoustically mediated transendothelial transport of this dextran through calcium-dependent pathways, including the Ca^{2+}-PKC pathway.

In addition, we have observed that acoustically generated ROS can take part in the process of increased cytosolic Ca^{2+} concentration. This phenomenon is consistent with the previous findings that have demonstrated the involvement of ROS in the cell sonoporation [22]. Moreover, previous studies reported that ROS promote caveolae-mediated transcytosis via Rac1 signaling and c-Src-dependent

caveolin-1 phosphorylation in human brain endothelial cells [24]. This could potentially be a putative explanation in the acoustically mediated caveolae-mediated transcytosis. However, based on our current understanding, these ROS are mainly generated from MB cavitation, which might have limited diffusion into cytoplasm because of the short diffusion distance. So, we speculate that the acoustically mediated ROS might mainly contribute to the lipid over-oxidation, which weakens the cellular membrane, facilitating the formation of membrane pores, promoting Ca^{2+} influx, increasing the cytosolic Ca^{2+} concentration and aiding transcytosis indirectly.

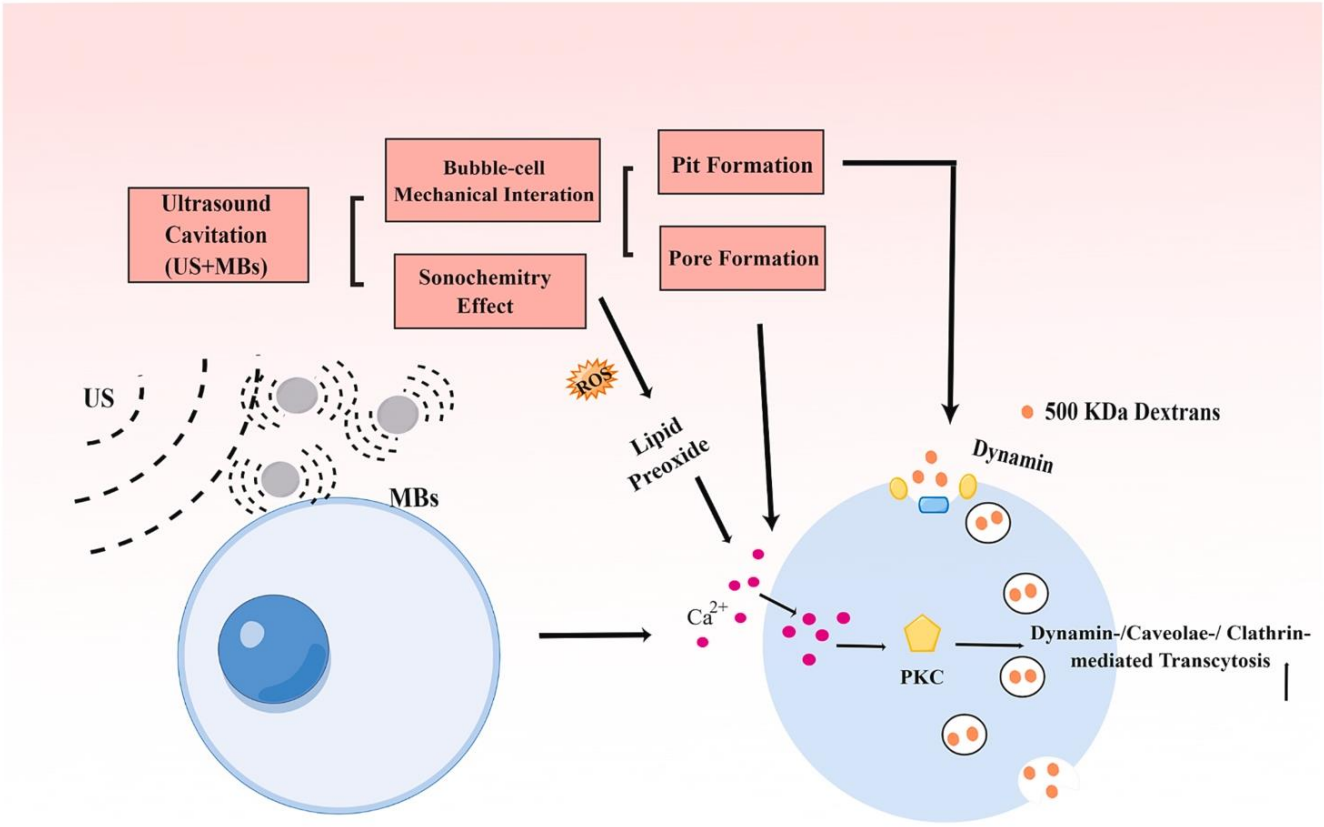
Besides, it has been reported that the acoustically-mediated mechanical forces can induce Ca^{2+} influx through the formation of membrane pores [19] and the activation of mechanosensitive channels (MSCs) [25]. However, in our study, we did not observe a significant difference in the transcytosis experiment when using several inhibitors of MSCs. This could potentially be attributed to the varying expression levels of MSC proteins in endothelial cell lines, including within the same cell line (hCMEC/D3) [26,27]. In a previous study, we reported the acoustically-mediated formation of membrane pores [18]. Interestingly, even in the presence of ROS scavenger (AA), the fluorescent signal of Ca^{2+} remained higher than in the control group. This suggests that both ROS generation and mechanical interaction between cells and MBs contribute to an increased ratio of pore formation and Ca^{2+} influx.

Ca^{2+} have been identified as a key factor in both endocytosis [19,28] and exocytosis [29,30] processes. The transcytosis process, including clathrin- and caveolae-mediated transcytosis, facilitates the transport of macromolecules (nanodrugs, proteins, nanoparticles, *etc.*) [31,32] across endothelial cells. The transient membrane pores induced by US + MBs results in membrane hyperpolarization. This hyperpolarization can be attributed to an increase in outward potassium current amplitudes, which subsequently increases the driving force for calcium in the cytosol thus increasing cytosolic calcium concentration [23]. The cytosolic Ca^{2+} activates the Ca^{2+}-related proteins, such as PKC, initiating downstream phosphorylation/dephosphorylation events and then will facilitate special biological functions, including endocytosis [33].

Dynamin is an essential component of both clathrin-dependent and caveolar-dependent endocytosis, plays a role in the invagination of cell plasma membrane to form a budding vesicle [34,35]. Following the application of US + MBs, membrane pits appear as a result of the mechanical force exerted by the oscillating microbubbles, which seem to be the initial step of transcytosis. Furthermore, our data demonstrate that both clathrin-dependent and caveolar-dependent pathways are involved in the acoustically mediated transcytosis.

Our study does face however certain limitations. Our monocultured endothelial cell model, while informative, cannot fully replicate the multifaceted BBB. Disparities in cellular electrophysiology between our model and an intact endothelial layer are also acknowledged. Furthermore, we pinpoint the investigation of mechanical sensitivity channels on the endothelial membrane as critical to deepening our understanding of endothelial function, proposing this as a directive for future research work.

To summarize, when combined with US stimulation, microbubbles interact the cell plasma membrane of hCMEC/D3 monolayer, causing a direct membrane deformation. This interaction generates both mechanical and sonochemical effects. In this process, pit formation occurs and seems to be the crucial step of endocytosis or transcytosis processes. Afterwards, we propose that the membrane weakens, facilitating changes in cell electrophysiology, including hyperpolarization, and subsequently the influx of Ca^{2+}. The combined effects of US and MBs induces transcytosis of 500 kDa dextran via a dynamin-/caveolae-/clathrin- related pathway. Besides, the acoustically triggered Ca^{2+} influx assists in the transcytosis process partly through PKC pathway, rather than the CAMKII pathway (Scheme1).



Scheme 1. Cascade of events that lead to an enhanced transport of molecules across the BBB: In Vitro Acoustically-mediated Membrane Deformation Increases Permeability of Macromolecular Substance in Blood-Brain Barrier Opening (BBBO).

5. Conclusion

In this study, we investigated the potential role of mechanical interactions between microbubbles and cells, facilitated by the application of ultrasound in promoting the enhanced extravasation of large molecules across the BBB. Our aim was to provide insights into the mechanisms underlying the increased transcytosis observed during the use of US + MBs. Our results demonstrate that the mechanical interaction between oscillating microbubbles and cell membrane plays a pivotal role in the dynamin-/caveolae-/clathrin- related transcytosis. Additionally, the enhanced transcytosis pathway mediated by US + MBs relies on calcium ion influx in relation with the PKC pathway. Overall, this study provides valuable insights into the potential mechanisms for macromolecular substance permeability across the BBB via acoustic bubble-cell interactions.

CRediT authorship contribution statement

Jifan Chen: Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Methodology, Writing – original draft. **Jean-Michel Escoffre:** Data curation, Formal analysis, Methodology, Writing – review & editing. **Oliver Romito:** Formal analysis, Methodology, Writing – original draft. **Tarik Iazourene:** Investigation, Methodology, Writing – original draft. **Antoine Presset:** Methodology, Writing – original draft. **Marie Roy:** Methodology, Writing – original draft. **Marie Potier Cartereau:** Methodology, Writing – original draft. **Christophe Vandier:** Formal analysis, Investigation, Methodology, Writing – original draft. **Yahua Wang:** Investigation, Methodology, Writing – original draft. **Guowei Wang:** Investigation, Methodology, Writing – original draft. **Pintong Huang:** Conceptualization, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Supervision, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Ayache Bouakaz:** Conceptualization, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Supervision, Validation, Writing – original draft, Writing – review & editing.

Declaration of competing interest

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

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgements

Funding: This work was supported by National Natural Science Foundation of China (No. 82030048, 82230069) (PH), China Scholarship Council (CSC, No. 202106320283) (JC), China Postdoctoral Science Foundation (No.2023M743114) (JC), Binjiang Institute of Zhejiang Univeristy (NO. ZY202205SMKY001) (PH) as well as from Inserm UMR 1253, iBrain, Université de Tours, Inserm, Tours, France (AB) and PHC Sakura (JME).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2024.106768.

References

[1] N.J. Abbott, A.A. Patabendige, D.E. Dolman, S.R. Yusof, D.J. Begley, Structure and function of the blood-brain barrier, Neurobiol. Dis. 37 (2010) 13–25.
[2] B. Obermeier, R. Daneman, R.M. Ransohoff, Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier, Nat. Med. 19 (2013) 1584–1596.
[3] B.J. Andreone, B.W. Chow, A. Tata, B. Lacoste, A. Ben-Zvi, K. Bullock, A.A. Deik, D. D. Ginty, C.B. Clish, C. Gu, Blood-Brain Barrier Permeability Is Regulated by Lipid Transport-Dependent Suppression of Caveolae-Mediated Transcytosis, Neuron 94 (2017) 581–594.e585.
[4] S. Wang, M.E. Karakatsani, C. Fung, T. Sun, C. Acosta, E. Konofagou, Direct brain infusion can be enhanced with focused ultrasound and microbubbles, J. Cereb. Blood Flow Metab. 37 (2017) 706–714.
[5] A.M. Mehta, A.M. Sonabend, J.N. Bruce, Convection-Enhanced Delivery, Neurotherapeutics 14 (2017) 358–371.
[6] D.T. Wiley, P. Webster, A. Gale, M.E. Davis, Transcytosis and brain uptake of transferrin-containing nanoparticles by tuning avidity to transferrin receptor, PNAS 110 (2013) 8662–8667.
[7] G. Morad, C.V. Carman, E.J. Hagedorn, J.R. Perlin, L.I. Zon, N. Mustafaoglu, T. E. Park, D.E. Ingber, C.C. Daisy, M.A. Moses, Tumor-Derived Extracellular Vesicles Breach the Intact Blood-Brain Barrier via Transcytosis, ACS Nano 13 (2019) 13853–13865.
[8] J. Lichota, T. Skjørringe, L.B. Thomsen, T. Moos, Macromolecular drug transport into the brain using targeted therapy, J. Neurochem. 113 (2010) 1–13.
[9] A. Ben-Zvi, B. Lacoste, E. Kur, B.J. Andreone, Y. Mayshar, H. Yan, C. Gu, Mfsd2a is critical for the formation and function of the blood-brain barrier, Nature 509 (2014) 507–511.
[10] C. Zhao, J. Ma, Z. Wang, H. Li, H. Shen, X. Li, G. Chen, Mfsd2a Attenuates Blood-Brain Barrier Disruption After Sub-arachnoid Hemorrhage by Inhibiting Caveolae-Mediated Transcellular Transport in Rats, Transl. Stroke Res. 11 (2020) 1012–1027.
[11] M. Zhou, S.X. Shi, N. Liu, Y. Jiang, M.S. Karim, S.J. Vodovoz, X. Wang, B. Zhang, A. S. Dumont, Caveolae-Mediated Endothelial Transcytosis across the Blood-Brain Barrier in Acute Ischemic Stroke, J. Clin. Med. 10 (2021).
[12] Y. Yang, Q. Li, X. Guo, J. Tu, D. Zhang, Mechanisms underlying sonoporation: Interaction between microbubbles and cells, Ultrason. Sonochem. 67 (2020) 105096.
[13] W.H. Liao, M.Y. Hsiao, Y. Kung, H.L. Liu, J.C. Béra, C. Inserra, W.S. Chen, TRPV4 promotes acoustic wave-mediated BBB opening via Ca(2+)/PKC-δ pathway, J. Adv. Res. 26 (2020) 15–28.
[14] C. Gasca-Salas, B. Fernández-Rodríguez, J.A. Pineda-Pardo, R. Rodríguez-Rojas, I. Obeso, F. Hernández-Fernández, M. Del Álamo, D. Mata, P. Guida, C. Ordás-Bandera, J.I. Montero-Roblas, R. Martínez-Fernández, G. Foffani, I. Rachmilevitch, J.A. Obeso, Blood-brain barrier opening with focused ultrasound in Parkinson's disease dementia, Nat. Commun. 12 (2021) 779.
[15] C.Y. Lin, H.Y. Hsieh, C.M. Chen, S.R. Wu, C.H. Tsai, C.Y. Huang, M.Y. Hua, K. C. Wei, C.K. Yeh, H.L. Liu, Non-invasive, neuron-specific gene therapy by focused ultrasound-induced blood-brain barrier opening in Parkinson's disease mouse model, J. Control. Release 235 (2016) 72–81.
[16] R. Pandit, W.K. Koh, R.K.P. Sullivan, T. Palliyaguru, R.G. Parton, J. Götz, Role for caveolin-mediated transcytosis in facilitating transport of large cargoes into the brain via ultrasound, J. Control. Release 327 (2020) 667–675.
[17] J. Deng, Q. Huang, F. Wang, Y. Liu, Z. Wang, Z. Wang, Q. Zhang, B. Lei, Y. Cheng, The role of caveolin-1 in blood-brain barrier disruption induced by focused ultrasound combined with microbubbles, J. Mol. Neurosci. 46 (2012) 677–687.
[18] A. Zeghimi, J.M. Escoffre, A. Bouakaz, Role of endocytosis in sonoporation-mediated membrane permeabilization and uptake of small molecules: a electron microscopy study, Phys. Biol. 12 (2015) 066007.
[19] B.D. Meijering, L.J. Juffermans, A. van Wamel, R.H. Henning, I.S. Zuhorn, M. Emmer, A.M. Versteilen, W.J. Paulus, W.H. van Gilst, K. Kooiman, N. de Jong, R.J. Musters, L.E. Deelman, O. Kamp, Ultrasound and microbubble-targeted delivery of macromolecules is regulated by induction of endocytosis and pore formation, Circ. Res. 104 (2009) 679–687.
[20] M.S. Karthikesh, X. Yang, The effect of ultrasound cavitation on endothelial cells, Exp. Biol. Med. (Maywood) 246 (2021) 758–770.
[21] K. Kooiman, A.F. van der Steen, N. de Jong, Role of intracellular calcium and reactive oxygen species in microbubble-mediated alterations of endothelial layer permeability, IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control 60 (2013) 1811–1815.
[22] J.M. Escoffre, P. Campomanes, M. Tarek, A. Bouakaz, New insights on the role of ROS in the mechanisms of sonoporation-mediated gene delivery, Ultrason. Sonochem. 64 (2020) 104998.
[23] T.A. Tran, J.Y. Le Guennec, P. Bougnoux, F. Tranquart, A. Bouakaz, Characterization of cell membrane response to ultrasound activated microbubbles, IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control 55 (2008) 43–49.
[24] V. Coelho-Santos, R. Socodato, C. Portugal, R.A. Leitão, M. Rito, M. Barbosa, P. O. Couraud, I.A. Romero, B. Weksler, R.D. Minshall, C. Fontes-Ribeiro, T. Summavielle, J.B. Relvas, A.P. Silva, Methylphenidate-triggered ROS generation promotes caveolae-mediated transcytosis via Rac1 signaling and c-Src-dependent caveolin-1 phosphorylation in human brain endothelial cells, Cell. Mol. Life Sci. 73 (2016) 4701–4716.
[25] Y. Song, J. Chen, C. Zhang, L. Xin, Q. Li, Y. Liu, C. Zhang, S. Li, P. Huang, Mechanosensitive Channel Piezo1 Induces Cell Apoptosis in Pancreatic Cancer by Ultrasound with Microbubbles. 25 (iScience 2022,) 103733.
[26] K.R. Kalari, K.J. Thompson, A.A. Nair, X. Tang, M.A. Bockol, N. Jhawar, S. K. Swaminathan, V.J. Lowe, K.K. Kandimalla, BBBomics-Human Blood Brain Barrier Transcriptomics Hub, Front. Neurosci. 10 (2016) 71.
[27] M.A. Lopez-Ramirez, D.K. Male, C. Wang, B. Sharrack, D. Wu, I.A. Romero, Cytokine-induced changes in the gene expression profile of a human cerebral microvascular endothelial cell-line, hCMEC/D3, Fluids Barriers CNS 10 (2013) 27.
[28] M.S. Schappe, K. Szteyn, M.E. Stremska, S.K. Mendu, T.K. Downs, P.V. Seegren, M. A. Mahoney, S. Dixit, J.K. Krupa, E.J. Stipes, J.S. Rogers, S.E. Adamson,

N. Leitinger, B.N. Desai, Chanzyme TRPM7 Mediates the Ca(2+) Influx Essential for Lipopolysaccharide-Induced Toll-Like Receptor 4 Endocytosis and Macrophage Activation, Immunity 48 (2018) 59–74.e55.
[29] M. Kreft, M. Potokar, M. Stenovec, T. Pangrsic, R. Zorec, Regulated exocytosis and vesicle trafficking in astrocytes, Ann. N. Y. Acad. Sci. 1152 (2009) 30–42.
[30] P. Stokłosa, S. Kappel, C. Peinelt, A Novel Role of the TRPM4 Ion Channel in Exocytosis, Cells 11 (2022) 1793.
[31] Y. Zheng, J. Wu, W. Shan, L. Wu, R. Zhou, M. Liu, Y. Cui, M. Zhou, Z. Zhang, Y. Huang, Multifunctional Nanoparticles Enable Efficient Oral Delivery of Biomacromolecules via Improving Payload Stability and Regulating the Transcytosis Pathway, ACS Appl. Mater. Interfaces 10 (2018) 34039–34049.
[32] S. Ayloo, C. Gu, Transcytosis at the blood–brain barrier, Curr. Opin. Neurobiol. 57 (2019) 32–38.
[33] M.N. Bao, L.J. Zhang, B. Tang, D.D. Fu, J. Li, L. Du, Y.N. Hou, Z.L. Zhang, H. W. Tang, D.W. Pang, Influenza A Viruses Enter Host Cells via Extracellular Ca(2+) Influx-Involved Clathrin-Mediated Endocytosis, ACS Appl Bio Mater 4 (2021) 2044–2051.
[34] B.S. Joshi, I.S. Zuhorn, Heparan sulfate proteoglycan-mediated dynamin-dependent transport of neural stem cell exosomes in an in vitro blood-brain barrier model, Eur. J. Neurosci. 53 (2021) 706–719.
[35] P.M. Azizi, R.E. Zyla, S. Guan, C. Wang, J. Liu, S.S. Bolz, B. Heit, A. Klip, W.L. Lee, Clathrin-dependent entry and vesicle-mediated exocytosis define insulin transcytosis across microvascular endothelial cells, Mol. Biol. Cell 26 (2015) 740–750.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Abdolahi, S., Ghazvinian, Z., Muhammadnejad, S., Saleh, M., Asadzadeh Aghdaei, H., Baghaei, K., 2022. Patient-derived xenograft (PDX) models, applications and challenges in cancer research. Journal of Translational Medicine 20, 206. https://doi.org/10.1186/s12967-022-03405-8

Ahmed, R., Ye, J., Gerber, S.A., Linehan, D.C., Doyley, M.M., 2020. Preclinical Imaging Using Single Track Location Shear Wave Elastography: Monitoring the Progression of Murine Pancreatic Tumor Liver Metastasis In Vivo. IEEE Trans Med Imaging 39, 2426–2439. https://doi.org/10.1109/TMI.2020.2971422

Akhurst, T., Kates, T.J., Mazumdar, M., Yeung, H., Riedel, E.R., Burt, B.M., Blumgart, L., Jarnagin, W., Larson, S.M., Fong, Y., 2005. Recent Chemotherapy Reduces the Sensitivity of [18F]Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography in the Detection of Colorectal Metastases. JCO 23, 8713–8716. https://doi.org/10.1200/JCO.2005.04.4222

Ali, M.K., Liu, Q., Liang, K., Li, P., Kong, Q., 2020. Bacteria-derived minicells for cancer therapy. Cancer Lett 491, 11–21. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.07.024

Appis, A.W., Tracy, M.J., Feinstein, S.B., 2015. Update on the safety and efficacy of commercial ultrasound contrast agents in cardiac applications. Echo Res Pract 2, R55-62. https://doi.org/10.1530/ERP-15-0018

Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Secretan, B., El Ghissassi, F., Bouvard, V., Altieri, A., Cogliano, V., 2007. Carcinogenicity of alcoholic beverages. The Lancet Oncology 8, 292–293. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(07)70099-2

Bae, K.B., Kim, S.-H., Kang, M.S., Kim, D.-H., 2020. An Animal Model of Colorectal Cancer Liver Metastasis With a High Metastasis Rate and Clonal Dynamics. Anticancer Research 40, 3297–3306. https://doi.org/10.21873/anticanres.14312

Bahrami, B., Hojjat-Farsangi, M., Mohammadi, H., Anvari, E., Ghalamfarsa, G., Yousefi, M., Jadidi-Niaragh, F., 2017. Nanoparticles and targeted drug delivery in cancer therapy. Immunology Letters 190, 64–83. https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.07.015

Barenholz, Y., 2012. Doxil®--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. J Control Release 160, 117–134. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.03.020

Baud, J.M., Luong, S., Rouyer, O., Maurizot, A., Gautier, C., 2017. Apport de l'échographie de contraste dans la caractérisation des lésions carotidiennes. JMV-Journal de Médecine Vasculaire 42, 301–314. https://doi.org/10.1016/j.jdmv.2017.06.003

Baumgaertner, I., Ratziu, V., Vaillant, J.-C., Hannoun, L., Poynard, T., André, T., 2010. Toxicité hépatique de la chimiothérapie du cancer colorectal métastatique : revue de la littérature. Bulletin du Cancer 97, 559–569. https://doi.org/10.1684/bdc.2010.1049

Bazan-Peregrino, M., Rifai, B., Carlisle, R.C., Choi, J., Arvanitis, C.D., Seymour, L.W., Coussios, C.C., 2013. Cavitation-enhanced delivery of a replicating oncolytic adenovirus to tumors using focused ultrasound. J Control Release 169, 40–47. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.03.017

Bertotti, A., Migliardi, G., Galimi, F., Sassi, F., Torti, D., Isella, C., Corà, D., Di Nicolantonio, F., Buscarino, M., Petti, C., Ribero, D., Russolillo, N., Muratore, A., Massucco, P., Pisacane, A., Molinaro, L., Valtorta, E., Sartore-Bianchi, A., Risio, M., Capussotti, L.,

Gambacorta, M., Siena, S., Medico, E., Sapino, A., Marsoni, S., Comoglio, P.M., Bardelli, A., Trusolino, L., 2011. A Molecularly Annotated Platform of Patient-Derived Xenografts ("Xenopatients") Identifies HER2 as an Effective Therapeutic Target in Cetuximab-Resistant Colorectal Cancer. Cancer Discovery 1, 508–523. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-11-0109

Bingham, S.A., Day, N.E., Luben, R., Ferrari, P., Slimani, N., Norat, T., Clavel-Chapelon, F., Kesse, E., Nieters, A., Boeing, H., Tjønneland, A., Overvad, K., Martinez, C., Dorronsoro, M., Gonzalez, C.A., Key, T.J., Trichopoulou, A., Naska, A., Vineis, P., Tumino, R., Krogh, V., Bueno-de-Mesquita, H.B., Peeters, P.H.M., Berglund, G., Hallmans, G., Lund, E., Skeie, G., Kaaks, R., Riboli, E., European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition, 2003. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. Lancet 361, 1496–1501. https://doi.org/10.1016/s0140-6736(03)13174-1

Biondi, A., Basile, F., Vacante, M., 2021. Familial adenomatous polyposis and changes in the gut microbiota: New insights into colorectal cancer carcinogenesis. World Journal of Gastrointestinal Oncology 13, 495–508. https://doi.org/10.4251/wjgo.v13.i6.495

Bismuth, H., Adam, R., Vibert, E., 2007. L'apport de la chimiothérapie dans le traitement des métastases hépatiques colo-rectales. Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine 191, 1647–1660. https://doi.org/10.1016/S0001-4079(19)32918-8

Boll, H., Nittka, S., Doyon, F., Neumaier, M., Marx, A., Kramer, M., Groden, C., Brockmann, M.A., 2011. Micro-CT Based Experimental Liver Imaging Using a Nanoparticulate Contrast Agent: A Longitudinal Study in Mice. PLOS ONE 6, e25692. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025692

Bouchalova, P., Bouchal, P., 2022. Current methods for studying metastatic potential of tumor cells. Cancer Cell Int 22, 394. https://doi.org/10.1186/s12935-022-02801-w

Bourn, M.D., Batchelor, D.V.B., Ingram, N., McLaughlan, J.R., Coletta, P.L., Evans, S.D., Peyman, S.A., 2020. High-throughput microfluidics for evaluating microbubble enhanced delivery of cancer therapeutics in spheroid cultures. J Control Release 326, 13–24. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.06.011

Bouvard, V., Loomis, D., Guyton, K.Z., Grosse, Y., Ghissassi, F.E., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Mattock, H., Straif, K., International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group, 2015. Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. Lancet Oncol 16, 1599–1600. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00444-1

Bouvet, M., Tsuji, K., Yang, M., Jiang, P., Moossa, A.R., Hoffman, R.M., 2006. In vivo Color-Coded Imaging of the Interaction of Colon Cancer Cells and Splenocytes in the Formation of Liver Metastases. Cancer Research 66, 11293–11297. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2662

Bressand, D., Novell, A., Girault, A., Raoul, W., Fromont-Hankard, G., Escoffre, J.-M., Lecomte, T., Bouakaz, A., 2019. Enhancing Nab-Paclitaxel Delivery Using Microbubble-Assisted Ultrasound in a Pancreatic Cancer Model. Mol Pharm 16, 3814–3822. https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.9b00416

Briolay, T., Petithomme, T., Fouet, M., Nguyen-Pham, N., Blanquart, C., Boisgerault, N., 2021. Delivery of cancer therapies by synthetic and bio-inspired nanovectors. Molecular Cancer 20, 55. https://doi.org/10.1186/s12943-021-01346-2

Brown, K.M., Xue, A., Julovi, S.M., Gill, A.J., Pavlakis, N., Samra, J.S., Smith, R.C., Hugh, T.J., 2018. Using patient-derived xenograft models of colorectal liver metastases to predict chemosensitivity. Journal of Surgical Research 227, 158–167. https://doi.org/10.1016/j.jss.2018.02.018

Brown, K.M., Xue, A., Mittal, A., Samra, J.S., Smith, R., Hugh, T.J., 2016. Patient-derived xenograft models of colorectal cancer in pre-clinical research: a systematic review. Oncotarget 7, 66212–66225. https://doi.org/10.18632/oncotarget.11184

Bürtin, F., Mullins, C.S., Linnebacher, M., 2020. Mouse models of colorectal cancer: Past, present and future perspectives. World Journal of Gastroenterology 26, 1394–1426. https://doi.org/10.3748/wjg.v26.i13.1394

Bush, N., Healey, A., Shah, A., Box, G., Kirkin, V., Kotopoulis, S., Kvåle, S., Sontum, P.C., Bamber, J., 2019. Therapeutic Dose Response of Acoustic Cluster Therapy in Combination With Irinotecan for the Treatment of Human Colon Cancer in Mice. Front Pharmacol 10, 1299. https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01299

Cacheux, W., Le Tourneau, C., Baranger, B., Mignot, L., Mariani, P., 2011. Thérapies ciblées dans le traitement des cancers colorectaux métastatiques : place actuelle. Journal de Chirurgie Viscérale 148, 12–19. https://doi.org/10.1016/j.jchirv.2010.12.007

Carpentier, A., Canney, M., Vignot, A., Reina, V., Beccaria, K., Horodyckid, C., Karachi, C., Leclercq, D., Lafon, C., Chapelon, J.-Y., Capelle, L., Cornu, P., Sanson, M., Hoang-Xuan, K., Delattre, J.-Y., Idbaih, A., 2016. Clinical trial of blood-brain barrier disruption by pulsed ultrasound. Science Translational Medicine 8, 343re2-343re2. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf6086

Caster, J.M., Patel, A.N., Zhang, T., Wang, A., 2017. Investigational nanomedicines in 2016: a review of nanotherapeutics currently undergoing clinical trials. WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology 9, e1416. https://doi.org/10.1002/wnan.1416

Cendre, R., 2021. Classification par méthodes d'apprentissage supervisé et faiblement superviséd'images multimodales pour l'aide au diagnostic du lentigo malin en dermatologie.

Céspedes, M.V., Casanova, I., Parreño, M., Mangues, R., 2006. Mouse models in oncogenesis and cancer therapy. Clin Transl Oncol 8, 318–329. https://doi.org/10.1007/s12094-006-0177-7

Chakravarty, P., Qian, W., El-Sayed, M.A., Prausnitz, M.R., 2010. Delivery of molecules into cells using carbon nanoparticles activated by femtosecond laser pulses. Nature Nanotech 5, 607–611. https://doi.org/10.1038/nnano.2010.126

Chang, Q., Ornatsky, O.I., Siddiqui, I., Straus, R., Baranov, V.I., Hedley, D.W., 2016. Biodistribution of cisplatin revealed by imaging mass cytometry identifies extensive collagen binding in tumor and normal tissues. Sci Rep 6, 36641. https://doi.org/10.1038/srep36641

Charalambous, A., Mico, V., McVeigh, L.E., Marston, G., Ingram, N., Volpato, M., Peyman, S.A., McLaughlan, J.R., Wierzbicki, A., Loadman, P.M., Bushby, R.J., Markham, A.F., Evans, S.D., Coletta, P.L., 2021. Targeted microbubbles carrying lipid-oil-nanodroplets

for ultrasound-triggered delivery of the hydrophobic drug, combretastatin A4. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine 36, 102401. https://doi.org/10.1016/j.nano.2021.102401

Chauhan, V.P., Boucher, Y., Ferrone, C.R., Roberge, S., Martin, J.D., Stylianopoulos, T., Bardeesy, N., DePinho, R.A., Padera, T.P., Munn, L.L., Jain, R.K., 2014. Compression of pancreatic tumor blood vessels by hyaluronan is caused by solid stress and not interstitial fluid pressure. Cancer Cell 26, 14–15. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.06.003

Chen, M., Liang, X., Gao, C., Zhao, R., Zhang, N., Wang, S., Chen, W., Zhao, B., Wang, J., Dai, Z., 2018. Ultrasound Triggered Conversion of Porphyrin/Camptothecin-Fluoroxyuridine Triad Microbubbles into Nanoparticles Overcomes Multidrug Resistance in Colorectal Cancer. ACS Nano 12, 7312–7326. https://doi.org/10.1021/acsnano.8b03674

Cho, Y.B., Hong, H.K., Choi, Y.-L., Oh, E., Joo, K.M., Jin, J., Nam, D.-H., Ko, Y.-H., Lee, W.Y., 2014. Colorectal cancer patient–derived xenografted tumors maintain characteristic features of the original tumors. Journal of Surgical Research 187, 502–509. https://doi.org/10.1016/j.jss.2013.11.010

Choi, J.J., Carlisle, R.C., Coviello, C., Seymour, L., Coussios, C.-C., 2014. Non-invasive and real-time passive acoustic mapping of ultrasound-mediated drug delivery. Phys Med Biol 59, 4861–4877. https://doi.org/10.1088/0031-9155/59/17/4861

Clarke, W.T., Feuerstein, J.D., 2019. Colorectal cancer surveillance in inflammatory bowel disease: Practice guidelines and recent developments. World Journal of Gastroenterology 25, 4148–4157. https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i30.4148

Cui, Z., Tang, J., Chen, J., Wang, Z., 2014. Hsa-miR-574-5p negatively regulates MACC-1 expression to suppress colorectal cancer liver metastasis. Cancer Cell Int 14, 47. https://doi.org/10.1186/1475-2867-14-47

de Caro, A., Talmont, F., Rols, M.-P., Golzio, M., Kolosnjaj-Tabi, J., 2024. Therapeutic perspectives of high pulse repetition rate electroporation. Bioelectrochemistry 156, 108629. https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2023.108629

de Jong, G.M., Aarts, F., Hendriks, T., Boerman, O.C., Bleichrodt, R.P., 2009. Animal Models for Liver Metastases of Colorectal Cancer: Research Review of Preclinical Studies in Rodents. Journal of Surgical Research 154, 167–176. https://doi.org/10.1016/j.jss.2008.03.038

Derieppe, M., Rojek, K., Escoffre, J.-M., de Senneville, B.D., Moonen, C., Bos, C., 2015. Recruitment of endocytosis in sonopermeabilization-mediated drug delivery: a real-time study. Phys Biol 12, 046010. https://doi.org/10.1088/1478-3975/12/4/046010

Deroose, C.M., De, A., Loening, A.M., Chow, P.L., Ray, P., Chatziioannou, A.F., Gambhir, S.S., 2007. Multimodality Imaging of Tumor Xenografts and Metastases in Mice with Combined Small-Animal PET, Small-Animal CT, and Bioluminescence Imaging. J Nucl Med 48, 295–303.

Dewhirst, M.W., Secomb, T.W., 2017. Transport of drugs from blood vessels to tumour tissue. Nat Rev Cancer 17, 738–750. https://doi.org/10.1038/nrc.2017.93

Dhuri, K., Gharat, S., Fernandes, N., Basudkar, V., Doshi, G., Momin, M., 2024. Viral therapy for targeted drug delivery to cancers: Recent advances, clinical and regulatory

perspectives. Journal of Drug Delivery Science and Technology 92, 105365. https://doi.org/10.1016/j.jddst.2024.105365

Doinikov, A.A., Bouakaz, A., 2010. Acoustic microstreaming around an encapsulated particle. J Acoust Soc Am 127, 1218–1227. https://doi.org/10.1121/1.3290997

Dupré, A., Gagnière, J., Chen, Y., Rivoire, M., 2013. Prise en charge des métastases hépatiques synchrones d'origine colorectale. Bulletin du Cancer 100, 363–371. https://doi.org/10.1684/bdc.2013.1727

e-cancer, 2021. Cancers Du Côlon : Comment Est Établi Le Diagnostic ? [WWW Document]. URL https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-colon/Le-diagnostic (accessed 7.18.24).

Elyas, E., Papaevangelou, E., Alles, E.J., Erler, J.T., Cox, T.R., Robinson, S.P., Bamber, J.C., 2017. Correlation of Ultrasound Shear Wave Elastography with Pathological Analysis in a Xenografic Tumour Model. Sci Rep 7, 165. https://doi.org/10.1038/s41598-017-00144-5

Escoffre, J.-M., Novell, A., Serrière, S., Lecomte, T., Bouakaz, A., 2013. Irinotecan delivery by microbubble-assisted ultrasound: in vitro validation and a pilot preclinical study. Mol Pharm 10, 2667–2675. https://doi.org/10.1021/mp400081b

Esenaliev, R.O., Larina, I.V., Larin, K.V., Motamedi, M., Evers, B.M., 2000. Mechanism of laser-induced drug delivery in tumors 3914, 188–196. https://doi.org/10.1117/12.388045

Faure, S., 2017. Anti-cancéreux cytotoxiques [WWW Document]. URL https://moodle.univ-angers.fr/pluginfile.php/639406/mod_resource/content/2/co/module_cytotoxiques_12.html (accessed 8.19.24).

Ferjaoui, Z., Jamal Al Dine, E., Kulmukhamedova, A., Bezdetnaya, L., Soon Chang, C., Schneider, R., Mutelet, F., Mertz, D., Begin-Colin, S., Quilès, F., Gaffet, E., Alem, H., 2019. Doxorubicin-Loaded Thermoresponsive Superparamagnetic Nanocarriers for Controlled Drug Delivery and Magnetic Hyperthermia Applications. ACS Appl. Mater. Interfaces 11, 30610–30620. https://doi.org/10.1021/acsami.9b10444

Fernández Moro, C., Bozóky, B., Geyer, N., Engstrand, J., Dirix, L., Vermeulen, P., Gerling, M., 2023. What's in a name? Refining the nomenclature of liver metastases growth patterns by changing "desmoplastic" to "encapsulated." BJC Rep 1, 1–2. https://doi.org/10.1038/s44276-023-00018-6

Fleten, K.G., Bakke, K.M., Mælandsmo, G.M., Abildgaard, A., Redalen, K.R., Flatmark, K., 2017. Use of non-invasive imaging to monitor response to aflibercept treatment in murine models of colorectal cancer liver metastases. Clin Exp Metastasis 34, 51–62. https://doi.org/10.1007/s10585-016-9829-3

Forsberg, F., Piccoli, C.W., Merton, D.A., Palazzo, J.J., Hall, A.L., 2007. Breast lesions: imaging with contrast-enhanced subharmonic US--initial experience. Radiology 244, 718–726. https://doi.org/10.1148/radiol.2443061588

Foster, S., Theodoropoulos, C., 2011. Ultrasound, in: Kiessling, F., Pichler, B.J. (Eds.), Small Animal Imaging: Basics and Practical Guide. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 207–217. https://doi.org/10.1007/978-3-642-12945-2_15

Foubert, F., Gouard, S., Saï-Maurel, C., Chérel, M., Faivre-Chauvet, A., Goldenberg, D.M., Barbet, J., Bailly, C., Bodet-Milin, C., Carlier, T., Kraeber-Bodéré, F., Touchefeu, Y.,

Frampas, E., 2018. Sensitivity of pretargeted immunoPET using 68Ga-peptide to detect colonic carcinoma liver metastases in a murine xenograft model: Comparison with 18FDG PET-CT. Oncotarget 9, 27502–27513. https://doi.org/10.18632/oncotarget.25514

Frangioni, J.V., 2003. *In vivo* near-infrared fluorescence imaging. Current Opinion in Chemical Biology 7, 626–634. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2003.08.007

Fröhlich, E., Muller, R., Cui, X.-W., Schreiber-Dietrich, D., Dietrich, C.F., 2015. Dynamic Contrast-Enhanced Ultrasound for Quantification of Tissue Perfusion. Journal of Ultrasound in Medicine 34, 179–196. https://doi.org/10.7863/ultra.34.2.179

Fujii, M., Shimokawa, M., Date, S., Takano, A., Matano, M., Nanki, K., Ohta, Y., Toshimitsu, K., Nakazato, Y., Kawasaki, K., Uraoka, T., Watanabe, T., Kanai, T., Sato, T., 2016. A Colorectal Tumor Organoid Library Demonstrates Progressive Loss of Niche Factor Requirements during Tumorigenesis. Cell Stem Cell 18, 827–838. https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.04.003

Gabizon, A., Shmeeda, H., Barenholz, Y., 2003. Pharmacokinetics of pegylated liposomal Doxorubicin: review of animal and human studies. Clin Pharmacokinet 42, 419–436. https://doi.org/10.2165/00003088-200342050-00002

Gao, J., Logan, K.A., Nesbitt, H., Callan, B., McKaig, T., Taylor, M., Love, M., McHale, A.P., Griffith, D.M., Callan, J.F., 2021. A single microbubble formulation carrying 5-fluorouridine, Irinotecan and oxaliplatin to enable FOLFIRINOX treatment of pancreatic and colon cancer using ultrasound targeted microbubble destruction. J Control Release 338, 358–366. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.08.050

García Vicente, A.M., Domínguez Ferreras, E., Sánchez Pérez, V., Poblete García, V.M., Villa Guzmán, J.C., Jiménez Aragón, F., Pineda Pineda, M.D., Molino Trinidad, C., Soriano Castrejón, Á., 2013. Response assessment of colorectal liver metastases with contrast enhanced CT/18F-FDG PET. Eur J Radiol 82, e255-261. https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2012.12.029

García-Pinel, B., Porras-Alcalá, C., Ortega-Rodríguez, A., Sarabia, F., Prados, J., Melguizo, C., López-Romero, J.M., 2019. Lipid-Based Nanoparticles: Application and Recent Advances in Cancer Treatment. Nanomaterials 9, 638. https://doi.org/10.3390/nano9040638

Gehl, J., 2003. Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. Acta Physiologica Scandinavica 177, 437–447. https://doi.org/10.1046/j.1365-201X.2003.01093.x

Gérard, J.-P., André, T., Bibeau, F., Conroy, T., Legoux, J.-L., Portier, G., Bosset, J.-F., Cadiot, G., Bouché, O., Bedenne, L., Société Française de Chirurgie Digestive (SFCD), Société Française d'Endoscopie Digestive (SFED0), Société Française de Radiothérapie Oncologique (SFRO), 2017. Rectal cancer: French Intergroup clinical practice guidelines for diagnosis, treatments and follow-up (SNFGE, FFCD, GERCOR, UNICANCER, SFCD, SFED, SFRO). Dig Liver Dis 49, 359–367. https://doi.org/10.1016/j.dld.2017.01.152

Giavazzi, R., Campbell, D.E., Jessup, J.M., Cleary, K., Fidler, I.J., 1986. Metastatic behavior of tumor cells isolated from primary and metastatic human colorectal carcinomas implanted into different sites in nude mice. Cancer Res 46, 1928–1933.

Glazer, E.S., Beaty, K., Abdalla, E.K., Vauthey, J.N., Curley, S.A., 2010. Effectiveness of positron emission tomography for predicting chemotherapy response in colorectal cancer liver metastases. Arch Surg 145, 340–345; discussion 345. https://doi.org/10.1001/archsurg.2010.41

Graham, K.C., Wirtzfeld, L.A., MacKenzie, L.T., Postenka, C.O., Groom, A.C., MacDonald, I.C., Fenster, A., Lacefield, J.C., Chambers, A.F., 2005. Three-dimensional High-Frequency Ultrasound Imaging for Longitudinal Evaluation of Liver Metastases in Preclinical Models. Cancer Research 65, 5231–5237. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0440

Graham, S.M., Carlisle, R., Choi, J.J., Stevenson, M., Shah, A.R., Myers, R.S., Fisher, K., Peregrino, M.-B., Seymour, L., Coussios, C.C., 2014. Inertial cavitation to non-invasively trigger and monitor intratumoral release of drug from intravenously delivered liposomes. Journal of Controlled Release 178, 101–107. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.12.016

Hackl, C., Man, S., Francia, G., Milsom, C., Xu, P., Kerbel, R.S., 2013. Metronomic oral topotecan prolongs survival and reduces liver metastasis in improved preclinical orthotopic and adjuvant therapy colon cancer models. Gut 62, 259–271. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-301585

Han, Z., Qiu, B., Li, L., Yu, J., Zhu, Z., 2023. Establishment of a Selective Liver Lobe Tumor-Bearing Mouse Model of Colorectal Cancer. Technol Cancer Res Treat 22, 15330338231198347. https://doi.org/10.1177/15330338231198347

Haram, M., Hansen, R., Bouget, D., Myhre, O.F., Davies, C. de L., Hofsli, E., 2023. Treatment of Liver Metastases With Focused Ultrasound and Microbubbles in Patients With Colorectal Cancer Receiving Chemotherapy. Ultrasound Med Biol 49, 2081–2088. https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2023.05.013

Hari, D.M., Leung, A.M., Lee, J.-H., Sim, M.-S., Vuong, B., Chiu, C.G., Bilchik, A.J., 2013. AJCC-7TH Edition Staging Criteria for Colon Cancer: Do the Complex Modifications Improve Prognostic Assessment? J Am Coll Surg 217, 181–190. https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2013.04.018

Hauser, A.K., Wydra, R.J., Stocke, N.A., Anderson, K.W., Hilt, J.Z., 2015. Magnetic Nanoparticles and Nanocomposites for Remote Controlled Therapies. J Control Release 219, 76–94. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.09.039

Hayashi, S., Mizuno, M., Yoshida, J., Nakao, A., 2009. Effect of sonoporation on cationic liposome-mediated IFNbeta gene therapy for metastatic hepatic tumors of murine colon cancer. Cancer Gene Ther 16, 638–643. https://doi.org/10.1038/cgt.2008.1

He, S., Singh, D., Helfield, B., 2022. An Overview of Cell Membrane Perforation and Resealing Mechanisms for Localized Drug Delivery. Pharmaceutics 14, 886. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14040886

Heijstek, M.W., Kranenburg, O., Borel Rinkes, I.H.M., 2005. Mouse Models of Colorectal Cancer and Liver Metastases. Digestive Surgery 22, 16–25. https://doi.org/10.1159/000085342

Henriquez, N.V., van Overveld, P.G.M., Que, I., Buijs, J.T., Bachelier, R., Kaijzel, E.L., Löwik, C.W.G.M., Clezardin, P., van der Pluijm, G., 2007. Advances in optical imaging and

novel model systems for cancer metastasis research. Clin Exp Metastasis 24, 699–705. https://doi.org/10.1007/s10585-007-9115-5

Hoffman, R.M., 2002. Green fluorescent protein imaging of tumour growth, metastasis, and angiogenesis in mouse models. The Lancet Oncology 3, 546–556. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(02)00848-3

Hoffmann, U., 2001. Handbook of Contrast Echocardiography. LV Function and Myocardial Perfusion, Edited by H. Becker, P.N. Burns, Springer-Verlag, 2000, pp. 184, price DM 98; ÖS 716, sFr 89.50, ISBN 3-540-67083-1. European Journal of Radiology 38, 164. https://doi.org/10.1016/S0720-048X(00)00295-3

Holtedahl, K., Borgquist, L., Donker, G.A., Buntinx, F., Weller, D., Campbell, C., Månsson, J., Hammersley, V., Braaten, T., Parajuli, R., 2021. Symptoms and signs of colorectal cancer, with differences between proximal and distal colon cancer: a prospective cohort study of diagnostic accuracy in primary care. BMC Fam Pract 22, 148. https://doi.org/10.1186/s12875-021-01452-6

Hu, Y., Liu, C., Muyldermans, S., 2017. Nanobody-Based Delivery Systems for Diagnosis and Targeted Tumor Therapy. Front Immunol 8, 1442. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01442

Hu, Y., Wei, J., Shen, Y., Chen, S., Chen, X., 2023. Barrier-breaking effects of ultrasonic cavitation for drug delivery and biomarker release. Ultrasonics Sonochemistry 94, 106346. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2023.106346

Huang, H.-C., Barua, S., Sharma, G., Dey, S.K., Rege, K., 2011. Inorganic nanoparticles for cancer imaging and therapy. Journal of Controlled Release 155, 344–357. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.06.004

Huang, J., Zhang, L., Zheng, J., Lin, Y., Leng, X., Wang, C., Li, P., Feng, L., 2023. Microbubbles-assisted ultrasonication to promote tumor accumulation of therapeutics and modulation of tumor microenvironment for enhanced cancer treatments. Biomaterials 299, 122181. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2023.122181

Hung, K.E., Maricevich, M.A., Richard, L.G., Chen, W.Y., Richardson, M.P., Kunin, A., Bronson, R.T., Mahmood, U., Kucherlapati, R., 2010. Development of a mouse model for sporadic and metastatic colon tumors and its use in assessing drug treatment. Proceedings of the National Academy of Sciences 107, 1565–1570. https://doi.org/10.1073/pnas.0908682107

Hyvelin, J.-M., Tardy, I., Arbogast, C., Costa, M., Emmel, P., Helbert, A., Theraulaz, M., Nunn, A.D., Tranquart, F., 2013. Use of ultrasound contrast agent microbubbles in preclinical research: recommendations for small animal imaging. Invest Radiol 48, 570–583. https://doi.org/10.1097/RLI.0b013e318289f854

Ignee, A., Atkinson, N.S.S., Schuessler, G., Dietrich, C.F., 2016. Ultrasound contrast agents. Endosc Ultrasound 5, 355–362. https://doi.org/10.4103/2303-9027.193594

Ingram, N., McVeigh, L.E., Abou-Saleh, R.H., Maynard, J., Peyman, S.A., McLaughlan, J.R., Fairclough, M., Marston, G., Valleley, E.M.A., Jimenez-Macias, J.L., Charalambous, A., Townley, W., Haddrick, M., Wierzbicki, A., Wright, A., Volpato, M., Simpson, P.B., Treanor, D.E., Thomson, N.H., Loadman, P.M., Bushby, R.J., Johnson, B.R.G., Jones, P.F., Evans, J.A., Freear, S., Markham, A.F., Evans, S.D., Coletta, P.L., 2020. Ultrasound-triggered therapeutic microbubbles enhance the efficacy of cytotoxic drugs

by increasing circulation and tumor drug accumulation and limiting bioavailability and toxicity in normal tissues. Theranostics 10, 10973–10992. https://doi.org/10.7150/thno.49670

Inoue, A., Deem, A.K., Kopetz, S., Heffernan, T.P., Draetta, G.F., Carugo, A., 2019. Current and Future Horizons of Patient-Derived Xenograft Models in Colorectal Cancer Translational Research. Cancers 11, 1321. https://doi.org/10.3390/cancers11091321

Jain, R.K., 2001. Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors1. Advanced Drug Delivery Reviews, Special issue dedicated to Dr. Eric Tomlinson, Advanced Drug Delivery Reviews, A Selection of the Most Highly Cited Articles, 1991-1998 46, 149–168. https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00131-9

Jain, R.K., 1994. Barriers to drug delivery in solid tumors. Sci Am 271, 58–65. https://doi.org/10.1038/scientificamerican0794-58

Jain, R.K., 1987. Transport of molecules in the tumor interstitium: a review. Cancer Res 47, 3039–3051.

Jain, R.K., Stylianopoulos, T., 2010. Delivering nanomedicine to solid tumors. Nat Rev Clin Oncol 7, 653–664. https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2010.139

Jakob, P., 2011. Small Animal Magnetic Resonance Imaging: Basic Principles, Instrumentation and Practical Issue, in: Kiessling, F., Pichler, B.J. (Eds.), Small Animal Imaging: Basics and Practical Guide. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 151–164. https://doi.org/10.1007/978-3-642-12945-2_12

Jian, M., Ren, L., He, G., Lin, Q., Tang, W., Chen, Y., Chen, J., Liu, T., Ji, M., Wei, Y., Chang, W., Xu, J., 2020. A novel patient-derived organoids-based xenografts model for preclinical drug response testing in patients with colorectal liver metastases. J Transl Med 18, 234. https://doi.org/10.1186/s12967-020-02407-8

Jiang, Hao, Guo, W., Huang, K., Jiang, Huijie, Zhang, R., Hu, H., Lin, X., Wang, S., 2021. Screening of radiotracer for diagnosis of colorectal cancer liver metastasis based on MACC1-SPON2. Abdom Radiol 46, 3227–3237. https://doi.org/10.1007/s00261-021-03015-w

Kalber, T.L., Waterton, J.C., Griffiths, J.R., Ryan, A.J., Robinson, S.P., 2008. Longitudinal in vivo susceptibility contrast MRI measurements of LS174T colorectal liver metastasis in nude mice. Journal of Magnetic Resonance Imaging 28, 1451–1458. https://doi.org/10.1002/jmri.21600

Kaneda, N., Nagata, H., Furuta, T., Yokokura, T., 1990. Metabolism and Pharmacokinetics of the Camptothecin Analogue CPT-11 in the Mouse. Cancer Research 50, 1715–1720.

Karimi, M., Ghasemi, A., Zangabad, P.S., Rahighi, R., Moosavi Basri, S.M., Mirshekari, H., Amiri, M., Pishabad, Z.S., Aslani, A., Bozorgomid, M., Ghosh, D., Beyzavi, A., Vaseghi, A., Aref, A.R., Haghani, L., Bahrami, S., Hamblin, M.R., 2016. Smart micro/nanoparticles in stimulus-responsive drug/gene delivery systems. Chem Soc Rev 45, 1457–1501. https://doi.org/10.1039/c5cs00798d

Kawai, K., Tamura, K., Sakata, I., Ishida, J., Nagata, M., Tsukada, H., Suemizu, H., Nakamura, M., Abe, Y., Chijiwa, T., 2013. A new in vivo model to analyze hepatic metastasis of the human colon cancer cell line HCT116 in NOD/Shi-scid/IL-2Rγnull (NOG) mice by 18F-FDG PET/CT. Oncology Reports 29, 464–468. https://doi.org/10.3892/or.2012.2141

Kerr, J., Anderson, C., Lippman, S.M., 2017. Physical activity, sedentary behaviour, diet, and cancer: an update and emerging new evidence. Lancet Oncol 18, e457–e471. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30411-4

Khalil, A.A., Jameson, M.J., Broaddus, W.C., Chung, T.D., Golding, S.E., Dever, S.M., Rosenberg, E., Valerie, K., 2013a. Subcutaneous administration of D-luciferin is an effective alternative to intraperitoneal injection in bioluminescence imaging of xenograft tumors in nude mice. ISRN Mol Imaging 2013, 689279. https://doi.org/10.1155/2013/689279

Khalil, A.A., Jameson, M.J., Broaddus, W.C., Lin, P.S., Dever, S.M., Golding, S.E., Rosenberg, E., Valerie, K., Chung, T.D., 2013b. The Influence of Hypoxia and pH on Bioluminescence Imaging of Luciferase-Transfected Tumor Cells and Xenografts. International Journal of Molecular Imaging 2013, 287697. https://doi.org/10.1155/2013/287697

Kim, D., Lee, S.S., Moon, H., Park, S.Y., Lee, H.J., 2020. PD-L1 Targeting Immune-Microbubble Complex Enhances Therapeutic Index in Murine Colon Cancer Models. Pharmaceuticals (Basel) 14, 6. https://doi.org/10.3390/ph14010006

Kim, M.K., Osada, T., Barry, W.T., Yang, X.Y., Freedman, J.A., Tsamis, K.A., Datto, M., Clary, B.M., Clay, T., Morse, M.A., Febbo, P.G., Lyerly, H.K., Hsu, D.S., 2012. Characterization of an Oxaliplatin Sensitivity Predictor in a Preclinical Murine Model of Colorectal Cancer. Molecular Cancer Therapeutics 11, 1500–1509. https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0937

Klerk, C.P.W., Overmeer, R.M., Niers, T.M.H., Versteeg, H.H., Richel, D.J., Buckle, T., Van Noorden, C.J.F., van Tellingen, O., 2007. Validity of Bioluminescence Measurements for Noninvasive in Vivo Imaging of Tumor Load in Small Animals. BioTechniques 43, S7–S13, S30. https://doi.org/10.2144/000112515

Kooiman, K., Roovers, S., Langeveld, S.A.G., Kleven, R.T., Dewitte, H., O'Reilly, M.A., Escoffre, J.-M., Bouakaz, A., Verweij, M.D., Hynynen, K., Lentacker, I., Stride, E., Holland, C.K., 2020. Ultrasound-Responsive Cavitation Nuclei for Therapy and Drug Delivery. Ultrasound in Medicine & Biology 46, 1296–1325. https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2020.01.002

Kooiman, K., Vos, H.J., Versluis, M., de Jong, N., 2014. Acoustic behavior of microbubbles and implications for drug delivery. Advanced Drug Delivery Reviews, Ultrasound triggered drug delivery 72, 28–48. https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.03.003

Kostakoglu, L., Goldsmith, S.J., 2003. 18F-FDG PET Evaluation of the Response to Therapy for Lymphoma and for Breast, Lung, and Colorectal Carcinoma. Journal of Nuclear Medicine 44, 224–239.

Kratochwil, C., Flechsig, P., Lindner, T., Abderrahim, L., Altmann, A., Mier, W., Adeberg, S., Rathke, H., Röhrich, M., Winter, H., Plinkert, P.K., Marme, F., Lang, M., Kauczor, H.-U., Jäger, D., Debus, J., Haberkorn, U., Giesel, F.L., 2019. 68Ga-FAPI PET/CT: Tracer Uptake in 28 Different Kinds of Cancer. J Nucl Med 60, 801–805. https://doi.org/10.2967/jnumed.119.227967

Krol, A., Maresca, J., Dewhirst, M.W., Yuan, F., 1999. Available volume fraction of macromolecules in the extravascular space of a fibrosarcoma: implications for drug delivery. Cancer Res 59, 4136–4141.

Kubota, T., 1994. Metastatic models of human cancer xenografted in the nude mouse: the importance of orthotopic transplantation. J Cell Biochem 56, 4–8. https://doi.org/10.1002/jcb.240560103

Lalire, P., Dejust, S., El Farsaoui, K., Rahim, A., Godard, F., Morland, D., Papathanassiou, D., 2019. Hypermétabolisme iatrogène de la graisse blanche en TEP au 18FDG. Médecine Nucléaire, 5es Journées Francophones de Médecine Nucléaire - Paris 43, 207. https://doi.org/10.1016/j.mednuc.2019.01.098

Lamanauskas, N., Novell, A., Escoffre, J.-M., Venslauskas, M., Satkauskas, S., Bouakaz, A., 2013. Bleomycin delivery into cancer cells in vitro with ultrasound and SonoVue® or BR14® microbubbles. J Drug Target 21, 407–414. https://doi.org/10.3109/1061186X.2012.761223

Lammertink, B.H.A., Bos, C., Deckers, R., Storm, G., Moonen, C.T.W., Escoffre, J.-M., 2015. Sonochemotherapy: from bench to bedside. Front. Pharmacol. 6. https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00138

Lassau, N., Bonastre, J., Kind, M., Vilgrain, V., Lacroix, J., Cuinet, M., Taieb, S., Aziza, R., Sarran, A., Labbe-Devilliers, C., Gallix, B., Lucidarme, O., Ptak, Y., Rocher, L., Caquot, L.-M., Chagnon, S., Marion, D., Luciani, A., Feutray, S., Uzan-Augui, J., Coiffier, B., Benastou, B., Koscielny, S., 2014. Validation of dynamic contrast-enhanced ultrasound in predicting outcomes of antiangiogenic therapy for solid tumors: the French multicenter support for innovative and expensive techniques study. Invest Radiol 49, 794–800. https://doi.org/10.1097/RLI.0000000000000085

Lassau, N., Koscielny, S., Chami, L., Chebil, M., Benatsou, B., Roche, A., Ducreux, M., Malka, D., Boige, V., 2011. Advanced hepatocellular carcinoma: early evaluation of response to bevacizumab therapy at dynamic contrast-enhanced US with quantification--preliminary results. Radiology 258, 291–300. https://doi.org/10.1148/radiol.10091870

Latacz, E., Höppener, D., Bohlok, A., Leduc, S., Tabariès, S., Fernández Moro, C., Lugassy, C., Nyström, H., Bozóky, B., Floris, G., Geyer, N., Brodt, P., Llado, L., Van Mileghem, L., De Schepper, M., Majeed, A.W., Lazaris, A., Dirix, P., Zhang, Q., Petrillo, S.K., Vankerckhove, S., Joye, I., Meyer, Y., Gregorieff, A., Roig, N.R., Vidal-Vanaclocha, F., Denis, L., Oliveira, R.C., Metrakos, P., Grünhagen, D.J., Nagtegaal, I.D., Mollevi, D.G., Jarnagin, W.R., D'Angelica, M.I., Reynolds, A.R., Doukas, M., Desmedt, C., Dirix, L., Donckier, V., Siegel, P.M., Barnhill, R., Gerling, M., Verhoef, C., Vermeulen, P.B., 2022. Histopathological growth patterns of liver metastasis: updated consensus guidelines for pattern scoring, perspectives and recent mechanistic insights. Br J Cancer 127, 988–1013. https://doi.org/10.1038/s41416-022-01859-7

Launoy, G., 2019. Épidémiologie Du Cancer Colorectal. EMC-Gastro-entérologie 14. https://doi.org/10.1016/S1155-1968(18)68922-9

Lavaud, J., Henry, M., Gayet, P., Fertin, A., Vollaire, J., Usson, Y., Coll, J.-L., Josserand, V., 2020. Noninvasive monitoring of liver metastasis development via combined multispectral photoacoustic imaging and fluorescence diffuse optical tomography. International Journal of Biological Sciences 16, 1616–1628. https://doi.org/10.7150/ijbs.40896

Lavilla-Alonso, S., Abo-Ramadan, U., Halavaara, J., Escutenaire, S., Tatlisumak, T., Saksela, K., Kanerva, A., Hemminki, A., Pesonen, S., 2011. Optimized Mouse Model for the

Imaging of Tumor Metastasis upon Experimental Therapy. PLOS ONE 6, e26810. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026810

Lecomte, T., Tougeron, D., Chautard, R., Bressand, D., Bibeau, F., Blanc, B., Cohen, R., Jacques, J., Lagasse, J.-P., Laurent-Puig, P., Lepage, C., Lucidarme, O., Martin-Babau, J., Panis, Y., Portales, F., Taieb, J., Aparicio, T., Bouché, O., Thésaurus National de Cancérologie Digestive (TNCD), Société Nationale Française de Gastroentérologie (SNFGE), Fédération Francophone de Cancérologie Digestive (FFCD), Groupe Coopérateur multidisciplinaire en Oncologie (GERCOR), Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer (UNICANCER), Société Française de Chirurgie Digestive (SFCD), Société Française d'Endoscopie Digestive (SFED), Société Française de Radiothérapie Oncologique (SFRO), Association de Chirurgie Hépato-Bilio-Pancréatique et Transplantation (ACHBT), Société Française de Pathologie (SFP), Association Française pour l'Étude du Foie (AFEF), Société Française de Radiologie (SFR), 2024. Non-metastatic colon cancer: French Intergroup Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatments, and follow-up (TNCD, SNFGE, FFCD, GERCOR, UNICANCER, SFCD, SFED, SFRO, ACHBT, SFP, AFEF, and SFR). Dig Liver Dis 56, 756–769. https://doi.org/10.1016/j.dld.2024.01.208

Lee, W.Y., Hong, H.K., Ham, S.K., Kim, C.I., Cho, Y.B., 2014. Comparison of Colorectal Cancer in Differentially Established Liver Metastasis Models. Anticancer Research 34, 3321–3328.

Li, J., Feng, Y., Heng, D., Chen, R., Wang, Y., Xu, Z., Zhang, D., Zhang, C., Zhang, Y., Ji, D., Tang, J., Sun, Y., 2020. Circulating non-coding RNA cluster predicted the tumorigenesis and development of colorectal carcinoma. Aging (Albany NY) 12, 23047–23066. https://doi.org/10.18632/aging.104055

Li, K., Liu, W., Yu, H., Chen, J., Tang, W., Wang, J., Qi, M., Sun, Y., Xu, X., Zhang, J., Li, Xinxiang, Guo, W., Li, Xiaoling, Song, S., Tang, S., 2024. ^{68}Ga-FAPI PET imaging monitors response to combined TGF-**β**R inhibition and immunotherapy in metastatic colorectal cancer. J Clin Invest 134. https://doi.org/10.1172/JCI170490

Li, Q.-R., Xu, H.-Z., Xiao, R.-C., Liu, B., Ma, T.-Q., Yu, T.-T., Li, L.-G., Wang, M.-F., Zhao, L., Chen, X., Li, T.-F., 2023. Laser-triggered intelligent drug delivery and anti-cancer photodynamic therapy using platelets as the vehicle. Platelets 34, 2166677. https://doi.org/10.1080/09537104.2023.2166677

Liang, C., Ji, D., Qin, F., Chen, G., 2023. CAF signature predicts the prognosis of colorectal cancer patients: A retrospective study based on bulk RNA sequencing and single-cell RNA sequencing data. Medicine (Baltimore) 102, e33149. https://doi.org/10.1097/MD.0000000000033149

Liang, P.S., Chen, T.-Y., Giovannucci, E., 2009. Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis. Int J Cancer 124, 2406–2415. https://doi.org/10.1002/ijc.24191

Lin, C.-Y., Huang, Y.-L., Li, J.-R., Chang, F.-H., Lin, W.-L., 2010. Effects of focused ultrasound and microbubbles on the vascular permeability of nanoparticles delivered into mouse tumors. Ultrasound Med Biol 36, 1460–1469. https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2010.06.003

Lin, C.-Y., Li, J.-R., Tseng, H.-C., Wu, M.-F., Lin, W.-L., 2012a. Enhancement of focused ultrasound with microbubbles on the treatments of anticancer nanodrug in mouse tumors. Nanomedicine 8, 900–907. https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.10.005

Lin, C.-Y., Tseng, H.-C., Shiu, H.-R., Wu, M.-F., Chou, C.-Y., Lin, W.-L., 2012b. Ultrasound sonication with microbubbles disrupts blood vessels and enhances tumor treatments of anticancer nanodrug. Int J Nanomedicine 7, 2143–2152. https://doi.org/10.2147/IJN.S29514

Liu, P., Chen, G., Zhang, J., 2022. A Review of Liposomes as a Drug Delivery System: Current Status of Approved Products, Regulatory Environments, and Future Perspectives. Molecules 27, 1372. https://doi.org/10.3390/molecules27041372

Liu, X., Zhang, Yifan, Wang, Y., Zhu, W., Li, G., Ma, X., Zhang, Yihan, Chen, S., Tiwari, S., Shi, K., Zhang, S., Fan, H.M., Zhao, Y.X., Liang, X.-J., 2020. Comprehensive understanding of magnetic hyperthermia for improving antitumor therapeutic efficacy. Theranostics 10, 3793–3815. https://doi.org/10.7150/thno.40805

Liu, Y., Wu, W., Hong, W., Sun, X., Wu, J., Huang, Q., 2014. Raltitrexed-based chemotherapy for advanced colorectal cancer. Clin Res Hepatol Gastroenterol 38, 219–225. https://doi.org/10.1016/j.clinre.2013.11.006

Longley, D.B., Harkin, D.P., Johnston, P.G., 2003. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. Nat Rev Cancer 3, 330–338. https://doi.org/10.1038/nrc1074

Lowery, J.T., Ahnen, D.J., Schroy III, P.C., Hampel, H., Baxter, N., Boland, C.R., Burt, R.W., Butterly, L., Doerr, M., Doroshenk, M., Feero, W.G., Henrikson, N., Ladabaum, U., Lieberman, D., McFarland, E.G., Peterson, S.K., Raymond, M., Samadder, N.J., Syngal, S., Weber, T.K., Zauber, A.G., Smith, R., 2016. Understanding the contribution of family history to colorectal cancer risk and its clinical implications: A state-of-the-science review. Cancer 122, 2633–2645. https://doi.org/10.1002/cncr.30080

Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y., Hori, K., 2000. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. J Control Release 65, 271–284. https://doi.org/10.1016/s0168-3659(99)00248-5

Magistri, P., Battistelli, C., Toietta, G., Strippoli, R., Sagnotta, A., Forgione, A., Di Benedetto, F., Uccini, S., Vittorioso, P., D'Angelo, F., Aurello, P., Ramacciato, G., Nigri, G., 2019. In vivo Bioluminescence-Based Monitoring of Liver Metastases from Colorectal Cancer: An Experimental Model. J Microsc Ultrastruct 7, 136–140. https://doi.org/10.4103/JMAU.JMAU_51_18

Mahmud, M.H., Nordin, A.J., Saad, F.F.A., Azman, A.Z.F., 2015. Impacts of biological and procedural factors on semiquantification uptake value of liver in fluorine-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography imaging. Quantitative Imaging in Medicine and Surgery 5, 70007–70707. https://doi.org/10.3978/j.issn.2223-4292.2015.05.02

Mainenti, P.P., Mancini, M., Mainolfi, C., Camera, L., Maurea, S., Manchia, A., Tanga, M., Persico, F., Addeo, P., D'Antonio, D., Speranza, A., Bucci, L., Persico, G., Pace, L., Salvatore, M., 2010. Detection of colo-rectal liver metastases: prospective comparison of contrast enhanced US, multidetector CT, PET/CT, and 1.5 Tesla MR with extracellular and reticulo-endothelial cell specific contrast agents. Abdom Imaging 35, 511–521. https://doi.org/10.1007/s00261-009-9555-2

Malyško-Ptašinskė, V., Staigvila, G., Novickij, V., 2023. Invasive and non-invasive electrodes for successful drug and gene delivery in electroporation-based treatments. Front. Bioeng. Biotechnol. 10. https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1094968

Mannheim, J.G., Schlichthaerle, T., Kuebler, L., Quintanilla-Martinez, L., Kohlhofer, U., Kneilling, M., Pichler, B.J., 2016. Comparison of small animal CT contrast agents. Contrast Media & Molecular Imaging 11, 272–284. https://doi.org/10.1002/cmmi.1689

Markelc, B., Sersa, G., Cemazar, M., 2013. Differential mechanisms associated with vascular disrupting action of electrochemotherapy: intravital microscopy on the level of single normal and tumor blood vessels. PLoS One 8, e59557. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059557

Marmottant, P., Hilgenfeldt, S., 2003. Controlled vesicle deformation and lysis by single oscillating bubbles. Nature 423, 153–156. https://doi.org/10.1038/nature01613

Marques, A.C., Costa, P.J., Velho, S., Amaral, M.H., 2020. Functionalizing nanoparticles with cancer-targeting antibodies: A comparison of strategies. Journal of Controlled Release 320, 180–200. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.01.035

Masson, F., Dangin, X., Baudin, P., 2011. Tomodensitométrie : principes, formation de l'image. EMC - Radiologie et imagerie médicale - Principes et techniques - Radioprotection 6, 1–20. https://doi.org/10.1016/S1879-8497(11)72883-7

Matano, M., Date, S., Shimokawa, M., Takano, A., Fujii, M., Ohta, Y., Watanabe, T., Kanai, T., Sato, T., 2015. Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9–mediated engineering of human intestinal organoids. Nat Med 21, 256–262. https://doi.org/10.1038/nm.3802

McIntyre, R.E., Buczacki, S.J.A., Arends, M.J., Adams, D.J., 2015. Mouse models of colorectal cancer as preclinical models. BioEssays 37, 909–920. https://doi.org/10.1002/bies.201500032

Meijering, B.D.M., Juffermans, L.J.M., van Wamel, A., Henning, R.H., Zuhorn, I.S., Emmer, M., Versteilen, A.M.G., Paulus, W.J., van Gilst, W.H., Kooiman, K., de Jong, N., Musters, R.J.P., Deelman, L.E., Kamp, O., 2009. Ultrasound and microbubble-targeted delivery of macromolecules is regulated by induction of endocytosis and pore formation. Circ Res 104, 679–687. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.183806

Meng, W., He, C., Hao, Y., Wang, L., Li, L., Zhu, G., 2020. Prospects and challenges of extracellular vesicle-based drug delivery system: considering cell source. Drug Delivery 27, 585–598. https://doi.org/10.1080/10717544.2020.1748758

Mier, W., Haberkorn, U., 2011. Radiotracer I: Standard Tracer, in: Kiessling, F., Pichler, B.J. (Eds.), Small Animal Imaging: Basics and Practical Guide. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 237–245. https://doi.org/10.1007/978-3-642-12945-2_18

Minchinton, A.I., Tannock, I.F., 2006. Drug penetration in solid tumours. Nat Rev Cancer 6, 583–592. https://doi.org/10.1038/nrc1893

Mishra, S., Yadav, T., Rani, V., 2016. Exploring miRNA based approaches in cancer diagnostics and therapeutics. Critical Reviews in Oncology/Hematology 98, 12–23. https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.10.003

Misra, R., Rajic, M., Sathiyamoorthy, K., Karshafian, R., 2021. Ultrasound and microbubbles (USMB) potentiated doxorubicin penetration and distribution in 3D breast tumour

spheroids. Journal of Drug Delivery Science and Technology 61, 102261. https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102261

Moradi Kashkooli, F., Soltani, M., Souri, M., 2020. Controlled anti-cancer drug release through advanced nano-drug delivery systems: Static and dynamic targeting strategies. Journal of Controlled Release 327, 316–349. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.08.012

Moulder, J.E., Rockwell, S., 1987. Tumor hypoxia: its impact on cancer therapy. Cancer Metastasis Rev 5, 313–341. https://doi.org/10.1007/BF00055376

Navarro-Becerra, J.A., Borden, M.A., 2023. Targeted Microbubbles for Drug, Gene, and Cell Delivery in Therapy and Immunotherapy. Pharmaceutics 15, 1625. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15061625

Neto, Í., Rocha, J., Gaspar, M.M., Reis, C.P., 2023. Experimental Murine Models for Colorectal Cancer Research. Cancers (Basel) 15, 2570. https://doi.org/10.3390/cancers15092570

Nie, F., Wang, X.-F., Zhao, S.-Y., Bu, L., Liu, X.-H., 2015. Gene silencing of Rac1 with RNA interference mediated by ultrasound and microbubbles in human LoVo cells: evaluation of cell invasion inhibition and metastatic. J Drug Target 23, 380–386. https://doi.org/10.3109/1061186X.2014.1002500

Nittayacharn, P., Yuan, H.-X., Hernandez, C., Bielecki, P., Zhou, H., Exner, A.A., 2019. Enhancing Tumor Drug Distribution With Ultrasound-Triggered Nanobubbles. J Pharm Sci 108, 3091–3098. https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.05.004

Nyati, M.K., Symon, Z., Kievit, E., Dornfeld, K.J., Rynkiewicz, S.D., Ross, B.D., Rehemtulla, A., Lawrence, T.S., 2002. The potential of 5-fluorocytosine/cytosine deaminase enzyme prodrug gene therapy in an intrahepatic colon cancer model. Gene Ther 9, 844–849. https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301706

O'Brien, M.E.R., Wigler, N., Inbar, M., Rosso, R., Grischke, E., Santoro, A., Catane, R., Kieback, D.G., Tomczak, P., Ackland, S.P., Orlandi, F., Mellars, L., Alland, L., Tendler, C., CAELYX Breast Cancer Study Group, 2004. Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYX/Doxil) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer. Ann Oncol 15, 440–449. https://doi.org/10.1093/annonc/mdh097

Oei, A.L., Vriend, L.E.M., Crezee, J., Franken, N.A.P., Krawczyk, P.M., 2015. Effects of hyperthermia on DNA repair pathways: one treatment to inhibit them all. Radiat Oncol 10, 165. https://doi.org/10.1186/s13014-015-0462-0

Oh, B.Y., Hong, H.K., Lee, W.Y., Cho, Y.B., 2017. Animal models of colorectal cancer with liver metastasis. Cancer Letters, New developments on Targeted Cancer Therapy 387, 114–120. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.01.048

Okigami, M., Tanaka, K., Inoue, Y., Saigusa, S., Okugawa, Y., Toiyama, Y., Mohri, Y., Kusunoki, M., 2016. Intravital imaging of the effects of 5-fluorouracil on the murine liver microenvironment using 2-photon laser scanning microscopy. Oncol Lett 11, 2433–2439. https://doi.org/10.3892/ol.2016.4258

Oliveira, R.C., Abrantes, A.M., Tralhão, J.G., Botelho, M.F., 2020. The role of mouse models in colorectal cancer research—The need and the importance of the orthotopic models. Animal Model Exp Med 3, 1–8. https://doi.org/10.1002/ame2.12102

O'Rourke, K.P., Loizou, E., Livshits, G., Schatoff, E.M., Baslan, T., Manchado, E., Simon, J., Romesser, P.B., Leach, B., Han, T., Pauli, C., Beltran, H., Rubin, M.A., Dow, L.E.,

Lowe, S.W., 2017. Transplantation of engineered organoids enables rapid generation of metastatic mouse models of colorectal cancer. Nat Biotechnol 35, 577–582. https://doi.org/10.1038/nbt.3837

Oshima, G., Wightman, S.C., Uppal, A., Stack, M.E., Pitroda, S.P., Oskvarek, J.J., Huang, X., Posner, M.C., Hellman, S., Weichselbaum, R.R., Khodarev, N.N., 2015. Imaging of tumor clones with differential liver colonization. Sci Rep 5, 10946. https://doi.org/10.1038/srep10946

Ozaki, K., Harada, K., Terayama, N., Kosaka, N., Kimura, H., Gabata, T., 2020. FDG-PET/CT imaging findings of hepatic tumors and tumor-like lesions based on molecular background. Jpn J Radiol 38, 697–718. https://doi.org/10.1007/s11604-020-00961-1

Ozawa, S., Miura, T., Terashima, J., Habano, W., 2021. Cellular irinotecan resistance in colorectal cancer and overcoming irinotecan refractoriness through various combination trials including DNA methyltransferase inhibitors: a review. cdr 4, 946–964. https://doi.org/10.20517/cdr.2021.82

Padera, T.P., Kadambi, A., di Tomaso, E., Carreira, C.M., Brown, E.B., Boucher, Y., Choi, N.C., Mathisen, D., Wain, J., Mark, E.J., Munn, L.L., Jain, R.K., 2002. Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. Science 296, 1883–1886. https://doi.org/10.1126/science.1071420

Pandit, P., Johnston, S.M., Qi, Y., Story, J., Nelson, R., Johnson, G.A., 2013. The utility of microCT and MRI in the assessment of longitudinal growth of liver metastases in a preclinical model of colon carcinoma. Acad Radiol 20, 430–439. https://doi.org/10.1016/j.acra.2012.09.030

Parodi, A., Molinaro, R., Sushnitha, M., Evangelopoulos, M., Martinez, J.O., Arrighetti, N., Corbo, C., Tasciotti, E., 2017. Bio-inspired engineering of cell- and virus-like nanoparticles for drug delivery. Biomaterials 147, 155–168. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.09.020

Patra, J.K., Das, G., Fraceto, L.F., Campos, E.V.R., Rodriguez-Torres, M. del P., Acosta-Torres, L.S., Diaz-Torres, L.A., Grillo, R., Swamy, M.K., Sharma, S., Habtemariam, S., Shin, H.-S., 2018. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. Journal of Nanobiotechnology 16, 71. https://doi.org/10.1186/s12951-018-0392-8

Perera, P.S., Thompson, R.L., Wiseman, M.J., 2012. Recent Evidence for Colorectal Cancer Prevention Through Healthy Food, Nutrition, and Physical Activity: Implications for Recommendations. Curr Nutr Rep 1, 44–54. https://doi.org/10.1007/s13668-011-0006-7

Phelip, J.M., Tougeron, D., Léonard, D., Benhaim, L., Desolneux, G., Dupré, A., Michel, P., Penna, C., Tournigand, C., Louvet, C., Christou, N., Chevallier, P., Dohan, A., Rousseaux, B., Bouché, O., 2019. Metastatic colorectal cancer (mCRC): French intergroup clinical practice guidelines for diagnosis, treatments and follow-up (SNFGE, FFCD, GERCOR, UNICANCER, SFCD, SFED, SFRO, SFR). Dig Liver Dis 51, 1357–1363. https://doi.org/10.1016/j.dld.2019.05.035

Pietsch, H., 2011. CT Contrast Agents, in: Kiessling, F., Pichler, B.J. (Eds.), Small Animal Imaging: Basics and Practical Guide. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 141–149. https://doi.org/10.1007/978-3-642-12945-2_11

Pochon, S., Tardy, I., Bussat, P., Bettinger, T., Brochot, J., von Wronski, M., Passantino, L., Schneider, M., 2010. BR55: a lipopeptide-based VEGFR2-targeted ultrasound contrast agent for molecular imaging of angiogenesis. Invest Radiol 45, 89–95. https://doi.org/10.1097/RLI.0b013e3181c5927c

Pothuraju, R., Khan, I., Jain, M., Bouvet, M., Malafa, M., Roy, H.K., Kumar, S., Batra, S.K., 2024. Colorectal cancer murine models: Initiation to metastasis. Cancer Letters 587, 216704. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2024.216704

Prentice, P., Cuschieri, A., Dholakia, K., Prausnitz, M., Campbell, P., 2005. Membrane disruption by optically controlled microbubble cavitation. Nature Phys 1, 107–110. https://doi.org/10.1038/nphys148

Presset, A., Bonneau, C., Kazuyoshi, S., Nadal-Desbarats, L., Mitsuyoshi, T., Bouakaz, A., Kudo, N., Escoffre, J.-M., Sasaki, N., 2020. Endothelial Cells, First Target of Drug Delivery Using Microbubble-Assisted Ultrasound. Ultrasound Med Biol 46, 1565–1583. https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2020.03.013

Price, P.M., Mahmoud, W.E., Al-Ghamdi, A.A., Bronstein, L.M., 2018. Magnetic Drug Delivery: Where the Field Is Going. Front Chem 6, 619. https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00619

Primeau, A.J., Rendon, A., Hedley, D., Lilge, L., Tannock, I.F., 2005. The distribution of the anticancer drug Doxorubicin in relation to blood vessels in solid tumors. Clin Cancer Res 11, 8782–8788. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-1664

Provenzano, P.P., Cuevas, C., Chang, A.E., Goel, V.K., Von Hoff, D.D., Hingorani, S.R., 2012. Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. Cancer Cell 21, 418–429. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.01.007

Puaux, A.-L., Ong, L.C., Jin, Y., Teh, I., Hong, M., Chow, P.K.H., Golay, X., Abastado, J.-P., 2011. A Comparison of Imaging Techniques to Monitor Tumor Growth and Cancer Progression in Living Animals. International Journal of Molecular Imaging 2011, 321538. https://doi.org/10.1155/2011/321538

Puig, I., Chicote, I., Tenbaum, S.P., Arqués, O., Herance, J.R., Gispert, J.D., Jimenez, J., Landolfi, S., Caci, K., Allende, H., Mendizabal, L., Moreno, D., Charco, R., Espín, E., Prat, A., Elez, M.E., Argilés, G., Vivancos, A., Tabernero, J., Rojas, S., Palmer, H.G., 2013. A Personalized Preclinical Model to Evaluate the Metastatic Potential of Patient-Derived Colon Cancer Initiating Cells. Clinical Cancer Research 19, 6787–6801. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-1740

Ramasawmy, R., Johnson, S.P., Roberts, T.A., Stuckey, D.J., David, A.L., Pedley, R.B., Lythgoe, M.F., Siow, B., Walker-Samuel, S., 2016. Monitoring the Growth of an Orthotopic Tumour Xenograft Model: Multi-Modal Imaging Assessment with Benchtop MRI (1T), High-Field MRI (9.4T), Ultrasound and Bioluminescence. PLoS One 11, e0156162. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156162

Raymond, E., Faivre, S., Woynarowski, J.M., Chaney, S.G., 1998. Oxaliplatin: mechanism of action and antineoplastic activity. Semin Oncol 25, 4–12.

Refaat, A., Yap, M.L., Pietersz, G., Walsh, A.P.G., Zeller, J., del Rosal, B., Wang, X., Peter, K., 2022. In vivo fluorescence imaging: success in preclinical imaging paves the way

for clinical applications. J Nanobiotechnology 20, 450. https://doi.org/10.1186/s12951-022-01648-7

Rega, D., Granata, V., Petrillo, A., Pace, U., Di Marzo, M., Fusco, R., D'Alessio, V., Nasti, G., Romano, C., Avallone, A., Ravo, V., Tatangelo, F., Maiolino, P., Palaia, R., Izzo, F., Delrio, P., 2022. Electrochemotherapy of Primary Colon Rectum Cancer and Local Recurrence: Case Report and Prospective Analysis. J Clin Med 11, 2745. https://doi.org/10.3390/jcm11102745

Riegler, J., Labyed, Y., Rosenzweig, S., Javinal, V., Castiglioni, A., Dominguez, C.X., Long, J.E., Li, Q., Sandoval, W., Junttila, M.R., Turley, S.J., Schartner, J., Carano, R.A.D., 2018. Tumor Elastography and Its Association with Collagen and the Tumor Microenvironment. Clin Cancer Res 24, 4455–4467. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-3262

Ritsma, L., Steller, E.J.A., Beerling, E., Loomans, C.J.M., Zomer, A., Gerlach, C., Vrisekoop, N., Seinstra, D., van Gurp, L., Schäfer, R., Raats, D.A., de Graaff, A., Schumacher, T.N., de Koning, E.J.P., Rinkes, I.H.B., Kranenburg, O., van Rheenen, J., 2012. Intravital microscopy through an abdominal imaging window reveals a pre-micrometastasis stage during liver metastasis. Sci Transl Med 4, 158ra145. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004394

Ritsma, L., Steller, E.J.A., Ellenbroek, S.I.J., Kranenburg, O., Borel Rinkes, I.H.M., van Rheenen, J., 2013. Surgical implantation of an abdominal imaging window for intravital microscopy. Nat Protoc 8, 583–594. https://doi.org/10.1038/nprot.2013.026

Robinson, S.M., Mann, D.A., Manas, D.M., Oakley, F., Mann, J., White, S.A., 2013. The potential contribution of tumour-related factors to the development of FOLFOX-induced sinusoidal obstruction syndrome. Br J Cancer 109, 2396–2403. https://doi.org/10.1038/bjc.2013.604

Rodriguez-Devora, J.I., Ambure, S., Shi, Z.-D., Yuan, Y., Sun, W., Xu, T., 2012. Physically facilitating drug-delivery systems. Ther Deliv 3, 125–139. https://doi.org/10.4155/tde.11.137

Rohovie, M.J., Nagasawa, M., Swartz, J.R., 2017. Virus-like particles: Next-generation nanoparticles for targeted therapeutic delivery. Bioeng Transl Med 2, 43–57. https://doi.org/10.1002/btm2.10049

Roovers, S., Segers, T., Lajoinie, G., Deprez, J., Versluis, M., De Smedt, S.C., Lentacker, I., 2019. The Role of Ultrasound-Driven Microbubble Dynamics in Drug Delivery: From Microbubble Fundamentals to Clinical Translation. Langmuir 35, 10173–10191. https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b03779

Roque, C.C. de T.A., Lima, E.N.P., Chojniak, R., Lima, B. de T.A.R., Santos, T.G. dos, 2019. Accuracy of ultrasound for detecting liver metastasis xenografts in nude mice. Research, Society and Development 8, e20881181–e20881181. https://doi.org/10.33448/rsd-v8i8.1181

Ruers, T.J.M., Langenhoff, B.S., Neeleman, N., Jager, G.J., Strijk, S., Wobbes, T., Corstens, F.H.M., Oyen, W.J.G., 2002. Value of positron emission tomography with [F-18]fluorodeoxyglucose in patients with colorectal liver metastases: a prospective study. J Clin Oncol 20, 388–395. https://doi.org/10.1200/JCO.2002.20.2.388

Sanchez-Cano, C., Carril, M., 2020. Recent Developments in the Design of Non-Biofouling Coatings for Nanoparticles and Surfaces. International Journal of Molecular Sciences 21, 1007. https://doi.org/10.3390/ijms21031007

Santé publique France, 2024a. Cancer du colon rectum [WWW Document]. URL https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/cancers/cancer-du-colon-rectum (accessed 8.6.24).

Santé publique France, 2024b. Participation au programme de dépistage organisé du cancer colorectal. Période 2022-2023 et évolution depuis 2010. [WWW Document]. URL https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/cancers/cancer-du-colon-rectum/documents/bulletin-national/participation-au-programme-de-depistage-organise-du-cancer-colorectal.-periode-2022-2023-et-evolution-depuis-2010 (accessed 9.24.24).

Sarraf-Yazdi, S., Mi, J., Dewhirst, M.W., Clary, B.M., 2004. Use of in vivo bioluminescence imaging to predict hepatic tumor burden in mice. J Surg Res 120, 249–255. https://doi.org/10.1016/j.jss.2004.03.013

Sato, M., Mizuta, K., Han, Q., Morinaga, S., KANG, B.M., KUBOTA, Y., MORI, R., BARANOV, A., KOBAYASHI, K., ARDJMAND, D., KOBAYASHI, N., BOUVET, M., ICHIKAWA, Y., NAKAJIMA, A., HOFFMAN, R.M., 2024. Targeting Methionine Addiction Combined With Low-dose Irinotecan Arrested Colon Cancer in Contrast to High-dose Irinotecan Alone, Which Was Ineffective, in a Nude-mouse Model. In Vivo 38, 1058–1063. https://doi.org/10.21873/invivo.13539

Saxena, M., Christofori, G., 2013. Rebuilding cancer metastasis in the mouse. Molecular Oncology, Mouse models of cancer: Essential tools for better therapies 7, 283–296. https://doi.org/10.1016/j.molonc.2013.02.009

Schneckenburger, H., 2019. Laser-assisted optoporation of cells and tissues – a mini-review. Biomed. Opt. Express, BOE 10, 2883–2888. https://doi.org/10.1364/BOE.10.002883

Schneider, M., 2011. Ultrasound Contrast Agents, in: Kiessling, F., Pichler, B.J. (Eds.), Small Animal Imaging: Basics and Practical Guide. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 219–229. https://doi.org/10.1007/978-3-642-12945-2_16

Schutt, E.G., Klein, D.H., Mattrey, R.M., Riess, J.G., 2003. Injectable microbubbles as contrast agents for diagnostic ultrasound imaging: the key role of perfluorochemicals. Angew Chem Int Ed Engl 42, 3218–3235. https://doi.org/10.1002/anie.200200550

Schwartz, M., 1961. A biomathematical approach to clinical tumor growth. Cancer 14, 1272–1294. https://doi.org/10.1002/1097-0142(196111/12)14:6<1272::aid-cncr2820140618>3.0.co;2-h

Sennoga, C.A., Kanbar, E., Auboire, L., Dujardin, P.-A., Fouan, D., Escoffre, J.-M., Bouakaz, A., 2017. Microbubble-mediated ultrasound drug-delivery and therapeutic monitoring. Expert Opin Drug Deliv 14, 1031–1043. https://doi.org/10.1080/17425247.2017.1266328

Serkova, N.J., Glunde, K., Haney, C.R., Farhoud, M., De Lille, A., Redente, E.F., Simberg, D., Westerly, D.C., Griffin, L., Mason, R.P., 2021. Preclinical Applications of Multi-Platform Imaging in Animal Models of Cancer. Cancer Research 81, 1189–1200. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-0373

Shen, Z., Shao, J., Zhang, J., Qu, W., 2020. Ultrasound cavitation enhanced chemotherapy: In vivo research and clinical application. Exp Biol Med (Maywood) 245, 1200–1212. https://doi.org/10.1177/1535370220936150

Siegel, R.L., Miller, K.D., Goding Sauer, A., Fedewa, S.A., Butterly, L.F., Anderson, J.C., Cercek, A., Smith, R.A., Jemal, A., 2020. Colorectal cancer statistics, 2020. CA: A Cancer Journal for Clinicians 70, 145–164. https://doi.org/10.3322/caac.21601

Smakman, N., Martens, A., Kranenburg, O., Borel Rinkes, I.H.M., 2004. Validation of bioluminescence imaging of colorectal liver metastases in the mouse. Journal of Surgical Research 122, 225–230. https://doi.org/10.1016/j.jss.2004.05.021

Smeenge, M., Tranquart, F., Mannaerts, C.K., de Reijke, T.M., van de Vijver, M.J., Laguna, M.P., Pochon, S., de la Rosette, J.J.M.C.H., Wijkstra, H., 2017. First-in-Human Ultrasound Molecular Imaging With a VEGFR2-Specific Ultrasound Molecular Contrast Agent (BR55) in Prostate Cancer: A Safety and Feasibility Pilot Study. Invest Radiol 52, 419–427. https://doi.org/10.1097/RLI.0000000000000362

Snipstad, S., Berg, S., Mørch, Ý., Bjørkøy, A., Sulheim, E., Hansen, R., Grimstad, I., van Wamel, A., Maaland, A.F., Torp, S.H., Davies, C. de L., 2017. Ultrasound Improves the Delivery and Therapeutic Effect of Nanoparticle-Stabilized Microbubbles in Breast Cancer Xenografts. Ultrasound in Medicine & Biology 43, 2651–2669. https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2017.06.029

Sta Maria, N.S., Barnes, S.R., Weist, M.R., Colcher, D., Raubitschek, A.A., Jacobs, R.E., 2015. Low Dose Focused Ultrasound Induces Enhanced Tumor Accumulation of Natural Killer Cells. PLoS One 10, e0142767. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142767

Stylianopoulos, T., Martin, J.D., Chauhan, V.P., Jain, S.R., Diop-Frimpong, B., Bardeesy, N., Smith, B.L., Ferrone, C.R., Hornicek, F.J., Boucher, Y., Munn, L.L., Jain, R.K., 2012. Causes, consequences, and remedies for growth-induced solid stress in murine and human tumors. Proc Natl Acad Sci U S A 109, 15101–15108. https://doi.org/10.1073/pnas.1213353109

Sun, F.X., Sasson, A.R., Jiang, P., An, Z., Gamagami, R., Li, L., Moossa, A.R., Hoffman, R.M., 1999. An ultra-metastatic model of human colon cancer in nude mice. Clin Exp Metastasis 17, 51–58. https://doi.org/10.1023/A:1026442321295

Sun, T., Dasgupta, A., Zhao, Z., Nurunnabi, M., Mitragotri, S., 2020. Physical triggering strategies for drug delivery. Advanced Drug Delivery Reviews, Advanced Drug Delivery 2020 - Part 3: Perspectives, Technologies and Translation 158, 36–62. https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.06.010

Surdez, D., Daudigeos-Dubus, E., 2016. PDX ou xénogreffe dérivée de la tumeur du patient, la renaissance d'un modèle oublié : son implication dans la recherche et la clinique de demain. Revue d'Oncologie Hématologie Pédiatrique 4, 237–245. https://doi.org/10.1016/j.oncohp.2016.10.017

Svrcek, M., 2023. Facteurs histopronostiques et biomarqueurs pour une prise en charge personnalisée du cancer colorectal. Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine 207, 1218–1228. https://doi.org/10.1016/j.banm.2023.05.004

Szabo, V., Bugyik, E., Dezso, K., Ecker, N., Nagy, P., Timar, J., Tovari, J., Laszlo, V., Bridgeman, V.L., Wan, E., Frentzas, S., Vermeulen, P.B., Reynolds, A.R., Dome, B.,

Paku, S., 2015. Mechanism of tumour vascularization in experimental lung metastases. J Pathol 235, 384–396. https://doi.org/10.1002/path.4464

Tahtabasi, M., Erturk, S.M., Basak, M., 2021. Comparison of MRI and 18F-FDG PET/CT in the Liver Metastases of Gastrointestinal and Pancreaticobiliary Tumors. Sisli Etfal Hastan Tip Bul 55, 12–17. https://doi.org/10.14744/SEMB.2020.80270

Tan, M.J., Fernandes, N., Williams, K.C., Ford, N.L., 2022. In vivo micro-computed tomography imaging in liver tumor study of mice using Fenestra VC and Fenestra HDVC. Sci Rep 12, 22399. https://doi.org/10.1038/s41598-022-26886-5

Tanaka, K., Morimoto, Y., Toiyama, Y., Matsushita, K., Kawamura, M., Koike, Y., Okugawa, Y., Inoue, Y., Uchida, K., Araki, T., Mizoguchi, A., Kusunoki, M., 2012a. In Vivo Time-Course Imaging of Tumor Angiogenesis in Colorectal Liver Metastases in the Same Living Mice Using Two-Photon Laser Scanning Microscopy. Journal of Oncology 2012, 265487. https://doi.org/10.1155/2012/265487

Tanaka, K., Okigami, M., Toiyama, Y., Morimoto, Y., Matsushita, K., Kawamura, M., Hashimoto, K., Saigusa, S., Okugawa, Y., Inoue, Y., Uchida, K., Araki, T., Mohri, Y., Mizoguchi, A., Kusunoki, M., 2012b. In vivo real-time imaging of chemotherapy response on the liver metastatic tumor microenvironment using multiphoton microscopy. Oncology Reports 28, 1822–1830. https://doi.org/10.3892/or.2012.1983

Tehrani, M.H.H., Moradi Kashkooli, F., Soltani, M., 2024. Effect of tumor heterogeneity on enhancing drug delivery to vascularized tumors using thermo-sensitive liposomes triggered by hyperthermia: A multi-scale and multi-physics computational model. Computers in Biology and Medicine 170, 108050. https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2024.108050

Tomizawa, M., Shinozaki, F., Motoyoshi, Y., Sugiyama, T., Yamamoto, S., Sueishi, M., 2013. Sonoporation: Gene transfer using ultrasound. World J Methodol 3, 39–44. https://doi.org/10.5662/wjm.v3.i4.39

Tran, T.A., Roger, S., Le Guennec, J.Y., Tranquart, F., Bouakaz, A., 2007. Effect of Ultrasound-Activated Microbubbles on the Cell Electrophysiological Properties. Ultrasound in Medicine & Biology 33, 158-163,. https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2006.07.029.

Tu, J., Yu, A.C.H., 2022. Ultrasound-Mediated Drug Delivery: Sonoporation Mechanisms, Biophysics, and Critical Factors. BME Frontiers 2022, 9807347. https://doi.org/10.34133/2022/9807347

Vallis, J., Wang, P.P., 2022. The Role of Diet and Lifestyle in Colorectal Cancer Incidence and Survival, in: Morgado-Diaz, J.A. (Ed.), Gastrointestinal Cancers. Exon Publications, Brisbane (AU).

van Duijnhoven, F.J.B., Bueno-De-Mesquita, H.B., Ferrari, P., Jenab, M., Boshuizen, H.C., Ros, M.M., Casagrande, C., Tjønneland, A., Olsen, A., Overvad, K., Thorlacius-Ussing, O., Clavel-Chapelon, F., Boutron-Ruault, M.-C., Morois, S., Kaaks, R., Linseisen, J., Boeing, H., Nöthlings, U., Trichopoulou, A., Trichopoulos, D., Misirli, G., Palli, D., Sieri, S., Panico, S., Tumino, R., Vineis, P., Peeters, P.H., van Gils, C.H., Ocké, M.C., Lund, E., Engeset, D., Skeie, G., Suárez, L.R., González, C.A., Sánchez, M.-J., Dorronsoro, M., Navarro, C., Barricarte, A., Berglund, G., Manjer, J., Hallmans, G., Palmqvist, R., Bingham, S.A., Khaw, K.-T., Key, T.J., Allen, N.E., Boffetta, P., Slimani,

N., Rinaldi, S., Gallo, V., Norat, T., Riboli, E., 2009. Fruit, vegetables, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. Am J Clin Nutr 89, 1441–1452. https://doi.org/10.3945/ajcn.2008.27120

Vásquez, J.L., Ibsen, P., Lindberg, H., Gehl, J., 2015. In Vitro and In Vivo Experiments on Electrochemotherapy for Bladder Cancer. The Journal of Urology 193, 1009–1015. https://doi.org/10.1016/j.juro.2014.09.039

Vaupel, P., Mayer, A., 2007. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. Cancer Metastasis Rev 26, 225–239. https://doi.org/10.1007/s10555-007-9055-1

Väyrynen, V., Wirta, E. -V., Seppälä, T., Sihvo, E., Mecklin, J. -P., Vasala, K., Kellokumpu, I., 2020. Incidence and management of patients with colorectal cancer and synchronous and metachronous colorectal metastases: a population-based study. BJS Open 4, 685–692. https://doi.org/10.1002/bjs5.50299

Vodovar, D., Aboab, J., Silva, S., Tournier, N., pour la Commission de recherche translationnelle de la SRLF, 2019. Comprendre la tomographie par émission de positons (TEP) — une modalité d'imagerie pour la réanimation ? Méd. Intensive Réa. 28, 347–352. https://doi.org/10.3166/rea-2019-0092

Wahid, M., Akhter, N., Jawed, A., Dar, S.A., Mandal, R.K., Lohani, M., Areeshi, M.Y., Khan, S., Haque, S., 2017. Pembrolizumab's non-cross resistance mechanism of action successfully overthrown ipilimumab. Critical Reviews in Oncology/Hematology 111, 1–6. https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.01.001

Wang, T.-Y., Choe, J.W., Pu, K., Devulapally, R., Bachawal, S., Machtaler, S., Chowdhury, S.M., Luong, R., Tian, L., Khuri-Yakub, B., Rao, J., Paulmurugan, R., Willmann, J.K., 2015. Ultrasound-guided delivery of microRNA loaded nanoparticles into cancer. J Control Release 203, 99–108. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.02.018

Wang, Y., Li, Y., Li, X., 2022. Ultrasound microbubble-mediated miR-503-5p downregulation suppressed in vitro CRC progression via promoting SALL1 expression. Tissue Cell 76, 101811. https://doi.org/10.1016/j.tice.2022.101811

Wang, Y., Li, Y., Yan, K., Shen, L., Yang, W., Gong, J., Ding, K., 2018. Clinical study of ultrasound and microbubbles for enhancing chemotherapeutic sensitivity of malignant tumors in digestive system. Chin J Cancer Res 30, 553–563. https://doi.org/10.21147/j.issn.1000-9604.2018.05.09

Watanabe, Yukiko, Aoi, A., Horie, S., Tomita, N., Mori, S., Morikawa, H., Matsumura, Y., Vassaux, G., Kodama, T., 2008. Low-intensity ultrasound and microbubbles enhance the antitumor effect of cisplatin. Cancer Sci 99, 2525–2531. https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2008.00989.x

Watanabe, Y., Aoi, A., Horie, S., Tomita, N., Mori, S., Morikawa, H., Matsumura, Y., Vassaux, G., Kodama, T., 2008. Low-Intensity Ultrasound and Microbubbles Enhance the Antitumor Effect of Cisplatin. Cancer Sci 99, 2525-2531,. https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2008.00989.x.

Weber, S.M., Peterson, K.A., Durkee, B., Qi, C., Longino, M., Warner, T., Lee, F.T., Weichert, J.P., 2004. Imaging of murine liver tumor using microCT with a hepatocyte-selective contrast agent: accuracy is dependent on adequate contrast enhancement. J Surg Res 119, 41–45. https://doi.org/10.1016/S0022-4804(03)00357-3

Wei, M., Gao, Y., Li, X., J. Serpe, M., 2017. Stimuli-responsive polymers and their applications. Polymer Chemistry 8, 127–143. https://doi.org/10.1039/C6PY01585A

Wei, S., Liu, Yiqun, Xin, Y., Feng, C., Zhang, Y., Jia, X., Chai, F., Zhao, J., Liu, Yulu, Yao, X., Liu, X., Wu, J., Hong, N., Cheng, J., Wang, Y., 2022. Detecting and monitoring tumors in orthotopic colorectal liver metastatic animal models with high-resolution ultrasound. Clin Exp Metastasis 39, 771–781. https://doi.org/10.1007/s10585-022-10177-4

Weiser, M.R., 2018. AJCC 8th Edition: Colorectal Cancer. Ann Surg Oncol 25, 1454–1455. https://doi.org/10.1245/s10434-018-6462-1

Wen, C., Feng, X., Yuan, H., Gong, Y., Wang, G., 2021. Circ_0003266 sponges miR-503-5p to suppress colorectal cancer progression via regulating PDCD4 expression. BMC Cancer 21, 284. https://doi.org/10.1186/s12885-021-07997-0

Wilson, S.R., Burns, P.N., 2010. Microbubble-enhanced US in body imaging: what role? Radiology 257, 24–39. https://doi.org/10.1148/radiol.10091210

Wolfram, J., Ferrari, M., 2019. Clinical Cancer Nanomedicine. Nano Today 25, 85-98,. https://doi.org/10.1016/j.nantod.2019.02.005.

Woodle, M.C., Lasic, D.D., 1992. Sterically stabilized liposomes. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes 1113, 171–199. https://doi.org/10.1016/0304-4157(92)90038-C

Wu, J., 2002. Theoretical study on shear stress generated by microstreaming surrounding contrast agents attached to living cells. Ultrasound in Medicine & Biology 28, 125–129. https://doi.org/10.1016/S0301-5629(01)00497-5

Xu, K., Chen, G., Qiu, Y., Yuan, Z., Li, H., Yuan, X., Sun, J., Xu, J., Liang, X., Yin, P., 2017. miR-503-5p confers drug resistance by targeting PUMA in colorectal carcinoma. Oncotarget 8, 21719–21732. https://doi.org/10.18632/oncotarget.15559

Yang, M., Baranov, E., Wang, J.-W., Jiang, P., Wang, X., Sun, F.-X., Bouvet, M., Moossa, A.R., Penman, S., Hoffman, R.M., 2002. Direct external imaging of nascent cancer, tumor progression, angiogenesis, and metastasis on internal organs in the fluorescent orthotopic model. Proc Natl Acad Sci U S A 99, 3824–3829. https://doi.org/10.1073/pnas.052029099

Yang, Y., Li, Q., Guo, X., Tu, J., Zhang, D., 2020. Mechanisms underlying sonoporation: Interaction between microbubbles and cells. Ultrasonics Sonochemistry 67, 105096. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105096

Yao, Y., Zhou, Y., Liu, L., Xu, Y., Chen, Q., Wang, Y., Wu, S., Deng, Y., Zhang, J., Shao, A., 2020. Nanoparticle-Based Drug Delivery in Cancer Therapy and Its Role in Overcoming Drug Resistance. Front. Mol. Biosci. 7. https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00193

Yuan, F., Krol, A., Tong, S., 2001. Available space and extracellular transport of macromolecules: effects of pore size and connectedness. Ann Biomed Eng 29, 1150–1158. https://doi.org/10.1114/1.1424915

Yurgelun, M.B., Hampel, H., 2018. Recent Advances in Lynch Syndrome: Diagnosis, Treatment, and Cancer Prevention. Am Soc Clin Oncol Educ Book 101–109. https://doi.org/10.1200/EDBK_208341

Zabala, M., Alzuguren, P., Benavides, C., Crettaz, J., Gonzalez-Aseguinolaza, G., Ortiz de Solorzano, C., Gonzalez-Aparicio, M., Kramer, M.G., Prieto, J., Hernandez-Alcoceba, R., 2009. Evaluation of bioluminescent imaging for noninvasive monitoring of colorectal cancer progression in the liver and its response to immunogene therapy. Mol Cancer 8, 2. https://doi.org/10.1186/1476-4598-8-2

Zaidi, M., Fu, F., Cojocari, D., McKee, T.D., Wouters, B.G., 2019. Quantitative Visualization of Hypoxia and Proliferation Gradients Within Histological Tissue Sections. Front Bioeng Biotechnol 7, 397. https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00397

Zeghimi, A., Escoffre, J.M., Bouakaz, A., 2015. Role of endocytosis in sonoporation-mediated membrane permeabilization and uptake of small molecules: a electron microscopy study. Phys Biol 12, 066007. https://doi.org/10.1088/1478-3975/12/6/066007

Zhang, C., Yan, L., Wang, X., Zhu, S., Chen, C., Gu, Z., Zhao, Y., 2020. Progress, Challenges, and Future of Nanomedicine. Nano Today 35, 101008,. https://doi.org/10.1016/j.nantod.2020.101008.

Zhang, M., Jiang, Huijie, Zhang, R., Xu, H., Jiang, Hao, Pan, W., Li, X., Wang, Y., Wang, S., 2018. Noninvasive evaluation of 18F-FDG/18F-FMISO-based Micro PET in monitoring hepatic metastasis of colorectal cancer. Sci Rep 8, 17832. https://doi.org/10.1038/s41598-018-36238-x

Zhang, X., Yang, G., Zhang, Y., Huang, P., Qiu, J., Sun, Y., Shen, Z., Liao, X., Xia, H., Shao, S., Wang, D., 2014. An experimental research into endostatin microbubble combined with focused ultrasound for anti-tumor angiogenesis in colon cancer. Gastroenterol Rep (Oxf) 2, 44–53. https://doi.org/10.1093/gastro/got038

Zhang, Y., Zhao, M., Yang, W., 2023. Protocol to establish a mouse model for hepatic metastasis of colorectal cancer. STAR Protocols 4, 102023. https://doi.org/10.1016/j.xpro.2022.102023

Zirakchian Zadeh, M., 2023. PET/CT in assessment of colorectal liver metastases: a comprehensive review with emphasis on 18F-FDG. Clin Exp Metastasis 40, 465–491. https://doi.org/10.1007/s10585-023-10231-9

Marie ROY

Délivrance de molécules thérapeutiques par sonoporation dans un modèle murin de métastases hépatiques de cancer colorectal

Résumé

Le cancer colorectal (CCR) est la deuxième cause de décès par cancer en France, entraînant des métastases hépatiques chez 40 à 60 % des patients. Le principal traitement disponible est la chimiothérapie, qui induit de nombreux effets secondaires. La sonoporation est une méthode basée sur l'utilisation combinée d'ultrasons et de microbulles qui augmente transitoirement la perméabilité de la barrière hémato-tumorale, favorisant ainsi l'extravasation et la biodistribution intratumorale des molécules thérapeutiques. Cependant, la majorité des protocoles de délivrance de molécules par sonoporation est évaluée sur des modèles cellulaires en 2D ou sur des modèles murins de cancers sous-cutanés qui ne reflètent pas la réalité clinique. Cette thèse a pour objectif d'étudier la délivrance de molécules chimiothérapeutiques par sonoporation sur un modèle cellulaire 3D de sphéroïde de CCR et d'établir un schéma thérapeutique de délivrance de l'irinotécan par sonoporation sur un modèle murin de métastases hépatiques de CCR. Les résultats *in vitro* montrent que la sonoporation induit une perméabilisation des sphéroïdes, affectant principalement la couche cellulaire périphérique. De plus, la délivrance de la bléomycine par sonoporation a induit une diminution significative de la croissance des sphéroïdes, mais n'a pas amélioré l'efficacité de la doxorubicine et de l'irinotécan. Les sphéroïdes tumoraux constituent une approche pertinente pour évaluer l'efficacité de la sonoporation pour la délivrance de molécules chimiothérapeutiques. Le modèle murin de métastases hépatiques de CCR est obtenu après une injection intra-splénique de cellules tumorales suivi d'une splénectomie. Le développement des métastases est évalué par imagerie de bioluminescence, échographie, scanner X, et par imagerie TEP au ^{18}F-FDG. Ces modalités d'imagerie se sont montrées complémentaires pour détecter et évaluer la croissance des métastases hépatiques. Dans nos conditions expérimentales, les résultats suggèrent que la délivrance de l'irinotécan par sonoporation n'améliore pas significativement son efficacité thérapeutique. Le protocole de sonoporation nécessite d'être optimisé notamment en caractérisant le comportement des MBs dans le tissu tumoral et en étudiant l'influence des paramètres ultrasonores (pression acoustique, durée d'exposition ultrasonore, *etc.*).

Mots clés : Thérapie, Imagerie, Sonoporation, Métastases hépatiques, Cancer colorectal, Sphéroïde

Abstract

Colorectal cancer (CRC) is the second leading cause of cancer death in France, leading to liver metastases in 40 to 60% of patients. The main treatment available is chemotherapy, which induces off-target effects. MB-assisted US (*i.e*, sonoporation) is a non-invasive and targeted drug delivery method that enhances the permeability of blood-tumor barrier, increasing the extravasation and the intratumoral bioavailability of therapeutic molecules. Nowadays, the most of drug delivery protocols using MB-assisted US are performed on 2D cell models or on subcutaneous murine cancer models, which do not reflect clinical reality. The aims of this PhD project are to study the delivery of chemotherapeutic molecules by sonoporation on a 3D spheroid model of CRC and to develop a mouse model of CRC liver metastases to study the delivery of irinotecan by sonoporation. *In vitro* results show that sonoporation induces spheroid permeabilization, mainly affecting the peripheral cell layer. In addition, the delivery of bleomycin by sonoporation induced a significant decrease in spheroid growth but did not improve the efficacy of doxorubicin and irinotecan. Tumor spheroids are a relevant approach to evaluate the efficacy of MB-assisted US for the delivery of chemotherapeutics. The mouse model of liver metastases of CRC is established after intra-splenic injection of tumor cells followed by splenectomy. The development of metastases is evaluated by bioluminescence imaging, ultrasound, X-ray scan, and ^{18}F-FDG PET imaging. The combination of these imaging modalities proved to be complementary for the longitudinal monitoring of tumoral progression in our mouse model of CRC liver metastases. Under our experimental conditions, the results suggest that irinotecan delivered by sonoporation does not significantly improve its therapeutic efficacy. The therapeutic protocol needs to be optimized, particularly by characterizing the behavior of microbubbles (MBs) in the tumor tissue and studying the influence of ultrasound parameters (acoustic pressure, ultrasound exposure duration, *etc.*).

Keywords : Therapy, Imaging, Sonoporation, Liver metastases, Colorectal cancer, Spheroid