

Université de Montréal

Libération localisée d'ATP cellulaire par ultrasons et microbulles pour l'immunothérapie du  
cancer

*Par*

Falonne Demeze Kenfack

Université de Montréal

Département de médecine, faculté de médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de M.Sc. en sciences biomédicales, option  
médecine expérimentale

Mars 2021

© Falonne Demeze Kenfack, 2021

*Ce mémoire intitulé*

**Libération localisée d'ATP cellulaire par ultrasons et microbulles pour l'immunothérapie du cancer**

*Présenté par*

**Falonne Demeze Kenfack**

*A été évalué par un jury composé des personnes suivantes*

**Alain Vinet, Ph.D.**

Président-rapporteur

**Yu François, Ph.D.**

Directeur de recherche

**Grygorczyk, Ryszard, Ph.D.**

Membre du jury

## Résumé

Plusieurs types cancéreux prolifèrent par leur capacité à exprimer les marqueurs de régulation négative du système immunitaire, tels que les récepteurs PD-L1 et CD80/86 qui inhibent l'activation et la prolifération des lymphocytes T. L'inhibition de ces voies par des anticorps peut ainsi réactiver la réponse immunitaire chez certains patients. D'autres voies de signalisations sont aujourd'hui explorées, incluant la signalisation purinergique (ATP/adénosine) dans la modulation du microenvironnement tumoral. L'adénosine triphosphate extracellulaire (ATPe) est classifiée parmi les molécules de danger extracellulaire et joue un rôle crucial dans l'activation de l'inflammasome NLRP3, un médiateur important de l'activation des réactions pro-inflammatoires. Les ultrasons sont des ondes mécaniques de haute pression capable d'engendrer la cavitation inertielle des microbulles. Il a été démontré que les microbulles (MB) stimulées par ultrasons (US) libèrent de l'ATP dans le muscle squelettique et dans le muscle cardiaque. Nous posons l'hypothèse selon laquelle le traitement US+MB appliqué sur une tumeur de cancer du sein murin (4T1) *in vivo* peut libérer de l'ATPe localement dans le but d'activer des réactions pro-inflammatoires pour l'immunothérapie du cancer. Dans ce mémoire, nous présentons la quantification du signal d'ATPe d'une culture de cellules 4T1, puis *in vivo* dans le muscle et dans une tumeur solide sous-cutanée chez la souris à la suite d'une stimulation par US+MB. Nos études démontrent que la thérapie US+MB libère de l'ATP *in vitro* et *in vivo*. En comparant le signal découlant de l'injection IM d'ATP avec celui du muscle et des tumeurs post-US+MB, nous pouvons conclure que le traitement US+MB libère une quantité d'ATPe supérieure à 250  $\mu\text{M}$ , ce qui est supérieur à la quantité d'ATPe dans un microenvironnement tumoral et qui persiste pour une durée d'au moins 60 min dans le muscle et 45 min dans la tumeur. La transfection stable de cellules MC38 (carcinome colorectal) à travers le gène PLenti-PmeLUC, codant la synthèse de luciférase sur la face externe de la membrane cellulaire, est explorée afin d'augmenter le rapport signal sur bruit en bioluminescence (annexe A). L'utilisation de POM-1 (inhibiteur pharmacologique de CD39) et l'utilisation de souris knockout du gène CD39 sont discutées pour la suite du projet afin d'inhiber la dégradation de l'ATP extracellulaire (Annexe B).

**Mots-clés :** Cancer, Ultrasons thérapeutiques, imagerie ultrasonore, ATP extracellulaire, bioluminescence, cavitation des microbulles.

## Abstract

Several cancer types proliferate due to their ability to express the negative regulatory markers of the immune system (PD-L1 and CD80/86) which inhibit the activation and proliferation of T cells. Inhibition of these pathways by antibodies (anti-PDL-1, anti-PD-1, anti-CTLA-4) can thus reactivate the immune system in some patients. Other signaling pathways are currently being explored, including purinergic signaling (ATP/adenosine) in the modulation of the tumor microenvironment. Extracellular Adenosine triphosphate (eATP) is classified as danger signal plays a critical role in the activation of the NLRP3 inflammasome, an important mediator of the innate immune response. Ultrasound (US) and microbubbles (MB) have been shown to release ATP in skeletal and cardiac muscle. Thus, we hypothesized that US+MB treatment in 4T1 breast cancer cells could locally activate pro-inflammatory responses by releasing an eATP in tumors for cancer immunotherapy. In this thesis, I present the quantification of the eATP signal after US+MB stimulation *in vitro* (4T1 cell culture), then in muscle and subcutaneous solid tumors in the mouse. Our studies demonstrate that US+MB treatment releases ATP both *in vitro* and *in vivo*. In comparison with the IM injection of ATP, we can conclude that US+MB released a large amount of ATP (>250  $\mu\text{M}$ ), which is more than the eATP concentration in the untreated tumor microenvironment, and which persisted for at least 60 min in muscle and 45 min in tumor. The stable transfection of MC38 cells (colorectal carcinoma) through the Plenti-PmeLUC gene, encoding the synthesis of luciferase on the external surface of cell membrane is explored to increase the signal to noise ratio in bioluminescence (see appendix A). The use of POM-1 (pharmacological inhibitor of CD39) and CD39 gene knockout mice to inhibit the degradation of eATP signal are discussed for the continuation of the project.

**Keywords:** Cancer, therapeutic ultrasound, ultrasound imaging, extracellular ATP, bioluminescence, cavitation of microbubble.

# Table des matières

Résumé .....	1
Abstract .....	2
Table des matières .....	3
Liste des tableaux .....	6
Liste des figures .....	7
Liste des sigles et abréviations .....	9
Remerciements .....	12
Introduction.....	13
Chapitre 1 Revue de la littérature .....	15
1.1 Prévalence du cancer et cancérogénèse .....	15
1.1.1 Prévalence du cancer .....	15
1.1.2 Cancérogénèse .....	15
1.2 Traitement du cancer par immunothérapie .....	18
1.2.1 Transfert adoptif des cellules (ACT) .....	18
1.2.2 Administration de cytokines.....	19
1.2.3 Inhibition des points de contrôle (IPC).....	19
1.3 Les ultrasons et les microbulles .....	21
1.3.1 Définition physique des ultrasons.....	21
1.3.2 Imagerie ultrasonore et ultrasons thérapeutiques .....	21
1.3.3 Structure, caractérisation et quantification des microbulles .....	23
1.4 L'ATP .....	28
1.4.1 Structure de l'ATP.....	28
1.4.2 Les voies de libération d'ATP à l'extérieur de la cellule.....	30

1.4.3 Les récepteurs purinergiques et la dégradation d'ATP par les NTPDases .....	31
1.4.4 Quantification d'ATP extracellulaire par imagerie de bioluminescence.....	33
1.4.5 Autres méthodes de quantification d'ATP .....	36
1.4.6 ATP, réponse immunitaire et cancer.....	37
1.5 Libération d'ATP par ultrasons et microbulles .....	39
1.5.1 Libération d'ATP par ultrasons .....	39
1.5.2 Libération d'ATP par ultrasons et microbulles .....	39
Chapitre 2 Hypothèses et objectifs .....	41
2.1 Hypothèses de travail .....	41
2.2 Objectifs .....	42
Chapitre 3 . Matériel et méthodes .....	43
3.1 Matériel .....	43
3.1.1 Modèle expérimental : les cellules 4T1.....	43
3.1.2 Réactifs .....	44
3.1.3 Appareillages .....	44
3.2 Méthodes .....	46
3.2.1 Quantification du signal d'ATPe après grattage des cellules 4T1 .....	46
3.2.2 Libération et quantification après US+MB <i>in vitro</i> .....	47
3.2.3 Quantification d'ATPe après US+MB dans le muscle.....	49
3.2.4 Contrôle positif d'ATPe dans le muscle.....	50
3.2.5 Libération et quantification d'ATPe dans les tumeurs après US+MB .....	50
3.2.6 Évaluation de la perfusion dans le muscle et dans les tumeurs .....	53
3.2.7 Méthodes statistiques.....	54
Chapitre 4 Résultats .....	56
4.1 Quantification d'ATPe <i>in vitro</i> .....	56

4.1.1 Test préliminaires .....	56
4.1.2 Quantification du signal d'ATPe après US+MB <i>in vitro</i> .....	57
4.2 Quantification d'ATPe dans le muscle .....	58
4.2.1 Évaluation de la perfusion dans le muscle .....	58
4.2.2 Quantification du signal d'ATPe dans le muscle après US+MB.....	60
4.2.3 Contrôle positif de quantification d'ATPe dans le muscle .....	60
4.3 Libération et quantification d'ATPe dans les tumeurs 4T1 après US+MB .....	61
4.3.1 Évaluation de la perfusion dans les tumeurs .....	61
4.3.2 Quantification du signal d'ATPe dans les tumeurs.....	64
Chapitre 5 Discussion .....	66
5.1 Discussion générale .....	66
5.1.1 Quantification d'ATPe <i>in vitro</i> .....	66
5.1.2 Quantification de la perfusion et du signal d'ATPe dans le muscle.....	68
5.1.3 Évaluation de la perfusion et quantification d'ATPe dans les tumeurs .....	69
5.2 Difficultés techniques rencontrées .....	71
5.2.1 Atténuation du signal de bioluminescence <i>in vivo</i> .....	71
5.2.2 Accès à la veine caudale pour l'administration de la luciférase et des microbulles.....	74
5.2.3 Analyse des paramètres de perfusion dans le muscle .....	74
5.3 Les prochaines étapes du projet .....	74
Conclusion .....	76
Références bibliographiques.....	77
Annexe A : Le système HEK-PLenti-PmeLUC .....	90
Annexe B : Mesure du signal d'ATPe en présence du POM-1.....	98
Annexe C : Article de conférence .....	100

## Liste des tableaux

Tableau 3.1 : Concentrations des différents réactifs utilisés pour mesurer le signal d'ATPe après grattage des cellules 4T1 .....	47
Tableau 3.2 : Conditions ultrasonores du test de vérification du dispositif expérimental in vitro. ....	47
Tableau 3.3 : Concentration des réactifs nécessaires à la quantification du signal d'ATP des cellules 4T1 in vitro après US+MB .....	49
Tableau 3.4 : Concentration et volume des réactifs utilisés pour la quantification du signal d'ATPe dans le muscle après US+MB .....	50
Tableau 3.5 : Récapitulatif des conditions ultrasonores du traitement US+MB dans le muscle...	50
Tableau 3.6 : Récapitulatif des concentrations des réactifs utilisés pour le contrôle positif de quantification d'ATPe dans le muscle .....	50
Tableau 3.7 : Concentration des différents réactifs utilisés lors de la quantification d'ATPe dans les tumeurs .....	52
Tableau 3.8 : Paramètres ultrasonores utilisées pour la quantification d'ATPe dans les tumeurs .....	52



## Liste des figures

Figure 1.1 : Différentes étapes de la cancérogénèse .....	16
Figure 1.2 : Processus d'immunoédition par les cellules cancéreuses .....	17
Figure 1.3 : Caractéristiques d'une onde ultrasonore. ....	21
Figure 1.4 : Imagerie ultrasonore d'une tumeur sous-cutanée. ....	22
Figure 1.5 : Structure d'une microbulle .....	23
Figure 1.6 : Cavitation des microbulles dans un champ ultrasonore.....	26
Figure 1.7 : Structure de l'adénosine triphosphate. ....	29
Figure 1.8 : Mécanisme de la réaction d'oxydation catalytique de la luciférine en présence d'ATP. .....	34
Figure 2.1 : Mécanisme proposé de libération d'ATP cellulaire après traitement par ultrasons et microbulles dans une tumeur de cellules de cancer du sein murin (4T1). ....	42
Figure 3.1 : Imagerie ultrasonore avec l'Acuson Sequoia. ....	45
Figure 3.2 : Schéma expérimental du traitement US+MB <i>in vitro</i> .....	47
Figure 3.3 : Imagerie microscopique des microbulles avant et après traitement US.. ....	48
Figure 3.4 : Tumeur 4T1 après injection sous-cutanée aux souris BALB/c.....	51
Figure 3.5 : Représentation schématique de la libération et de la quantification d'ATPe après US+MB dans le muscle et dans une tumeur 4T1 greffée à une souris BALB/c. ....	52
Figure 3.6 : Fonction exponentielle du retour des microbulles après leur implosion.. ....	54
Figure 3.7 : Sélection du ROI pour analyse de la perfusion dans le muscle.....	54
Figure 4.1 : Densité moyenne de photons du signal d'ATPe après grattage d'une population de cellules 4T1 à différentes concentrations de luciférase.....	56
Figure 4.2 : Densité moyenne de photons du signal d'ATPe après traitement US+MB d'une culture de cellules 4T1 <i>in vitro</i> .....	57
Figure 4.3 : Imagerie de la perfusion dans le muscle pendant le traitement US+MB .....	58
Figure 4.4 : Évaluation de la perfusion dans le muscle avant et après le traitement US+MB par "Burst replenishment imaging" .....	59
Figure 4.5 : Évaluation des paramètres de perfusion dans le muscle pré et post-US+MB .....	59
Figure 4.6 : Quantification du signal d'ATPe après US+MB dans le muscle.....	60
Figure 4.7 : Contrôle positif de quantification d'ATP dans le muscle.. ....	61

Figure 4.8 : Imagerie de la perfusion dans les tumeurs 4T1 pendant le traitement US+MB. ....	62
Figure 4.9 : Évaluation de la perfusion dans les tumeurs 4T1 avant et après le traitement US+MB par “Burst replenishment imaging”. ....	63
Figure 4.10 : Quantification des paramètres de perfusion dans les tumeurs 4T1 pré et post-US+MB. ....	64
Figure 4.11 : Quantification du signal d’ATPe après US+MB dans les tumeurs.....	65
Figure 5.1 : Mesure du signal de bioluminescence <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> des cellules PC3 exprimant la luciférase .....	72
Figure 5.2 : Test d’atténuation du signal de bioluminescence .....	73

## Liste des sigles et abréviations

ACT : *“Adoptive Cell Therapy”*

ADP: Adénosine diphosphate

ALL : *“Acute lymphocytic leukemia”*

AMP : Adénosine monophosphate

AR : *“Adenosine receptor”*

ATP : Adénosine triphosphate

ATPe : Adénosine triphosphate extracellulaire

CALHM1 : *“Calcium homeostasis modulator 1”*

CD : *“Cluster of differentiation “*

CP : Cellules compétentes

CPS : *“Contrast pulse sequencing”*

CTLA-4 : *“Cytotoxic T lymphocytes associated protein 4”*

DAMPs : *“Damage-associated molecular patterns “*

DMEM : *“Dulbecco’s Modified Eagle Medium “*

DSPC : 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

DSPE : 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine

GBF : Générateurs de basses fréquences

HIFU : *“High intensity focused ultrasound”*

HUVECs : *“ Human Umbilical Vein Endothelial Cells”*

IFN : Interférons

IL: Interleukines

IPC : Inhibiteur des points de contrôle

LIPUS : *“Low intensity pulsed ultrasound”*

LNH : Lymphome non- hodgkinien

MB : Microbulles

MC38 : *“Murine colon adenocarcinoma”*

NLRP3 : *“Nod-like receptor family, pyrin domain containing 3”*

NTPDases : *“Nucleoside triphosphate diphosphohydrolases”*

PANX-1 : Pannexine-1

PBS : *"Phosphate buffered saline"*

PD-1 : *"Programmed cell death 1"*

PD-L1 : *"Programmed cell death -ligand 1"*

PEG : Polyéthylène glycol

PmeLUC : *"Plasma membrane luciferase"*

POM-1 : Polyoxométallate-1

ROI : *"Region of interest"*

RPM : Rotation par minute

RPMI : *"Mammalian Cell Culture Media"*

SNARE: *"N-éthylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor"*

TILs : *"Tumor-infiltrating lymphocytes"*

TME : *"Tumor microenvironment"*

US : Ultrasons

VNUT : *"Anti-Vesicular Nucleotide Transporter"*

*Je dédie ce mémoire à mes parents, Demeze Francois et Tigountsa Lucienne*

## Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier mon directeur, **Dr François Yu**, qui m'a acceptée dans son laboratoire et a supervisé mes travaux tout au long de ma maîtrise. Ses enseignements, sa grande disponibilité, son sens de pédagogie et ses nombreuses rétroactions constructives m'ont permis d'acquérir une formation solide en recherche.

Je remercie également : Le **Dr Jean François Cailhier** mon parrain de maîtrise pour sa disponibilité et le temps qu'il a consacré à mes évaluations au comité de parrainage. La coordonnatrice du laboratoire LBUM **Dre Louise Allard**, pour son soutien, ses conseils et surtout pour ses multiples rétroactions lors de la rédaction de ce mémoire. Les **membres du LBUM** pour leur grande contribution dans mon processus d'apprentissage à travers les réunions de laboratoire auxquelles j'ai pu participer. L'**équipe technique de l'animalerie** pour l'expertise apportée à la réalisation de mes expériences. J'exprime exceptionnellement ma gratitude envers Mélissa Marcoux pour tout le temps consacré à mon égard. Tous les **membres du laboratoire MTL** pour leur contribution à mon apprentissage. Je remercie spécialement Bala et Sepideh pour leurs patiences et leurs enseignements enrichissants. Mes **amis** et mes **proches** pour tous les bons moments passés ensemble ces deux dernières années.

Pour terminer, j'exprime ma gratitude envers toute **ma famille** et spécialement envers mes parents, mes frères (Ghislain, Aurélien, Joël) et mes sœurs (Francine, Christele, Vickie, Clarine, Floriane, Elvira) pour tout le soutien moral et financier qu'ils m'ont accordé. Je remercie mon époux Serge Gael Dontsa pour toute son affection et ses encouragements.

# Introduction

Le cancer est un problème mondial de santé publique. Au Canada, on estime qu'en 2020, on diagnostiquera 225 800 nouveaux cas de cancer et que 83 300 personnes décéderont de cette maladie [1]. L'immunothérapie du cancer a connu un succès fulgurant dans les dernières décennies, notamment avec le développement des inhibiteurs des points de contrôle. Utilisé en complément avec d'autres thérapies anti-cancer telles que la chimiothérapie et la radiothérapie, le traitement du cancer par l'immunothérapie s'avère de plus en plus prometteur. Cependant, certains cancers solides ne répondent pas au traitement disponible en clinique. Le mécanisme à l'origine de cette non-réponse n'est pas encore complètement élucidé. Toutefois, certaines études montrent chez les non-répondants une résistance intrinsèque ou acquise après une réponse initiale [2], [3]. En effet, dans le cas de la résistance acquise, des mutations géniques au niveau du CMH1 (complexe majeur d'histocompatibilité de classe I) et de l'interféron- $\gamma$  conduisent à une perte de la fonction des cellules T tueuses naturelles [3]. Ainsi, une voie complémentaire de restauration de la réponse immunitaire est la voie de signalisation purinergique par le biais de l'adénosine triphosphate extracellulaire (ATPe), un médiateur de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires et de la prolifération des cellules immunitaires (cellules tueuses naturelles, macrophages).

L'ATPe est la molécule en amont de la voie de signalisation purinergique et est classifié parmi les signaux de danger. La liaison de l'ATPe à son récepteur P2X7 contribue à l'activation de l'inflammasome NLRP3 (*Nod-like receptor protein family pyrin domain containing 3*), un médiateur clé des réactions pro-inflammatoires [4], [5]. Dans un tissu sain, la concentration d'ATP intracellulaire est de 5-10 mM alors que celle à l'extérieur de la cellule est de 10-100 nM [6]. Bien que la concentration d'ATPe extracellulaire dans le micro-environnement tumoral soit plus élevée que celle dans les tissus sains (100  $\mu$ M) [6], les cellules tumorales expriment les marqueurs membranaires tels que le CD39 et le CD73 qui dégradent l'ATPe en adénosine, un puissant médiateur anti-inflammatoire [7]. Il a été démontré que l'inhibition des CD39 et/ou des CD73 entraîne une réponse immunitaire complémentaire à la thérapie anti-PD1/PD-L1 [8]. Ainsi, augmenter la concentration d'ATPe dans une tumeur pourrait produire une réponse anti-inflammatoire et par suite contribuer à l'immunothérapie du cancer.

Les microbulles (MB) sont des molécules de gaz de très petite taille (0.5-10  $\mu\text{M}$ ) encapsulées dans une membrane de nature lipidique, protéique ou polymérique. Sous l'effet mécanique des ultrasons (US) de haute pression, les microbulles oscillent et entrent en cavitation inertielle. Il a été démontré que la cavitation inertielle des microbulles entraîne une libération d'ATP, suivi d'une augmentation de la perfusion dans le muscle [9]. Cependant, à notre connaissance, aucune étude focalisée sur la libération d'ATP après stimulation des MB par US (US+MB) dans une tumeur n'a été publiée à l'heure actuelle.

L'objectif général de ce projet est la quantification du signal d'ATP extracellulaire résultant de la stimulation des microbulles par ultrasons dans une tumeur *in vivo*. Une approche à la fois thérapeutique (ultrasons à haute pression) et diagnostique (visualisation en temps réel de la cavitation des microbulles) sera utilisée pour libérer localement de l'ATP dans une tumeur de cancer du sein murin (4T1) greffée à un modèle de souris syngénique BALB/c femelle. Le premier objectif de ce travail est la quantification du signal d'ATPe dans une culture de cellules 4T1 *in vitro* après US+MB. Le second objectif consiste en la en quantification du signal d'ATPe dans le muscle post-US+MB. Enfin, le troisième objectif est de quantifier le signal d'ATPe dans les tumeurs 4T1 *in vivo* après traitement US+MB. Puisque l'augmentation d'ATPe post-US+MB est un médiateur clé de la vasodilatation dans le muscle [9], l'évaluation de la perfusion dans le muscle et dans les tumeurs après le traitement US+MB a également été réalisée.

Ce manuscrit est subdivisé en 5 chapitres. Dans le chapitre 1 une revue de la littérature sur l'immunothérapie, les ultrasons, les microbulles et l'ATP sera décrite. Le chapitre 2 sera consacré à la description de l'hypothèse de recherche et des objectifs du projet. Le matériel et la méthode utilisée pour libérer (les ultrasons thérapeutiques, imagerie et ultrasonore) et quantifier (bioluminescence) l'ATPe seront décrits dans le chapitre 3. Dans le chapitre 4, les résultats d'évaluation de la perfusion et d'imagerie du signal d'ATPe seront présentés. Une discussion générale du manuscrit sera présentée au chapitre 5.



# Chapitre 1 Revue de la littérature

## 1.1 Prévalence du cancer et cancérogénèse

### 1.1.1 Prévalence du cancer

En 2016, on dénombrait 17.2 millions de cas de cancer dans le monde avec 8.9 millions de décès [10]. Au Canada, on estime qu'en 2020, on diagnostiquera 225800 nouveaux cas de cancer avec 83300 décès [1]. Selon ces estimations, le cancer du poumon est le plus prévalent (29800 cas) suivi du cancer du sein (27400 cas), du cancer colorectal (26900 cas) et celui de la prostate (23300 cas) [1]. À l'exception du cancer du sein et de celui de la thyroïde, les hommes sont majoritairement affectés par rapport aux femmes. On note le vieillissement de la population comme facteur expliquant la haute incidence et prévalence du cancer au Canada. On estime que 90% de cas sont observés chez les 50 ans et plus [1]. L'environnement, la génétique et l'alimentation sont également d'autres facteurs de risque de développement du cancer.

### 1.1.2 Cancérogénèse

Le cancer est une maladie causée par le développement et la division incontrôlée de différents types cellulaires pouvant se regrouper en agglomérat de cellules (tumeur). Lorsque les tumeurs se délocalisent et se disséminent dans les tissus voisins, ils forment des métastases. La Figure 1.1 décrit le passage d'une cellule normale à une cellule cancéreuse métastatique.

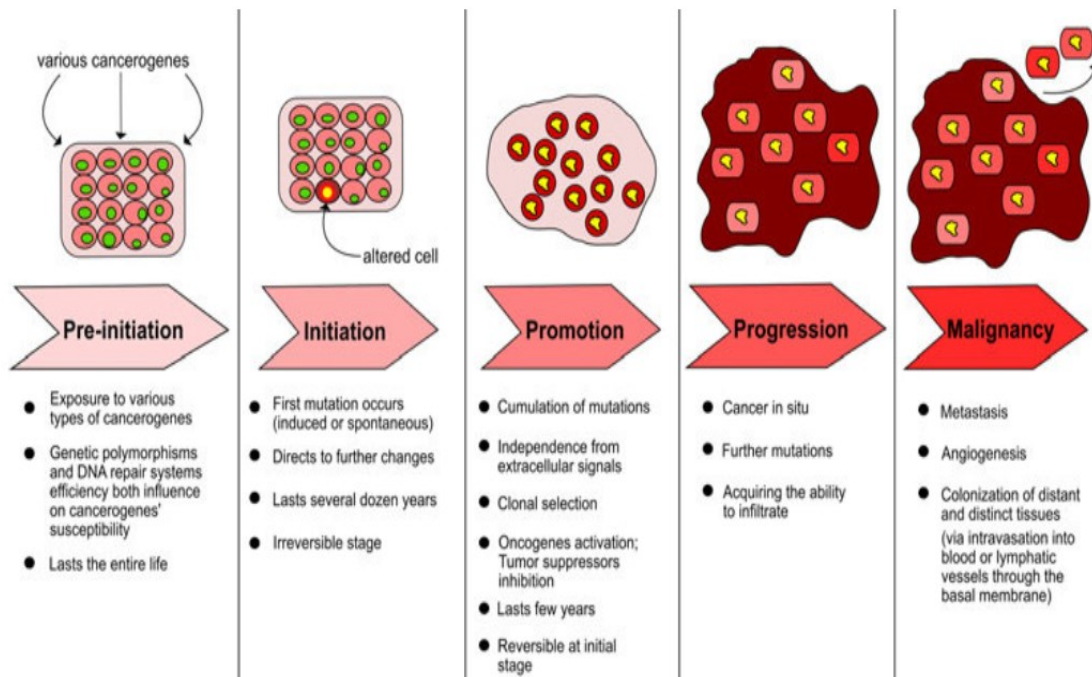


Figure 1.1 : Différentes étapes de la cancérogénèse. Adapté de Kołat et al., 2019 [11]

La formation d'une cellule cancéreuse est initiée par des agents carcinogènes (radiations ionisantes, virus) et/ou des mutations génétiques qui altèrent la structure et la fonction de l'ADN. L'altération de l'ADN entraîne une transformation néoplasique et une expansion clonale menant à la formation d'une tumeur primaire. La progression tumorale est marquée par l'accumulation de mutations et par l'expression de nouveaux gènes qui permettent la migration et l'infiltration des cellules dans des sites métastatiques. Pendant la phase de métastase, on observe une invasion caractérisée par une dissémination des cellules tumorales à travers les voies lymphatique ou sanguine [11]. Étant donné que le développement d'un cancer se fait en moyenne sur 20 ans et que chaque organisme est doté d'un système de défense lui permettant de détruire le non-soi (cellules cancéreuses), comment expliquer que les cellules cancéreuses parviennent à proliférer et devenir néfaste pour l'hôte ?

Le concept de l'immunoédition met en évidence le rôle du système immunitaire sur le matériel génétique des cellules tumorales. Le processus d'immunoédition se définit en trois étapes: l'élimination, l'équilibre et l'échappement (Figure 1.2).

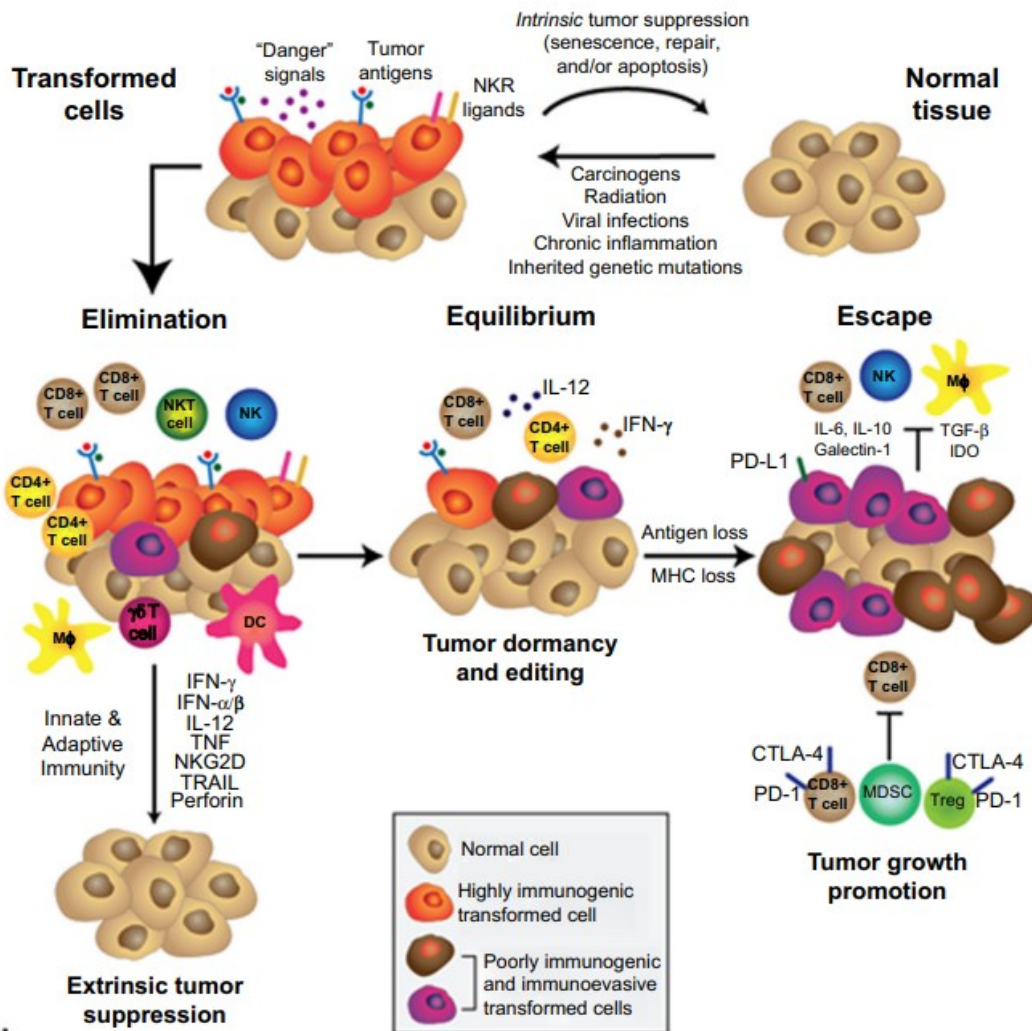


Figure 1.2 : Processus d'immunoédition par les cellules cancéreuses. Adapté de Teng et al., 2013 [12]

Pendant la première phase de l'immunoédition qui est celle de l'élimination, l'immunité à médiation cellulaire et l'immunité à médiation humorale agissent en synergie pour détruire les cellules cancéreuses. La prolifération des cellules immunitaires est fortement liée à l'action des signaux de danger extracellulaires tels que L'ATP extracellulaire qui entraînent la libération des cytokines pro-inflammatoires et la prolifération des cellules immunitaires. Les cellules présentatrices d'antigènes (macrophages, cellules dendritiques), les lymphocytes (CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>) et les cellules T tueuses naturelles forment un cocktail immunitaire qui concoure à une suppression extrinsèque de la tumeur [12]. Par ailleurs, si une des cellules cancéreuses résiste à l'immunosuppression, un équilibre s'installe entre les cellules immunitaires et les cellules

cancéreuses. Les cellules T et les cytokines assurent le maintien de cet équilibre. La phase d'échappement se produit lorsqu'un déséquilibre s'installe à cause de l'expansion clonale de la cellule cancéreuse résistante et l'arrêt de la prolifération des cellules immunitaires. À cette étape, les cellules cancéreuses développent des marqueurs (CD80/86, PD-L1) de régulation négative pour déjouer le système immunitaire [12]. Un autre mécanisme sous-jacent de l'arrêt de la prolifération des cellules immunitaires est la dégradation des signaux de danger. Par exemple, l'ATP extracellulaire sous l'effet des enzymes membranaires (CD39 et CD73) produit l'adénosine, un puissant médiateur des réactions anti-inflammatoires.

## **1.2 Traitement du cancer par immunothérapie**

L'immunothérapie du cancer peut être utilisée comme monothérapie ou en association avec d'autres thérapies anti-cancer telles que la chimiothérapie, la radiothérapie ou la chirurgie. Elle est basée sur la stimulation et le déclenchement des réponses immunitaires pour la destruction des cellules cancéreuses. Tel que décrit précédemment dans la Figure 1.2, les cellules cancéreuses peuvent générer un environnement immunosupprimé en empêchant entre autres l'action des lymphocytes T. Plusieurs approches d'immunothérapies visent ainsi la restitution de la réponse immunitaire engendrée par ces cellules (lymphocytes T). Il s'agit du transfert adoptif des cellules, de l'administration des cytokines et de l'inhibition des points de contrôle.

### **1.2.1 Transfert adoptif des cellules (ACT)**

La thérapie par ACT consiste à prélever par aphérèse les lymphocytes T du patient, à activer ces dernières par des anticorps (anti-CD3) et à y effectuer une transduction par des rétrovirus ou des lentivirus qui codent pour le récepteur aux antigènes chimériques (CAR). Les cellules conditionnées sont ensuite re-infusées au patient qui développera une réponse immunitaire solide et efficace contre les cellules cancéreuses. La thérapie par ACT est une stratégie prometteuse pour le traitement de la leucémie lymphoïde chronique (ALL) et le lymphome non-Hodgkinien (LNH). Un taux de rémission complète de 50% chez des patients atteints de LNH, traités par ACT et ayant préalablement reçu de la chimiothérapie a été démontrée [13]. Plus tard en 2017, le même groupe a démontré un taux de réponse de 71% de la thérapie par ACT chez des patients atteints d'ALL et préalablement traités par chimiothérapie [14]. Cependant, l'inconvénient majeur de la thérapie par ACT est la toxicité connexe à la

libération des cytokines (troubles neurologiques, fièvre, élimination des cellules non cancéreuses).

### **1.2.2 Administration de cytokines**

Les cytokines sont des protéines de faible poids moléculaire libérées dans le milieu extracellulaire en réponse à un stimulus. Elles jouent un rôle majeur dans la prolifération des cellules immunitaires lors des réactions anti-inflammatoires et pro-inflammatoires. L'administration des cytokines dans la lutte anti-cancer est basée sur l'infusion au patient de cytokines solubles capable de déclencher une réaction immunitaire pro-inflammatoire. L'interleukine-2 (IL-2) et l'interféron  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) sont des cytokines pro-inflammatoires qui ont connu le plus de succès en clinique. L'IL-2 infusée en fortes doses intraveineuses (720000 UI/Kg) toutes les 8h pendant 5 jours chez des patients atteints de mélanome métastatique a connu un taux de succès de 16% [15]. Quant à l'IFN- $\alpha$ , il est utilisé en clinique dans le traitement de la leucémie à tricholeucocytes, avec un taux de réponse totale de 5% et de réponse partielle de 70% [16]. Les effets secondaires associés à l'infusion des cytokines sont principalement la fièvre, les maux de tête, les troubles gastro-intestinaux, la fatigue, les œdèmes et les troubles hépatiques [15], [17]. Les cytokines telles que l'IL-1 $\beta$  ou l'IL-18 qui sont en aval de l'activation de l'inflammasome NLRP3 ne sont pas encore utilisées en clinique, mais des recherches précliniques et cliniques voient de plus en plus le jour. Dans le cas de l'IL-18, une infusion en intraveineuse (0.01 et 0.1 mg/kg) tous les 28 jours a démontré une réponse très limitée, mais une bonne tolérance chez des patients atteints de mélanomes [18].

### **1.2.3 Inhibition des points de contrôle (IPC)**

La thérapie basée sur l'IPC dont CTLA-4 et PD-1 a connu un succès fulgurant dans les dernières décennies et a valu le prix Nobel à James Allison et Tasuku Honjo en 2018. Le récepteur PD-1 (*programmed cell death 1*) est une protéine membranaire de type-1 exprimée de façon inductible par les cellules présentatrices d'antigènes (cellules dendritiques, monocytes), les cellules B, les cellules T (CD4, CD8) et les cellules T régulatrices [19], [20]. PD-1 possède 2 ligands : PD-L1 (ou CD274) et PD-L2 (ou CD273). Ces ligands sont exprimés de manière inductible et constitutive par les cellules présentatrices d'antigènes, les cellules endothéliales, les îlots de Langerhans et les cellules cancéreuses. La liaison entre PD-1 et son ligand entraîne une inhibition

des kinases impliquées dans l'activation du récepteur des cellules T (TCR) [21]. Le nivolumab, un anticorps monoclonal humain dirigé contre PD-1, a montré un effet thérapeutique dans le traitement du mélanome métastatique avec une survie sur 5 ans de 44% des patients ayant suivi la thérapie [22]. Garon et al. ont observé un taux de réponse de 19.4% chez 495 patients atteints du cancer du poumon non à petites cellules ayant reçu du pembrolizumab (anticorps monoclonal, humanisé dirigé contre PD-1) [23].

Le récepteur CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*), aussi connu sur le nom de CD 152 (cluster de différenciation 152) est une protéine membranaire exprimée de manière constitutive par les cellules T régulatrices, les CD8 et les CD4 [24]. CTLA-4 est un homologue du récepteur CD28, d'où sa capacité à réduire l'activation des cellules T après liaison au récepteur CD80/86 [25]. L'ipilimumab est un anticorps monoclonal humain dirigé contre CTLA-4 qui inhibe la liaison entre CTLA-4 et les récepteurs CD80/86 et entraîne une diminution de la prolifération des cellules T régulatrices. L'ipilimumab est approuvé en clinique pour le traitement du mélanome métastatique [26]. On note également une augmentation de la survie sur 5 ans chez 52% des patients atteints du mélanome avancé et ayant reçu une combinaison de nivolumab et ipilimumab [22]. Les effets secondaires associés à la thérapie basée sur l'IPC sont majoritairement une diminution de l'appétit, la fatigue, les troubles hépatiques pulmonaires et cardiaques [23], [27].

Malgré le succès qu'a connu l'immunothérapie en clinique (monothérapie ou en combinaison avec d'autres thérapies comme la chimiothérapie), une grande partie des patients répondent partiellement (résistance adaptative) ou pas du tout (résistance innée) au traitement [28]. Par exemple, la thérapie par inhibition de points de contrôle a connu un taux de succès général de 12.46% en 2018 [29]. Chez les non-répondants, on note parfois une forte expression de cellules T dysfonctionnelles résistant à la thérapie anti PD-1 (PD-1+CD38<sup>hi</sup>CD8<sup>+</sup>) [30], le CD38 étant un marqueur tumorigénique du microenvironnement tumoral. Ainsi, trouver de nouvelles cibles thérapeutiques pouvant être utilisées en complémentarité avec celles existantes en clinique pourrait contribuer à l'amélioration de l'efficacité de l'immunothérapie. Des recherches récentes montrent que la voie de signalisation purinergique dans le microenvironnement tumoral, et plus précisément celle des récepteurs adénosinergiques, pourrait être une cible potentielle pour l'immunothérapie du cancer [31]–[33].

## 1.3 Les ultrasons et les microbulles

### 1.3.1 Définition physique des ultrasons

Les ultrasons (US) sont des ondes mécaniques de hautes fréquences ( $> 20$  kHz) non audibles par l'oreille humaine, qui se propagent en milieu liquide ou solide et faiblement en milieu gazeux. En physique médicale, les US sont générés à l'aide d'un transducteur qui contient un élément piézoélectrique de structure cristalline, capable de convertir l'énergie électrique en énergie mécanique. Un champ ultrasonore est défini par la pression acoustique exprimée en pascals (Pa). L'onde ultrasonore se propage principalement de façon longitudinale par une alternance de zones de compression (haute pression) et de raréfaction (basse pression). Les ondes ultrasonores sont caractérisées par (Figure 1.3) [34] :

- L'amplitude (A) : la variation maximale de la pression acoustique;
- La longueur d'onde ( $\lambda$ ) : la distance séparant 2 maxima consécutifs;
- La fréquence (f) : le nombre de cycles par seconde;
- La période (T) : le temps requis pour l'accomplissement d'un cycle

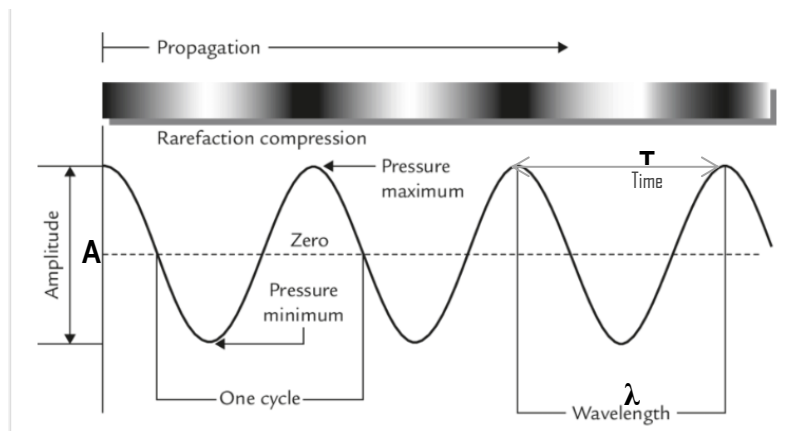


Figure 1.3 : Caractéristiques d'une onde ultrasonore. Adapté de Su et al., 2008 [34]

### 1.3.2 Imagerie ultrasonore et ultrasons thérapeutiques

#### 1.3.2.1 Imagerie ultrasonore

En imagerie ultrasonore, une onde émise par un transducteur se propage dans un tissu, et est réfléchiée ou diffusée lorsqu'elle rencontre des différences d'impédances acoustiques. La portion rétrodiffusée est recaptée par le transducteur, transduite inversement en signal électrique, puis enregistrée sous forme d'images. Les ultrasons utilisés en imagerie médicale ont

une fréquence comprise entre 1 et 50 MHz. Il existe plusieurs modes en imagerie ultrasonore: (1) le mode Doppler qui permet de mesurer la vitesse et la déformation des structures (pour imager les vaisseaux sanguins et le cœur); (2) le mode B (*Brightness*) qui produit une image dont le contraste de chaque point est fonction de l'amplitude, permet d'étudier l'anatomie des tissus ; (3) le mode M (motion) permet de visualiser les structures en fonction de la profondeur de ces dernières et du temps [35]. L'imagerie en mode B est la plus utilisée en clinique notamment en obstétrique, en échocardiographie, en physiothérapie et en cancérologie. Ce mode permet de détecter et de visualiser la morphologie des cancers comme le mélanome (Figure 1.4a). Avec une injection de microbulles (agent de contraste), le mode B est souvent utilisé en combinaison avec le mode cadence CPS (*Contrast pulse sequencing*) afin d'améliorer la visualisation de la perfusion d'un tissu d'intérêt. Avant infusion, contrairement au mode B, le tissu d'intérêt n'est pas perceptible (Figure 1.4b). Après l'infusion intraveineuse, au fur et à mesure que les microbulles remplissent les vaisseaux sanguins, une délimitation claire se dessine à l'échographe (Figure 1.4c et 1.4d).

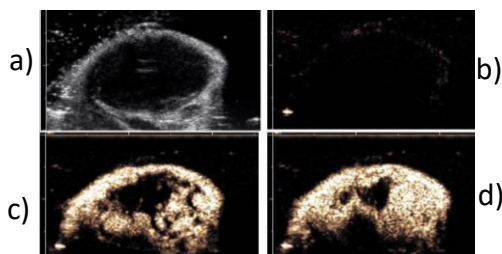


Figure 1.4 : Imagerie ultrasonore d'une tumeur sous-cutanée : a) Imagerie en mode B; b) Imagerie en mode CPS avant injection des microbulles; c) Imagerie en mode CPS, 5 secondes après injection des microbulles; d) Imagerie en mode CPS 30 secondes après administration des microbulles [36].

### 1.3.2.2 Les ultrasons thérapeutiques

L'utilisation des ultrasons à des fins thérapeutiques repose principalement sur deux techniques: le HIFU (*High Intensity Focused Ultrasound*) et le LIPUS (*Low-Intensity Pulsed Ultrasound*). Le HIFU est une approche thérapeutique peu invasive émergente dans le traitement du cancer [37]. Son principe est basé sur la conversion de l'énergie acoustique en chaleur (effet thermique) avec une élévation de température pouvant aller jusqu'à 80°C et en quelques secondes. la température augmente en fonction du coefficient d'absorption, de la taille et de la forme tissu et peut entraîner une nécrose coagulante irréversible (mort cellulaire accidentelle) [37]. Utilisé généralement à une intensité de 10-10000 W/cm<sup>2</sup>, le HIFU peut aussi causer plusieurs



bio-effets mécaniques à l’instar du stress cellulaire, de la cavitation et la force de radiation. Le HIFU est utilisé en clinique pour la thérapie du cancer métastatique des os, de l’utérus et la prostate [38]. Finalement, une dernière variante du HIFU consiste en des impulsions de forte amplitude mais de très courte durée, provoquant des effets essentiellement mécaniques (sans augmentation de température) nommée histotripsy. Des pulses de l’ordre de 80 MPa sont alors focalisés dans les organes visés [39].

Le traitement à travers les ultrasons pulsés à faible intensité (LIPUS) est basé sur la conversion de l’énergie acoustique des ondes mécaniques en signal biochimique à travers des mécanorécepteurs [40]. Comparé au HIFU, le LIPUS a une faible intensité ultrasonore ( $30 \text{ mW/cm}^2$ ), mais peut entraîner des effets biologiques considérables. En plus de son rôle prépondérant dans la stimulation des ostéoblastes et le remodelage osseux, le LIPUS est de plus en plus utilisé dans les essais *in vitro*, pré-cliniques et cliniques pour traiter le cancer. Kondo et al. ont démontré une augmentation de l’effet thérapeutique (diminution de la viabilité) de la doxorubicine dans une suspension de lymphomes lorsque cette dernière était également traitée par le LIPUS [41]. Dans le même ordre d’idée, Carina et al. ont démontré *in vitro* l’effet inhibiteur du LIPUS sur l’activité ostéoclastique des métastases du cancer du sein dans les os [40].

### 1.3.3 Structure, caractérisation et quantification des microbulles

#### 1.3.3.1 Structure des microbulles

Les microbulles sont des molécules de gaz de très petite taille (diamètre compris entre  $0.5$  et  $10 \mu\text{m}$ ) encapsulées dans une membrane ( $1$  à  $200 \text{ nm}$ ) de nature lipidique, protéique ou polymérique (Figure 1.5) [42].

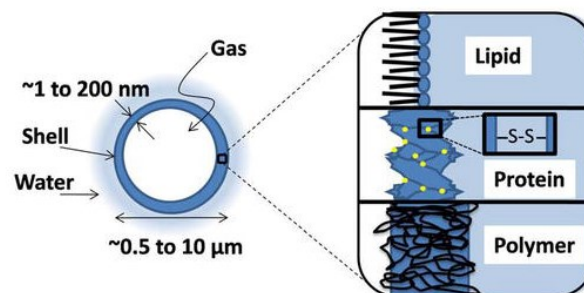


Figure 1.5 : Structure d’une microbulle. Adapté de Sonaye et al., 2019 [42]

Les microbulles sont généralement administrées par voie intraveineuse comme traceur en imagerie médicale. Pour être fonctionnelles, elles doivent présenter une stabilité dans le sang après injection. Cette stabilité dépend de la nature du gaz utilisé et de la composition de la membrane. Le gaz idéal doit : être inerte, avoir une forte pression vapeur afin d'établir un gradient de pression permettant de maintenir le gaz dans la microbulle, avoir une faible solubilité dans le sang pour permettre la persistance des microbulles en circulation [43]. L'azote et les perfluorocarbones sont les gaz couramment présents dans les microbulles utilisées en clinique et en recherche.

La membrane de nature lipidique est la plus sollicitée dans les différentes formulations disponibles en clinique. Elle est composée d'une monocouche de phospholipides dont les têtes hydrophiles sont orientées vers l'extérieur de la microbulle alors que les queues hydrophobes sont tournées vers l'intérieur. Les groupements acyls des phospholipides dans les différentes formulations sont: distearoyl-phosphatidylcholine, dipalmitoyl-phosphatidyl choline, 1,2-distearyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine. La membrane lipidique contient également des groupements phosphatidyl éthylène glycol (PEG) liés de manière covalente avec les phospholipides. La pégylation empêche la coalescence des microbulles par répulsion stérique: une faible quantité de PEG (environ 5 % de la formulation totale) permet d'augmenter la stabilité et donc la concentration des microbulles en circulation [44]. Les microbulles de nature lipidique produisent généralement un bon rendement avec une grande échogénicité [45]. Definity (Lantheus Medical Imaging, N. Billerica, MA) et Sonovue (Bracco, Milan, Italie) sont les microbulles lipidiques les plus utilisées en clinique.

La membrane de nature protéique est constituée de protéines amphipatiques, riches en ponts disulfures (S-S) provenant de l'interaction des groupements thiols des résidus cystéines. Ces liaisons assurent la rigidité de la membrane et diminuent la surface de diffusion du gaz. Les microbulles de nature protéique présentent une grande surface tensique, une grande stabilité et se dissolvent facilement sur l'effet de la pression acoustique. Par exemple, l'Albunex (Molecular Biosystem Inc, San Diego, États-Unis) dont la membrane est constituée d'albumine, peut rester stable pendant 2 ans [46]. Le lysozyme est également utilisé dans différentes formulations, car sa structure quaternaire est riche en ponts disulfures. L'orientation des groupements thiols dans la membrane facilite l'interaction microbulle-cellule, ce qui favorise l'absorption des microbulles

tout en gardant l'intégrité de la membrane de la cellule [47]. Les microbulles dont la membrane contient du lysozyme (150-200 nm) persistent plus longtemps en circulation à cause de leur rigidité et biocompatibilité.

La membrane de nature polymérique est constituée d'une couche épaisse de polymères solides et dégradables (100 à 200 nm). Ces polymères établissent des liaisons entre eux pour former une structure dense et plus résistante que les membranes lipidiques et protéiques [46]. Sonavist (SH U563A, Schering AG, Berlin, Germany) est un exemple de microbulles de nature polymérique. Sa membrane est constituée de cyanoacrylate.

#### 1.3.3.2 Caractérisation des microbulles

La caractérisation des microbulles permet de déterminer la taille et la distribution de celles-ci afin de prédire leur stabilité. Le Coulter Multisizer III est un appareil permettant la quantification des microbulles. Son principe est basé sur le changement d'impédance électrique causé par l'électrolyte (contient les microbulles) lors de son passage dans un orifice [48]. La différence d'impédance qui en résulte est proportionnelle au volume des microbulles dans la suspension [49]. L'imagerie par microscopie est une méthode alternative de comptage des microbulles. Elle permet de visualiser les microbulles individuellement et d'en déduire leur distribution en lumière blanche et en épifluorescence [48].

#### 1.3.3.3 Cavitation et effets biologiques connus des microbulles

Les microbulles sont des agents de contraste, qui sous l'effet des ondes acoustiques peuvent subir 2 phénomènes majeurs : la cavitation stable et la cavitation inertielle. La pression négative et la fréquence sont les paramètres déterminants du phénomène qui se produira. En effet, l'excitation des microbulles à une fréquence correspondante à celle de leur résonance entraîne l'apparition de plusieurs harmoniques de fréquences différentes et en alternance de raréfaction et de compression. La cavitation stable se produit sous l'effet d'une faible pression (< 0.35 MPa) et sans déformation majeure. La cavitation inertielle se produit sous haute pression (> 0.35 MPa) : les microbulles oscillent violemment, déstabilisent leurs membranes, implosent et s'assemblent en des corps gazeux plus volumineux (coalescence), devenant de plus en plus instables ( Figure 1.6) [50].

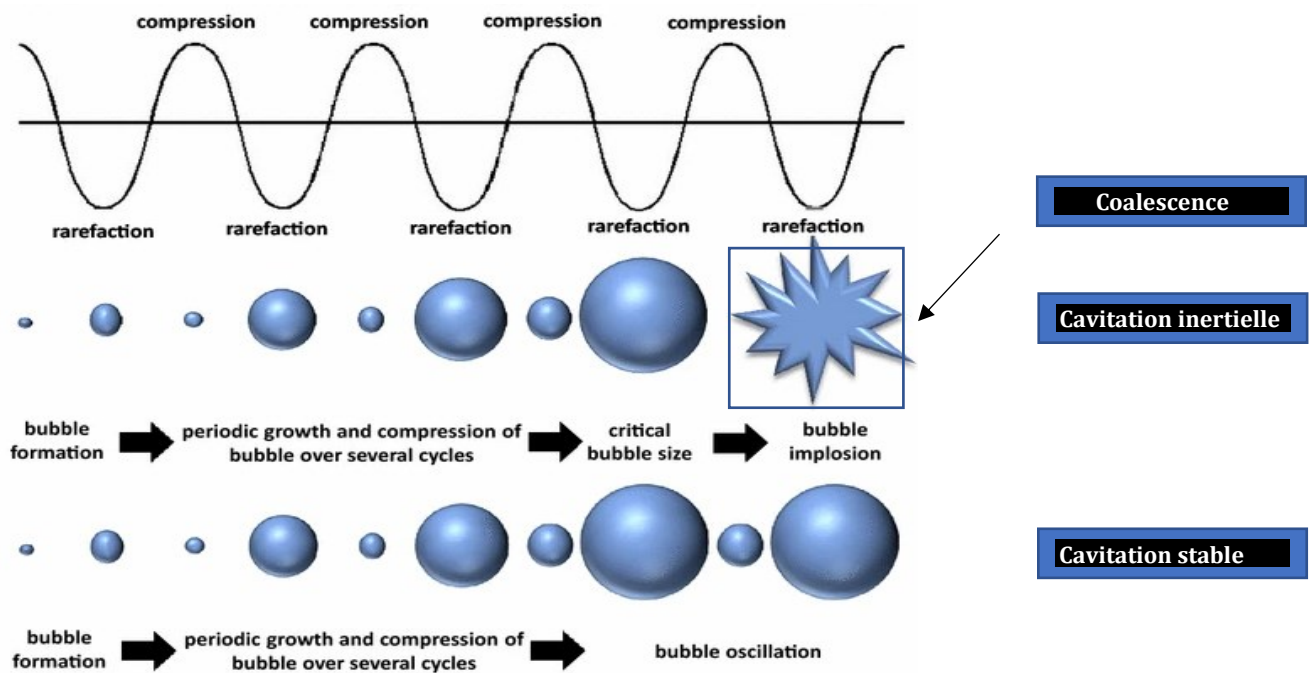


Figure 1.6 : Cavitation des microbulles dans un champ ultrasonore. Adapté de Izadifar et al., 2019 [50].

La cavitation des microbulles sous l'effet des ultrasons peut entraîner la sonoporation (formation d'un pore transitoire dans la membrane cellulaire). Lorsque le pore a une surface  $< 30 \mu\text{m}^2$ , il peut se réparer et se refermer (sonoporation transiente), alors qu'un pore  $> 100 \mu\text{m}^2$  ne se referme pas, entraînant la mort de la cellule [51]. La sonoporation est influencée à la fois par l'amplitude et la pression ultrasonore permettant l'oscillation des microbulles [52]. En effet, une corrélation entre la taille des pores formés et la pression ultrasonore a été démontrée après stimulation des microbulles par ultrasons dans une culture cellulaire *in vitro* [53]. La sonoporation peut engendrer la diffusion des ions à travers la membrane en l'occurrence l'influx des ions  $\text{Ca}^{2+}$  et l'efflux des ions  $\text{K}^+$  et par conséquent la dépolarisation de la membrane plasmique. effet, la sonoporation irréversible entraîne une dépolarisation permanente de la membrane alors que la sonoporation réversible entraîne une dépolarisation permanente ou temporaire de la membrane [54]. . Par ailleurs, la sonoporation permet également l'absorption des molécules exogènes notamment les agents thérapeutiques. Dans la thérapie génique par exemple, la sonoporation de la membrane permet de faciliter la livraison locale des acides nucléiques afin de moduler l'expression génique [55]–[57]. La sonoporation permet également la diffusion des molécules endogènes. Belcik et al., ont décrit la microporation comme mécanisme clé de la libération d'ATP à la suite du traitement ultrasons et microbulles dans une culture cellulaire *in vitro* [9]. Aussi, les

travaux de Hussein et al., démontrent une libération du contenu cytoplasmique et lysosomal après stimulation des microbulles par ultrasons sur la membrane cellulaire *in vitro* [58].

Hormis la sonoporation, l'activité cavitationnelle des microbulles peut également contribuer à l'augmentation de la perméabilité vasculaire de la barrière hémato-encéphalique [59], [60]. L'ouverture locale et transiente de la barrière hémato-encéphalique entraîne la surexpression des gènes qui codent pour les marqueurs inflammatoires [60], [61].

Dans le cadre de l'immunothérapie du cancer, les effets des microbulles stimulées par ultrasons ne sont pas encore très bien élucidés. En effet, une des pistes envisagées pour l'amélioration de la thérapie basée sur l'IPC consiste en l'application d'une thérapie ciblée ultrasons et microbulles en plus d'une injection d'anticorps anti-PD-L1. Ainsi, l'augmentation de la perfusion par microbulles stimulées par ultrasons dans un modèle de cancer du côlon (MC38) *in vivo* a démontré une amélioration de la thérapie anti-PD-L1 marquée par une augmentation locale de la concentration de l'anticorps anti-PD-L1 et une forte infiltration des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> [62]. Parallèlement, le traitement ultrasons et microbulles peut potentiellement améliorer l'immunothérapie en augmentant l'accumulation d'anticorps dans la tumeur, notamment en ciblant la voie de signalisation purinergique. En effet, les études de Amate et al. montrent une extravasation et une accumulation de l'anticorps dirigé vers le CD73 (enzyme dégradant l'AMP en adénosine) après stimulation des microbulles par ultrasons dans une tumeur solide 4T1 *in vivo* [63].

#### 1.3.3.4 Utilisation des microbulles en clinique

Les microbulles sont très utilisées en imagerie médicale. La dose utilisée en échocardiographie est de  $10^9$ - $10^{10}$  microbulles dans un volume de 1 à 2 ml [45]. La demi-vie des microbulles en circulation est de 5-10 min [64]. Après injection, les microbulles sont éliminées de la circulation par le système immunitaire. Elles sont premièrement fixées par le système du complément (opsonisation) puis la membrane est digérée par les cellules de Kupffer. Le gaz est ensuite excrété lors des échanges pulmonaires.

##### - **Sur le plan diagnostic**

En imagerie, les microbulles sont utilisées pour opacifier la paroi du myocarde. Elles permettent d'amplifier le signal Doppler du sang afin de visualiser la vascularisation et identifier les anomalies [65]. En cancérologie, les microbulles stimulées par ultrasons permettent le guidage

et l'évaluation post-traitement de plusieurs cancers dont le cancer du foie [66]. En effet, l'infusion des microbulles après ablation thermique d'une tumeur hépatique permet de détecter la présence des résidus tumoraux perfusés au site d'ablation [66]. Aussi, Miyamoto et al. ont démontré l'efficacité des microbulles dans le diagnostic du cancer du sein (bénin/malin) avec une meilleure spécificité que sans utilisation des agents de contrastes [67]. En physiopathologie, les microbulles permettent d'évaluer et de quantifier le flux sanguin afin d'étudier la physiopathologie des maladies comme l'ischémie [9]. Nous verrons que cette approche permet de quantifier la perfusion musculaire et tumorale avant et après un traitement MB+US dans ce projet (voir section 3.2.6).

#### - **Sur le plan thérapeutique**

Une amélioration de l'effet thérapeutique de la gemcitabine (agent chimiothérapeutique) combinée aux microbulles stimulées par ultrasons a été observée chez des patients atteints du cancer du pancréas comparée aux groupes ayant reçu individuellement la gemcitabine [68]. De même, des études cliniques récentes montrent une ouverture de barrière hémato-encéphalique par des microbulles stimulés par des ultrasons focalisés et guidés par résonance magnétique chez des patients atteints du cancer primaire du cerveau [69].

## **1.4 L'ATP**

### **1.4.1 Structure de l'ATP**

La respiration cellulaire est une succession de réactions biochimiques (glycolyse, cycle de Krebs, phosphorylation oxydative) de dégradation des sucres (exemple: le glucose) dans le but de produire l'énergie chimique sous forme d'adénosine triphosphate (ATP). L'ATP est un mononucléotide constitué d'une base azotée purique dénommée adénine liée à un sucre appelé ribose et à 3 groupements phosphates [70] (Figure 1.7).

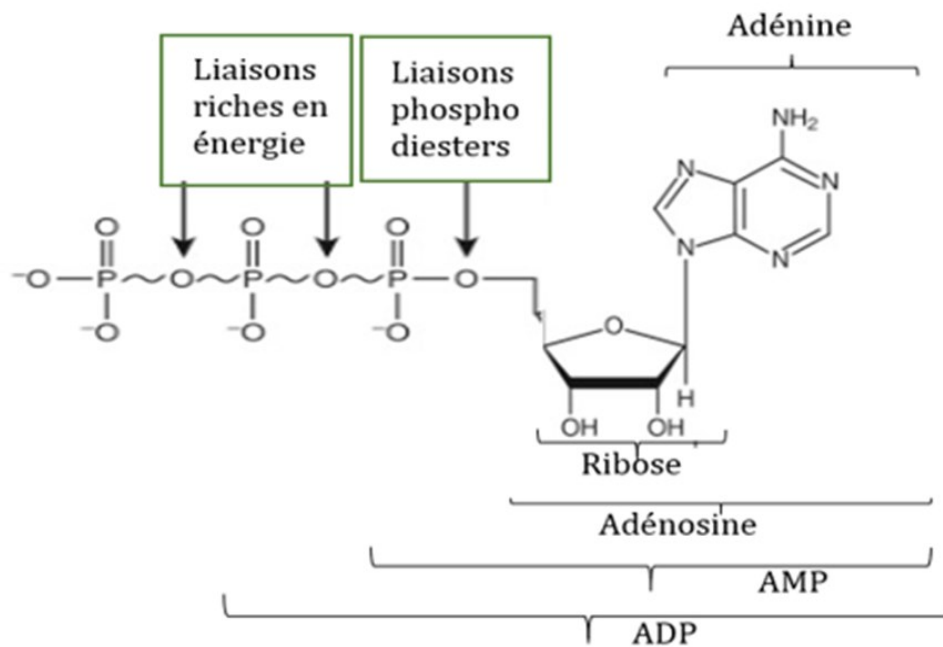


Figure 1.7 : Structure de l'adénosine triphosphate. Adaptée de Zimmerman et al., 2011 [70]

La synthèse de l'ATP a lieu dans la matrice mitochondriale et est assurée par l'ATP synthase. Cette enzyme utilise le gradient de protons généré par les coenzymes NADH et FADH<sub>2</sub> issues du cycle de Krebs pour produire l'énergie nécessaire au transfert d'un groupement phosphate (Pi) à l'adénosine diphosphate (ADP). La liaison phosphodiester entre l'ADP et le Pi est très riche en énergie (-7.3 kcal/mol). L'ATP est ainsi considérée comme la source centrale de stockage d'énergie. Après sa synthèse dans la mitochondrie, l'ATP est transportée et accumulée dans le cytoplasme. La concentration intracellulaire d'ATP dans un tissu sain est de 5-10 mM alors que celle à l'extérieur de la cellule (ATP extracellulaire) est de 10-100 nM [6]. L'ATP intracellulaire a pour rôle primordial de produire l'énergie nécessaire pour : l'accomplissement des réactions anaboliques (synthèse des lipides et des protéines), le transport actif des ions et la migration cellulaire. Par ailleurs, l'ATP extracellulaire intervient dans la propagation de l'influx nerveux, dans le maintien du potentiel de repos, dans la sécrétion hormonale et particulièrement dans la voie de signalisation des récepteurs purinergiques [71]–[74]. La dégradation de l'ATP en ADP, puis en AMP permet la synthèse de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) qui est puissant second messenger dans la voie de signalisation des protéines G. L'ATP joue également un rôle clé dans la physiopathologie de certaines maladies telles que l'athérosclérose, la prééclampsie et le cancer

[74]–[76]. Dans le cas du cancer, on note une accumulation dans le microenvironnement tumoral de médiateurs inflammatoires capables d'engendrer l'angiogenèse, la tumorigénèse et l'échappement à la réponse immunitaire. En effet, on note une accumulation d'ATP extracellulaire dans le microenvironnement tumoral en provenance des cellules cancéreuses nécrotiques. Cependant, l'ATPe devient tumorigène lorsqu'il est dégradé respectivement par les enzymes CD39 et CD73 en adénosine, un médiateur anti-inflammatoire [77]. Par contre, lorsque l'ATPe se fixe à son récepteur P2X7 et active l'inflammasome NLRP3, on assiste à une libération de cytokines pro-inflammatoires en l'occurrence l'IL-18 et l'IL1 $\beta$  [77], [78].

### 1.4.2 Les voies de libération d'ATP à l'extérieur de la cellule

Dans le but de contrôler ou de réguler des fonctions physiologiques, l'ATP est libérée dans le milieu extracellulaire. Cette libération est médiée par 2 voies principales : la voie lytique et la voie non lytique. Dans les années 1990, la voie lytique était considérée comme l'unique mécanisme de libération d'ATP. Les recherches des dernières décennies montrent que c'est la voie non lytique qui est prépondérante pour la libération d'ATP extracellulaire.

#### 1.4.2.1 La voie non lytique

La voie non lytique met en évidence toutes les protéines membranaires et intracellulaires qui permettent le transport d'ATP à l'extérieur de la cellule. On distingue : les canaux ioniques et les vésicules sécrétoires (exocytose). Parmi les canaux ioniques, on distingue : les connexines, la pannexine-1, et le CALHM1 (*calcium homeostasis modulator 1*) [79]. Les connexines ou "*gap-junctions*" sont des protéines constituées de 7 domaines transmembranaires qui s'ouvrent à la suite de la propagation du flux de calcium en réponse à un besoin physiologique ou pathologique. Cette ouverture entraîne la libération des molécules intracellulaires telles que l'IP3 (inositol triphosphate), le glucose, les acides aminés (glutamate, aspartate) et l'ATP [80]. Ainsi, une association entre l'augmentation de l'expression des connexines et l'augmentation de la libération d'ATP extracellulaire dans les cellules cancéreuses du cerveau a été démontré [81]. La pannexine-1 (PANX1) est une glycoprotéine à 4 domaines membranaires qui est exprimée de manière ubiquitaire dans les tissus humains. Pendant le potentiel de repos, la PANX1 reste fermée tandis que le stress mécanique ou la dépolarisation entraîne son ouverture et la libération d'ATP [82]. Des études ont déjà démontré une libération d'ATP à travers la PANX1 dans les métastases



du cancer du sein chez des souris [83]. CALHM1 est un pore constitué de 4 domaines transmembranaires. Il est activé par la diminution de la concentration du calcium et du potentiel électrique membranaire [84]. CALHM1 est exprimé préférentiellement dans l'hippocampe, mais aussi dans d'autres types cellulaires tels que les oocytes, les cellules Hela et les cellules gustatives [84]. La libération d'ATP extracellulaire par la CALHM1 dans les cellules gustatives a été démontrée *in vitro* [84] [85].

L'exocytose fait partie des voies principales de libération d'ATP cellulaire. À travers le transport actif secondaire, l'ATP est susceptible de s'accumuler dans une vésicule sécrétoire à travers le transporteur VNUT (*vesicular nucleotide transporter*) [86]. L'excrétion de l'ATP, médiée par la concentration intracellulaire de calcium se fait lorsque la vésicule fusionne avec la membrane par l'intermédiaire du complexe protéique SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein receptor*) [87]. Les souris knockout de la vésicule VNUT présente un déficit de vésicules de stockage et un déficit d'ATP extracellulaire [88]. On observe chez ses souris un blocage du signalement purinergique.

#### 1.4.2.2 La voie lytique

La libération d'ATP par la voie lytique est la conséquence d'une apoptose, d'une nécrose ou d'un dommage tissulaire. La mort cellulaire entraîne une perte de l'intégrité de la membrane et une libération des particules endogènes telles que l'ATP. Dans les sites inflammatoires, on note une accumulation d'ATP provenant des cellules nécrotiques [89]. Les stimuli mécaniques tels que les ultrasons, la déformation de la membrane, la pression osmotique ou une brèche vasculaire, peuvent également permettre une libération d'ATP extracellulaire par la voie lytique [90]. Une libération d'ATP par apoptose provoquée a été démontré dans des ostéosarcomes humains *in vitro* [91].

### **1.4.3 Les récepteurs purinergiques et la dégradation d'ATP par les NTPDases**

#### 1.4.3.1 Les récepteurs purinergiques

La voie de signalisation purinergique met en évidence une cascade de réactions biochimiques impliquant : (1) les nucléotides (ATP, ADP, AMP) et leurs récepteurs (P2); (2) les nucléosides (adénosine) et leurs récepteurs (AR). Chez les mammifères, on dénombre 19 récepteurs purinergiques dont 15 récepteurs P2 et 4 récepteurs AR exprimés, dans presque tous

les tissus et les cellules [92]. Les récepteurs P2 sont subdivisés en récepteurs P2X et P2Y. En fonction de la structure de la protéine et du type de ligand, on distingue 8 récepteurs P2Y dont P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub>, P2Y<sub>14</sub> qui contiennent 7 domaines transmembranaires, une extrémité N-terminal extracellulaire et une extrémité C-terminal intracellulaire [93]. Les récepteurs P2Y sont des récepteurs métabotropiques couplés aux protéines G et activés par plusieurs ligands notamment l'ATP, l'UDP et l'UTP. Parmi ses récepteurs, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub> et P2Y<sub>11</sub> présentent une sélectivité unique pour l'ATP [94].

Les récepteurs P2X sont subdivisés en 7 sous-groupes dont P2X<sub>1-7</sub>. Ce sont des récepteurs ionotropes et cationiques composés d'une extrémité N-terminal intracellulaire, de 2 domaines transmembranaires qui forment un canal ionique non sélectif et d'une extrémité C-terminal sur lequel se fixe l'ATP et les ions [95]. L'ATP est un agoniste de tous les récepteurs P2X (tous les sous-types) en présence de magnésium [96]. En général, la concentration d'ATP nécessaire pour activer la voie de signalisation purinergique est de 3-500 nM [97]. Par contre, celle nécessaire pour activer le récepteur P2X<sub>7</sub> (impliqué dans l'activation de l'inflammasome) est de 0.5 à 1 mM car ce dernier possède une faible affinité pour l'ATP [74].

Finalement, en fonction de l'affinité, de la voie de signalisation activée ainsi que du type de protéines G auquel est couplé le récepteur, on distingue 4 sous-classes de récepteurs d'adénosine (AR) dont : A1, A2A, A2B et A3 [98]. Les AR sont des glycoprotéines constituées de 7 domaines transmembranaires dont l'extrémité N-terminal est orienté vers l'extérieur de la cellule tandis que l'extrémité C-terminal est dirigé vers l'intérieur. Le côté intracellulaire contient un site de phosphorylation et d'acylation indispensable au mécanisme de régulation et d'internalisation du récepteur [99]. Le principal mécanisme de production d'adénosine est celui de la dégradation d'ATP extracellulaire en ATP, ADP et AMP par les NTPDases (*nucleoside triphosphate diphosphohydrolases*) [99].

#### 1.4.3.2 Dégradation d'ATP par les NTPDases

Joseph et al. ont démontré une colocalisation entre un site de libération d'ATP et l'activité enzymatique des NTPDases *in vitro* [100]. Les ectonucléotidases sont constituées par : (1) des ectonucléosides triphosphates déshydrogénases ou E-NTPDase (NTPDase1 (CD39), NTPDase2, NTPDase3, NTPDase8) ; (2) de la phosphatase alcaline; (3) des 5-nucléotidases (CD73) ; et (4) des

ectonucléotides pyrophosphatases. CD39 et CD73 dégradent spécifiquement l'ATP extracellulaire en adénosine, une molécule clé de la tumorigénèse. En effet, CD39 hydrolyse l'ATP en ADP et l'ADP en AMP. C'est une protéine constituée de 5 séquences hautement conservées et ancrées dans la membrane à travers 2 domaines transmembranaires essentiels à son activité catalytique [101]. Le récepteur CD39 est exprimé à la fois par des cellules cancéreuses, les cellules endothéliales et les cellules immunitaires et sa surexpression est stimulée par le dommage cellulaire, l'inflammation chronique et l'hypoxie [7]. L'expression de CD39 par les cellules endothéliales et tumorales permet l'angiogenèse et les métastases des cellules cancéreuses tandis que son expression par les Tregs permet d'inhiber l'activité antitumorale des cellules T tueuses naturelles [8]. Il a été démontré qu'une injection intratumorale de ARL67156 (1.6 mg/kg, inhibiteur de CD39) permet une augmentation de la concentration d'ATP péricellulaire dans une tumeur colorectale [102]. Aussi, l'inhibition du CD39 par le polyoxometalate-1 ou POM-1 administré par voie sous-cutanée (250 µg) et en combinaison avec les IPC (anti-PD1, anti-CTLA-4) a démontré une prolifération intratumorale des lymphocytes T, une production de cytokines et l'empêchement de la résistance à la thérapie IPC [103].

Le CD73 est une glycoprotéine membranaire constituée de 2 sous-unités et ancrée dans la membrane par l'extrémité C-terminal. Cette extrémité est liée au phosphatidyl glycosyl inositol qui est le site de liaison de l'AMP. En plus d'être exprimés par les cellules immunitaires (cellules dendritiques, cellules B et T), CD73 s'exprime dans les cellules endothéliales et les cellules stromales [104]. Le récepteur CD73 est exprimé dans plusieurs organes, et cellules notamment le cerveau, le foie, le rein, colon, le muscle, le tissu sanguin (endothélium), les cellules immunitaires [103]. Le CD73 catalyse la déphosphorylation de l'AMP pour produire l'adénosine, un puissant médiateur des réactions anti-inflammatoire [105]. La surexpression de CD73 dans les tumeurs est associée en clinique à un mauvais pronostic [106]. Par exemple, l'expression de CD73 chez des patientes atteintes du cancer de l'ovaire est corrélée avec un mauvais pronostic [107].

#### **1.4.4 Quantification d'ATP extracellulaire par imagerie de bioluminescence**

Les développements en imagerie optique permettent de visualiser *in vitro et in vivo* des cellules et des organismes entiers à travers des méthodes non invasives. La bioluminescence, bien adaptée aux études pré-cliniques sur des petits animaux (faible pénétration dans les tissus),

permet la quantification de la prolifération cellulaire [108], l'étude des interactions entre les macromolécules [109], l'évaluation de l'effet de la thérapie génique et cellulaire [109], et la quantification de l'ATP extracellulaire [9], [110]–[112]. Le principe de la bioluminescence repose sur la conversion de l'énergie chimique (provenant des réactifs) en énergie lumineuse, et ce en plusieurs étapes (Figure 1.8). Premièrement la luciférine réagit avec l'ATP pour former un composé intermédiaire appelé adénylyl (adénylate luciféryl). Ensuite, l'adénylyl subit une oxydation et une décarboxylation pour produire l'oxyluciférine dans un état excité. Le retour de l'oxyluciférine à l'état stable produit de la lumière dont les longueurs d'onde (550-570 nm) se situent entre le vert et le rouge [113]. La production de la lumière est rendue possible grâce à l'action catalytique de la luciférase.

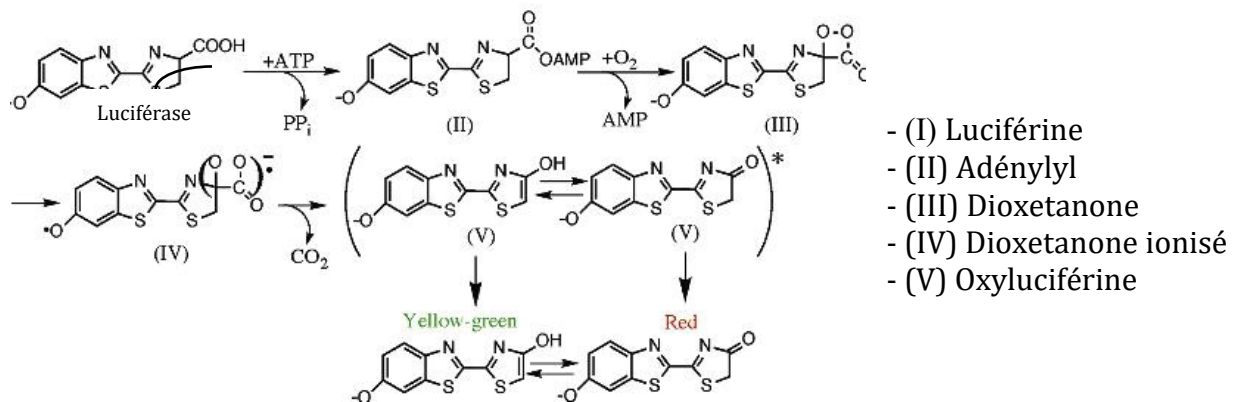


Figure 1.8 : Mécanisme de la réaction d'oxydation catalytique de la luciférine en présence d'ATP. Adapté de Baldwin, 1996 [113].

#### 1.4.4.1 La luciférase Firefly soluble

Trois types de luciférases sont couramment utilisés en recherche: la luciférase *Gaussia* (*Gaussia Princeps*) qui produit la lumière dans le spectre du bleu, la luciférase *Renilla* (*Renilla Reniformis*) qui émet également la lumière dans le spectre du bleu et la luciférase *Firefly* (*Photinus Pyralis*) qui produit la lumière dans le spectre du vert et du rouge. Étant donné que le spectre d'émission de la luciférase *Firefly* est plus large et peut s'étendre dans le spectre de la lumière rouge, la luciférase *Firefly* est la plus connue et la plus utilisée en bioluminescence. Elle possède un poids moléculaire de 62 kDa et est constituée de 2 domaines interreliés: dont un N-terminal constitué de 2 feuillets bêta et de 3 hélices alpha et un C-terminal constitué d'une hélice alpha et d'un feuillet bêta [114]. Le site actif de la luciférase joue un rôle clé dans le spectre d'émission de

la lumière de l'enzyme. La luciférase émet la lumière dans le spectre du visible aux longueurs d'ondes comprises entre le vert et le rouge avec un pic maximal à 560 nm. L'arginine 218 sur le site actif est essentielle à l'activité enzymatique de la luciférase [115]. En effet l'altération de la structure de l'arginine 218 entraîne une diminution de l'affinité de la luciférase pour la luciférine de 15 à 20 fois tandis que sa substitution par un acide aminé non chargé entraîne le décalage du pic d'émission dans le spectre de la lumière rouge [115].

La méthode la plus sensible, simple, spécifique et fiable d'imagerie d'ATP extracellulaire *in vivo* est la bioluminescence [111]. La réaction entre la luciférine et l'ATP suit le principe de l'équilibre chimique. Une mole de luciférine réagit avec une mole d'ATP pour produire une quantité de lumière proportionnelle à la quantité de matière du réactif limitant. Il existe donc une linéarité entre la quantité d'ATP et la quantité de lumière produite [116]. Dans les essais *in vitro* et *in vivo* de quantification d'ATP, la luciférase peut être utilisée directement sous sa forme soluble [9], [117]–[119] ou à travers des cellules transfectées qui expriment la luciférase sur la face externe de la membrane [111], [112], [120].

#### 1.4.4.2 La luciférase membranaire: le système PmeLUC

Chez les lucioles, la luciférase s'exprime naturellement dans le cytosol. Ainsi, des modifications structurelles du gène de la luciférase sont nécessaires pour son adressage sur la membrane externe de la cellule. L'ajout d'une séquence leader (récepteur de l'acide folique) constituée de 26 acides aminés au côté N-terminal et d'une séquence C-terminal GPI (glycosyl phosphatidylinositol) constitué de 28 acides aminés permet l'adressage de la luciférase sur la membrane externe de la bicouche lipidique [120]. Ce gène peut être ensuite transfecté de façon stable (virus) ou non (plasmides) dans des lignées cellulaires humaines telles que les HEK293 (cellules embryonnaires du rein) ou des lignées cellulaires de cancer pour quantifier l'ATP extracellulaire. Par exemple, l'ATP extracellulaire tumoral peut être quantifié en utilisant des cellules HEK293 transfectées exprimant la luciférase sur la membrane externe (HEK293-pmeLUC) dans des tumeurs OVCAR-3 (carcinome ovarien) et MZ-2-MEL (mélanome humain) greffées à des souris athymiques [111].

La quantification d'ATP extracellulaire à travers des cellules qui expriment la luciférase sur la membrane est une méthode rapide, fiable et très spécifique [111]. Cette méthode présente néanmoins des limites telles que la complexité de la transfection (choix de la lignée cellulaire

sélection clonale, le niveau d'expression de la luciférase) et la faible affinité du pmeLUC pour l'ATP (détection d'ATP à des concentrations supérieures à 5-10  $\mu\text{M}$ ) [121].

#### 1.4.4.3 L'Optix Mx2

L'Optix Mx2 ART (*Advanced Research Technologies-GE Healthcare*) utilise le principe de l'imagerie optique «*Continuous Wave*» pour capter la lumière produite par fluorescence ou par bioluminescence [122]. Un photomultiplicateur est placé à l'entrée du système pour permettre l'amplification et la visualisation de la lumière. La machine contient également une plaque chauffante ajustable sur laquelle l'objet (animal ou la plaque de puit) est immobilisé avant l'imagerie. Deux lignes dont l'une rouge et l'autre verte affichées à l'écran permettent l'ajustement de la localisation verticale de l'objet dans l'appareil. La limite supérieure de l'objet doit toujours être en dessous de la ligne rouge tandis que la ligne verte doit être placée directement au-dessus de la région à imager sur l'objet.

L'Optix Mx2 est caractérisée entre autres par :

- La résolution qui est la distance séparant deux pixels (exprimé en mm). Puisque le système mesure le signal de manière séquentielle point par point, plus la résolution est fine, plus le nombre de point augmente, ce qui allonge le temps d'acquisition total.
- Le temps d'intégration correspond au temps pendant lequel la caméra accumule les photons à chaque localisation. Finalement, le système d'imagerie est connecté à un ordinateur dans lequel sont transférées les données de la caméra, puis traité par le logiciel Optix View.

#### 1.4.5 Autres méthodes de quantification d'ATP

Plusieurs méthodes alternatives permettent de quantifier l'ATP. Le FRET (*Forster resonance energy transfer-based*) est une méthode utilisée pour quantifier l'ATP dans les compartiments intracellulaires et extracellulaires dans certains organites (mitochondrie) *in vitro*. Son principe repose sur le transfert d'énergie entre la sous-unité epsilon de la protéine FOF1- ATP synthase de la bactérie *Bacillus* et l'ATP. La sonde Ateam (*adenosine-5-triphosphate indicator based on Epsilon Analytical measurement*) permet de quantifier l'ATP dans la mitochondrie, le cytoplasme et le noyau des cellules HeLa [123] [124]. Cette méthode présente l'avantage de quantifier l'ATP dans une seule cellule. Toutefois, elle présente une grande complexité et ne permet pas de quantifier l'ATP extracellulaire exclusivement [111].

La chromatographie haute performance liquide (HPLC) en phase inverse est une méthode alternative de quantification d'ATP. Les nucléotides tels que l'ATP, l'ADP et l'AMP sont des molécules chargées et capables d'être éluées individuellement dans une colonne chromatographique. Le principe de la HPLC est basé sur la séparation des molécules dans une colonne contenant une phase stationnaire et une phase mobile en fonction de leur polarité. L'ATP, l'ADP et l'AMP ont été quantifiées simultanément dans un tissu du cortex cérébral par HPLC [125]. Ces travaux ont également permis de tracer une courbe de calibration d'ATP qui met en évidence la linéarité entre le voltage de la HPLC et la concentration d'ATP. L'inconvénient de la HPLC est qu'elle quantifie à la fois l'ATP intracellulaire et extracellulaire. Toutefois, il est possible de quantifier l'ATP extracellulaire exclusivement si les aliquots du compartiment extracellulaire sont récoltés individuellement.

#### **1.4.6 ATP, réponse immunitaire et cancer**

Les signaux de danger ou alarmines incluent à la fois les molécules exogènes telles que les PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) et les molécules endogènes ou DAMPs (*damaged associated molecular patterns*). Ces molécules ont pour rôle de déclencher des réponses immunitaires innées et adaptatives en réponse à une invasion microbienne ou au stress cellulaire [5]. Pour activer les réactions inflammatoires, les alarmines se fixent à des récepteurs intracellulaires et extracellulaires dénommés PRRs (*pattern recognition receptors*). On distingue 5 classes de PRRs : les TLRs (*Toll-like receptors*), CLR (C-type lectin receptors), NLRs (*NOD-like Receptors*), RIRs (*RIG-Like receptors*) et les AIM2 (*absent in melanoma 2 receptors*) [5].

L'ATP est classée parmi les DAMPs et est impliquée dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 (*NOD-LRR-and pyrin domain-containing*) [5] [4]. Dans la structure de l'inflammasome NLRP3, on retrouve la protéine NLRP3, un domaine pyrine (PYD) et une protéine adaptée ASC (*adaptor protein apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) qui est la pro-caspase-1 [126]. La fixation de l'ATP extracellulaire au récepteur P2X7 est l'une des étapes clés de l'activation de l'inflammasome NLRP3 [4]. Le récepteur P2X7 activé forme un canal ionique non spécifique et entraîne : (1) la réduction de la concentration intracellulaire du potassium; (2) l'activation de la caspase-1; et (3) le clivage de la pro-interleukine 1 $\beta$  [127] [4]. La liaison de l'IL-1 $\beta$  à son récepteur IL-1R contribue à l'activation des facteurs de croissance nécessaire à la

différenciation des cellules immunitaires. L'IL-1 $\beta$  est un initiateur de l'inflammation sécrété principalement par les cellules myéloïdes, qui joue un rôle important à la jonction entre les réponses immunitaires innées et adaptatives (expression de molécules inflammatoires, maturation des lymphocytes T, prolifération des lymphocytes T, activation des cellules dendritiques) [128], [129]. Des agonistes de NLRP3 ont ainsi été combinés avec succès avec l'immunothérapie [130], [131]. Toutefois, le rôle de IL-1 $\beta$  dans la tumorigénèse est complexe et est associée dans la littérature à la fois à une action pro-tumorale [132], ou anti-tumorale [128], [133]. Ainsi, l'ATP libérée par les cellules cancéreuses mortes peut entraîner l'activation de l'inflammasome NLRP3, et une réponse adaptative IL-1 $\beta$  dépendante antitumorale [129]. Dans le cas de la réponse anti-tumorale, l'efficacité thérapeutique des agents de chimiothérapie (oxaliplatine, anthracyclines) a été associée à la libération d'ATP par les cellules mortes, à l'activation de l'inflammasome et à la production de l'IL-1 $\beta$  dans des tumeurs CT 26 du cancer du côlon [134].

Le microenvironnement tumoral (TME) désigne un ensemble constitué par les cellules tumorales, les cellules immunitaires dont les TILs (*tumour infiltrating lymphocytes*), les vaisseaux sanguins, la matrice extracellulaire et les messagers cellulaires [74]. L'ATP et l'adénosine sont connues comme étant les constituants majeurs du microenvironnement tumoral. En effet la concentration d'ATP dans un microenvironnement tumoral est d'environ 100  $\mu$ M ce qui est 1000 fois plus élevé que celle d'un tissu sain [6]. La mort cellulaire causée par l'hypoxie, le stress cellulaire ou l'inflammation est à l'origine de la grande quantité d'ATP dans le TME. Le récepteur P2X7 est moins sensible à l'ATP ce qui implique qu'une grande concentration d'ATP (0.5-1mM) est nécessaire pour son activation [6]. Cependant, les récepteurs membranaires tels que CD39 et CD73, dégradent l'ATP extracellulaire en adénosine afin de promouvoir la tumorigénèse et la régulation négative des réponses immunitaires dans le TME. Ainsi, l'utilisation des microbulles stimulés par ultrasons pourrait être une méthode complémentaire de libération et d'augmentation d'ATPe dans le microenvironnement tumoral en combinaison avec une inhibition des CD39 et CD73.



## 1.5 Libération d'ATP par ultrasons et microbulles

### 1.5.1 Libération d'ATP par ultrasons

L'hyperthermie tissulaire causée par les ultrasons pulsés de haute pression (HIFU) peut contribuer à la libération d'ATP cellulaire. Les travaux de Hu et al. ont montré une libération d'ATP cellulaire dans le compartiment extracellulaire par des cellules MC38 *in vitro* [135]. Deux conditions ultrasonores ont été testées : (1) HIFU thermique,  $P^+ = 12$  MPa ;  $P^- = 6.7$  MPa; rapport cyclique = 30 %; (2) HIFU mécanique,  $P^+ = 31.7$  MPa;  $P^- = 10.7$  MPa; rapport cyclique = 3 % tous deux à une fréquence de 1.1 MHz et le signal d'ATP a été mesuré par bioluminescence. La libération d'une « grande quantité initiale d'ATP » a été observée dans les 2 cas, mais l'ATP libérée par HIFU mécanique a été consommée rapidement tandis que l'ATP libérée par HIFU thermique a persisté dans le temps. En effet, le HIFU mécanique a permis de libérer une concentration d'ATP de 45  $\mu$ M à 10 min post-traitement mais qui a diminué jusqu'à 5  $\mu$ M à 40 min. Cependant, dans le cas du HIFU thermique, la concentration d'ATP était de 55  $\mu$ M à 10 min post-traitement et de 47  $\mu$ M à 40 min. Aussi, il est connu que le LIPUS (1.5 MHz, 30 mW/cm<sup>2</sup>) permet une libération d'ATP extracellulaire dans une culture d'ostéoblastes [136]. La quantité d'ATP libérée par le LIPUS était de l'ordre de  $2.3 \times 10^{-13}$  mol/ $\mu$ g directement après le traitement ultrasons à l'exception que l'ATP était déjà consommé totalement à 5 min post-traitement.

### 1.5.2 Libération d'ATP par ultrasons et microbulles

Le mécanisme et la libération d'ATP par les microbulles stimulées par ultrasons sont très peu élucidés à l'heure actuelle. Les études de Belcik et al. ont démontré une libération d'ATP *in vitro* et *in vivo* après traitement par US+MB [9]. En effet, leurs travaux *in vitro* (fréquence = 1.3 MHz, index mécanique = 1.3, 1 min de traitement) ont décrit la microporation transitoire et la mécanotransduction (récepteur non-identifié) comme mécanisme potentiel de libération d'ATP dans les érythrocytes et les cellules endothéliales. Par ailleurs, après traitement US (fréquence = 1.3 MHz, index mécanique = 1.3, 10min de traitement) et MB (Definity) dans le muscle de souris C57BL/6, ils ont observé un fort signal d'ATP (40 fois plus élevé du côté traité par rapport au contrôle) qui persiste 24 h post-traitement (5 fois plus élevé par rapport au contrôle). De plus, ils ont montré que l'ATP libérée après US+MB entraîne la libération des molécules à action

vasodilatatrices (adénosine, prostaglandines, oxyde nitrique) et l'augmentation de la perfusion dans le muscle à travers les récepteurs A2A et P2Y qui semblent jouer des rôles redondants (l'inhibition d'une ou l'autre des deux voies n'a pas d'effet sur la réponse vasodilatatrice des US+MB). Ces effets vasodilatateurs ont été confirmés cliniquement, puisqu'une augmentation locale du débit sanguin a été observée chez des patients atteints de la maladie de l'artère périphérique après traitement US+MB [137]. Parallèlement, ils ont démontré dans le muscle cardiaque de souris que le signal d'ATP augmentait avec la densité de ligne (17, 35, 65 lignes par image) et la durée du pulse (40-cycle et 5-cycle) [121].

Toutefois, la faisabilité d'une libération d'ATP par US+MB dans la tumeur demeure inconnue, tout comme sa caractérisation, sa durée et les mécanismes impliqués. L'augmentation de la concentration d'ATP extracellulaire par microbulles et ultrasons, combinée à l'inhibition des NTPDases (CD39 et CD73) afin de diminuer l'adénosine (traitements à l'étude en immunothérapie), peut-elle être une cible thérapeutique pour l'immunothérapie du cancer?

## Chapitre 2 Hypothèses et objectifs

### 2.1 Hypothèses de travail

L'immunothérapie est un traitement prometteur dans la lutte anti-cancer. Toutefois, la résistance de certains cancers à ce traitement oriente notre réflexion vers l'exploration de pistes complémentaires pour les cancers qui répondent peu ou pas. Il a déjà été démontré qu'il existe un mauvais pronostic pour les patients atteints de cancer et ayant une surexpression du récepteur CD73 [107]. Plusieurs études mettent en exergue l'inhibition pharmacologique de l'action des enzymes CD39 et CD73 pour augmenter la concentration d'ATPe et favoriser les réponses immunitaires pro-inflammatoires anti-cancer [102], 103].

Par ailleurs, le traitement ultrasons (US) et microbulles(MB) peut libérer de l'ATP localement dans le muscle, augmenter la perfusion dans le muscle et avec un effet durable [9], [119]. Toutefois, la quantité, la cinétique et les voies de libération d'ATPe dans les tumeurs sont inconnues. Notre hypothèse est celle selon laquelle la thérapie ciblée US+MB dans une tumeur solide 4T1 *in vivo* peut relâcher de l'ATP dans le milieu extracellulaire. La Figure 2.1 est une illustration de cette hypothèse.

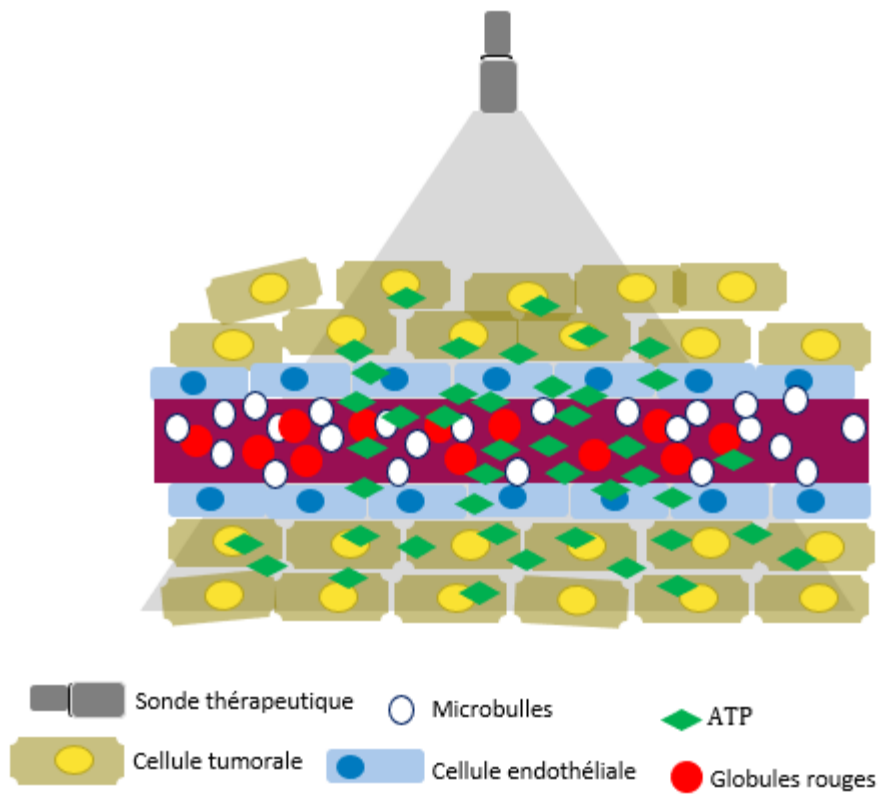


Figure 2.1 : Mécanisme proposé de libération d'ATP cellulaire après traitement par ultrasons et microbulles dans une tumeur de cellules de cancer du sein murin (4T1).

## 2.2 Objectifs

Le premier objectif de ce travail est de quantifier le signal d'ATP extracellulaire par imagerie de bioluminescence après US+MB dans une culture de cellules de cancer du sein murin (4T1) *in vitro*. Le second et le troisième objectif consistent respectivement en la quantification du signal d'ATP relâché dans le muscle et dans une tumeur 4T1 *in vivo*. La perfusion dans le muscle et dans les tumeurs est évaluée en sous-objectifs

## Chapitre 3 . Matériel et méthodes

Dans ce chapitre, nous décrivons dans la première sous-section (Matériel) les modèles expérimentaux, les réactifs et les appareils utilisés. La deuxième section (Méthodes) est répartie en 6 parties décrivant: (1) les expériences de quantification du signal d'ATPe *in vitro* après grattage des cellules 4T1; (2) la méthodologie de libération et de quantification du signal d'ATPe dans les cellules 4T1 après traitement US+MB; (3) le traitement US+MB dans le muscle ainsi que l'imagerie du signal qui en découle; (4) le contrôle positif de quantification d'ATPe dans le muscle; (5) la libération et la quantification du signal d'ATPe après US+MB dans les tumeurs; (6) l'évaluation de la perfusion dans le muscle et dans les tumeurs; (7) les méthodes statistiques.

### 3.1 Matériel

#### 3.1.1 Modèle expérimental : les cellules 4T1

Les cellules de cancer du sein murin (4T1) sont une lignée cellulaire dérivée des glandes mammaires de souris BALB/c fC3H. Ce sont des cellules adhérentes ayant une morphologie épithéliale. Cette lignée cellulaire a été choisie pour plusieurs raisons. Les cellules 4T1 sont facilement transplantables à des modèles syngéniques et se développent spontanément au site d'injection. De plus, tout comme les métastases du cancer du sein humain, les cellules 4T1 forment des métastases dans les ganglions lymphatiques, le poumon, le cerveau et le foie. Finalement, les cellules 4T1 sont immunogéniques avec une infiltration lymphocytaire, ce qui fait des 4T1 une référence pour les études en immunothérapie. Elles ont été fournies par le laboratoire du Dr John Stagg (Centre de recherche du CHUM, Montréal, Canada). Pour toute nos expériences, les cellules 4T1 ont été ensemencées dans du milieu RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) supplémenté de 10% SBF (sérum de bovin fœtal) et de 1% d'antibiotique (mélange de streptomycine et pénicilline). Elles ont été incubées dans une étuve à CO<sub>2</sub> (5%) et à une température de 37°C. Lors des différents passages, les cellules ont été détachées à l'aide de la trypsine et rincées au PBS (*Phosphate Buffer Saline*). Les souris BALB/c femelles âgées de 6 à 8 semaines (Charles River, Senneville, Québec, Canada) ont été utilisées comme modèle pour la quantification du signal d'ATPe *in vivo*.

### 3.1.2 Réactifs

Pour notre expérimentation, **la D-luciférine** a été achetée sous forme anhydre à la compagnie Perkin Elmer (# 122799, Waltham, Massachusetts)

La **luciférase**, a été achetée sous forme soluble à la compagnie Promega (# E1701, Madison, WI).

Le **ATP determination kit** est constitué de la luciférine, luciférase et une solution tampon contenant du magnésium et une solution d'ATP. Le kit utilisé dans l'étude a été acheté à la compagnie Thermofisher (# A22066, Walthman, MA).

Le **FLAAB** (*ATP assay mix dilution buffer*, Sigma Aldrich, Saint-Louis, MO) est une solution tampon constituée de magnésium et de plusieurs autres ions.

**Les microbulles** commerciales Definity<sup>R</sup> (Lantheus, Billerica, MA) ont été utilisées pour notre expérimentation. Elles ont un diamètre compris entre 1 et 6  $\mu\text{m}$  et présentent une stabilité d'au moins 2 semaines après 6 réactivations [13]. Avant utilisation, les microbulles Definity<sup>R</sup> doivent être activées. Lors de la première utilisation, l'activation se fait par brassage pendant 45 secondes à travers un vialmix. Pour des utilisations ultérieures d'une fiole déjà activée, un brassage manuel (plusieurs cycles d'inversion à la main) est suivi par un comptage sur un Coulter Multisizer 3 pour déterminer la taille et la concentration des MB. Les microbulles Definity<sup>R</sup> ont été récupérées à la clinique d'échocardiographie du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal.

### 3.1.3 Appareillages

#### 3.1.3.1 L'Optix Mx2

L'Optix Mx-2 (GE, Fairfield, CT) a été utilisé pour imager le signal d'ATPe dans une culture de cellules 4T1 *in vitro* ainsi que dans le muscle et dans les tumeurs *in vivo*. 3 paramètres majeurs ont été pris en compte avant le début de chaque imagerie : la résolution, le temps d'intégration et la position de la ligne verte par rapport à l'objet à imager. Pour les expériences *in vitro*, une résolution de 1.5 mm et un temps d'intégration de 1 seconde ont été choisis selon le manuel de l'OPTIX Mx2. La ligne verte a été placée directement au niveau du ménisque de la solution d'intérêt. Quant aux tests *in vivo*, une résolution de 2.5 mm et un temps d'intégration de 5 secondes ont été utilisés. En effet, nous avons préalablement testé une résolution 1.5 mm ainsi

qu'un temps d'intégration de 1 seconde mais nous n'avons pas observé de signal d'ATP *in vivo*. Aussi, la ligne verte a été placée au-dessus du muscle ou de la tumeur pour maximiser l'intensité lumineuse émise tel que décrit dans le manuel d'utilisation de l'Optix Mx2.

### 3.1.3.2 L'échographe Acuson Siemens Sequoia

L'Acuson a été utilisé premièrement pour le guidage en temps réel de la thérapie US+MB. Deuxièmement, il a permis d'évaluer la perfusion dans le muscle et dans les tumeurs à travers l'enregistrement des vidéos montrant l'activité des microbulles. Pour l'acquisition d'images, nous avons utilisé principalement le mode B et le mode CPS (*Contrast Pulse Sequencing*). Le mode B, à une fréquence de 14 MHz (Figure 3.1b), a permis de localiser le tissu d'intérêt (muscle ou tumeur). Le mode CPS, à une fréquence de 7 MHz et un index mécanique de 0.2 (Figure 3.1c) a permis de détecter et de visualiser les microbulles dans les vaisseaux sanguins du muscle ou de la tumeur.

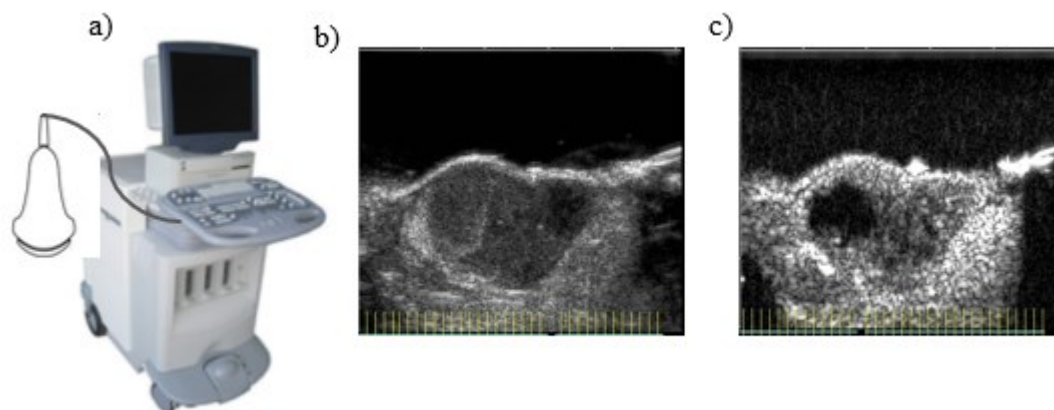


Figure 3.1 : Imagerie ultrasonore avec l'Acuson Sequoia : a) Échographe Acuson Sequoia; b) Imagerie en mode B d'une tumeur 4T1; c) Imagerie en mode CPS d'une tumeur 4T1 perfusée par des microbulles.

### 3.1.3.3 Les ultrasons thérapeutiques

Les ultrasons thérapeutiques ont été utilisées pour engendrer la cavitation inertielle des microbulles. Ils sont constitués, d'un générateur de basses fréquences, d'un amplificateur et d'une sonde.

#### - **Le générateur de basses fréquences ou GBF (33500B, KEYSIGHT)**

Le GBF émet des signaux ayant une gamme de fréquence de 1 $\mu$ Hz-20MHz. Le GBF a permis de régler les différents paramètres ultrasonores désirés, notamment, la longueur du pulse

exprimée en nombre de cycles, l'amplitude en mVpp, ainsi que l'intervalle de temps entre les pulses en secondes.

- **L'amplificateur (modèle 75A250A, Amplifier Research, Souderton, PA, USA)**

La caractéristique principale de l'amplificateur est le gain qui représente le rapport entre la puissance de sortie de l'amplificateur ( $P_s$ ) et la puissance d'entrée ( $P_e$ ). L'entrée de l'amplificateur est branchée au générateur de basse fréquence et la sortie à la sonde OLYMPUS. Ainsi le signal qui arrive du GBF est amplifié puis envoyé à la sonde OLYMPUS qui génère les impulsions ultrasonores.

- **La sonde thérapeutique (0.5 inch, A303S, 1MHz, Olympus)**

La sonde thérapeutique est un mono-élément constitué de céramique avec un diamètre  $D = 1.27$  cm et une distance focale  $N = 2.69$  cm. Dans le champ proche de cette sonde ( $N < 2.69$  cm), il existe une grande variation de la pression (entre 0 et le maximum) tandis que dans le champ éloigné ( $N > 2.69$  cm), la pression est plus homogène. La sonde a été calibrée dans le champ éloigné à l'aide d'un hydrophone (HMB-0200, ONDA corp) dans un réservoir d'eau dégazée et à l'aide d'un système de positionnement 3D. Pour toutes nos expériences, une fréquence de 1 MHz a été utilisée.

## **3.2 Méthodes**

### **3.2.1 Quantification du signal d'ATPe après grattage des cellules 4T1**

Notre première approche afin de libérer de l'ATP cellulaire a consisté en un grattage cellulaire en utilisant un embout de pipette (embout de 100  $\mu$ L). Le grattage entraîne un dommage membranaire et permet une libération d'ATP par la voie lytique. Cette expérience avait pour but de déterminer premièrement si les cellules 4T1 peuvent libérer de l'ATPe et deuxièmement l'effet de la concentration de la luciférase sur le signal d'ATP libéré. Plusieurs concentrations de luciférase (0.175-0.35-0.7  $\mu$ M) ont été testées pour une quantité constante de luciférine (400  $\mu$ M). Les cellules 4T1 ont été mise en culture dans une plaque de 12 puits pendant 48h. Avant introduction de la solution de réaction (400  $\mu$ L), les cellules ont été rincées au PBS. A l'aide d'un embout de pipette, un grattage sous forme de croix a été effectué et la plaque de puit et cette ensuite été imagée à l'Optix Mx2 par imagerie de bioluminescence (BLI). Les concentrations des différents réactifs sont décrits dans le tableau 3.1.



Réactifs	Luciférine	Luciférase		
Concentration solution mère	107 mM	219 $\mu$ M		
Concentration finale (Volume dans le puit = 400 $\mu$ L)	400 $\mu$ M	0.7 $\mu$ M	0.35 $\mu$ M	0.175 $\mu$ M

Tableau 3.1 : Concentrations des différents réactifs utilisés pour mesurer le signal d'ATPe après grattage des cellules 4T1

### 3.2.2 Libération et quantification après US+MB *in vitro*

Avant de quantifier le signal d'ATPe, le dispositif expérimental et la transmission US a d'abord été vérifié par microscopie. Le dispositif expérimental était constitué (de bas en haut – voir figure 3.2) : (1) d'une plaque absorbante (pour limiter la réflexion des US) ; (2) de couches de couplage (gel, film plastique et couche d'eau) ; (3) d'une plaque de 96 puits inversée, contenant  $50 \times 10^6$  MB/mL par puit ; (4) d'un adaptateur de gélatine de porc 3% (0.2 g + 20 ml d'H<sub>2</sub>O distillée) préalablement préparé dans un bout de tube plastique (hauteur du tube = distance focale du transducteur = 2.69 cm) ; (5) la sonde ultrasonore posée dans le bout de tube. Les paramètres ultrasonores sont décrits dans le Tableau 3.2. Les microbulles (MB) ont été imagées au microscope avant et après le traitement (Figure 3.3).

Pression	# Cycles	# Salves	
800 kPa	1000 cycles	1X	5X

Tableau 3.2 : Conditions ultrasonores du test de vérification du dispositif expérimental *in vitro*

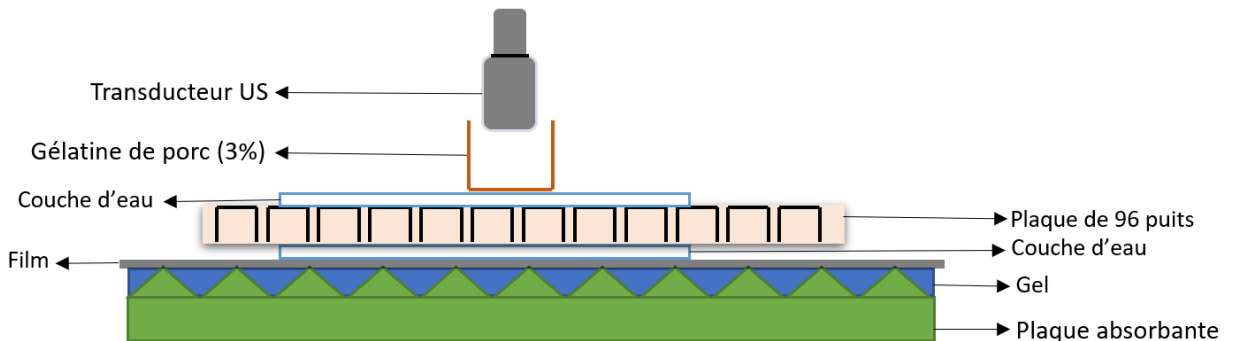


Figure 3.2 : Schéma expérimental du traitement US+MB *in vitro*

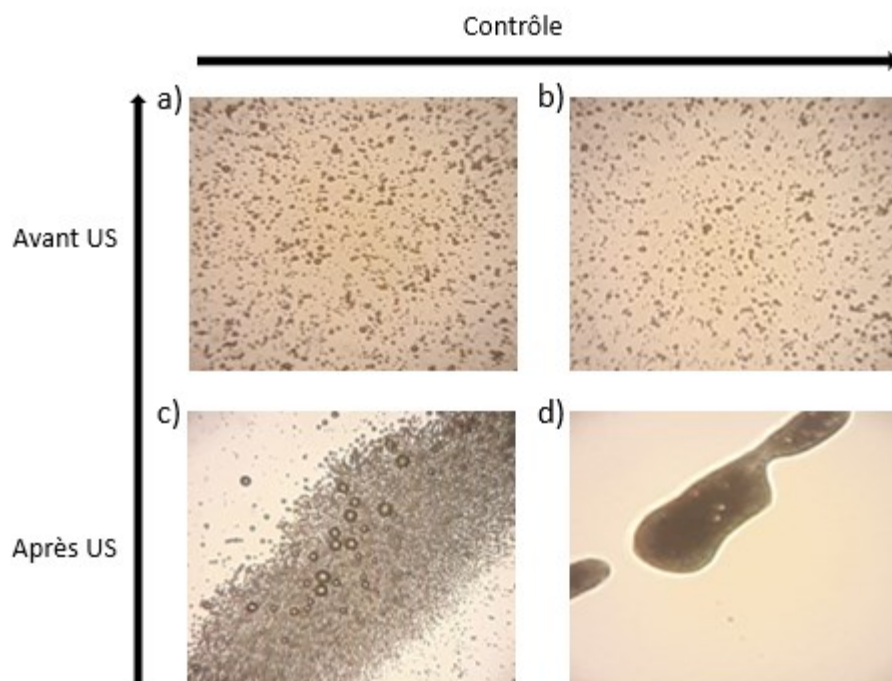


Figure 3.3 : Imagerie microscopique des microbulles avant et après traitement US. a) et b) représentent les images des microbulles avant traitement US tandis que c) et d) représentent les images après 1 et 5 salves respectivement.

Après validation du dispositif expérimental pour la livraison des ultrasons thérapeutiques, les cellules 4T1 ( $10^4$  cellules) ont étéensemencées dans une plaque de 96 puits la veille pour atteindre une confluence de  $4 \times 10^4$  cellules le jour de l'expérimentation. Avant le traitement US, elles ont été rincées au PBS (2 fois) puis en mis en contact avec la solution contenant les microbulles, la luciférine et la luciférase ( $400 \mu\text{L}$ ) (Tableau 3.3). Ensuite, la plaque de puits a été retournée pour permettre le contact entre les microbulles et les cellules (Figure 3.3). Les microbulles prennent à peu près 4 min pour remonter en surface. Enfin, les cellules ont été traitées par ultrasons puis imagées par BLI à travers l'Optix Mx2.

Réactifs	Luciférine	Luciférase	Microbulles
Concentration solution mère	107 mM	219 $\mu$ M	1.7 x 10 <sup>9</sup> MB/mL
Concentration finale (Volume dans le puit = 400 $\mu$ L)	250 $\mu$ M	0.7 $\mu$ M	50 x 10 <sup>6</sup> MB/mL

Tableau 3.3 : Concentration des réactifs nécessaires à la quantification du signal d'ATP des cellules 4T1 *in vitro* après US+MB

### 3.2.3 Quantification d'ATPe après US+MB dans le muscle

Le traitement US+MB a été réalisé sur des souris BALB/c femelles âgées de 6 semaines d'âge et ayant un poids d'environ 17g. Six jours avant les expériences, les souris ont subi une chirurgie et un cathéter a été inséré dans la veine jugulaire droite (conformément à la PNF numéro CI-553 du centre de recherche du CHUM). En bref, une canule (polyéthylène, diamètre = 0.30 mm) a été placée dans la veine jugulaire. Cette canule a été utilisée pour l'infusion de microbulles et de la luciférase.

Les souris ont été anesthésiées à l'isoflurane (2%) et les poils au niveau des cuisses postérieures ont été rasés afin d'éviter une atténuation du signal de bioluminescence. Les souris ont ensuite reçu de la luciférine par voie intrapéritonéale ainsi qu'un bolus de luciférase par la veine jugulaire canulée. Les microbulles ont été administrées en infusion continue (4 $\mu$ L/min) à travers un pousse seringue (Havard Apparatus 22, Holliston, MA). Le traitement US a été effectué via le transducteur thérapeutique Olympus sur le muscle gastrocnémien du côté droit tandis que le côté gauche a été utilisé comme contrôle négatif. La thérapie a été guidée en temps réel avec l'Acuson Sequoia et des vidéos de pré, pendant et post-traitement ont été enregistrées. La sonde d'imagerie a été orientée parallèlement au muscle traité tandis que la sonde thérapeutique a été placée perpendiculairement à la sonde de thérapie (Figure 3.4). Les souris ont ensuite été scannées en bioluminescence avec l'Optix Mx2 et le signal a été imagé toutes les 15 min pendant 1h30. 4h30 post-traitement, la luciférine et la luciférase ont été réinjectées et le signal a de nouveau été imagé par BLI. Le schéma expérimental est décrit à la Figure 3.5 et la concentration des réactifs ainsi que les conditions ultrasonores sont résumées dans les Tableaux 3.4 et 3.5 respectivement.

Réactifs	Luciférine	Luciférase	Microbulles
Voie d'administration	IP	IV	IV
Masse	3mg	270 µg	-
Volume injecté	100 µL	50 µL	200 µL
Concentration dans le volume injecté	107 mM	88 µM	1.7 x 10 <sup>9</sup> MB/ml

Tableau 3.4 : Concentration et volume des réactifs utilisés pour la quantification du signal d'ATPe dans le muscle après US+MB

Fréquence d'imagerie	Fréquence du traitement	Pulse	Amplitude	Pression	Intervalle entre deux pulses	Durée du traitement
7MHz	1MHz	5000 cycles	500 mVpp	800 kPa	5 sec	10 min

Tableau 3.5 : Récapitulatif des conditions ultrasonores du traitement US+MB dans le muscle

### 3.2.4 Contrôle positif d'ATPe dans le muscle

Des souris BALB/C anesthésiées et rasées au niveau des pattes ont reçu une microinjection intramusculaire d'une concentration de 250 µM d'ATP (10 µL) après avoir reçu respectivement de la luciférine par voie intrapéritonéale et de la luciférase par voie intraveineuse (par la veine caudale). Le signal d'ATPe a été mesuré par imagerie de BLI et toutes les 4 min pendant 16 min. Les concentrations des différents réactifs utilisés sont résumées dans le Tableau 3.6.

Réactifs	Luciférine	Luciférase	ATP
Voie d'administration	IP	IV	IM
Masse	3 mg	270 µg	2.5 µg
Volume injecté	100 µL	20 µL	10 µL
Concentration dans le volume injecté	107 mM	219 µM	250 µM

Tableau 3.6 : Récapitulatif des concentrations des réactifs utilisés pour le contrôle positif de quantification d'ATPe dans le muscle

### 3.2.5 Libération et quantification d'ATPe dans les tumeurs après US+MB

#### 3.2.5.1 Injection des cellules tumorales

Les cellules 4T1 ont été mises en culture dans un flacon de 175 cm<sup>2</sup>. Lorsque les cellules ont atteint une confluence de 90 %, elles ont été rincées au PBS et détachées du flacon à l'aide de la trypsine. Ensuite, elles ont été centrifugées à une vitesse de 500 RPM pendant 5 min puis re-suspendues dans du PBS et comptés à travers un compteur de cellules automatiques (TC20, BIO-RAD, Montréal, QC). Avant injection, les cellules ont été mélangées avec du matrigel (#CB-

40234C, Fisher Scientific, MA) (50% matrigel + 50% de cellules) puis injectées dans un volume de 100  $\mu\text{L}$  par côté. Dans la première série d'expériences,  $1 \times 10^6$  cellules (par côté) ont été injectées par voie sous-cutanée bilatéralement, tandis que dans la deuxième série d'expériences, les souris ont reçu  $0.75 \times 10^6$  cellules par côté. Dans la première série d'expériences le traitement US+MB a été commencé lorsque les tumeurs avaient atteint un volume cible de  $400 \text{ mm}^3$  (Longueur x Largeur x Épaisseur/2) Cependant, le centre des tumeurs semblait nécrotique et on observait une faible concentration des microbulles au centre de la tumeur (Figure 3.4a). C'est donc la raison pour laquelle dans la deuxième série d'expérience, une quantité plus faible de cellules a été injectée et le traitement US a été commencé lorsque les tumeurs avaient atteint un volume moyen de  $300 \text{ mm}^3$  (Figure 3.4b).

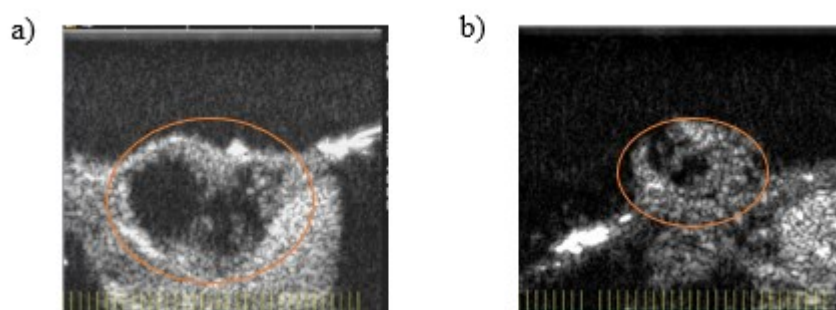


Figure 3.4 : Tumeur 4T1 après injection sous-cutanée aux souris BALB/c : a) Cellules 4T1, 3 semaines après injection de  $1 \times 10^6$  cellules ( $V=435 \text{ mm}^3$ ). b) Cellules 4T1, 2 semaines après injection de  $0.75 \times 10^6$  cellules ( $V=300 \text{ mm}^3$ ).

### 3.2.5.2 Protocole US+MB dans une tumeur 4T1 *in vivo*

Une semaine avant les expériences, les souris ont subi une chirurgie et un cathéter a été inséré dans la veine jugulaire. Le jour de l'expérience, les masses tumorales ont été rasées après que les souris aient été placées sous isoflurane (2%). Les souris ont premièrement reçu de la luciférine par voie intrapéritonéale. Ensuite, les microbulles et la luciférase ont été administrées par voie intra-jugulaire. Un traitement US au moyen du transducteur Olympus a été effectué pendant 10 min sur une tumeur tandis que la tumeur du côté opposée a été utilisée comme contrôle négatif. Comme dans le muscle, l'Acuson Sequoia a été utilisé d'une part pour visualiser les microbulles dans les vaisseaux tumoraux et pour le guidage de la thérapie ultrasonore. Les vidéos de pré-traitement, pendant le traitement et de post-traitement ont été enregistrées. À la

fin du traitement, un bolus de saline a été administré par voie intra-jugulaire et les souris ont été scannées par imagerie optique de BLI toutes les 15 min pendant 1h30 min. Le schéma expérimental regroupant toutes les étapes décrites précédemment est représenté à la Figure 3.5, tandis que les concentrations des différents réactifs et les conditions ultrasonores sont décrites respectivement dans les Tableaux 3.7 et 3.8.

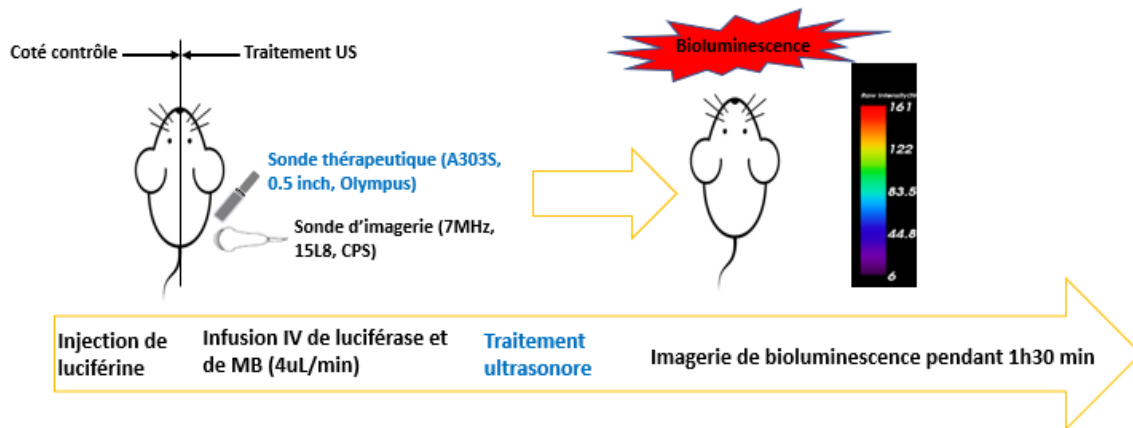


Figure 3.5 : Représentation schématique de la libération et de la quantification d'ATPe après US+MB dans le muscle et dans une tumeur 4T1 greffée à une souris BALB/c.

Réactifs	Luciférine	Luciférase	Microbulles
Voie d'administration	IP	IV	IV
Masse	3mg	270 µg	-
Volume injecté	100 µL	50 µL	200 µL
Concentration dans le volume injecté	107 mM	88 µM	1.7 x 10 <sup>9</sup> MB/ml

Tableau 3.7 : Concentration des différents réactifs utilisés lors de la quantification d'ATPe dans les tumeurs

Fréquence	Pulse	Amplitude	Pression	Intervalle entre deux pulses	Durée du traitement
1MHz	5000 cycles	500 mVpp	800 kPa	10 sec	10 min

Tableau 3.8 : Paramètres ultrasonores utilisées pour la quantification d'ATPe dans les tumeurs

### 3.2.6 Évaluation de la perfusion dans le muscle et dans les tumeurs

#### 3.2.6.1 Analyse qualitative des vidéos et pré-traitement et de post-traitement par le “*Burst replenishment imaging*”

Le “*burst replenishment imaging*” consiste en une séquence vidéo avec la sonde d'imagerie en mode CPS non destructif (PRF = 5 images par seconde, MI=0.2) incluant une salve à haut indice mécanique (ici 5 frames à MI=1.9), et qui élimine toutes les microbulles dans la tranche imagée afin de quantifier la cinétique de reperfusion par les microbulles. Elle permet une analyse qualitative de la perfusion dans la zone d'intérêt en comparant les vidéos pré- et post-traitement. La zone d'intérêt est déterminée à travers la vidéo enregistrée pendant le traitement et dans laquelle il est possible de localiser l'activité cavitationnelle des microbulles provoquées par le pulse thérapeutique. La comparaison des images extraites des vidéos de pré et de post-traitement (quantité et vitesse à laquelle reviennent les microbulles) à différents intervalles de temps permet ainsi l'évaluation de l'effet de la thérapie US+MB sur la perfusion.

#### 3.2.6.2 Évaluation quantitative de la perfusion

Dans un second temps, ces mêmes séquences vidéo ont été analysées quantitativement pour déterminer des paramètres décrivant la perfusion dans la zone d'intérêt. Pour cela, un modèle mathématique d'équation  $y = A (1 - e^{-\beta t})$  montrant la destruction et la reperfusion des microbulles a été utilisé (Figure 3.6) et le calcul s'est effectué à travers MATLAB (R2020a. version 9.8.0, Natick, MA). Dans cette équation,  $y$  représente l'intensité acoustique (dB),  $A$  représente le plateau de l'intensité acoustique (dB) et est proportionnel à la fraction du volume sanguin,  $\beta$  désigne la vitesse de l'intensité acoustique en fonction du temps (1/s), et  $A \times \beta$  représente la perfusion dans la ROI (*region of interest*) et est exprimée en dB/s [139]. Tout comme dans l'analyse précédente, la ROI des vidéos de pré et de post-traitement analysée dans l'interface MATLAB a été sélectionnée à partir de la vidéo de traitement US+MB dans laquelle on pouvait localiser l'effet du pulse thérapeutique (Figure 3.7).

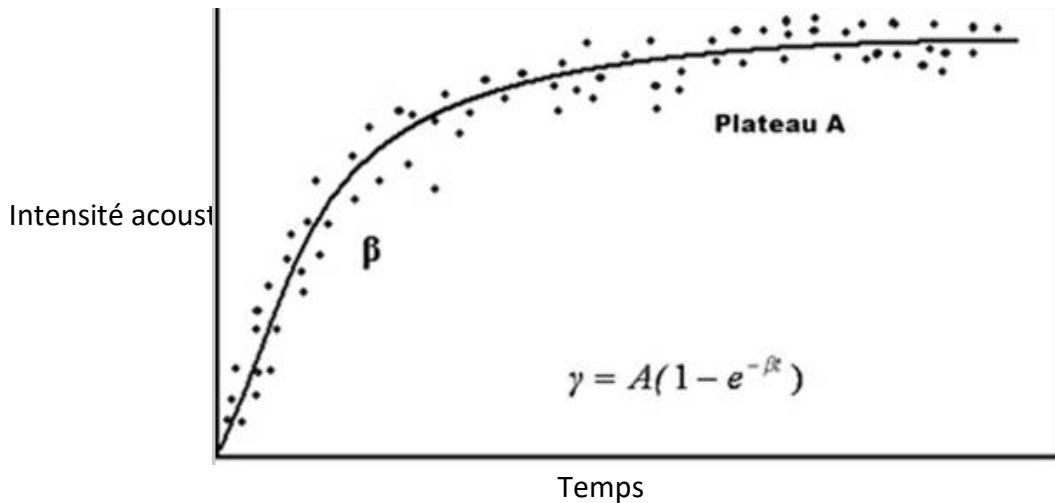


Figure 3.6 : Fonction exponentielle du retour des microbulles après leur implosion. A représente le plateau de l'intensité acoustique.  $\beta$  désigne la vitesse de l'intensité acoustique en fonction du temps.  $\gamma$  est l'intensité acoustique en fonction du temps. Adapté de Kern et al [139].

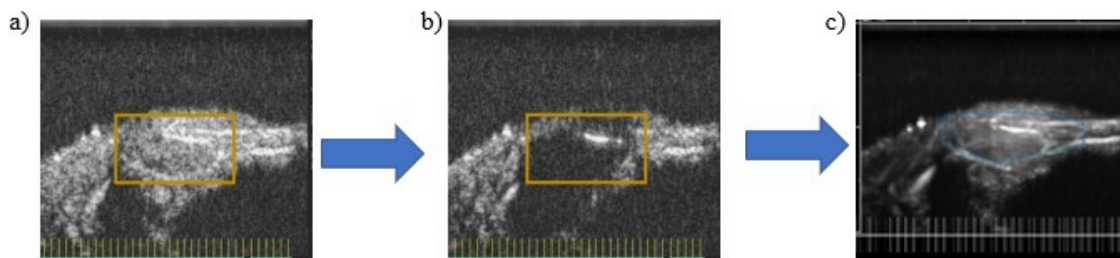


Figure 3.7 : Sélection du ROI pour analyse de la perfusion dans le muscle. a) Vaisseaux sanguins musculaires remplis de microbulles avant implosion. b) Détection de l'implosion des microbulles sous l'effet du pulse thérapeutique. c) Sélection du ROI à analyser dans l'interface MATLAB.

### 3.2.7 Méthodes statistiques

Le logiciel *Prism 8.0* (GraphPad Prism, San Diego, CA, USA) a été employé pour analyser toutes les données présentées dans les chapitres 4 et 5. Toutes ces données sont exprimées sous forme de moyenne  $\pm$  écart type. Pour l'analyse des données de quantification du signal d'ATPe *in vitro* (grattage cellulaire (Figure 4.1), traitement US+MB (Figure 4.2) ainsi que dans les tumeurs *in vivo* (Figure 4.11), le test de Bonferroni à posteriori du test ANOVA à mesures répétées à deux facteurs a été utilisé. Le test t apparié a permis d'évaluer l'effet du traitement US+MB sur la perfusion dans le muscle et dans les tumeurs (Figure 4.5 et Figure 4.10). Ce test a également



permis de déterminer l'effet du traitement US+MB sur le signal d'ATP dans le muscle (Figure 4.6). La correction de Bonferroni à postériori du test ANOVA à mesures répétées à un facteur a permis de déterminer l'effet du temps sur le signal d'ATPe dans le muscle à la suite du traitement US+MB (Figure 4.6) et après injection intramusculaire d'ATP (Figure 4.7). Le test t non apparié a permis de comparer le signal de bioluminescence d'un mélange de luciférine, luciférase et ATP injecté intramusculaire versus *in vitro* (boite de pétri) (Figure 5.2).

## Chapitre 4 Résultats

Ce chapitre est consacré à la description des résultats : (1) de quantification d'ATPe *in vitro*; (2) d'évaluation de la perfusion et de quantification du signal d'ATPe après US+MB dans le muscle; (3) du contrôle positif de quantification d'ATPe dans le muscle; (4) d'évaluation de la perfusion et de quantification du signal d'ATPe post-US+MB dans les tumeurs 4T1.

### 4.1 Quantification d'ATPe *in vitro*

#### 4.1.1 Test préliminaires

Premièrement, le signal d'ATPe provenant du grattage des cellules 4T1 *in vitro* a été quantifié à l'Optix Mx2 par imagerie de bioluminescence (BLI) à 1, 4 et 8 minutes avec différentes concentrations de luciférase. Dans la Figure 4.1, on observe une augmentation significative de la densité moyenne de photons à 1 min post-grattage (pour une concentration de luciférase de 1X (0.7  $\mu$ M) et 0.5X (0.35  $\mu$ M) par rapport au pré-grattage (background ou bg) (n=5, \*p < 0.05, test de Bonferroni) mais pas à 0.25X (0.175  $\mu$ M). Le signal d'ATPe est rapidement retourné aux valeurs pré-grattage à 4 et 8 min. Cette expérience a permis de conclure que le signal de BLI est dépendant de la concentration de luciférase et qu'il n'est pas possible de diminuer la concentration de luciférase sans perdre de signal. Nous avons donc utilisé une concentration de 1X (0.7  $\mu$ M) pour la suite des études *in vitro* de mesure du signal d'ATPe.

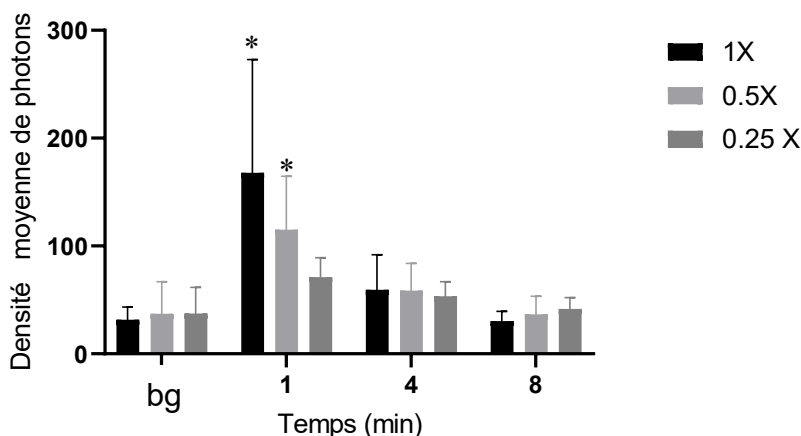


Figure 4.1 : Densité moyenne de photons du signal d'ATPe après grattage d'une population de cellules 4T1 à différentes concentrations de luciférase. n=5, \*p < 0.05, test de Bonferroni. n=5 signifie que chaque concentration de luciférase a été testé 5 fois (au total 15 puits dans plusieurs plaques de puits) .

#### 4.1.2 Quantification du signal d'ATPe après US+MB *in vitro*

Après traitement US+MB dans une culture de cellules 4T1, le signal d'ATPe a également été évalué par imagerie de BLI. Dans la Figure 4.2, la densité moyenne de photons est représentée en fonction du temps après US+MB. On peut observer une augmentation significative de cette densité (signal d'ATPe) à 1min post-traitement pour les pressions de 800 kPa (1000-100-10 cycles) et de 250 kPa (1000 cycles), ( $n=5$ ,  $*p < 0.05$ , test de Bonferroni). En effet, la tendance du graphe montre une augmentation du signal d'ATPe avec la pression et le nombre de cycles. Toutefois, pour une pression de 250 kPa et un pulse de longueur 10 et 100 cycles, le signal d'ATP libéré est relativement faible et il n'existe pas de différence significative avec le pré-traitement (bg). À 5 min post-US+MB, le signal d'ATPe reste significativement plus élevé que celui du background pour une pression de 800 kPa seulement. Nos résultats indiquent qu'un traitement US+MB entraîne une libération d'ATP qui augmente avec la pression et le nombre de cycles. Cette libération d'ATP est détectable 5 min post traitement avec une haute pression de 800 kPa mais pas à 250 kPa.

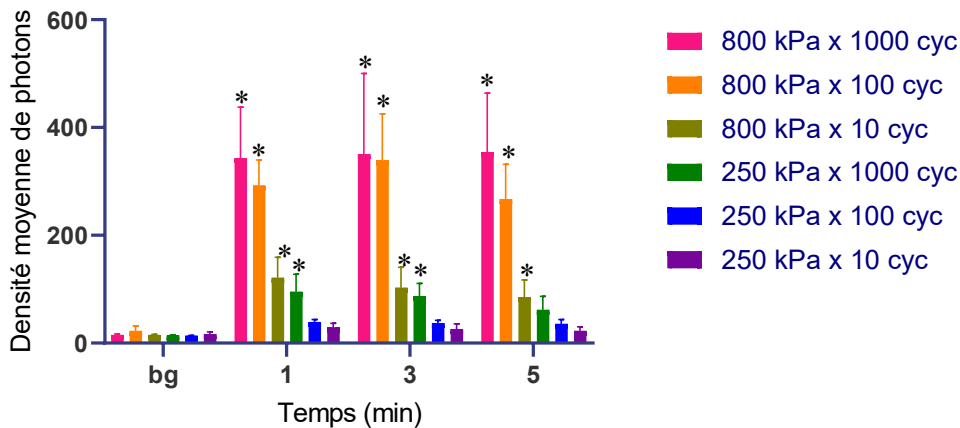


Figure 4.2 : Densité moyenne de photons du signal d'ATPe après traitement US+MB d'une culture de cellules 4T1 *in vitro*.  $n=5$ ,  $*p < 0.05$ , test de Bonferroni.  $n=5$  représente le nombre de répétitions de chaque condition de pression et de nombre de cycles ( au total 30 puits dans plusieurs plaques de puits).

## 4.2 Quantification d'ATPe dans le muscle

### 4.2.1 Évaluation de la perfusion dans le muscle

Puisqu'il est connu que l'augmentation de la concentration d'ATP extracellulaire est un des mécanismes impliqués dans l'augmentation de la perfusion dans le muscle post-US+MB [9], la perfusion dans le muscle de souris BALB/c a été évaluée premièrement par la méthode de "Burst replenishment imaging". La Figure 4.3 représente les images extraites de la vidéo elucidant l'activité cavitationnelle des microbulles dans le muscle. De prime abord, on observe qu'avant le pulse thérapeutique, les vaisseaux sanguins du muscle sont irrigués par les microbulles. Ensuite, les pulses thérapeutiques, envoyés toutes les 5 secondes, causent l'implosion des microbulles, qui disparaissent de la circulation, suivies de nouvelles microbulles qui regagnent les vaisseaux sanguins musculaires avec le temps. Cette analyse nous a permis de localiser la zone insonifiée par le pulse thérapeutique afin d'analyser la perfusion dans cette région. La Figure 4.4 met en exergue les images extraites des vidéos de pré et de post-traitement. On observe un retour plus rapide des microbulles à 1, 3 et 5 secondes après la salve d'imagerie, ce qui traduit une augmentation de la perfusion après US+MB.

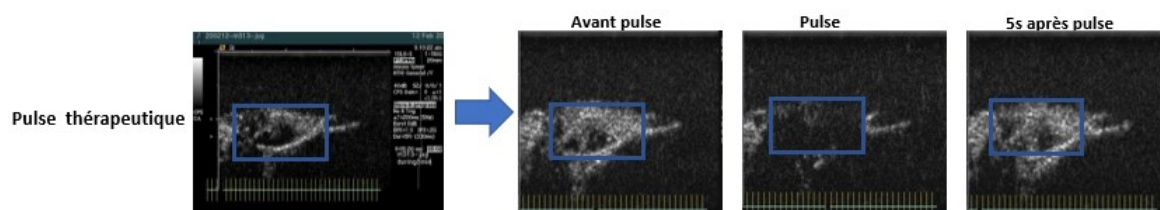


Figure 4.3 : Imagerie de la perfusion dans le muscle pendant le traitement US+MB

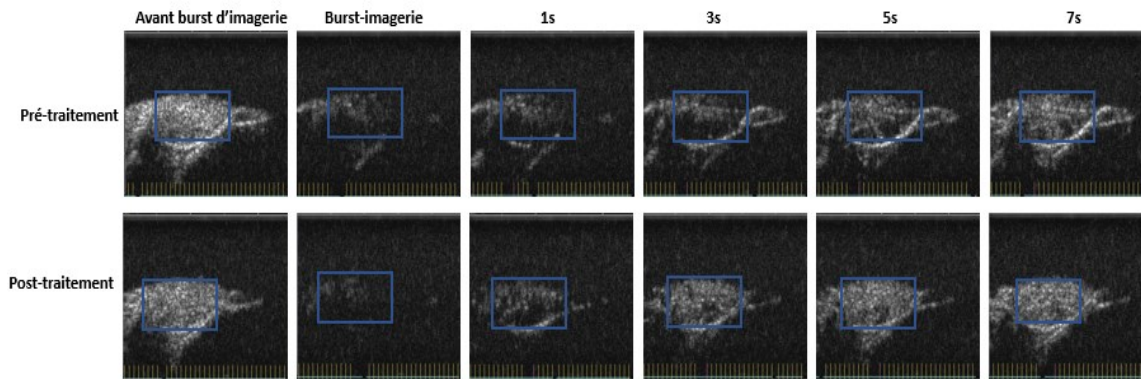


Figure 4.4 : Évaluation de la perfusion dans le muscle avant et après le traitement US+MB par “Burst replenishment imaging”

Deuxièmement, la perfusion a été évaluée à travers le calcul des paramètres de perfusion. À la figure 4.5a, on observe que le paramètre A (proportionnel à la fraction du volume sanguin) reste inchangé dans le muscle après US+MB ( $n=3$ ,  $p = ns$ , test t apparié). Par contre, à la Figure 4.5b, on observe une augmentation significative de la vitesse de l’intensité acoustique ( $\beta$ ) ( $n=3$ ,  $*p < 0.05$ , test t apparié). Aussi, à la Figure 4.5c), la perfusion représentée par les coefficients  $A \times \beta$  augmente également de façon significative après US+MB ( $n=3$ ,  $*p < 0.05$ , test t apparié). Bien que la quantité de microbulles (A) reste inchangée dans le muscle post-traitement, cette observation rejoint celle de la première analyse qui démontre une augmentation de la perfusion dans le muscle après US+MB.

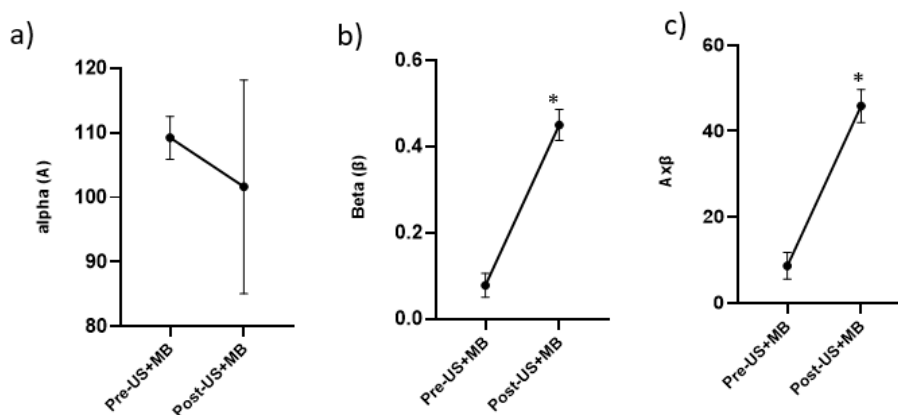


Figure 4. 5 : Évaluation des paramètres de perfusion dans le muscle pré et post-US+MB. a) Plateau de l’intensité acoustique (A ou alpha), ( $n=3$ ,  $p = ns$ , test t apparié); b) Vitesse de l’intensité acoustique pré et post-traitement (beta ou  $\beta$ ) ( $n=3$ ,  $*p < 0.05$ , test t apparié). c) Perfusion dans le muscle ( $A \times \beta$ ), ( $n=3$ ,  $*p < 0.05$ , test t apparié); ns = non significatif

## 4.2.2 Quantification du signal d'ATPe dans le muscle après US+MB

Après traitement US+MB, le signal d'ATPe a été suivi pendant 4h30 par imagerie optique de BLI (Figure 4.6). Un signal d'ATPe a été observé dans le muscle traité par US+MB (Figure 4.6a) mais pas dans le muscle controlatéral. En effet, le muscle insonifié présentait une densité moyenne de photons 5.5 fois plus élevée ( $64.2 \pm 48.6$ ) que celle du muscle non traité ( $11.6 \pm 1.2$ ) à 15 min post-US+MB ( $n=6$ ,  $*p < 0.05$ , test t apparié, Figure 4.6b). En comparant le signal avant MB+US avec ceux mesurés aux différents intervalles de temps (15 min à 1h30), on observe une persistance du signal jusqu'à 60 min post-US+MB ( $44.7 \pm 14.7$ ,  $*p < 0.05$ , test de Bonferroni, Figure 4.6c). 4h30 après réinjection de luciférine (3mg) et luciférase (270  $\mu$ g), le signal d'ATPe mesuré n'était pas statistiquement différent de celui du prétraitement.

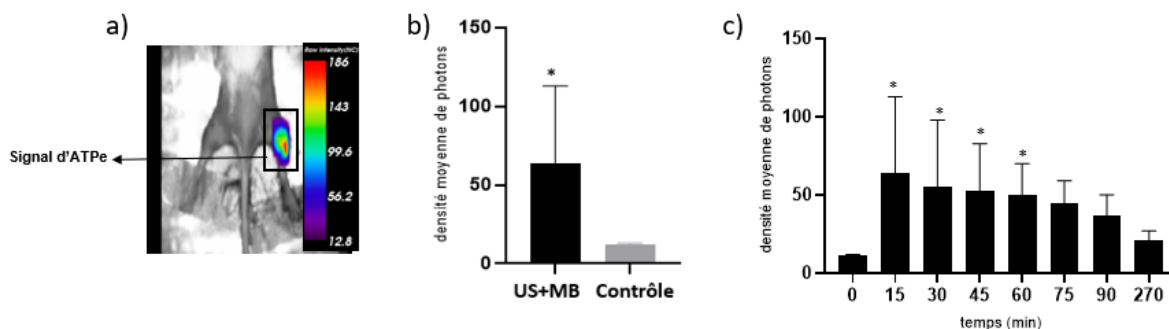


Figure 4.6 : Quantification du signal d'ATPe après US+MB dans le muscle. a) Signal d'ATPe dans le muscle 15 min après US+MB sur le muscle traité versus le muscle contrôle. b) Densité moyenne de photons sur le muscle traité par US+MB versus le muscle contrôle ( $n=6$ ,  $*p < 0.05$ , Test t apparié). c) Densité moyenne de photons en fonction du temps du signal post-US+MB ( $n=6$ ,  $*p < 0.05$ , US+MB versus pré-traitement, Test de Bonferroni).

## 4.2.3 Contrôle positif de quantification d'ATPe dans le muscle

Après administration de luciférine et luciférase, une acquisition a été faite pour mesurer le niveau d'ATPe avant injection d'ATP (bg). Par la suite, une injection intramusculaire d'ATP (20 $\mu$ L à une concentration de 250  $\mu$ M, Tableau 3.6) a été effectuée dans le muscle gastrocnémien, puis le signal d'ATPe a été mesuré par imagerie de BLI et suivi pendant 16 min. On observe sur la Figure 4.7a un signal de bioluminescence au site d'injection d'ATP. De plus, la Figure 4.7b montre une augmentation significative de la densité moyenne de photons post-injection ( $28.8 \pm 4.3$ ) versus

pré-injection ( $13.5 \pm 1.7$ ) à 4 et 8 min mais qui se dégrade avant 12 min ( $n=3$ ,  $*p < 0.01$ , test de Bonferroni). Ainsi, nous avons observé un pic de la densité de photons de 28.8 pour une concentration d'ATPe locale de 250  $\mu\text{M}$ . Il est à noter que ce signal était à la fois inférieur en intensité et a duré moins longtemps que celui de la stimulation par US+MB.

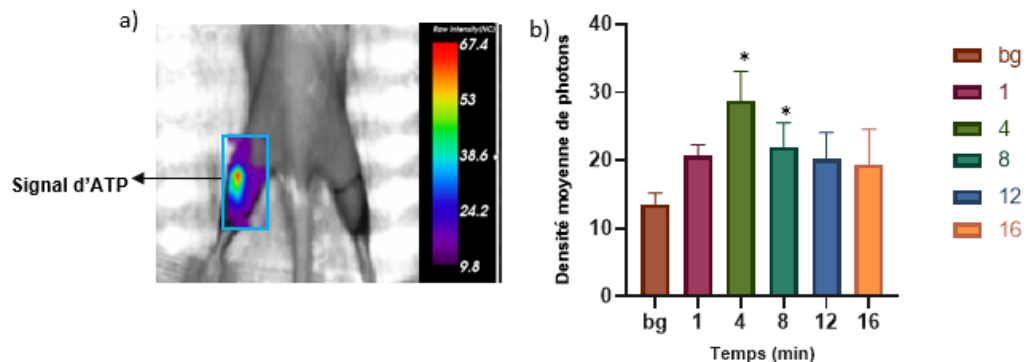


Figure 4.7 : Contrôle positif de quantification d'ATP dans le muscle. a) Signal d'ATPe au site d'injection IM 4 min post-injection. b) Densité moyenne de photons post-injection en fonction du temps. Le background (bg) désigne la pré-injection.  $n=3$ ,  $*p < 0.05$ , test de Bonferroni.

## 4.3 Libération et quantification d'ATPe dans les tumeurs 4T1 après US+MB

### 4.3.1 Évaluation de la perfusion dans les tumeurs

De la même façon que dans le muscle, nous avons soumis des tumeurs 4T1 à une thérapie US+MB avec un guidage (CPS) et quantification de la perfusion par imagerie de contraste ultrasonore (Acuson Sequoia). On peut visualiser les vaisseaux sanguins tumoraux remplis de microbulles avant le pulse thérapeutique et après leur implosion (Figure 4.8). Le centre de la tumeur étant nécrotique, les microbulles ne s'y rendaient pas et donc il n'existait pas d'activité cavitationnelle à cet endroit. La thérapie a donc été volontairement décalée vers la section indiquée par la boîte bleue tel qu'illustrée dans la vidéo prise pendant la thérapie démontrant une forte activité des microbulles à cet endroit (Figure 4.8a et 4.8b). On note aussi un remplissage plus rapide des microbulles notamment à 3 secondes après la salve, ce qui traduit une

augmentation de la perfusion (Figure 4.9a). Toutefois, cette augmentation de perfusion post-US+MB n'a été observée que dans une tumeur, car les autres tumeurs montraient plutôt une diminution de la perfusion post-US+MB (exemple montré à la Figure 4.9b). Par ailleurs, l'évaluation des paramètres de perfusion schématisée dans les Figures 4.10a, 4.10b et 4.10c montrent que le volume sanguin matérialisé par A reste inchangé tandis qu'on note une diminution significative du flux microvasculaire ( $\beta$ ) ainsi que de la perfusion ( $A \times \beta$ ) post-US+MB ( $n=7$ ,  $*p < 0.05$ ). Cependant, une tumeur a montré une élévation de la perfusion à la suite du traitement (Figure 4.10d, 4.10e et 4.10f). La méthode du *"Burst replenishment imaging"* montrait également une augmentation de perfusion dans cette même tumeur.

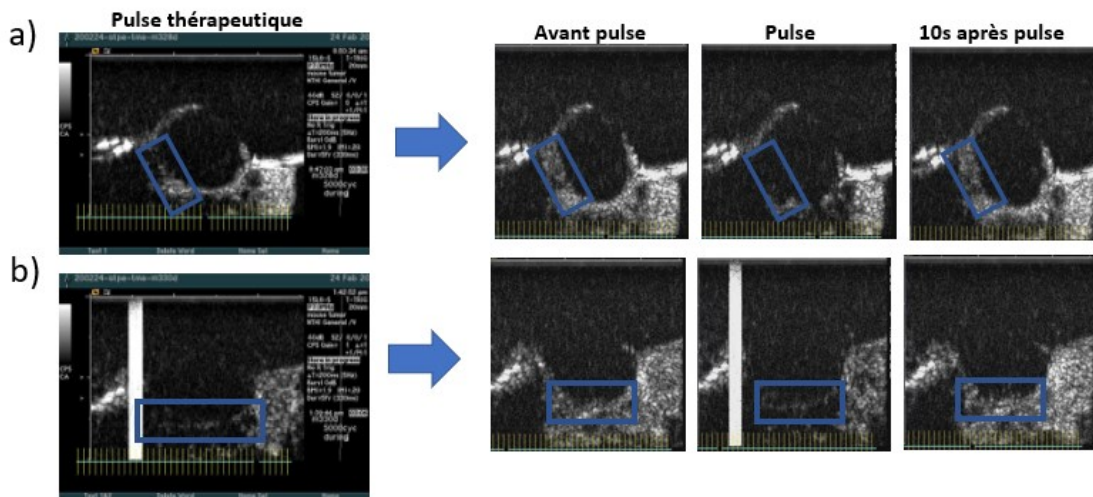


Figure 4.8 : Imagerie de la perfusion dans les tumeurs 4T1 pendant le traitement US+MB. a) et b) représentent deux tumeurs distinctes.



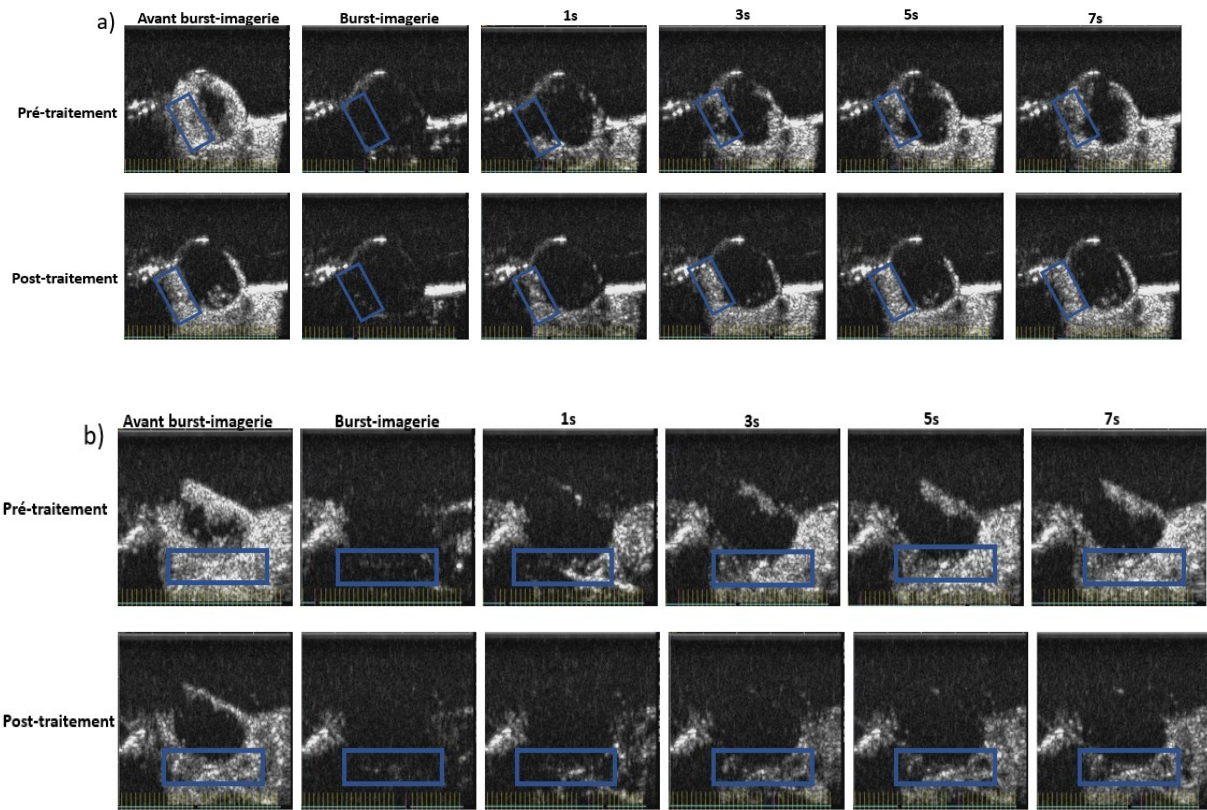


Figure 4.9 : Évaluation de la perfusion dans les tumeurs 4T1 avant et après le traitement US+MB par “Burst replenishment imaging” a) Tumeur matérialisant l’augmentation de la perfusion post-US+MB. b) Tumeur montrant une diminution de la perfusion post US+MB.

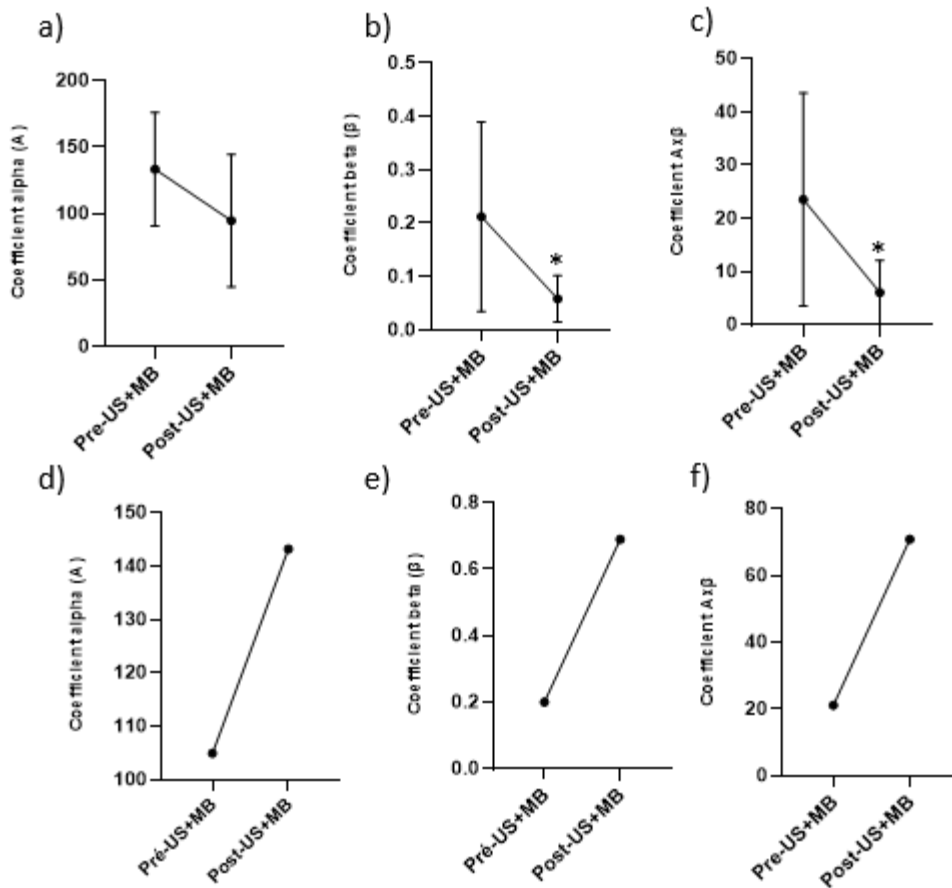


Figure 4.10 : Quantification des paramètres de perfusion dans les tumeurs 4T1 pré et post-US+MB. a) Plateau de l'intensité acoustique (A ou alpha) (n=7, p = ns, test t apparié). b) Vitesse de l'intensité acoustique (beta ou β) (n=7, \*p < 0.05, test t apparié). c) Perfusion dans les tumeurs (A x β) (n=7, \*p < 0.05, test t apparié). d, e et f sont respectivement les paramètres A, β, A x β et sont des paramètres de perfusion dans la seule tumeur montrant une élévation de perfusion après le traitement US+MB.

### 4.3.2 Quantification du signal d'ATPe dans les tumeurs

Après traitement US+MB, un signal d'ATPe a été observé dans la tumeur traitée par rapport à la tumeur contrôle (Figure 4.11a). L'intensité moyenne de photons du côté traité par US+MB était 2 fois plus élevée ( $27.5 \pm 13.5$ ) par rapport à celui non traité ( $12.75 \pm 1.1$ ) et cette augmentation a persisté pendant 45 min post-traitement (n=7, \*p < 0.05, test de Bonferroni, Figure 4.11b). Il est important de noter que la tumeur ayant précédemment montré une augmentation de perfusion post-US+MB (Figure 4.10d, 4.10e et 4.10f) a également présenté un très fort signal d'ATPe (Figure 4.11c) tandis que les autres tumeurs ont montré un signal d'ATPe

relativement plus faible. Puisque l'intensité moyenne de BLI de cette tumeur était très élevée par rapport à celle des autres tumeurs, cette dernière a intentionnellement été exclue du graphe représenté à la Figure 4.11b.

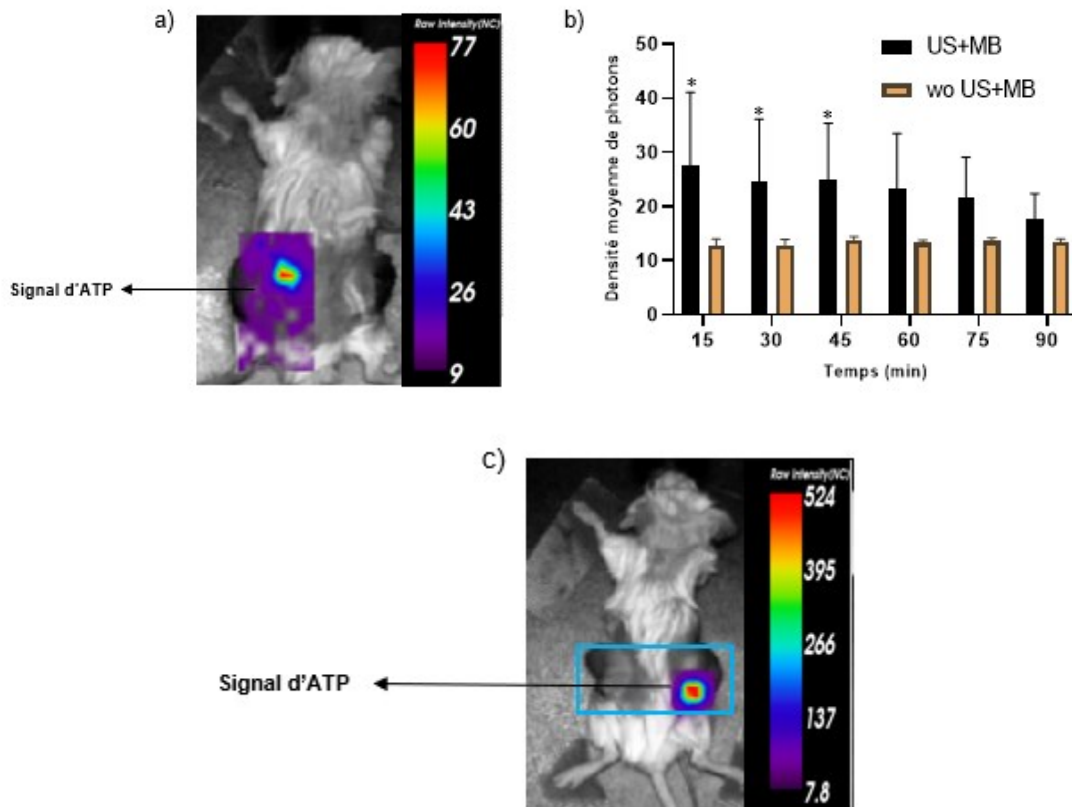


Figure 4.11 : Quantification du signal d'ATPe après US+MB dans les tumeurs : a) Intensité brute (nombre de photons) du signal d'ATPe post-US+MB dans la tumeur traitée. b) Intensité moyenne du signal dans la tumeur traitée par US+MB et dans la tumeur controlatérale (contrôle négatif) en fonction du temps (n=7, \*p<0.05, test de Bonferroni).c) Intensité brute du signal d'ATPe dans la tumeur ayant montré un fort signal de BLI.

## Chapitre 5 Discussion

Ce chapitre est consacré à la discussion générale des résultats obtenus à l'issue de notre étude. Les difficultés rencontrées lors des différentes expériences ainsi que les perspectives futures du projet seront également présentées.

### 5.1 Discussion générale

Cette section est répartie en 3 grandes sous-sections : une section portant sur la quantification d'ATPe *in vitro*, une deuxième section accentuée sur l'évaluation de la perfusion et la mesure du signal d'ATPe dans le muscle et une troisième section basée sur les études dans la tumeur (perfusion et mesure du signal d'ATPe).

#### 5.1.1 Quantification d'ATPe *in vitro*

Les études *in vitro* nous ont permis de conclure que les stimuli externes tels que le grattage cellulaire et les microbulles stimulées par ultrasons peuvent libérer de l'ATPe. Les résultats du grattage cellulaire montrent une augmentation significative du signal d'ATPe pour une concentration de luciférase de 1X (0.7  $\mu\text{M}$ ) et de 0.5X (0.35  $\mu\text{M}$ ) à 1 min (n=5). Le graphique associé (Figure 4.1) montre une grande variabilité du signal d'ATPe en utilisant cette méthode, ce qui pourrait s'expliquer par des différences entre les stimuli, dont la pression exercée sur l'embout lors du grattage cellulaire, et le contrôle de la zone grattée. Si la pression exercée est grande, le dommage membranaire est plus grand, plus de cellules sont affectées et une plus grande quantité d'ATP est libérée. Le graphique montre également que la concentration de luciférase joue un rôle considérable sur le signal de bioluminescence (BLI) mesuré. Pour une grande concentration de luciférase, le signal est maximal en début de réaction. En effet, la cinétique de la réaction catalysée par la luciférase suit l'équation de Michaelis-Menten qui stipule que la vitesse de la réaction est proportionnelle à la concentration d'enzyme [140]. Par ailleurs, il n'existe pas de différence significative entre l'intensité de bioluminescence à 4 minutes post-grattage versus avant le grattage cellulaire. Cette diminution du signal pourrait s'expliquer premièrement la consommation des réactifs impliqués dans la réaction de bioluminescence

spécifiquement l'ATP libéré. En effet, les études cinétiques effectuées par une stagiaire de notre laboratoire ont montré que pour une concentration de luciférine de 500  $\mu\text{M}$  (celle utilisée dans cette expérience était de 400  $\mu\text{M}$ ) et d'ATP comprise entre 90 nM et 9  $\mu\text{M}$ , on obtient une densité moyenne de photons comprise entre 35 et 6500 et que le signal augmente avec la concentration d'ATP. En faisant le rapprochement avec notre étude, on peut déduire que la diminution du signal est associée à la faible quantité d'ATP libérée et que la luciférine est en excès dans le milieu. Quant à la luciférase, elle est régénérée à la fin de la réaction.

Un signal d'ATPe a aussi été observé après traitement US+MB dans une culture de cellules 4T1 *in vitro*. La densité de photon associée au signal d'ATP augmentait avec la pression et le nombre de cycles. En effet, lorsque la pression ultrasonore est élevée, les microbulles exercent une activité plus intense sur la membrane plasmique, ce qui peut entraîner une libération d'une plus grande quantité d'ATP. De même, les pulses les plus longs permettent de maintenir une activité plus longue des microbulles entraînant ainsi la libération d'une grande quantité d'ATP. Il a été démontré que la sonoporation (microporation) est le mécanisme principal de libération d'ATP *in vitro* après traitement US+MB [9]. En effet, la sonoporation entraîne la formation des pores sur la membrane plasmique et la libération des molécules intracellulaires telles que l'ATP. De plus, une pression ultrasonore élevée peut entraîner la mort cellulaire et une libération d'ATP. En effet, la mort cellulaire par apoptose ou par nécrose est un mécanisme connu de libération d'ATP dans le microenvironnement tumoral [91].

En comparant les résultats du signal d'ATPe libéré post-grattage avec celui du traitement US+MB, on pourrait argumenter qu'il existe 2 mécanismes de libération d'ATPe : la libération immédiate et la libération continue d'ATPe. En effet, le mécanisme sous-jacent du grattage cellulaire pourrait être la libération immédiate d'ATPe, étant donné qu'on observe un signal dont le pic est atteint en début de réaction et qui se dégrade rapidement (1min). Quant au traitement US+MB, l'ATP pourrait être libéré à la fois par la voie immédiate et la voie continue ce qui pourrait expliquer un maintien de signal pendant 5min. La voie immédiate de libération d'ATP pourrait être relié aux dommages physiques provoqués par le grattage ou le traitement US+MB. En revanche, la voie continue mettrait en évidence les mécanismes secondaires en aval du traitement US+MB. En effet, il a été démontré que la thérapie US+MB libéré de l'ATP de façon immédiate (microporation) et continue (mécanotransduction dans le muscle) [9]. De plus, la

libération d'ATPe par la pannexine-1 qui est canal ionique mécanosensible a déjà été proposée [141].

### 5.1.2 Quantification de la perfusion et du signal d'ATPe dans le muscle

À travers l'analyse des images pré et post-traitement par le “*burst replenishment imaging*”, nous avons pu démontrer que la thérapie US+MB augmente la perfusion dans le muscle notamment avec le retour plus rapide des microbulles à 1, 3 et 5 secondes après le burst d'imagerie post-traitement (Figure 4.4). Aussi, une augmentation significative de la perfusion post-US+MB a été observée dans le muscle après calcul des paramètres de perfusion (Figure 4.5). Cette augmentation était associée à la fois à l'élévation de la vitesse de l'intensité acoustique ( $\beta$ ) et de la perfusion microvasculaire ( $Ax\beta$ ) mais pas du volume sanguin microvasculaire ( $A$ ). En effet, il a déjà été démontré que l'activité cavitationnelle des microbulles entraîne une activation du signalement purinergique (ATP, adénosine) et une vasodilatation du muscle squelettique, cardiaque et chez des patients atteints de la maladie de l'artère périphérique [9], [119], [137]. Nos résultats montrent que le mécanisme primordial à l'origine de cette vasodilatation dans le muscle s'accompagne d'une augmentation de la concentration d'ATPe. En effet, l'activation du récepteur P2Y par l'ATPe entraîne l'activation de l'oxyde nitrique synthase et la production du NO (monoxyde d'azote), un vasodilatateur [9]. De même, sous l'action du CD39 et du CD73, l'ATPe libéré après US+MB dans le muscle est dégradé en adénosine, une molécule ayant une forte action vasodilatatrice [9].

Dans le muscle, nous avons démontré que le traitement US+MB à une pression de 800 kPa avec un long pulse de 5000 cycles permet une libération d'ATPe. Une augmentation significative du signal d'ATPe a été observée sur le côté traité par US+MB contrairement au côté non traité. Il est intéressant d'observer que le signal d'ATPe post-US+MB a persisté environ 1h post-traitement dans le muscle (Figure 4.6). Cette persistance du signal pourrait s'expliquer par plusieurs facteurs. Premièrement, comme *in vitro*, nous pensons que le traitement US+MB crée des pores sur la membrane et une libération continue d'ATP. Deuxièmement, la thérapie US+MB active la pannexine-1 et un relargage prolongé d'ATP. En effet, une diminution du signal d'ATPe (10 fois) chez des souris knockout du gène de la pannexine-1 comparé au groupe sauvage suite à la

thérapie US+MB a déjà été démontrée [119]. Aussi, le signal a persisté plus de 30 min à la fois chez le groupe Panx1<sup>-/-</sup> et chez le groupe sauvage.

À 1h15 post-traitement, le signal d'ATPe est statistiquement non différent de celui du pré-traitement. La diminution du signal pourrait s'expliquer entre autres par la dégradation de la luciférine. En effet, la demi-vie de la luciférine dans le plasma est d'environ 2 heures [111], donc celle-ci pouvait constituer le facteur limitant de la réaction de BLI à 1h15. Cependant, après la réinjection de luciférine et luciférase 4h30 post-US+MB (Figure 4.6) la densité moyenne de photons du côté traité n'était pas statistiquement plus élevée que celle pré-traitement. On pourrait penser qu'à 4h30, le facteur limitant de la réaction de BLI était plutôt l'ATP notamment avec une baisse de son relargage.

L'injection IM de 250  $\mu\text{M}$  d'ATP (n=3) nous a permis de déterminer plusieurs paramètres importants dans cette étude: Premièrement, cette injection, en tous points similaire aux autres études dans le muscle mis à part la source d'ATP, nous informe sur la sensibilité de notre système *in vivo*, à savoir que 250  $\mu\text{M}$  d'ATP correspond à une densité de photons de  $\sim 30$  *in vivo*. Ce pic a été atteint à 4 minutes post-injection et pas à 1 minute, ce qui exclut une dégradation de l'ATP dans la seringue. La concentration de 250  $\mu\text{M}$  a été choisie comme référence parce que la concentration d'ATP extracellulaire dans le microenvironnement tumoral est de 100  $\mu\text{M}$  [6]. En comparant le signal d'ATP 16 minutes post-injection avec celui à 15 minutes post-traitement US+MB dans le muscle, nous pouvons en déduire que le traitement US+MB libère une quantité d'ATP supérieure à 250  $\mu\text{M}$  *in vivo*. Il est aussi important de souligner que, puisque le signal de BLI peut être atténué par les tissus, l'injection IM a été effectuée sur les muscles de surface afin de maximiser la capture de la lumière émise par la réaction entre l'ATP, la luciférine et la luciférase. Par ailleurs, le traitement US s'est effectué sur le tissu musculaire en entier (en surface et en profondeur). Ceci accentue l'argument que le traitement US+MB permet un relargage d'ATP important (plus de 250  $\mu\text{M}$ ) et pour une durée de temps prolongée.

### 5.1.3 Évaluation de la perfusion et quantification d'ATPe dans les tumeurs

Dans les tumeurs, en utilisant la méthode du "*burst replenishment imaging*", nous avons observé une augmentation de la perfusion dans une seule tumeur tandis que les autres tumeurs (n=7) ont montré une diminution de la perfusion (Figure 4.9). De même, l'analyse MATLAB montre

également une augmentation des paramètres  $A$ ,  $\beta$  et  $Ax\beta$  dans une seule tumeur (Figure 4.10d, 4.10e, 4.10f) tandis que les autres tumeurs montrent une diminution du flux microvasculaire ( $\beta$ ), de la perfusion ( $Ax\beta$ ) et un volume sanguin qui reste inchangé ( $A$ ) (Figure 4.10a, 4.10b, 4.10c). Cette observation pourrait s'expliquer premièrement par la faible présence des microbulles dans le centre des tumeurs (Figure 4.8). Il faut noter que les tumeurs 4T1 sont constituées de cellules qui prolifèrent très vite et par conséquent se nécrosent rapidement. Ainsi, le traitement US+MB était limité à la région perfusée. Deuxièmement, les paramètres ultrasonores utilisés (800 kPa, 5000 cycles) pourraient entraîner des spasmes dans les vaisseaux sanguins tumoraux, provoquant une diminution de la perfusion dans la tumeur. En effet, une vasoconstriction après traitement ultrasons et microbulles à haute pression (500-750 kPa) et à une longueur de 60 pulses a été observée dans les tumeurs PC3 (cellules du cancer de la prostate) alors que les faibles pressions (125-250 kPa) montraient plutôt une augmentation significative de la perfusion tumorale 10 à 25 min post-traitement [142].

Le signal d'ATP obtenu après imagerie de bioluminescence a permis démontrer que le traitement US+MB permet de libérer de l'ATPe dans les tumeurs 4T1. On observe une augmentation significative du signal d'ATPe dans les tumeurs traitées par US+MB par rapport au côté contrôle (Figure 4.11). À la différence des études dans le muscle, nous avons observé une grande variabilité du signal d'ATPe dans les tumeurs (une tumeur a montré un très fort signal par rapport aux 7 autres). Cette différence entre le muscle et la tumeur pourrait s'expliquer par plusieurs facteurs. Le premier facteur est la vasoconstriction engendrée par le traitement US+MB. Les vaisseaux sanguins tumoraux étant jeunes, le pulse de 5000 cycles à une pression de 800 kPa peut entraîner une constriction des vaisseaux et empêcher la circulation des microbulles. Il en résulte ainsi une diminution globale de la perfusion. Le deuxième facteur est la nature de la vascularisation du tissu. Le muscle est un tissu fortement vascularisé découlant de vaisseaux préexistants tandis que les tumeurs possèdent en général une vascularisation désorganisée dérivant de l'angiogenèse stimulée par les facteurs de croissance libérés par le tissu tumoral. Troisièmement, les cellules tumorales expriment fortement les NTPDases qui dégradent rapidement l'ATP pour produire l'adénosine, un mécanisme qui permet l'évasion immunitaire. Toutefois, une des tumeurs a montré un fort signal d'ATPe et une augmentation de la perfusion directement après le traitement (Figure 4.10d, 4.10e et 4.10f). Cette découverte semble montrer



qu'il pourrait exister une association entre l'augmentation de la concentration d'ATPe et de la perfusion après US+MB.

## 5.2 Difficultés techniques rencontrées

Dans cette section, les difficultés techniques rencontrées pendant les expériences seront abordées en 3 sous sections : l'atténuation du signal de bioluminescence *in vivo*, l'accès à la veine caudale pour l'administration de la luciférase et les microbulles et finalement l'analyse des paramètres de perfusion dans le muscle.

### 5.2.1 Atténuation du signal de bioluminescence *in vivo*

Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* démontrent que le signal d'ATPe est quantifiable par bioluminescence en utilisant le système IVIS [9], [111], [121]. Nos études *in vitro* de quantification du signal d'ATP après traitement US+MB nous ont également permis de démontrer que le signal d'ATP post-US+MB est quantifiable par bioluminescence dans une population de cellules 4T1 en utilisant l'Optix Mx2. Cependant, les premières études de mesure du signal d'ATPe dans le muscle en utilisant l'Optix Mx2 post-US+MB n'ont pas démontré une augmentation du signal d'ATPe (résultats non présentés). Nous avons alors pensé que cela était en lien avec un problème de sensibilité de la méthode et/ou d'atténuation. En effet, il est bien connu que l'énergie optique est rapidement atténuée avec la profondeur. Par exemple, le changement dans le spectre de cellules PC3 bioluminescentes *in vitro* et *in vivo* est reproduit dans la Figure 5.1 [143]: une forte diminution de l'ordre de 65% (surface sous la courbe) a été observée *in vivo* en raison de l'atténuation. Cette atténuation est particulièrement forte dans les longueurs d'onde < 600 nm.

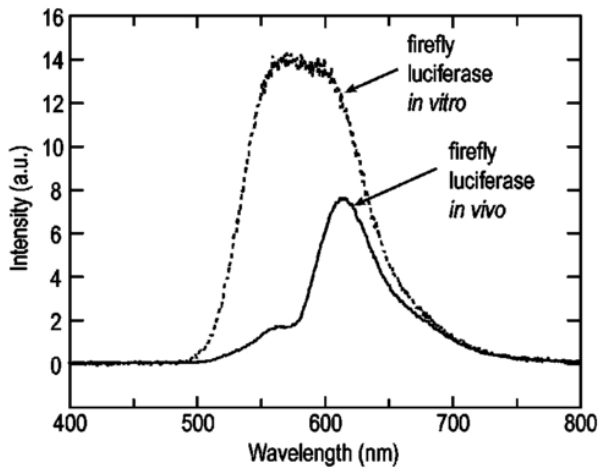


Figure 5.1 : Mesure du signal de bioluminescence *in vitro* et *in vivo* des cellules PC3 exprimant la luciférase. Adapté de Rice et al., 2001 [143]

Nous avons donc cherché à déterminer le niveau d'atténuation du signal de bioluminescence *in vivo* avec notre système dans le muscle : un test d'atténuation a été réalisé en mesurant l'intensité de bioluminescence d'un mélange de luciférine (250  $\mu\text{M}$ ), luciférase (219 nM) et ATP (100  $\mu\text{M}$ ) dans un volume de 10  $\mu\text{L}$  contenu dans une boîte de pétri d'une part et injectée en intramusculaire d'autre part. La concentration de luciférase utilisée est équivalente à celle qu'on retrouverait dans le muscle après injection IV de 270  $\mu\text{g}$  chez une souris de 20 g. La Figure 5.2a montre un pourcentage d'atténuation de 77.6% après injection intramusculaire, ce qui est plus que la valeur attendue, et laisse présager que la bande passante en bioluminescence dans l'Optix Mx2 est possiblement  $< 600$  nm, ce que nous n'avons pu modifier. Aussi, pour déterminer si le tissu musculaire atténue le signal d'ATPe, nous avons mesuré l'intensité de BLI d'un mélange de luciférine (250  $\mu\text{M}$ ), luciférase (0.7  $\mu\text{M}$ ) et d'ATP (100  $\mu\text{M}$ ) dans un volume de 10  $\mu\text{L}$  contenu dans une plaque de puits avec et sans du tissu musculaire au-dessus du mélange. Par ailleurs le signal a été imagé à différentes positions de la ligne verte (pos0 = directement au-dessus de la goutte ou du muscle, pos-1= - 0.5 cm du muscle et pos1 = 0.5 cm du muscle). Les résultats obtenus sont décrits à la Figure 5.2b. En comparant le signal sans tissu musculaire (TM) avec celui en présence du muscle avec la ligne verte en position 0 (TM-Pos0), on observe une diminution (59%) du signal en présence du tissu musculaire (n=2). On observe également que la ligne verte influence le signal de BLI. Idéalement cette dernière devrait être placée directement au-dessus de la région d'intérêt, soit à la position 0 car on observe une diminution de la densité de photons pour les positions -1 et 1. Toutefois, des expériences supplémentaires (augmentation

de la taille de l'échantillon) sont nécessaires pour prouver que la différence du signal est significative d'une condition à une autre.

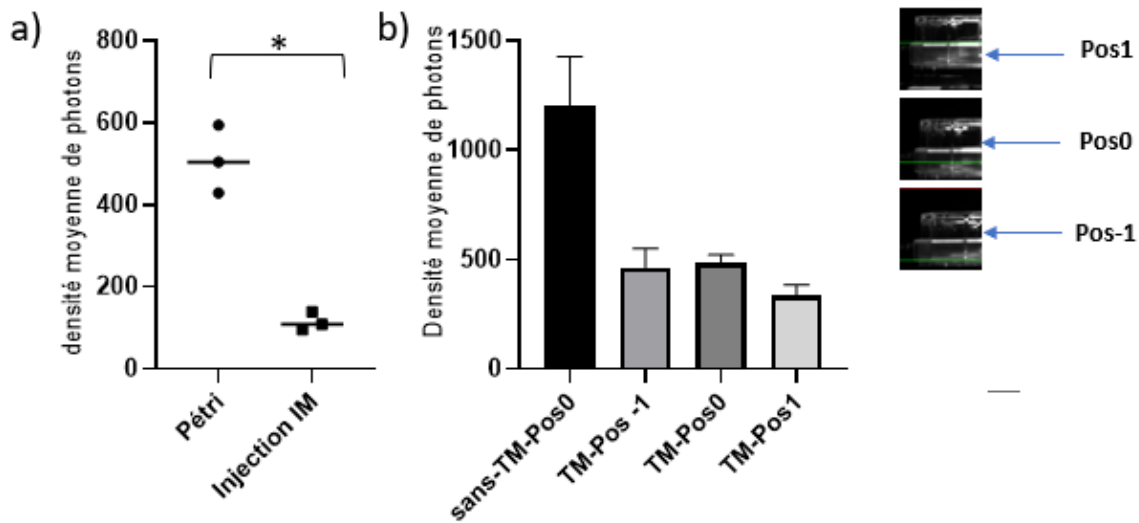


Figure 5.2 : Test d'atténuation du signal de bioluminescence. a) Densité moyenne du mélange de luciférine, luciférase et ATP dans un pétri, versus injecté par voie intramusculaire (n=3, \*p<0.05, test t non apparié). b) Signal d'ATPe en présence (Position 0) ou non du tissu musculaire et ce à différentes positions de la ligne verte (Position1 ou Pos1, Position0 ou Pos0 et Position-1 ou Pos-1) (n=2). TM désigne le tissu musculaire.

Pour augmenter la sensibilité de la détection du signal d'ATP *in vivo*, 2 facteurs ont été ajustés : la quantité de luciférase et le temps d'intégration pour l'acquisition d'images. En effet, les résultats obtenus après grattage des cellules 4T1 à différentes concentrations de luciférase avait démontré qu'il existe une association entre la concentration de luciférase et le signal d'ATP. Ainsi, la quantité de luciférase pour les expériences *in vivo* a été augmentée d'un facteur 10 (de 27 µg à 270 µg), pour toutes les expériences (dans le muscle et dans les tumeurs). Le temps d'intégration quant à lui a été augmenté d'un facteur 5 (de 1 à 5 secondes). Il est important de rappeler que toutes les expériences *in vivo* (Figures 4.6, 4.7 et 4.11) ont été effectuées avec les mêmes conditions (luciférine, luciférase, paramètres Optix Mx2). L'augmentation du temps d'intégration a permis d'augmenter le rapport signal sur bruit et d'obtenir un signal plus significatif de BLI. Cependant, cette augmentation du temps d'intégration augmente le temps d'acquisition de l'image.

## **5.2.2 Accès à la veine caudale pour l'administration de la luciférase et des microbulles**

Dans nos études *in vivo*, l'accès à la veine caudale était nécessaire pour administrer la luciférase et les microbulles. Avant injection (insertion du cathéter), la queue de la souris était désinfectée et chauffée environs 2 minutes. Cependant il était difficile d'accéder à la veine qui n'était pas souvent assez visible chez les souris BALB/c. Après environs 3 échecs d'insertion de l'aiguille dans la queue, des hématomes se formaient sur la queue et il fallait attendre en moyenne 2 jours pour essayer de nouveau.

L'insertion d'un cathéter dans la veine jugulaire après chirurgie a permis de remédier à cette situation. Les souris devaient rester sous infusion de saline héparinisée post-opératoire et étaient prêtes pour recevoir le traitement US+MB 3 jours après la canulation de la veine jugulaire. Les souris pouvaient être retournées à leur cages munie d'un adaptateur permettant de maintenir le cathéter en infusion constante et maintenue jusqu'à 3 semaines post-opératoires. Une difficulté majeure avec cette nouvelle technique était la manipulation du cathéter jugulaire après implantation, car une mauvaise utilisation pouvait être fatale pour les souris (entrée des bulles d'aires dans le cathéter pouvant mener à une embolie pulmonaire).

## **5.2.3 Analyse des paramètres de perfusion dans le muscle**

Un bris interne de l'Acuson Sequoia a causé la perte de certaines vidéos de pré-traitement et de post-traitement dans le muscle (n=3). Après réparation, nous n'avons pas été en mesure de récupérer ces vidéos. Ainsi, les données de perfusion dans le muscle ne sont basées que sur l'analyse MATLAB pour n=3 (initialement, n=6).

## **5.3 Les prochaines étapes du projet**

Cette étude a permis de démontrer que le traitement US+MB permet de libérer de l'ATP *in vitro* et *in vivo* et que le signal est quantifiable avec l'Optix Mx2. Toutefois, plusieurs questions demeurent inexplorées : premièrement, pour augmenter la concentration d'ATPe dans les tumeurs après US+MB, l'utilisation du POM-1, un inhibiteur du spécifique du CD39 serait envisageable. Cette expérience permettra d'empêcher l'action hydrolytique du CD39 sur l'ATPe. Aussi, des souris knockout du gène du CD39 pourront être un excellent modèle de mesure du

signal d'ATPe dans les tumeurs afin d'augmenter le signal d'ATPe après US+MB. Deuxièmement, Il serait important d'étudier les différents mécanismes expliquant la persistance du signal d'ATP au cours du temps (sonoporation, mécanotransduction) dans le microenvironnement tumoral. Par exemple, l'utilisation des souris pannexine-1 knockout permettra de déterminer le rôle de cette protéine sur la libération continue d'ATP. En troisième plan, étant donné que nous avons été en mesure de quantifier l'ATPe à travers des cellules HEK-293 transfectés stablement avec le gène de la luciférase membranaire (Annexe A), la transfection de certains modèles de cancers à l'occurrence les cellules MC38 ou les PC3 pourraient être des méthodes alternatives de quantification du signal d'ATPe *in vitro* et *in vivo*. L'avantage de cette méthode serait d'une part une livraison locale de la luciférase, ce qui évitera aux souris une chirurgie pour insertion du cathéter dans la veine jugulaire et d'autre part le faible coût puisqu'une source externe de luciférase ne sera plus nécessaire. Enfin, une caractérisation de la réponse immunitaire post-US+MB sera nécessaire pour démontrer que l'ATP extracellulaire peut activer des réactions pro-inflammatoires. Ainsi le traitement ultrasonore sera effectué à plusieurs reprises et les tumeurs seront récupérés post-traitement pour analyse des TILs en l'occurrence les cellules tueuses naturelles, les macrophages et les cellules T.

## Conclusion

Le but de cette étude était de démontrer que le traitement US+MB permet la libération d'ATP dans les tumeurs de cancer du sein murin (4T1). La première étude basée sur le grattage cellulaire *in vitro* a permis de démontrer que les cellules 4T1 peuvent libérer de l'ATP dans le milieu extracellulaire et que le signal est quantifiable par imagerie de bioluminescence (BLI). Cette étude a également permis de comprendre l'effet de la concentration en luciférase sur le signal d'ATP. La seconde étude a démontré que le traitement US+MB sur des cellules 4T1 *in vitro* permet de libérer de l'ATPe. Cette 2<sup>e</sup> étude a démontré qu'une augmentation de la pression et du nombre de cycles augmente le signal d'ATP libéré par US+MB. Dans la troisième étude, nous avons démontré une augmentation significative du signal d'ATP post-US+MB dans le muscle traité par rapport au muscle contrôle et pouvant persister jusqu'à 1h post-US+MB. De façon intéressante, le contrôle positif de quantification d'ATP dans le muscle (injection de 250  $\mu$ M d'ATP) suggère que le traitement US+MB libère une quantité d'ATPe supérieure à 250  $\mu$ M *in vivo*. L'analyse de la perfusion (pré et post-US+MB) a démontré une augmentation significative de la perfusion dans le muscle. La quatrième étude a permis de démontrer que le traitement US+MB dans les tumeurs 4T1 injectées en sous-cutané libère de l'ATPe, et le signal peut persister 45 min post-US+MB. Cependant, la perfusion a diminué dans les tumeurs post-US+MB.

Pour résumer, le traitement US+MB permet de libérer de l'ATP dans une population de cellules 4T1 *in vitro* et *in vivo* avec une persistance du signal de 60 min dans le muscle et de 45 min dans les tumeurs. De façon intéressante, nous avons noté à la fois une augmentation de la perfusion et du signal d'ATPe dans le muscle post-US+MB. Dans les tumeurs, bien que la perfusion ait diminuée, le signal d'ATPe a augmenté significativement après US+MB. Ainsi, ce projet a permis d'étudier pour la première fois la libération et la quantification d'ATP extracellulaire dans les tumeurs post-US+MB. Bien que des études complémentaires de mesure du signal d'ATPe post-US+MB dans les tumeurs soient nécessaires, l'imagerie par bioluminescence du signal d'ATPe *in vitro* et *in vivo* en utilisant l'Optix Mx2 a été bien démontrée.

## Références bibliographiques

- [1] D. R. Brenner *et al.*, “Projected estimates of cancer in Canada in 2020,” *CMAJ*, vol. 192, no. 9, pp. E199–E205, Mar. 2020.
- [2] M. Ottaviano, S. De Placido, and P. A. Ascierto, “Recent success and limitations of immune checkpoint inhibitors for cancer: a lesson from melanoma,” *Virchows Arch*, vol. 474, no. 4, pp. 421–432, Apr. 2019.
- [3] J. M. Zaretsky *et al.*, “Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma,” Dec. 28, 2020.
- [4] G. Y. Chen and G. Nuñez, “Sterile inflammation: sensing and reacting to damage,” *Nat Rev Immunol*, vol. 10, no. 12, pp. 826–837, Dec. 2010.
- [5] T. Gong, L. Liu, W. Jiang, and R. Zhou, “DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases,” *Nature Reviews Immunology*, vol. 20, no. 2, Art. no. 2, Feb. 2020.
- [6] S. M. Gilbert *et al.*, “ATP in the tumour microenvironment drives expression of nfp2X 7, a key mediator of cancer cell survival,” *Oncogene*, vol. 38, no. 2, Art. no. 2, Jan. 2019.
- [7] D. Allard, B. Allard, and J. Stagg, “On the mechanism of anti-CD39 immune checkpoint therapy,” *J Immunother Cancer*, vol. 8, no. 1, Feb. 2020.
- [8] I. Perrot *et al.*, “Blocking Antibodies Targeting the CD39/CD73 Immunosuppressive Pathway Unleash Immune Responses in Combination Cancer Therapies,” *Cell Reports*, vol. 27, no. 8, pp. 2411-2425.e9, May 2019.
- [9] J. T. Belcik *et al.*, “Augmentation of muscle blood flow by ultrasound cavitation is mediated by ATP and purinergic signaling,” *Circulation*, vol. 135, no. 13, pp. 1240–1252, Mar. 2017.
- [10] C. Fitzmaurice *et al.*, “Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 29 Cancer Groups, 1990 to 2016,” *JAMA Oncol*, vol. 4, no. 11, Nov. 2018.
- [11] D. Kołat, Ż. Kałuzińska, A. K. Bednarek, and E. Płuciennik, “The biological characteristics of transcription factors AP-2 $\alpha$  and AP-2 $\gamma$  and their importance in various types of cancers,” *Biosci Rep*, vol. 39, no. 3, Mar. 2019.

- [12] M. W. L. Teng, M. H. Kershaw, and M. J. Smyth, "Cancer Immunoediting," in *Cancer Immunotherapy*, Elsevier, 2013, pp. 85–99.
- [13] C. J. Turtle *et al.*, "Immunotherapy of non-Hodgkin's lymphoma with a defined ratio of CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> CD19-specific chimeric antigen receptor–modified T cells," *Sci. Transl. Med.*, vol. 8, no. 355, pp. 355ra116–355ra116, Sep. 2016.
- [14] C. J. Turtle *et al.*, "Durable Molecular Remissions in Chronic Lymphocytic Leukemia Treated With CD19-Specific Chimeric Antigen Receptor–Modified T Cells After Failure of Ibrutinib," *J Clin Oncol*, vol. 35, no. 26, pp. 3010–3020, Sep. 2017.
- [15] M. B. Atkins *et al.*, "High-Dose Recombinant Interleukin 2 Therapy for Patients With Metastatic Melanoma: Analysis of 270 Patients Treated Between 1985 and 1993," *JCO*, vol. 17, no. 7, pp. 2105–2105, Jul. 1999.
- [16] H. M. Golomb *et al.*, "Alpha-2 interferon therapy of hairy-cell leukemia: a multicenter study of 64 patients.," *Journal of Clinical Oncology*, Sep. 2016.
- [17] S. Lee and K. Margolin, "Cytokines in Cancer Immunotherapy," *Cancers (Basel)*, vol. 3, no. 4, pp. 3856–3893, Oct. 2011.
- [18] A. A. Tarhini *et al.*, "A phase 2, randomized study of SB-485232, rhIL-18, in patients with previously untreated metastatic melanoma," *Cancer*, vol. 115, no. 4, pp. 859–868, Feb. 2009.
- [19] V. A. Boussiotis, "Molecular and Biochemical Aspects of the PD-1 Checkpoint Pathway," *N Engl J Med*, vol. 375, no. 18, pp. 1767–1778, Nov. 2016.
- [20] S. Yao and L. Chen, "PD-1 as an Immune Modulatory Receptor," *Cancer J*, vol. 20, no. 4, pp. 262–264, 2014.
- [21] R. Mizuno *et al.*, "PD-1 Primarily Targets TCR Signal in the Inhibition of Functional T Cell Activation," *Front Immunol*, vol. 10, Mar. 2019.
- [22] J. Larkin *et al.*, "Five-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma," *New England Journal of Medicine*, vol. 381, no. 16, pp. 1535–1546, Oct. 2019.
- [23] E. B. Garon *et al.*, "Pembrolizumab for the Treatment of Non–Small-Cell Lung Cancer," *New England Journal of Medicine*, vol. 372, no. 21, pp. 2018–2028, May 2015.
- [24] J. A. Seidel, A. Otsuka, and K. Kabashima, "Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 Therapies in Cancer: Mechanisms of Action, Efficacy, and Limitations," *Front Oncol*, vol. 8, Mar. 2018.



- [25] C. E. Rudd, A. Taylor, and H. Schneider, "CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction," *Immunol Rev*, vol. 229, no. 1, pp. 12–26, May 2009.
- [26] L. Festino, V. Vanella, M. Strudel, and P. A. Ascierto, "Chapter 7 - Molecular Mechanisms Underlying the Action of Ipilimumab Against Metastatic Melanoma," in *Immunology*, M. A. Hayat, Ed. Academic Press, pp. 85–96, 2018.
- [27] D. Y. Wang *et al.*, "Fatal Toxic Effects Associated With Immune Checkpoint Inhibitors: A Systematic Review and Meta-analysis," *JAMA Oncol*, vol. 4, no. 12, p. 1721, Dec. 2018.
- [28] D. Vijayan, A. Young, M. W. L. Teng, and M. J. Smyth, "Targeting immunosuppressive adenosine in cancer," *Nature Reviews Cancer*, vol. 17, no. 12, Art. no. 12, Dec. 2017.
- [29] A. Haslam and V. Prasad, "Estimation of the Percentage of US Patients With Cancer Who Are Eligible for and Respond to Checkpoint Inhibitor Immunotherapy Drugs," *JAMA Netw Open*, vol. 2, no. 5, May 2019.
- [30] V. Verma *et al.*, "PD-1 blockade in subprimed CD8 cells induces dysfunctional PD-1+CD38hi cells and anti-PD-1 resistance," *Nat Immunol*, vol. 20, no. 9, pp. 1231–1243, Sep. 2019.
- [31] B. Allard, D. Allard, L. Buisseret, and J. Stagg, "The adenosine pathway in immunoncology," *Nature Reviews Clinical Oncology*, vol. 17, no. 10, Art. no. 10, Oct. 2020.
- [32] R. D. Leone and L. A. Emens, "Targeting adenosine for cancer immunotherapy," *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, vol. 6, no. 1, p. 57, Jun. 2018.
- [33] S. Vigano *et al.*, "Targeting Adenosine in Cancer Immunotherapy to Enhance T-Cell Function," *Front. Immunol.*, vol. 10, 2019.
- [34] C.-H. Su, H.-I. Yeh, C. Hou, and C.-H. Tsai, "Nonviral Technologies for Gene Therapy in Cardiovascular Research," *International Journal of Gerontology - INT J GERONTOL*, vol. 2, pp. 35–47, Jun. 2008.
- [35] A. A. Mohamed, A. A. Arifi, and A. Omran, "The basics of echocardiography," *J Saudi Heart Assoc*, vol. 22, no. 2, pp. 71–76, Apr. 2010.
- [36] A. L. Klibanov and J. A. Hossack, "Ultrasound in Radiology: from Anatomic, Functional, Molecular Imaging to Drug Delivery and Image-Guided Therapy," *Invest Radiol*, vol. 50, no. 9, pp. 657–670, Sep. 2015.
- [37] C. G. Chaussy and S. Thüroff, "High-Intensity Focused Ultrasound for the Treatment of Prostate Cancer: A Review," *Journal of Endourology*, vol. 31, no. S1, p. S-30, Feb. 2017.

- [38] N. M. Duc and B. Keserci, "Emerging clinical applications of high-intensity focused ultrasound," *Diagn Interv Radiol*, vol. 25, no. 5, pp. 398–409, Sep. 2019.
- [39] A. Eranki *et al.*, "High-Intensity Focused Ultrasound (HIFU) Triggers Immune Sensitization of Refractory Murine Neuroblastoma to Checkpoint Inhibitor Therapy," *Clin Cancer Res*, vol. 26, no. 5, pp. 1152–1161, Mar. 2020.
- [40] V. Carina *et al.*, "Inhibitory effects of low intensity pulsed ultrasound on osteoclastogenesis induced in vitro by breast cancer cells," *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, vol. 37, no. 1, p. 197, Aug. 2018.
- [41] T. Kondo *et al.*, "Low-intensity ultrasound adjuvant therapy: enhancement of doxorubicin-induced cytotoxicity and the acoustic mechanisms involved," *J Med Ultrason (2001)*, vol. 36, no. 2, p. 61, Jun. 2009.
- [42] H. V. Sonaye, R. Y. Shaikh, and C. A. Doifode, "Using Microbubbles as Targeted Drug Delivery to Improve AIDS," *Pharmaceutical Formulation Design - Recent Practices*, Jun. 2019.
- [43] E. Quaia, "Classification and Safety of Microbubble-Based Contrast Agents," in *Contrast Media in Ultrasonography: Basic Principles and Clinical Applications*, E. Quaia, Ed. Berlin, Heidelberg: Springer, pp. 3–14, 2005.
- [44] R. H. Abou-Saleh, M. Swain, S. D. Evans, and N. H. Thomson, "Poly(ethylene glycol) Lipid-Shelled Microbubbles: Abundance, Stability, and Mechanical Properties," *Langmuir*, vol. 30, no. 19, pp. 5557–5563, May 2014.
- [45] K. Ferrara, R. Pollard, and M. Borden, "Ultrasound Microbubble Contrast Agents: Fundamentals and Application to Gene and Drug Delivery," *Annual Review of Biomedical Engineering*, vol. 9, no. 1, pp. 415–447, 2007.
- [46] S. Sirsi and M. Borden, "Microbubble Compositions, Properties and Biomedical Applications," *Bubble Sci Eng Technol*, vol. 1, no. 1–2, pp. 3–17, Nov. 2009.
- [47] L. Lee, F. Cavalieri, and M. Ashokkumar, "Exploring New Applications of Lysozyme-Shelled Microbubbles," *Langmuir*, vol. 35, no. 31, pp. 9997–10006, Aug. 2019.
- [48] J. A. Feshitan, C. C. Chen, J. J. Kwan, and M. A. Borden, "Microbubble size isolation by differential centrifugation," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 329, no. 2, pp. 316–324, Jan. 2009.

- [49] J. J. Rychak, J. R. Lindner, K. Ley, and A. L. Klibanov, "Deformable gas-filled microbubbles targeted to P-selectin," *Journal of Controlled Release*, vol. 114, no. 3, pp. 288–299, Sep. 2006.
- [50] Z. Izadifar, P. Babyn, and D. Chapman, "Ultrasound Cavitation/Microbubble Detection and Medical Applications," *J. Med. Biol. Eng.*, vol. 39, no. 3, pp. 259–276, Jun. 2019
- [51] Y. Hu, J. M. F. Wan, and A. C. H. Yu, "Membrane Perforation and Recovery Dynamics in Microbubble-Mediated Sonoporation," *Ultrasound in Medicine and Biology*, vol. 39, no. 12, pp. 2393–2405, Dec. 2013.
- [52] B. Helfield, X. Chen, S. C. Watkins, and F. S. Villanueva, "Biophysical insight into mechanisms of sonoporation," *PNAS*, vol. 113, no. 36, pp. 9983–9988, Sep. 2016.
- [53] I. De Cock *et al.*, "Ultrasound and microbubble mediated drug delivery: acoustic pressure as determinant for uptake via membrane pores or endocytosis," *J Control Release*, vol. 197, pp. 20–28, Jan. 2015.
- [54] P. Qin *et al.*, "Sonoporation-Induced Depolarization of Plasma Membrane Potential: Analysis of Heterogeneous Impact," *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 40, no. 5, pp. 979–989, May 2014.
- [55] H. Lee *et al.*, "Microbubbles used for contrast enhanced ultrasound and theragnosis: a review of principles to applications," *Biomed. Eng. Lett.*, vol. 7, no. 2, pp. 59–69, May 2017.
- [56] H.-D. Liang, J. Tang, and M. Halliwell, "Sonoporation, drug delivery, and gene therapy," *Proc Inst Mech Eng H*, vol. 224, no. 2, pp. 343–361, Feb. 2010.
- [57] C. Pichon, K. Kaddur, P. Midoux, F. Tranquart, and A. Bouakaz, "Recent advances in gene delivery with ultrasound and microbubbles," *Journal of Experimental Nanoscience*, vol. 3, no. 1, pp. 17–40, Mar. 2008.
- [58] F. Hussein, C. Antonescu, and R. Karshafian, "Ultrasound and microbubble induced release from intracellular compartments," *BMC Biotechnol*, vol. 17, May 2017.
- [59] N. McDannold, N. Vykhodtseva, and K. Hynynen, "Use of ultrasound pulses combined with Definity for targeted blood-brain barrier disruption: a feasibility study," *Ultrasound Med Biol*, vol. 33, no. 4, pp. 584–590, Apr. 2007.

- [60] D. McMahon, R. Bendayan, and K. Hynynen, "Acute effects of focused ultrasound-induced increases in blood-brain barrier permeability on rat microvascular transcriptome," *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, Art. no. 1, Apr. 2017.
- [61] K. Hynynen, "Ultrasound for drug and gene delivery to the brain," *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 60, no. 10, pp. 1209–1217, Jun. 2008.
- [62] N. Li *et al.*, "Tumor perfusion enhancement by ultrasound stimulated microbubbles potentiates PD-L1 blockade of MC38 colon cancer in mice," *Cancer Lett*, vol. 498, pp. 121–129, Feb. 2021.
- [63] M. Amate, J. Goldgewicht, B. Sellamuthu, J. Stagg, and F. T. H. Yu, "The effect of ultrasound pulse length on microbubble cavitation induced antibody accumulation and distribution in a mouse model of breast cancer," *Nanotheranostics*, vol. 4, no. 4, pp. 256–269, 2020.
- [64] P. J. H. Lee, P. N. Matkar, M. A. Kuliszewski, and H. Leong-Poi, "Ultrasound-targeted cardiovascular gene therapy," in *Cardiac Regeneration and Repair*, Elsevier, 2014, pp. 380–407.
- [65] M. J. K. Blomley, J. C. Cooke, E. C. Unger, M. J. Monaghan, and D. O. Cosgrove, "Microbubble contrast agents: a new era in ultrasound," *BMJ*, vol. 322, no. 7296, pp. 1222–1225, May 2001.
- [66] I. Lekht *et al.*, "Role of contrast-enhanced ultrasound (CEUS) in evaluation of thermal ablation zone," *Abdom Radiol (NY)*, vol. 41, no. 8, pp. 1511–1521, 2016.
- [67] Y. Miyamoto, T. Ito, E. Takada, K. Omoto, T. Hirai, and F. Moriyasu, "Efficacy of Sonazoid (Perflubutane) for Contrast-Enhanced Ultrasound in the Differentiation of Focal Breast Lesions: Phase 3 Multicenter Clinical Trial," *American Journal of Roentgenology*, vol. 202, no. 4, pp. W400–W407, Mar. 2014.
- [68] S. Kotopoulos, G. Dimcevski, O. Helge Gilja, D. Hoem, and M. Postema, "Treatment of human pancreatic cancer using combined ultrasound, microbubbles, and gemcitabine: A clinical case study," *Medical Physics*, vol. 40, no. 7, p. 072902, Jul. 2013.
- [69] T. Mainprize *et al.*, "Blood-Brain Barrier Opening in Primary Brain Tumors with Non-invasive MR-Guided Focused Ultrasound: A Clinical Safety and Feasibility Study," *Sci Rep*, vol. 9, Jan. 2019.

- [70] J. J. Zimmerman, A. von Saint André-von Arnim, and J. McLaughlin, "Chapter 74 - Cellular Respiration," in *Pediatric Critical Care (Fourth Edition)*, B. P. Fuhrman and J. J. Zimmerman, Eds. Saint Louis: Mosby, , pp. 1058–1072, 2011.
- [71] I. Bjelobaba, M. M. Janjic, and S. S. Stojilkovic, "Purinergic Signaling Pathways in Endocrine System," *Auton Neurosci*, vol. 191, pp. 102–116, Sep. 2015.
- [72] M. Bonora *et al.*, "ATP synthesis and storage," *Purinergic Signal*, vol. 8, no. 3, pp. 343–357, Sep. 2012.
- [73] G. Burnstock, "Purinergic nerves," *Pharmacol. Rev.*, vol. 24, no. 3, pp. 509–581, Sep. 1972.
- [74] F. Di Virgilio, A. C. Sarti, S. Falzoni, E. De Marchi, and E. Adinolfi, "Extracellular ATP and P2 purinergic signalling in the tumour microenvironment," *Nature Reviews Cancer*, vol. 18, no. 10, Art. no. 10, Oct. 2018.
- [75] Spaans Floor, de Vos Paul, Bakker Winston W., van Goor Harry, and Faas Marijke M., "Danger Signals From ATP and Adenosine in Pregnancy and Preeclampsia," *Hypertension*, vol. 63, no. 6, pp. 1154–1160, Jun. 2014.
- [76] Stachon Peter *et al.*, "Extracellular ATP Induces Vascular Inflammation and Atherosclerosis via Purinergic Receptor Y2 in Mice," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 36, no. 8, pp. 1577–1586, Aug. 2016.
- [77] P. A. Beavis, J. Stagg, P. K. Darcy, and M. J. Smyth, "CD73: a potent suppressor of antitumor immune responses," *Trends in Immunology*, vol. 33, no. 5, pp. 231–237, May 2012.
- [78] M. Segovia, S. Russo, M. R. Girotti, G. A. Rabinovich, and M. Hill, "Role of inflammasome activation in tumor immunity triggered by immune checkpoint blockers," *Clinical & Experimental Immunology*, vol. 200, no. 2, pp. 155–162, 2020.
- [79] A. Taruno, "ATP Release Channels," *Int J Mol Sci*, vol. 19, no. 3, Mar. 2018.
- [80] A. L. Harris, "Connexin channel permeability to cytoplasmic molecules," *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, vol. 94, no. 1, pp. 120–143, May 2007.
- [81] M. L. Cotrina, J. H.-C. Lin, J. C. López-García, C. C. G. Naus, and M. Nedergaard, "ATP-Mediated Glia Signaling," *J. Neurosci.*, vol. 20, no. 8, pp. 2835–2844, Apr. 2000.
- [82] L. Bao, S. Locovei, and G. Dahl, "Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP," *FEBS Letters*, vol. 572, no. 1–3, pp. 65–68, 2004.

- [83] P. W. Furlow *et al.*, "Mechanosensitive pannexin-1 channels mediate microvascular metastatic cell survival," *Nat Cell Biol*, vol. 17, no. 7, pp. 943–952, Jul. 2015.
- [84] Z. Ma, J. E. Tanis, A. Taruno, and J. K. Foskett, "Calcium homeostasis modulator (CALHM) ion channels," *Pflugers Arch*, vol. 468, no. 3, pp. 395–403, Mar. 2016.
- [85] R. A. Romanov, O. A. Rogachevskaja, M. F. Bystrova, P. Jiang, R. F. Margolskee, and S. S. Kolesnikov, "Afferent neurotransmission mediated by hemichannels in mammalian taste cells," *EMBO J*, vol. 26, no. 3, pp. 657–667, Feb. 2007.
- [86] K. Sawada *et al.*, "Identification of a vesicular nucleotide transporter," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 105, no. 15, pp. 5683–5686, Apr. 2008.
- [87] M. Dosch, J. Gerber, F. Jebbawi, and G. Beldi, "Mechanisms of ATP Release by Inflammatory Cells," *Int J Mol Sci*, vol. 19, no. 4, Apr. 2018.
- [88] Y. Moriyama, M. Hiasa, S. Sakamoto, H. Omote, and M. Nomura, "Vesicular nucleotide transporter (VNUT): appearance of an actress on the stage of purinergic signaling," *Purinergic Signal*, vol. 13, no. 3, pp. 387–404, Sep. 2017.
- [89] S. S. Iyer *et al.*, "Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 106, no. 48, pp. 20388–20393, Dec. 2009.
- [90] N. Mikolajewicz, A. Mohammed, M. Morris, and S. V. Komarova, "Mechanically stimulated ATP release from mammalian cells: systematic review and meta-analysis," *J Cell Sci*, vol. 131, no. 22, p. jcs223354, Nov. 2018.
- [91] I. Martins *et al.*, "Molecular mechanisms of ATP secretion during immunogenic cell death," *Cell Death Differ*, vol. 21, no. 1, pp. 79–91, Jan. 2014.
- [92] A. Verkhatsky and G. Burnstock, "Biology of purinergic signalling: Its ancient evolutionary roots, its omnipresence and its multiple functional significance," *BioEssays*, vol. 36, no. 7, pp. 697–705, 2014.
- [93] N. White and G. Burnstock, "P2 receptors and cancer," *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 27, no. 4, pp. 211–217, Apr. 2006.
- [94] K. A. Jacobson and C. E. Müller, "Medicinal Chemistry of Adenosine, P2Y and P2X Receptors," *Neuropharmacology*, vol. 104, pp. 31–49, May 2016.
- [95] M. Hattori and E. Gouaux, "Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors," *Nature*, vol. 485, no. 7397, pp. 207–212, May 2012.

- [96] M. Li, S. D. Silberberg, and K. J. Swartz, "Subtype-specific control of P2X receptor channel signaling by ATP and Mg<sup>2+</sup>," *PNAS*, vol. 110, no. 36, pp. E3455–E3463, Sep. 2013.
- [97] J. G. Fitz, "Regulation of Cellular Atp Release," *Trans Am Clin Climatol Assoc*, vol. 118, pp. 199–208, 2007.
- [98] S. Gessi, S. Merighi, V. Sacchetto, C. Simioni, and P. A. Borea, "Adenosine receptors and cancer," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1808, no. 5, pp. 1400–1412, May 2011.
- [99] P. A. Borea, S. Gessi, S. Merighi, F. Vincenzi, and K. Varani, "Pharmacology of Adenosine Receptors: The State of the Art," *Physiological Reviews*, vol. 98, no. 3, pp. 1591–1625, May 2018.
- [100] S. M. Joseph, M. R. Buchakjian, and G. R. Dubyak, "Colocalization of ATP Release Sites and Ecto-ATPase Activity at the Extracellular Surface of Human Astrocytes," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 26, pp. 23331–23342, Jun. 2003.
- [101] B. Allard, M. S. Longhi, S. C. Robson, and J. Stagg, "The ectonucleotidases CD39 and CD73: novel checkpoint inhibitor targets," *Immunol Rev*, vol. 276, no. 1, pp. 121–144, Mar. 2017.
- [102] M. Michaud *et al.*, "Autophagy-Dependent Anticancer Immune Responses Induced by Chemotherapeutic Agents in Mice," *Science*, vol. 334, no. 6062, pp. 1573–1577, Dec. 2011.
- [103] X.-Y. Li *et al.*, "Targeting CD39 in Cancer Reveals an Extracellular ATP- and Inflammasome-Driven Tumor Immunity," *Cancer Discov*, vol. 9, no. 12, pp. 1754–1773, Dec. 2019.
- [104] I. Monteiro *et al.*, "CD73 expression and clinical significance in human metastatic melanoma," *Oncotarget*, vol. 9, no. 42, pp. 26659–26669, Jun. 2018.
- [105] L. Antonioli, C. Blandizzi, P. Pacher, and G. Haskó, "Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine," *Nature Reviews Cancer*, vol. 13, no. 12, Art. no. 12, Dec. 2013
- [106] B. G. Leclerc *et al.*, "CD73 Expression Is an Independent Prognostic Factor in Prostate Cancer," *Clin Cancer Res*, vol. 22, no. 1, pp. 158–166, Jan. 2016.
- [107] P.-O. Gaudreau, B. Allard, M. Turcotte, and J. Stagg, "CD73-adenosine reduces immune responses and survival in ovarian cancer patients," *Oncoimmunology*, vol. 5, no. 5, Jan. 2016.
- [108] L. Uhrbom, E. Nerio, and E. C. Holland, "Dissecting tumor maintenance requirements using bioluminescence imaging of cell proliferation in a mouse glioma model," *Nature Medicine*, vol. 10, no. 11, Art. no. 11, Nov. 2004.

- [109] P. E. de Almeida, J. R. M. van Rappard, and J. C. Wu, "In vivo bioluminescence for tracking cell fate and function," *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, vol. 301, no. 3, pp. H663–H671, Sep. 2011.
- [110] J. Y. Adams *et al.*, "Visualization of advanced human prostate cancer lesions in living mice by a targeted gene transfer vector and optical imaging," *Nature Medicine*, vol. 8, no. 8, Art. no. 8, Aug. 2002.
- [111] G. Morciano *et al.*, "Use of luciferase probes to measure ATP in living cells and animals," *Nature Protocols*, vol. 12, no. 8, Art. no. 8, Aug. 2017.
- [112] K. Yamamoto, K. Furuya, M. Nakamura, E. Kobatake, M. Sokabe, and J. Ando, "Visualization of flow-induced ATP release and triggering of Ca<sup>2+</sup> waves at caveolae in vascular endothelial cells," *J. Cell. Sci.*, vol. 124, no. Pt 20, pp. 3477–3483, Oct. 2011.
- [113] T. O. Baldwin, "Firefly luciferase: the structure is known, but the mystery remains," *Structure*, vol. 4, no. 3, pp. 223–228, Mar. 1996.
- [114] E. Conti, N. P. Franks, and P. Brick, "Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes," *Structure*, vol. 4, no. 3, pp. 287–298, Mar. 1996.
- [115] B. R. Branchini, R. A. Magyar, M. H. Murtiashaw, and N. C. Portier, "The Role of Active Site Residue Arginine 218 in Firefly Luciferase Bioluminescence," *Biochemistry*, vol. 40, no. 8, pp. 2410–2418, Feb. 2001.
- [116] N. Omidbakhsh, F. Ahmadpour, and N. Kenny, "How Reliable Are ATP Bioluminescence Meters in Assessing Decontamination of Environmental Surfaces in Healthcare Settings?," *PLoS One*, vol. 9, no. 6, Jun. 2014.
- [117] K. Furuya, M. Sokabe, and R. Grygorczyk, "Real-time luminescence imaging of cellular ATP release," *Methods*, vol. 66, no. 2, pp. 330–344, Mar. 2014.
- [118] R. Grygorczyk, K. Furuya, and M. Sokabe, "Imaging and characterization of stretch-induced ATP release from alveolar A549 cells," *J Physiol*, vol. 591, no. Pt 5, pp. 1195–1215, Mar. 2013.
- [119] F. Moccetti *et al.*, "Flow Augmentation in the Myocardium by Ultrasound Cavitation of Microbubbles: Role of Shear-Mediated Purinergic Signaling," *Journal of the American Society of Echocardiography*, 0, Jun. 2020.



- [120] P. Pellegatti, S. Falzoni, P. Pinton, R. Rizzuto, and F. Di Virgilio, "A Novel Recombinant Plasma Membrane-targeted Luciferase Reveals a New Pathway for ATP Secretion," *MBoC*, vol. 16, no. 8, pp. 3659–3665, Jun. 2005.
- [121] S. Falzoni, G. Donvito, and F. Di Virgilio, "Detecting adenosine triphosphate in the pericellular space," *Interface Focus*, vol. 3, no. 3, Jun. 2013.
- [122] S. Keren, O. Gheysens, C. S. Levin, and S. S. Gambhir, "A Comparison Between a Time Domain and Continuous Wave Small Animal Optical Imaging System," *IEEE Trans. Med. Imaging*, vol. 27, no. 1, pp. 58–63, Jan. 2008.
- [123] H. Imamura *et al.*, "Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 106, no. 37, pp. 15651–15656, Sep. 2009.
- [124] T. Yoshida, S. Alfaqaan, N. Sasaoka, and H. Imamura, "Application of FRET-Based Biosensor 'ATeam' for Visualization of ATP Levels in the Mitochondrial Matrix of Living Mammalian Cells," in *Mitochondria*, vol. 1567, D. Mokranjac and F. Perocchi, Eds. New York, NY: Springer New York, pp. 231–243, 2017.
- [125] G. Manfredi, L. Yang, C. D. Gajewski, and M. Mattiazzi, "Measurements of ATP in mammalian cells," *Methods*, vol. 26, no. 4, pp. 317–326, Apr. 2002.
- [126] P. R. Vajjhala, R. E. Mirams, and J. M. Hill, "Multiple Binding Sites on the Pyrin Domain of ASC Protein Allow Self-association and Interaction with NLRP3 Protein," *J Biol Chem*, vol. 287, no. 50, pp. 41732–41743, Dec. 2012.
- [127] N. Kelley, D. Jeltema, Y. Duan, and Y. He, "The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation," *Int J Mol Sci*, vol. 20, no. 13, Jul. 2019.
- [128] L. Arranz, M. del M. Arriero, and A. Villatoro, "Interleukin-1 $\beta$  as emerging therapeutic target in hematological malignancies and potentially in their complications," *Blood Reviews*, vol. 31, no. 5, pp. 306–317, Sep. 2017.
- [129] F. Ghiringhelli *et al.*, "Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1 $\beta$ -dependent adaptive immunity against tumors," *Nature Medicine*, vol. 15, no. 10, Art. no. 10, Oct. 2009.

- [130] M. S. J. Mangan, E. J. Olhava, W. R. Roush, H. M. Seidel, G. D. Glick, and E. Latz, "Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases," *Nat Rev Drug Discov*, vol. 17, no. 8, pp. 588–606, Aug. 2018.
- [131] M. Segovia *et al.*, "Targeting TMEM176B Enhances Antitumor Immunity and Augments the Efficacy of Immune Checkpoint Blockers by Unleashing Inflammasome Activation," *Cancer Cell*, vol. 35, no. 5, pp. 767–781.e6, May 2019.
- [132] E. A. Perez-Yepe, J.-T. Ayala-Sumuano, R. Lezama, and I. Meza, "A novel  $\beta$ -catenin signaling pathway activated by IL-1 $\beta$  leads to the onset of epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells," *Cancer Lett*, vol. 354, no. 1, pp. 164–171, Nov. 2014.
- [133] H. E. Lee *et al.*, "Inhibition of NLRP3 inflammasome in tumor microenvironment leads to suppression of metastatic potential of cancer cells," *Scientific Reports*, vol. 9, no. 1, Art. no. 1, Aug. 2019.
- [134] L. Aymeric *et al.*, "Tumor Cell Death and ATP Release Prime Dendritic Cells and Efficient Anticancer Immunity," *Cancer Res*, vol. 70, no. 3, pp. 855–858, Feb. 2010.
- [135] Z. Hu *et al.*, "Release of endogenous danger signals from HIFU-treated tumor cells and their stimulatory effects on APCs," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 335, no. 1, pp. 124–131, Sep. 2005.
- [136] S. Manaka *et al.*, "Low-intensity pulsed ultrasound-induced ATP increases bone formation via the P2X7 receptor in osteoblast-like MC3T3-E1 cells," *FEBS Letters*, vol. 589, no. 3, pp. 310–318, 2015.
- [137] O. R. Mason *et al.*, "Augmentation of Tissue Perfusion in Patients With Peripheral Artery Disease Using Microbubble Cavitation," *JACC: Cardiovascular Imaging*, vol. 13, no. 3, pp. 641–651, Mar. 2020.
- [138] M. Gauthier, D. A. King, and W. D. O'Brien, "Evaluation of the Temporal Stability of Definity Using Double Passive Cavitation Detection," *J Ultrasound Med*, vol. 32, no. 9, pp. 1535–1537, Sep. 2013.
- [139] R. Kern *et al.*, "Real-time ultrasound brain perfusion imaging with analysis of microbubble replenishment in acute MCA stroke," *J Cereb Blood Flow Metab*, vol. 31, no. 8, pp. 1716–1724, Aug. 2011.

- [140] M. DeLuca and W. D. McElroy, "Kinetics of the firefly luciferase catalyzed reactions," *Biochemistry*, vol. 13, no. 5, pp. 921–925, Feb. 1974.
- [141] A. M. Forsyth, J. Wan, P. D. Owrutsky, M. Abkarian, and H. A. Stone, "Multiscale approach to link red blood cell dynamics, shear viscosity, and ATP release," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 108, no. 27, pp. 10986–10991, Jul. 2011.
- [142] S. Michon, F. Rodier, and F. T. H. Yu, "Targeted Anti-Cancer Provascular Therapy Using Ultrasound-Stimulated Microbubbles," in *2020 IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS)*, pp. 1–4, Sep. 2020.
- [143] B. W. Rice, M. D. Cable, and M. B. Nelson, "In vivo imaging of light-emitting probes," *JBO*, vol. 6, no. 4, pp. 432–440, Oct. 2001.
- [144] D. Lu and P. A. Insel, "Hydrolysis of extracellular ATP by ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase (ENTPD) establishes the set point for fibrotic activity of cardiac fibroblasts," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 288, no. 26, pp. 19040–19049, Jun. 2013.

# Annexe A : Le système HEK-PLenti-PmeLUC

## Introduction

Le système HEK-PLenti-PmeLUC est une méthode alternative de quantification d'ATPe à travers des cellules HEK 293 qui expriment la luciférase sur la membrane plasmique. Cette méthode a été développée afin d'augmenter la sensibilité de la méthode parce qu'il fallait dix fois plus de luciférase soluble que celle citée dans la littérature pour détecter un signal d'ATPe chez les souris BALB/c à travers l'Optix Mx2. Le système a été développé en collaboration avec le laboratoire du Dr Francis Rodier.

Les cellules HEK 293 ont été utilisées comme modèle de transfection pour l'expression de la luciférase sur la membrane afin de quantifier l'ATP extracellulaire. Les cellules HEK 293 sont des cellules embryonnaires du rein humain provenant d'une cellule fœtale neuronale du rein et transfectés par l'ADN de l'adénovirus de type 5 (Ad5). Les cellules HEK 293 sont très utilisées pour l'expression génique parce qu'elles sont faciles à transfecter et produisent un très bon rendement de transfection. Elles ont été fournies par le laboratoire du Dr John Stagg (Centre de recherche du CHUM, Canada).

La structure du gène du PLenti-PmeLUC a été basée sur les travaux précédents de Pellegati et al. [120] et établit par l'équipe du Dr Francis Rodier. Dans leur étude, ils ont développé le système HEK-PmeLUC par transfection non stable (plasmides) du gène de la luciférase sur les cellules HEK 293. Cette méthode requiert toutefois une nouvelle transfection avant chaque étude. Pour développer une lignée de cellules HEK 293 qui exprime à perpétuité de la luciférase sur la membrane plasmique, des sites de recombinaisons (attL1 et attL2) ont été rajoutés sur le gène du PmeLUC puis ce dernier a été inséré dans un vecteur résistant à la kanamycine pour former un vecteur d'entrée (l'insertion a été réalisée par la compagnie invitrogen). Ensuite, le vecteur d'entrée a été recombiné avec un vecteur de destination contenant la séquence promotrice du cytomégalovirus (CMV) et capable de générer un clone d'expression qui exprime la luciférase. Le vecteur de destination contenait également un gène de résistance à la puromycine pour la sélection clonale. La réaction de recombinaison et la structure du clone d'expression sont présentées à la Figure A.1.

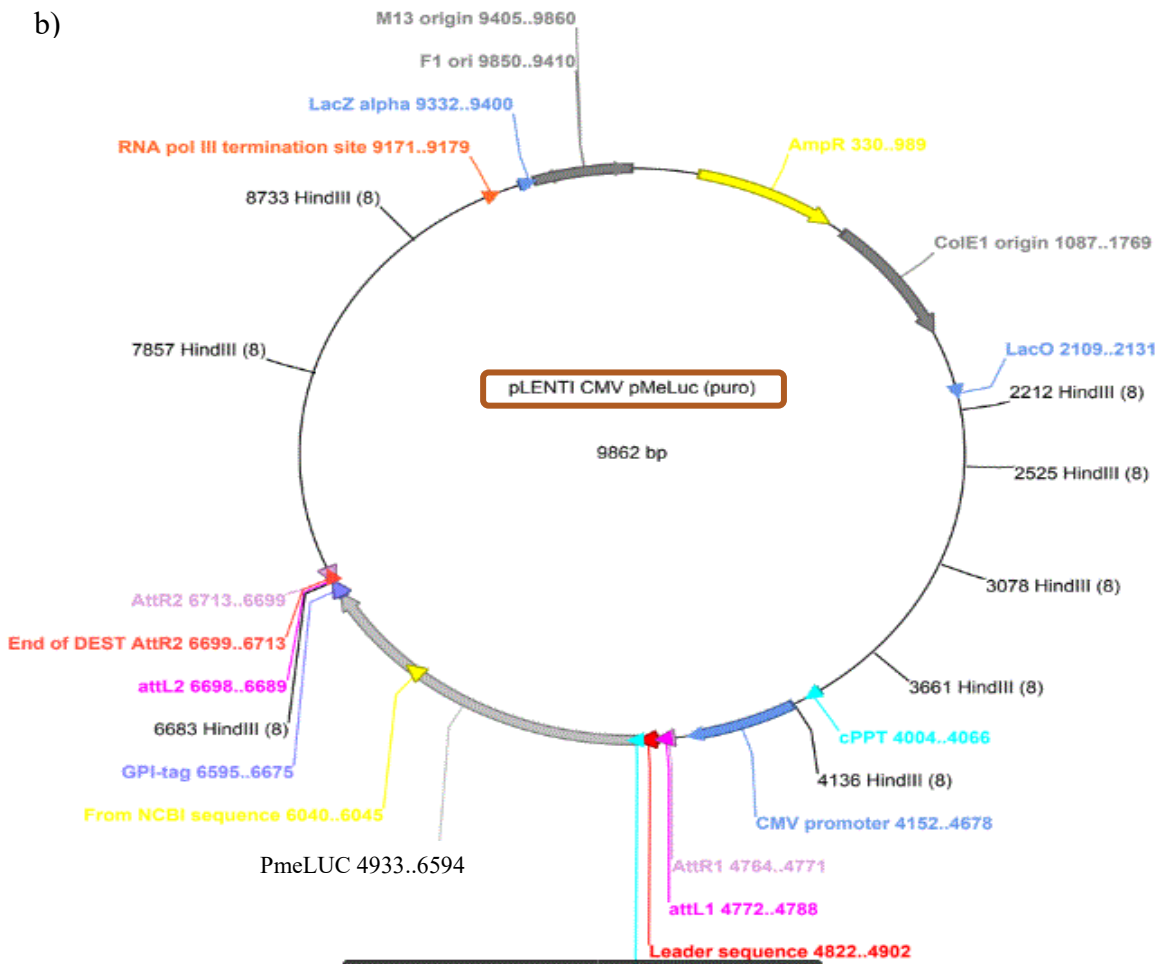
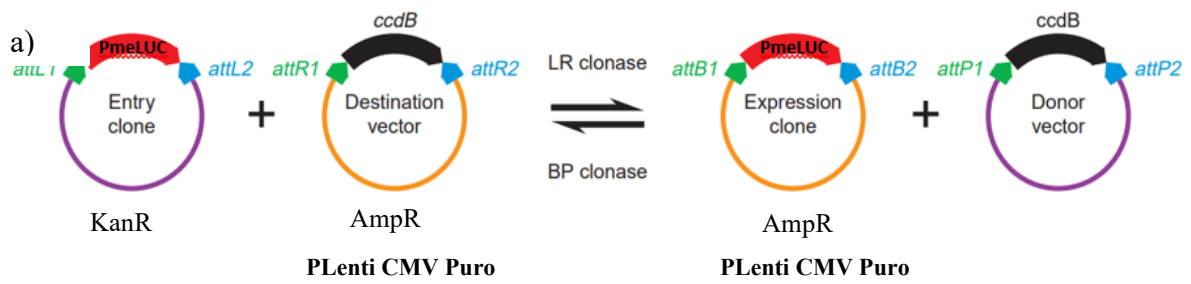


Figure A.1: Synthèse du clone d'expression. a) Réaction de recombinaison (Adaptée de Katzen, 2007). b) Structure du clone d'expression (Laboratoire Dr Francis Rodier, CRCHUM).

## A.1 Méthodologie

### A.1.1 Synthèse et isolation du clone d'expression

Dans un eppendorf, 150 ng de vecteur d'entrée et 150 ng de vecteur de destination ont été mélangés dans du tampon Tris-EDTA et en présence de la LR clonase (enzyme qui catalyse la réaction entre le vecteur d'entrée et le vecteur de destination). Ensuite, le mélange a été incubé pendant une heure et la protéinase K a été ajoutée. Une autre incubation de 10 min s'en est suivie. La protéinase K a pour rôle de digérer des protéines qui auraient contaminé l'échantillon par inadvertance. Après synthèse du vecteur d'expression, ce dernier a été amplifié dans des cellules compétentes (CP) d'*Escherichia Coli* (Stbl3). Les CP ont préalablement été incubés avec 129.7 ng de vecteur d'expression pendant 30 min puis un choc thermique du mélange a été réalisé pendant 1 min dans un bain de 42°C et 1 ml de milieu de culture (*Super Optimal Broth* ou SOC) contenant de l'ampicilline a ensuite été ajouté au mélange après refroidissement. Finalement, la préparation a étéensemencée dans des boites de pétri et incubée à 37°C. Les cellules résistantes à l'ampicilline ont formé des colonies 24h après incubation (Figure A.2).

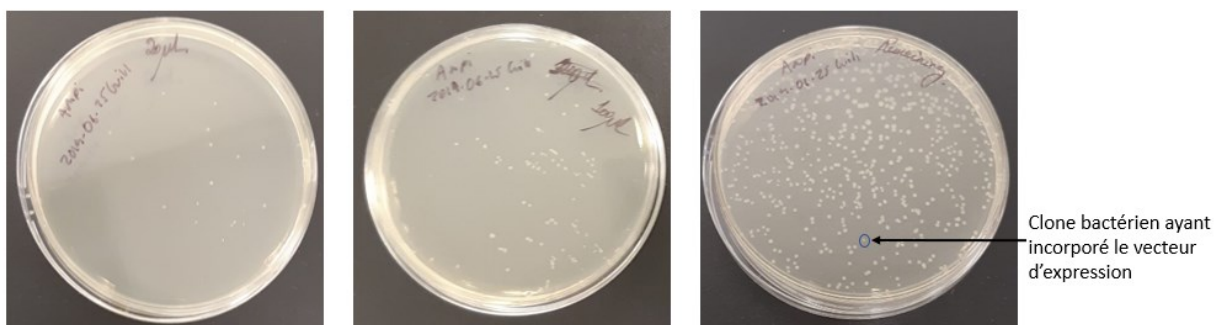


Figure A.2 : Transformation du clone d'expression dans des cellules compétentes (stbl3). a) Colonies pour 20  $\mu$ L de stbl3-vecteur d'expression. b) Colonies pour 100  $\mu$ L de stbl3-clone d'expression. c) Colonies 880  $\mu$ L de stbl3-clone d'expression.

Un des clones ayant cru après transformation a été amplifié dans du milieu de culture LB contenant de l'ampicilline (100  $\mu$ g/ml) puis le vecteur d'expression contenant notre insert a été isolé via le kit Qiagen (Midiprep : #12143, Hilden, Allemagne; Miniprep : #27104 Hilden, Allemagne). Le miniprep permet d'isoler une petite quantité de plasmide alors que le midiprep

permet l'isolation d'une plus grande quantité de plasmides. À la fin de l'isolation, l'ADN (vecteur d'expression) a été quantifié à travers le Nanodrop (Denovix, Wilmington, DE).

Plasmide	Kit d'isolation	Concentration
P	MiniPrep	253.95 ng/ $\mu$ L
P1	Midiprep	864.257 ng/ $\mu$ L
P2	Midiprep	854.663 ng/ $\mu$ L
P3	Midiprep	721.363 ng/ $\mu$ L

Tableau A.1 : Concentration du plasmide PLenti-PmeLUC après amplification et purification

### A.1.2 Électrophorèse sur gel d'agarose

Pour vérifier que les plasmides isolés précédemment contiennent notre insert, une électrophorèse sur gel d'agarose a été réalisée. 0.5 g de poudre d'agarose ont été mélangés à 50 ml d'eau distillée puis chauffés et dissout au micro-onde pendant 2 min. 0.3  $\mu$ L de Gelred (agent intercalant) a été ajouté à la solution puis le gel a été coulé dans la cuvette. À l'aide d'un peigne, des trous ont été créés à la surface du gel pour l'introduction des échantillons. Le vecteur d'expression (10 ng/ $\mu$ L) a ensuite été mélangé à l'enzyme de restriction (HIND III), qui a coupé le plasmide aux sites de restriction indiqués à la Figure A.1. Le mélange a ensuite été centrifugé pendant 1 min puis introduit dans les puits. L'échelle 1 Kb (Thermo Fisher Scientific, #10787018, Waltham, MA) à une concentration de 0.5 ng/ $\mu$ L, a servi de marqueur afin de déterminer la taille des fragments du clone d'expression après digestion. La migration s'est effectuée à un voltage de 130 V à travers une solution de migration diluée (x100) dans de l'eau distillée et la révélation s'est faite à travers un Transilluminateur UV (Alphaimager EP, Alpha Innotech, San Leandro, CA).

### A.1.3 Production des lentivirus (laboratoire Dr Francis Rodier)

La production des lentivirus s'est effectuée pendant cinq jours à partir des cellules 293 FT et du clone d'expression produit à l'étape précédente. Les cellules 293 FT sont une variante des cellules HEK 293 qui expriment l'antigène SV40 indispensable à la production d'une grande quantité de la protéine d'intérêt. Au jour 1, les cellules 293 FT ont été mises en culture dans du DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*). Au jour 2, le milieu de culture a été remplacé par un nouveau milieu de culture contenant du polyéthylèneimine, 8  $\mu$ g de vecteur d'expression, 12  $\mu$ g

d'un mélange de plasmides (pLP1, pLP2, pLP-VSVG). Le mélange de plasmides contribue à l'expression des protéines virales. Au jour 3, le milieu de culture a été remplacé par du DMEM riche en glucose (10%). Au jour 4, des fusions cellulaires étaient déjà visibles au microscope. Au jour 5, les virus ont été collectées par plusieurs étapes de centrifugation. Premièrement, le surnageant du flacon a été collecté et centrifugé à 1500 RPM pendant 5 min afin d'enlever les cellules et les débris cellulaires. Ensuite le surnageant obtenu a été filtré et ultracentrifugé à 20000 RPM pendant 2h30 min puis le culot a été collecté et resuspendu dans du tampon HBSS et conservé à -80 degré. Ce culot était constitué des lentivirus d'intérêts.

#### **A.1.4 Infection des cellules HEK293 (Laboratoire Dr Francis Rodier)**

Les cellules HEK 293 ont été au préalable mises en culture dans du DMEM-F12 pendant 24h dans un flacon de 25 cm<sup>2</sup>. Ensuite, le milieu de culture a été remplacé par du DMEM-F12 contenant du polybrène (4µg/ml) et des lentivirus (40 µL= 4X) puis les cellules ont été incubées pendant 16h. Ensuite, les cellules ont été rincées au PBS (3 fois) puis remises en culture dans du DMEM F12 normal. Après infection, les cellules HEK293 ont été mises en culture dans une plaque de 6 puits en présence de différentes concentrations de puromycine (0.5-1-1.5 µg/ml) pour permettre la sélection clonale. Une concentration de puromycine de 1 µg/ml était suffisante pour éliminer toutes les cellules n'exprimant pas le PLenti-PmeLUC.

#### **A.1.5 Mesure du signal d'ATPe à travers les HEK-PLenti-PmeLUC**

Le signal d'ATPe *in vitro* a été quantifié à travers le système HEK-PLenti-PmeLUC par bioluminescence. Dans une plaque de 96 puits semi-opaque (#655098, Thomas Scientific, Swedesboro, NJ), 2 millions de cellules HEK-PLenti-PmeLUC ont été mélangées avec de la luciférine et différentes concentrations d'ATP. La plaque de puits a été analysée par imagerie de BLI au luminomètre. Les concentrations de luciférine, et d'ATP sont décrites dans le tableau ci-après :

Luciférine	ATP			
2.5 mM	0 µM	10 µM	100 µM	500µM

Tableau A.2 : Différentes concentrations de réactifs utilisées pour la quantification d'ATPe à travers le système HEK-PLenti-PmeLUC.



## A.2 Résultats et discussion

La figure A.3 représente les résultats d'électrophorèse sur gel d'agarose après digestion par le HINDIII. Premièrement, on observe que les bandes de l'échelle sur le gel sont similaires à celles de la figure A.3.b, preuve que la migration a été effective. P, P1, P2 et P3 représentent les échantillons du PLenti-PmeLUC après isolation par le miniprep (P) et le midiprep (P1, P2 et P3). Le PLenti-PmeLUC possède 8 sites de restriction et libère ainsi 8 fragments après digestion observable sur le gel dont 2 plus denses (34% et 26%). Le deuxième fragment représenté par les flèches (P, P1, P2, P3) à la Figure A.3a correspond à notre insert. C'est un fragment de 2547 paires de bases (identifié à partir de la Figure A.3a et A.3b), coupé entre les positions 8733 et 2212 (Tableau A.2 et Figure A.1). La présence de l'insert dans notre Gel nous a permis de valider la recombinaison, l'amplification et l'isolation du clone d'expression.

Les résultats de la figure A.4 mettent en évidence la mesure du signal d'ATPe à travers les cellules HEK-PLenti-PmeLUC en présence de la luciférine et différentes concentrations d'ATP (0-1-10-100-500  $\mu$ M) après infection. L'intensité lumineuse obtenue pour différentes concentrations d'ATP est exprimée en CPS (count per second). Sur le graphe A.4, nous observons un signal de luminescence, preuve que les cellules 293 transfectées expriment la luciférase. Toutefois, l'augmentation du signal n'est pas proportionnelle à l'augmentation de la concentration d'ATP. Une explication plausible serait la faible expression de la luciférase par les HEK-293. Une façon d'augmenter le rendement de transfection serait d'augmenter la concentration du PLenti-PmeLUC pour la transfection. Aussi, il a été démontré que le seuil de sensibilité du PmeLUC pour l'ATP se situe entre 5-10  $\mu$ M avec une saturation à 1 mM [121]. Ainsi, il serait donc indispensable de mesurer le signal de luminescence dans un intervalle de 10  $\mu$ M à 1 mM pour mieux comprendre l'action du PLenti-PmeLUC sur le signal d'ATP. En absence d'ATP (0  $\mu$ M), nous avons observé un signal de luminescence. Étant donné que nous avons mesuré le signal d'ATPe dans une suspension de cellules, il est possible que certaines cellules aient libérées de l'ATP pendant la préparation. Une façon de dégrader cet ATP résiduelle serait d'incuber notre préparation avec de l'apyrase (une enzyme qui hydrolyse l'ATP) avant ajout d'ATP. Puisque cette étude a été effectuée pour n=2, augmenter la taille de l'échantillon (n=5) rendra nos interprétations plus robustes.

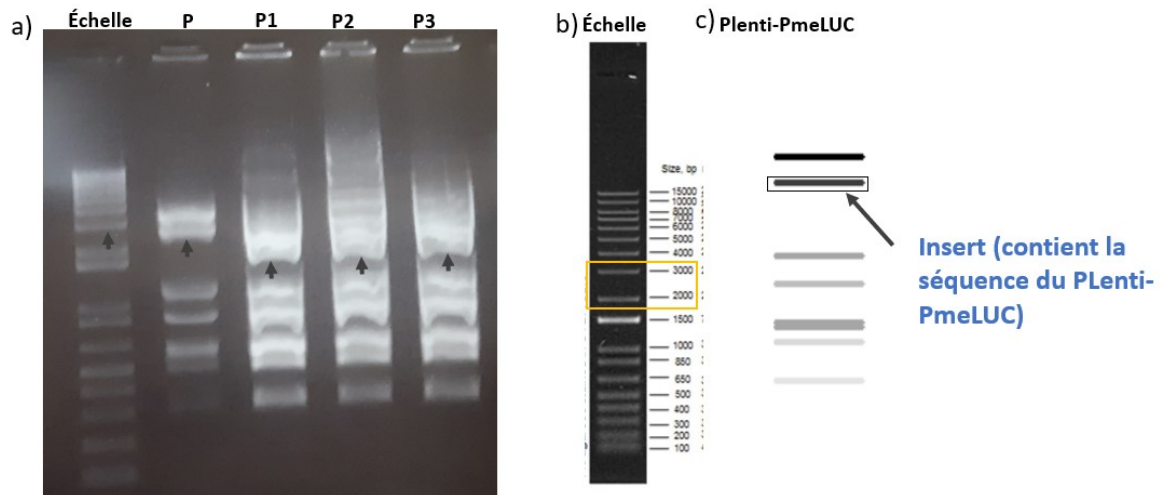


Figure A.3 : Électrophorèse sur gel d'agarose du gène PLenti-PmeLUC (clone d'expression). a) Gel de migration de l'échelle et de l'insert. b) Fragments de l'échelle après digestion (1Kb). c) Fragments du gène du PLenti-PmeLUC après digestion. Concentration du PLenti-PmeLUC = 10 ng/ $\mu$ L dans les puits P, P1, P2 et P3.

Taille	Site1	Position	Site2	Position	Masse %
3341	Hind III	8733	Hind III	2212	34
2547	Hind III	4136	Hind III	6683	26
1174	Hind III	6683	Hind III	7857	12
876	Hind III	7857	Hind III	8733	9
583	Hind III	3078	Hind III	3661	6
553	Hind III	2525	Hind III	3078	6
475	Hind III	3661	Hind III	4136	5
313	Hind III	221	Hind III	2525	3

Tableau A.3 Taille et masse des fragments du clone d'expression après digestion par le HINDIII

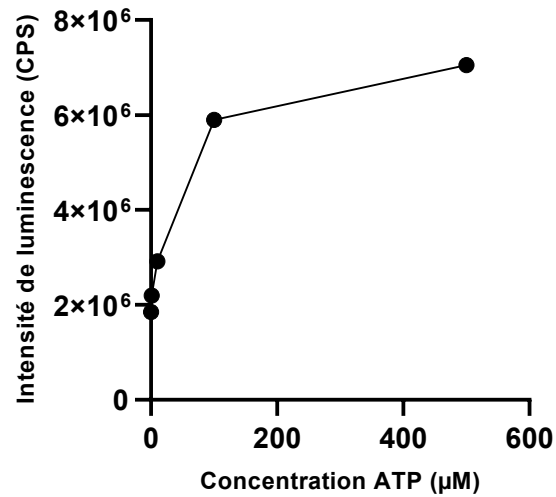


Figure A.4 : Quantification du signal d'ATPe à travers le système HEK-PLenti-PmeLUC à différentes concentrations d'ATP (0-1-10-100-500 µM) (n=2).

## Conclusion

La courbe de calibration d'ATPe obtenue à partir des cellules HEK-PLenti-PmeLUC à différentes concentrations d'ATP *in vitro* a permis de démontrer que les cellules HEK 293 peuvent être transfectées stablement de manière à exprimer le gène de la luciférase sur la membrane et permettre la quantification d'ATP extracellulaire.

# Annexe B : Mesure du signal d'ATPe en présence du POM-1

## Introduction

L'objectif de cette étude était de démontrer une augmentation du signal d'ATPe en présence du POM-1, un inhibiteur pharmacologique du CD39. Les HUVECs (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) sont des cellules dérivées de l'endothélium de la veine du cordon ombilical. Les HUVECs ont été utilisées comme modèle expérimental parce qu'elles expriment le récepteur CD39, capable de dégrader l'ATP libérée après US+MB.

## B.1 Méthodologie

Les HUVECs ont été mis en culture dans une plaque de 96 puits semi-transparente (# 655088, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Austria) pendant 16h en présence ou en absence du POM-1. 30 min avant l'imagerie, les cellules ont été rincées au PBS et re-incubées en présence d'ATP et de POM-1 d'une part et d'autre part d'ATP sans POM-1 (contrôle). Après incubation, la luciférine, la luciférase et le FLAAB ont été ajoutées dans le milieu de culture (volume réactionnel total = 100  $\mu$ L) et la plaque de puits a été imagée au luminomètre. Les concentrations des différents réactifs sont décrites dans le tableau ci-après:

Réactifs	Luciférine	Luciférase	ATP	POM-1
Stock	107 mM	219 $\mu$ M	100 $\mu$ M	1mM
Concentration finale	250 $\mu$ M	0.7 $\mu$ M	1 $\mu$ M	100 $\mu$ M

Tableau B.1: Concentration des réactifs utilisés pour la vérification de l'effet du POM-1

## B.2 Résultats et discussion

Après ajout de la solution de luciférine, luciférase et ATP, une diminution significative du signal d'ATP pour le groupe HUVECs-POM-1 par rapport aux groupes HUVECs et contrôle a été observée (Figure B.1). On s'attendait à avoir une augmentation du signal d'ATP après traitement des HUVECs par le POM-1. La diminution du signal observée pourrait s'expliquer par l'interaction du POM-1 avec un des réactifs de la réaction de bioluminescence à l'occurrence le magnésium ou la luciférase. En effet, il est connu que le POM-1 interfère avec la réaction de bioluminescence [144].

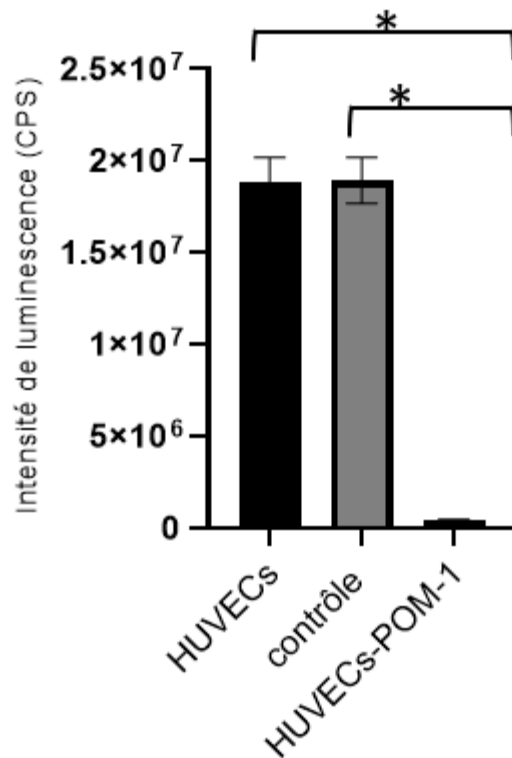


Figure B.1 : Effet du POM-1 sur le signal d'ATPe. Signal d'ATPe en présence ou non du POM-1 (100  $\mu$ M) et d'ATP (1 $\mu$ M). Le contrôle a été réalisé en absence des HUVECs et du POM-1 (mélange de luciférine, luciférase et ATP). n=3, \*p < 0.0001, test t non apparié.

## Conclusion

L'inhibition du récepteur CD39 par POM-1 et la quantification du signal d'ATPe ne peuvent être évaluées par bioluminescence. Des méthodes alternatives de mesure du signal d'ATP comme le test colorimétrique utilisant le vert de malachite permettrait de mesurer le signal d'ATP en présence du POM-1.

## Annexe C : Article de conférence

Titre : Localized release of extracellular ATP by ultrasound and microbubbles for enhancing cancer immunotherapy

Auteurs : Falonne Demeze Kenfack, Andrea Shima, Balasubramanian Sellamuthu, and Francois Yu

Statut : Publié par IEEE en 2020 dans le cadre du symposium international des ultrasons (IUS)

Implication des auteurs : FDK a écrit les protocoles, effectué la majorité des expériences et rédigé cet article. AS a effectué les tests de quantification d'ATPe *in vitro*. BS a contribué aux expériences d'imagerie d'ATPe dans le muscle. FY a vérifié et validé les protocoles, supervisé les expériences de quantification d'ATPe dans le muscle et dans les tumeurs, révisé et soumis cet article.

# Localized release of extracellular ATP by ultrasound and microbubbles for enhancing cancer immunotherapy

Falonne Demeze Kenfack  
Centre de recherche du CHUM  
Université de Montréal  
Montréal, Canada

B. Sellamuthu, PhD  
Centre de recherche du CHUM  
Université de Montréal  
Montréal, Canada

Andrea Shima  
Centre de recherche du CHUM  
Université de Montréal  
Montréal, Canada

Francois Yu, PhD  
Centre de recherche du CHUM  
Université de Montréal  
Montréal, Canada

**Abstract - Introduction:** Extracellular ATP (eATP) is a damage-associated molecular pattern (DAMP) which plays a critical role in the activation of the NLRP3 inflammasome, an important mediator of the innate immune response. Ultrasound (US) and microbubbles (MB) have been shown to release ATP in muscle locally [1]. Our hypothesis is that US+MB could release ATP in tumor microenvironment following by the activation of pro-inflammatory immune response. The eATP release following US+MB and its quantification in muscle and 4T1 model will be presented.

**Methods:** eATP quantification *in vitro*: 4T1 cells were incubated with D-luciferin (250  $\mu$ M), luciferase (0.7  $\mu$ M) and MB (5x10<sup>6</sup> MB/ml) and the eATP signal was measured by bioluminescence (BLI) using Optix MX2. eATP quantification *in vivo*: We quantified eATP in mice hindlimbs (n = 6) and 4T1 subcutaneous tumors (n = 8). After IP injection of D-luciferin (3 mg) and IV infusion of luciferase (270  $\mu$ g) and MB (Definity, 4 $\mu$ L/min), the mice received US treatment (1 MHz, 5000 cycles, 800 kPa) using a therapeutic probe for 10 min. The therapy was guided by US contrast imaging and the eATP signal was measured by BLI. A positive control was performed by IM administration of ATP (250  $\mu$ M) in the hindlimb (n = 3).

**Results and conclusion:** US+MB treatment released ATP *in vitro* and the signal increased with the number of cycle and pressure. Following the IM injection of ATP (250  $\mu$ M), we detected a BLI signal at 4 min that was higher than baseline but was back to baseline level at 8 min. In muscle, After US+MB, the signal was 5.5 folds greater in the treated side compared to the non-treated side at 15 min and persisted until 75 min post-treatment. In tumors, we observed a significant increase in eATP signal post-US+MB in the treated side at 15 min that persisted up to 45 min post-treatment compared to the control side. In conclusion, US+MB treatment releases ATP in muscle and in 4T1 tumors which persisted longer in time compared to a direct intramuscular injection. The immune response characterization in 4T1 tumors after US+MB is in progress.

**Keywords—** Cancer, therapeutic ultrasound, ultrasound imaging, extracellular ATP, bioluminescence, microbubbles cavitation

## I. INTRODUCTION

In Canada, it is estimated that, in 2020, 225800 new cases of cancer will be diagnosed, and that 83300 people will die from this disease [2]. Immunotherapy is an emerging powerful cancer treatment that is changing clinical practice, notably with the discovery of immune check point blockade (ICBs). Current ICBs inhibit the activities of 2 immunosuppressive molecules: CTLA-4 and PD-1. ICBs therapy have successfully cured many cancer such as metastatic melanoma, [3] and lung cancer [4]. Despite the success of ICBs therapy in clinic, a large proportion of patients respond partially or not at all to treatment [5]. Thus, finding new therapeutic approaches that can address ICB resistance could help to improve the efficacy of immunotherapy.

In healthy tissue, intracellular ATP concentration is 5-10 mM and extracellular ATP (eATP) is 10-100 nM [5]. eATP is a molecule upstream of the purinergic signaling pathway and acts as a critical danger signal molecule. The binding of eATP to the P2X7 receptor is known to activate pro-inflammatory response through inflammasome NLRP3 activation [6]. While eATP exists as a trace in the extracellular compartment, external stimuli can increase extracellular ATP concentration. Microbubbles (MB) are small gaseous spheres (1-10  $\mu$ m) encapsulated in a lipid, protein, or polymer membrane. In a high pressure ultrasound field, MB oscillate and undergo inertial cavitation. Belcik et al. [1] demonstrated that the inertial cavitation of MB released ATP in muscle and caused vasodilation. Herein, our objective was to quantify eATP release following US+MB using bioluminescence in cells culture, in muscle and, subcutaneous murine tumors model.

## II. MATERIALS AND METHODS

### A. Reagents

Luciferin was diluted (see details in section II-D) to the appropriate concentration using FLAAB (ATP buffer solution). The FLAAB (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO) was reconstituted with saline according to the manufacturer's instructions. Luciferase (Promega, Madison, WI) was diluted with saline before infusion.

### B. Animal and cancer model

All animal experiments were approved by the CHUM research center Institutional Animal Protection Committee. Wild type BALB/c mice (6 weeks age, Charles Rivers Laboratories, Senneville, Canada) were anesthetized using 2% isoflurane. Luciferase and microbubbles were injected using a polyethylene catheter inserted in the jugular vein. 4T1 cells were used as a tumor model for both *in vitro* and *in vivo* studies. They were provided by John Stagg Laboratory (Centre de recherche du CHUM, Montréal, Canada). The treatment was performed when tumors reached a size between 300-400 mm<sup>3</sup>.

### C. Ultrasound treatment *in vitro* and *in vivo*

US pressure was calibrated using a membrane hydrophone (HMB-0200, ONDA Corporation, Sunnyvale, CA) in a degassed water tank using a motorized 3D positioning system. An unfocused ultrasound transducer at 1MHz (A303S, Olympus, Waltham, MA) was used. For the *in vitro* studies, a single US burst was applied to inverted 96 well plates containing confluent 4T1 cells. We tested 6 different conditions varying pressure (250-800 kPa) and pulse length (10-1000 cycles). For the *in vivo* studies, we used a pressure of 800 kPa with a long pulse of 5000 cycles, repeated every 5 seconds for 10 minutes. The therapeutic transducer was positioned perpendicularly to an imaging clinical scanner (15L8 probe, Acuson Sequoia, Siemens) used in CPS mode (7 MHz, MI=0.2) to guide therapy. MB (Definity) were infused at a constant rate of 4µL/ml using a syringe pump. The contralateral side (tumor or muscle) was used as a control.

### D. Optical imaging of ATP release after US+MB

The kinetics of released ATP was captured after US+MB treatment by bioluminescence (BLI) using Optix MX2 imager (GE, Fairfield, CT). For the *in vitro* studies, a solution containing luciferin (250 µM), luciferase (0.7 µM), FLAAB and MB (5 × 10<sup>6</sup> MB/ml) was added to the cell culture before treatment. The image was captured before and after treatment at a resolution of 1.5 mm and an integration time of 1 second. For *in vivo* studies, 3 mg of luciferin was administered intraperitoneally (IP) and luciferase (270 µg) intravenously (jugular vein) before US+MB treatment. The bioluminescent signal was measured by Optix MX2 at a resolution of 2 mm with an integration time of 5 seconds. The light emitted was quantified using the Optix View software. Positive control of eATP quantification was performed by measuring light intensity after the intramuscular (IM) injection of ATP (250 µM, 20 µL).

### E. Statistical analysis

Data are expressed as mean ± standard deviation for each region of interest. Two-way analysis of variance (US treatment and time) were used for eATP signal *in vitro* analysis and eATP signal measurement in the tumor. Student's paired T-test was

used to analyze the data of eATP signal in muscle. GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Prism, San Diego, CA, USA) was used to analyze all data.

## III. RESULTS

### A. US+MB release ATP in 4T1 cells *in vitro*

We observed an increase of eATP signal following US+MB treatment in 4T1 cells (Fig.1). The signal increased with the pressure and number of cycles (p < 0.05, Tukey's multiple comparisons test).

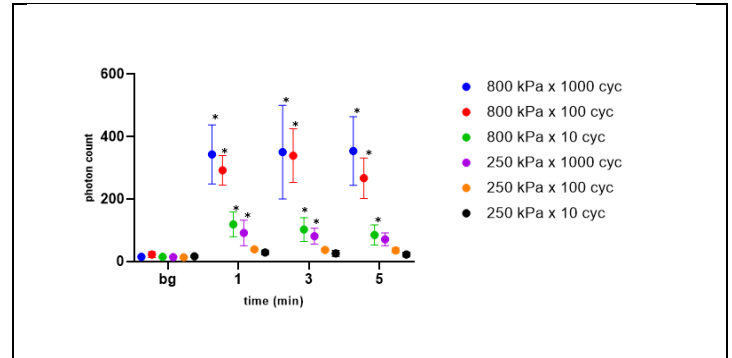


Fig.1: eATP signal (photon count) after US+MB treatment in 4T1 cells *in vitro*. Data are represented as mean ± standard deviation. n=5, \*p < 0.05 versus background (post hoc Tukey test following a 2 way-ANOVA)

### B. eATP quantification in muscle

Following IM injection of ATP in the muscle (Fig.2a and Fig.2b), we observed an eATP signal which peaked at 4 min (28.8 ± 4.3) but decreased at 8 min post-injection (p < 0.05, Dunn's test). After US+MB treatment in the muscle (n = 6), a high level of eATP signal was detected. The signal was 5.5 folds greater in the treated side (64.2 ± 48.6) compared to the non-treated side (11.6 ± 1.2) at 15 min and it persisted up to 60 min.

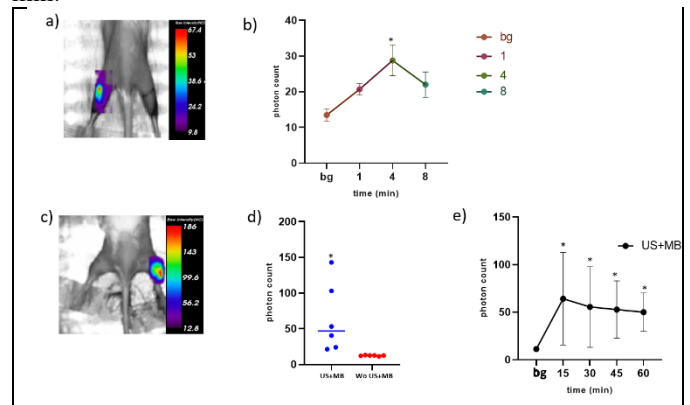


Fig.2: eATP signal quantification in muscle. eATP measured 4 min after IM injection of 250 µM. of ATP. (b) bioluminescence signal (photon count) as a function of time following IM injection (n=3, \*p < 0.05 versus background, Dunn's test); (c) eATP signal measured by optical imaging 15 min post-US+MB. (d) eATP signal (photon count) in treated side versus non-treated side at 15 min (n=6, \*p < 0.05, Wilcoxon test); (e) time course of eATP signal after US+MB treatment (n=6, \*p < 0.05, US treatment versus background, Dunn's test).



### C. eATP signal measurement after US+MB in tumors *in vivo*

Bioluminescence imaging revealed an eATP signal after US+MB treatment in the tumor (Fig.3a). The means of photons in the treated side was 4.7 times greater in the treated side ( $62.2 \pm 98.9$ ) compared to the non-treated side ( $12.7 \pm 1.6$ ) at 15 min and the signal persisted up to 45 min post-US+MB ( $50.9 \pm 74.2$ ) ( $p < 0.05$ , Tukey's multiple comparisons test) (Fig.3b).

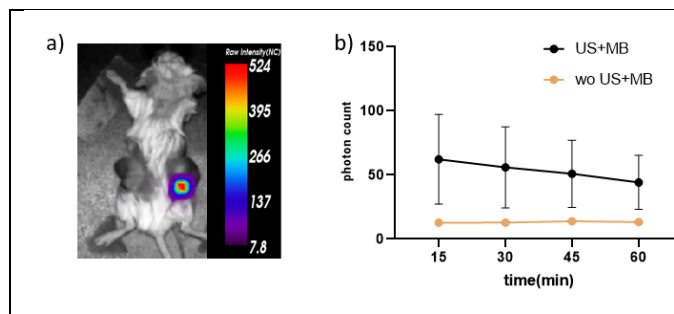


Fig. 3: eATP signal after US+MB in 4T1 tumors. (a) eATP signal measured by optical imaging 15 min post-treatment. (b) time course of eATP signal (photon count) after US+MB treatment in treated side versus non treated side (n=8, \* $p < 0.05$ , Tukey test)

## IV. DISCUSSION

Our results support that US+MB treatment can release ATP in muscle and in 4T1 tumors. Our *in vitro* studies suggest that high pressure and number of cycles are necessary to release a great amount of ATP. This is consistent with the observation that microporation is an important mechanism of ATP release after US+MB *in vitro* [9].

Our *in vivo* studies of eATP quantification in muscle demonstrated that US+MB can release ATP. MB destruction was observed both at the center and in the periphery of the muscle during the treatment and an increase of perfusion was also observed after the treatment (results not shown). Interestingly, IM injection of eATP suggested that more than 250  $\mu\text{M}$  of eATP could be released in muscle following US+MB treatment.

To the author's knowledge, this is the first study investigating the eATP release in the tumor *in vivo* after US+MB treatment. We observed an eATP signal following the treatment which persisted for up to 45 min post-treatment. In contrast to what we observed in the muscle, microbubbles were concentrated at the periphery of the tumor and the center appeared to be necrotic. One tumor showed a strong bioluminescent signal and the signal of the seven other mice was relatively low. Since the activities of microbubbles were low in the center, it could explain the weak eATP signal captured in the tumor.

## V. CONCLUSION

The findings of this study demonstrated that US+MB treatment can release ATP in muscle and in 4T1 tumors. The signal obtained persisted for up to 45 min post-treatment. This promising result is paving the way for the characterization of the immune response in tumor following US+MB treatment.

## ACKNOWLEDGMENT

The author of this manuscript would like to thank the staff of MTL-YuLab and all the granting agencies.

## REFERENCES

- [1] J. T. Belcik *et al.*, "Augmentation of muscle blood flow by ultrasound cavitation is mediated by ATP and purinergic signaling," *Circulation*, vol. 135, no. 13, pp. 1240–1252, Mar. 2017.
- [2] D. R. Brenner *et al.*, "Projected estimates of cancer in Canada in 2020," *CMAJ*, vol. 192, no. 9, pp. E199–E205, Mar. 2020.
- [3] J. Larkin *et al.*, "Five-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma," *New England Journal of Medicine*, vol. 381, no. 16, pp. 1535–1546, Oct. 2019.
- [4] E. B. Garon *et al.*, "Pembrolizumab for the Treatment of Non-Small-Cell Lung Cancer," *New England Journal of Medicine*, vol. 372, no. 21, pp. 2018–2028, May 2015.
- [5] D. Vijayan, A. Young, M. W. L. Teng, and M. J. Smyth, "Targeting immunosuppressive adenosine in cancer," *Nature Reviews Cancer*, vol. 17, no. 12, Art. no. 12, Dec. 2017.
- [6] G. Y. Chen and G. Nuñez, "Sterile inflammation: sensing and reacting to damage," *Nat Rev Immunol*, vol. 10, no. 12, pp. 826–837, Dec. 2010.
- [7] S. M. Gilbert *et al.*, "ATP in the tumour microenvironment drives expression of nfp2X 7, a key mediator of cancer cell survival," *Oncogene*, vol. 38, no. 2, Art. no. 2, Jan. 2019.

