



HAL
open science

**Etude du rôle d'un donneur de monoxyde d'azote
(Glycéryl Trinitrate) dans la mort cellulaire
immunogène induite par des chimiothérapies (FOX)
et/ou radiothérapie dans le cancer colique**

Lucile Dondaine

► **To cite this version:**

Lucile Dondaine. Etude du rôle d'un donneur de monoxyde d'azote (Glycéryl Trinitrate) dans la mort cellulaire immunogène induite par des chimiothérapies (FOX) et/ou radiothérapie dans le cancer colique. Sciences du Vivant [q-bio]. 2017. hal-01581097

HAL Id: hal-01581097

<https://ephe.hal.science/hal-01581097v1>

Submitted on 4 Sep 2017

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

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



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre



MEMOIRE

présenté par

Lucile DONDAINE

pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

**Etude du rôle d'un donneur de monoxyde d'azote (Glycéryl Trinitrate)
dans la mort cellulaire immunogène induite par des chimiothérapies
(FOX) et/ou radiothérapie dans le cancer colique**

soutenu le 6 avril 2017 devant le jury suivant :

Mme Mireille ROSSEL (MC, EPHE)	Présidente
Mme Catherine PAUL (MC, EPHE)	Tuteur scientifique
Mme Sophie THENET (DE, EPHE)	Tuteur pédagogique
M. Yann GODET (MCF, UFC-Inserm)	Rapporteur
M. Cédric REBE (IB, CGFL)	Examineur

Mémoire préparé sous la direction de :

Mme Catherine PAUL
Laboratoire d'Immunologie et Immunothérapie des cancers
Equipe EA7269 EPHE/uB
Faculté de Médecine 7 Boulevard Jeanne d'Arc 21000 DIJON Directeur : Ali BETTAIEB

et de

Mme Sophie THENET
Laboratoire de Pharmacologie Cellulaire et Moléculaire
UMR S 1138 Equipe « Physiopathologies intestinales : nutrition et fonction de barrière »
Centre de Recherche des Cordeliers
15 rue de l'École de Médecine 75006 PARIS Directeur : Armelle LETURQUE



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre



MEMOIRE

présenté par

Lucile DONDAINE

pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

**Etude du rôle d'un donneur de monoxyde d'azote (Glycéryl Trinitrate)
dans la mort cellulaire immunogène induite par des chimiothérapies
(FOX) et/ou radiothérapie dans le cancer colique**

soutenu le 6 avril 2017 devant le jury suivant :

Mme Mireille ROSSEL (MC, EPHE)	Présidente
Mme Catherine PAUL (MC, EPHE)	Tuteur scientifique
Mme Sophie THENET (DE, EPHE)	Tuteur pédagogique
M. Yann GODET (MCF, UFC-Inserm)	Rapporteur
M. Cédric REBE (IB, CGFL)	Examineur

Mémoire préparé sous la direction de :

Mme Catherine PAUL
Laboratoire d'Immunologie et Immunothérapie des cancers
Equipe EA7269 EPHE/uB
Faculté de Médecine 7 Boulevard Jeanne d'Arc 21000 DIJON Directeur : Ali BETTAIEB

et de

Mme Sophie THENET
Laboratoire de Pharmacologie Cellulaire et Moléculaire
UMR S 1138 Equipe « Physiopathologies intestinales : nutrition et fonction de barrière »
Centre de Recherche des Cordeliers
15 rue de l'École de Médecine 75006 PARIS Directeur : Armelle LETURQUE

Remerciements

Je remercie les membres de mon jury de m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger mon travail de Diplôme de l'EPHE. Merci à **Mireille ROSSEL** d'avoir accepté de présider le jury ; à **Yann GODET** d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de Diplôme de l'EPHE en qualité de rapporteur mais également à **Cédric REBE**, examinateur de mon mémoire.

Ali BETTAIEB, je vous remercie de m'avoir accueillie au sein de votre équipe de recherche et de m'avoir fait confiance. Merci pour votre gentillesse, votre aide ainsi que vos conseils tout au long de mon Diplôme.

Catherine PAUL, MERCI pour tout ce que tu as fait pour moi depuis bientôt quatre années... Du BTS à ce Diplôme de l'EPHE, merci à toi Catherine de m'avoir accordé autant de confiance sur tes différents projets collaboratifs ou non, d'avoir cru en moi et d'avoir accepté d'être ma tutrice scientifique même si vous n'aviez pas de financement pour moi... Avec « quelques » complications, des hauts et des bas, nous y sommes tout de même arrivées !!! Merci de m'avoir transmis tes connaissances scientifiques ainsi que ta rigueur. Merci pour ta pédagogie, ta disponibilité, tes nombreux conseils ainsi que pour ta patience qui m'ont été précieux lors de ces trois années ! Je sais que ça n'a pas dû être facile tous les jours de me supporter... Désolée... ;) Je te remercie également de m'avoir donné cette persévérance, de m'avoir fait relativiser et de me rebooster dans les moments où ça n'allait pas !

Sophie THENET, tout d'abord je te remercie d'avoir accepté d'être ma tutrice pédagogique, d'avoir corrigé et évalué ce travail. Merci également pour ta gentillesse, ta disponibilité et tous tes conseils ! Merci pour ces journées de Diplôme de l'EPHE qui m'ont été très bénéfiques afin d'avancer dans mon projet de recherche et de prendre un peu plus confiance en moi à l'oral...

Aux membres de l'équipe EPHE. Merci à vous tous !

Nad' Nadhirus, plus qu'un collègue, un ami ! Durant ces deux années, tu as été un pilier pour moi... Tu as été là du début à la fin de mon Diplôme. Merci pour ta gentillesse, ton écoute, ta générosité, ta bonne humeur constante et ta joie de vivre ! Tu es vraiment une personne géniale, j'ai beaucoup appris avec toi. Merci d'avoir autant cru en moi et de m'avoir poussée pour que je prenne confiance en moi ! Tu as toujours été là pour moi tant sur le côté professionnel que personnel et je ne te remercierai jamais assez... Je t'en ai fait voir des sacrées hein... Désolée ! ;)

Cindy, que dire à part un « grand grand » merci ! Merci pour ta gentillesse, ta simplicité ! Merci de m'avoir accordé autant de temps pour les manip', pour ton aide précieuse et tes nombreux conseils ! Grâce à toi, j'ai pu acquérir de nombreuses compétences expérimentales et je t'en suis très reconnaissante ! Un « immense » merci de m'avoir aidée et soutenue lors de nos grosses manip' *in vitro*, *in vivo* et *ex vivo*, heureusement que tu étais

là !!! Nous formons un chouette binôme ! :) D'autant plus que « *Si nous avions fait le devoir ensemble, nous aurions eu une super note !* » Et n'oublie pas... « *Nous sommes les deux plus c***** !!!* » ;) Enfin, je te remercie pour tous les bons moments que l'on a passés ensemble aussi bien au labo qu'à l'extérieur ! Et désolée de t'avoir fait endurer mon caractère...

La Dream Team, le groupe de choc !!!!! Wonder woman, Cindy et la chauve-souris, un « grand » merci pour tout ! Merci pour ces p'tits restaurants, ces p'tites sorties du midi et toutes ces réunions confinées dans le bureau !

Véronique, sans qui rien de tout cela ne serait arrivé... Tu as été mon encadrante lors de mon premier stage de BTS. Merci de m'avoir accordé ta confiance, de m'avoir consacré du temps malgré ton emploi du temps très chargé et d'avoir cru en moi ! A la fin de mon BTS, tu as réussi à me faire comprendre que j'avais la capacité de réaliser des études supérieures et je t'en remercie !

Stéphanie, merci pour ta gentillesse, ton aide et tes conseils tout au long de ces trois années.

Sarra, Nesrine, Sab', Simon et Carla merci pour tous ces moments passés ensemble et pour vos coups de pouce manip'.

Aux membres de l'unité U1231, à tous ceux que j'ai côtoyés durant ces trois années, merci de votre gentillesse, votre aide et ces soirées passées ensemble, merci à vous tous !

Popo, Flavie et Lulu, mes coupines !!!!! :) Tout d'abord, je tenais à vous dire que je suis super contente de vous avoir rencontrées, vous êtes des filles géniales, des filles en OR !!!!! Un « IMMENSE » merci pour tout ! Merci de votre gentillesse, votre générosité, votre écoute et ces moments de rigolades ! Merci pour ces pauses à parler et à me rebooster, pour toutes ces sorties shopping, salle de sport, badminton, escalade et toutes nos p'tites soirées super méga cool !!! Merci d'avoir été là dans les bons comme dans les mauvais moments, de m'avoir soutenue, encouragée, boostée pour le finir ce « fichu » mémoire ! Vous avez été un réel pilier pour moi tout au long de ce Diplôme !

Ewen et Christine, merci beaucoup de m'avoir laissé cette chance de collaborer avec vous ! C'était toujours avec plaisir et j'espère bien pouvoir continuer cette collab'... Cette collab' qui m'a permis de réaliser de belles manip' fluo sur des supers petites molécules ! Grâce à vous, j'ai deux publications ! Merci ! Ewen, je te remercie tout particulièrement pour tout ce que tu as fait pour moi ! Un « grand » merci de t'être démené pour me trouver un « fameux » contrat pour continuer d'avancer nos projets... Merci beaucoup pour ces deux mois !!! Je t'en suis très reconnaissante !

Céline, un « grand » merci pour cette collaboration qui m'a permis d'avancer sur mon projet de recherche. Ensemble nous avons réalisé de super chouettes manip' d'irradiation *in vitro* mais également *in vivo* sur le petit animal et je t'en remercie ! J'espère que cette collab'

pourra continuer et qu'elle donnera des résultats aussi prometteurs qu'aujourd'hui ! Merci également de ta gentillesse et de nous avoir accordé du temps !

Aux membres de la plateforme de cytométrie et au centre de zootechnie qui ont également contribué à la réalisation de ce travail, merci. **Arlette**, je te remercie tout particulièrement pour ces expériences partagées en cytométrie, merci pour tous tes conseils ! Merci de ta joie de vivre quotidienne, ta générosité et tes supers repas de Noël !

A ma famille et mes amis, je ne vous remercierai jamais assez !!! Merci de m'avoir encouragée et soutenue durant toutes mes études ! MERCI !

Papa, Maman, Anaïs et Franck, si j'en suis arrivée là aujourd'hui, c'est grâce à vous ! Un « IMMENSE » MERCI n'est pas assez fort... Merci pour tout ce que vous faites pour moi, d'être là dans les bons comme dans les mauvais moments... de croire en moi, en mes capacités, quand je pense que je ne voulais même pas passer le BAC, ayant vu ma sœur réviser comme une dingue, je m'étais dit que je n'y arriverai jamais... ;) Merci de m'avoir aidé à trouver ma voie, de m'avoir donné la possibilité de faire ce que je voulais, de m'épanouir. Vous n'avez jamais cessé de m'encourager, de me donner cette force, cette poigne pour y arriver, et cela tous les jours, malgré la distance, vous répondez toujours présents et rappliquez au secours de votre fille ou de ta « petite » sœur ... Vous êtes ce qu'il y a de plus précieux pour moi !

Table des matières

Liste des abréviations	4
Liste des figures	8
Liste des tableaux	10
INTRODUCTION	11
Partie A : Le cancer colorectal	12
1. Epidémiologie	12
2. Classifications et stades de progression des carcinomes coliques.....	13
2.1 Classification anatomopathologique.....	13
2.2 Classification moléculaire.....	15
3. Physiopathologie du cancer colorectal	15
3.1 Généralités	15
3.2 Le microenvironnement tumoral	17
3.2.1 Microenvironnement tumoral et stroma tumoral	18
3.2.2 Microenvironnement immunitaire des tumeurs.....	18
3.2.2.1 Rôle de l'immunité dans la biologie du cancer	19
3.2.2.2 Cellules immunitaires et microenvironnement tumoral.....	20
4. Traitements des cancers du côlon.....	21
4.1 Traitements conventionnels des cancers du côlon	21
4.1.1 Traitement locorégional	21
4.1.2 Traitements néo-adjuvants et adjuvants	22
4.1.2.1 Radiothérapie	22
4.1.2.2 Chimiothérapie.....	23
4.1.3 Traitement systémique.....	23
4.1.3.1 5-Fluorouracile	24
4.1.3.2 Oxaliplatine.....	25
4.1.3.3 Irinotecan	25
4.2 Immunothérapie.....	26
4.2.1 Immunothérapie passive ou thérapie ciblée.....	26
4.2.2 Immunothérapie active	27
4.2.2.1 Immunothérapie active aspécifique.....	27
4.2.2.2 Immunothérapie active spécifique.....	27

Partie B : La mort cellulaire immunogène	31
1. Caractéristiques de la mort cellulaire immunogène	31
2. Facteurs clés de la mort cellulaire immunogène	32
3. Mise en évidence de la capacité à induire la mort cellulaire immunogène.....	37
4. Importance de la mort cellulaire immunogène.....	38
Partie C : Le monoxyde d'azote (NO)	40
1. Rôles physiologique et physiopathologique du NO	40
1.1 Généralités	40
1.2 Sources du monoxyde d'azote	40
1.2.1 Origine du NO dans l'organisme.....	40
1.2.2 Apport exogène de NO par des « donneurs de NO ».....	42
2. Mécanismes d'action du NO	43
2.1 Mécanismes directs.....	43
2.2 Mécanismes indirects.....	44
3. NO et cancer.....	47
Partie D : Objectifs	50
MATERIEL ET METHODES	51
1. Modèles murins et lignées cellulaires	52
1.1 Modèles murins.....	52
1.2 Lignées cellulaires.....	53
1.3 Modèles de tumeurs coliques chez la souris.....	53
1.4 Formation de nodules pulmonaires dans un modèle murin	55
2. Traitement des cellules	55
3. Analyses par cytométrie en flux.....	56
3.1 Analyse de la mort cellulaire	56
3.2 Immunomarquage de la calréticuline membranaire	56
4. Dosage de l'ATP.....	57
5. Dosage HMGB1.....	58
6. Détection en microscopie à fluorescence de la calréticuline membranaire.....	58
7. Analyse des transcrits.....	59
7.1 Extraction des ARN totaux.....	60
7.2 <i>Reverse Transcription</i>	60
7.3 RT-qPCR	61
8. Analyse protéique par Western Blot.....	62
8.1 Extraction protéique.....	62

8.2	Dosage protéique	63
8.3	Western Blot.....	63
9.	Tests statistiques	65
RESULTATS		66
1.	Effet anti-tumoral de l'association FOX / GTN	67
1.1	Absence de levée de résistance à l'oxaliplatine par le GTN dans des modèles <i>in vitro</i>	67
1.2	Effet sensibilisateur du GTN à la mort tumorale induite par le FOX.....	67
1.2.1	Etude de la mort cellulaire induite par la combinaison FOX / GTN.....	69
1.2.2	Implication des cellules immunitaires dans l'effet anti-tumoral de la combinaison FOX / GTN	70
2.	Caractérisation de la mort cellulaire immunogène.....	72
2.1	Sécrétion des facteurs immunogènes solubles.....	72
2.2	Externalisation de la calréticuline	73
3.	Rôle du NO dans l'externalisation de la calréticuline.....	75
3.1	Rôle du NO dans la mort cellulaire induite par la combinaison FOX / GTN	75
3.2	Rôle du NO dans la mort cellulaire immunogène	76
3.2.1	Sécrétion des facteurs immunogènes solubles	77
3.2.2	Externalisation de la calréticuline	77
3.2.3	Expression de la NOSII en réponse à des chimiothérapies	79
3.2.4	Voie de stress du réticulum endoplasmique	80
3.2.5	Modulation de l'effet immunogène des thérapies anticancéreuses par le NO	81
4.	Association de la radiothérapie à la combinaison FOX / GTN.....	83
4.1	Effet anti-tumoral de la combinaison FOX / GTN / Radiothérapie.....	83
4.2	Etude de la mort cellulaire induite par la radiothérapie	88
4.3	Caractérisation de la mort immunogène	89
4.3.1	Sécrétion des facteurs immunogènes solubles	89
4.3.2	Externalisation de la calréticuline	90
DISCUSSION ET PERSPECTIVES		92
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES		101
ANNEXES		111
	Annexe 1.....	112
	Annexe 2.....	122

Liste des abréviations

5-FdUDP	5-Fluoro-désoxyuridine diphosphate
5-FdUMP	5-Fluoro-désoxyuridine monophosphate
5-FdUTP	5-Fluoro-désoxyuridine triphosphate
5-Fu	5-Fluorouracile
7AAD	7-Aminoactinomycine D
Ac	Anticorps
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	Acide Désoxyribonucléique complémentaire
ALDH	Aldéhyde déshydrogénase
AMPc	Adénosine Monophosphate cyclique
ARN	Acide Ribonucléique
ARN	ARN mature
ATP	Adénosine Triphosphate
BH₄	Tétrahydrobioptérine
Ca²⁺	Calcium
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
cPTIO	carboxy-PTIO, 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide
CrC	Carcinomes Coliques
CRT	Calréticuline
CTLA-4	Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4
DACH	Diaminocyclohexane
DAMPs	Damage-Associated Molecular Patterns
DC	Dendritic Cells
DO	Densité Optique
EDRF	Endothelium Derived Relaxing Factor
EDTA	Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid

EGF	Epidermal Growth Factor
eNOS	NOS endothéliale
EpCam	Epithelial Cell adhesion molecule
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
FMN	Flavine Mononucléotide
Fw	Forward
GCs	Guanylate Cyclase soluble
GDN	Glyceryl Dinitrate
GTN	Glyceryl Trinitrate
H89	Isoquinolinesulfonamide
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HMG	High Mobility Group
HMGB1	Hich-mobility group box 1
HRP	Horseradish Peroxydase
HSP	Heat Shock Protein
ICD	Immune Cell Death
IL-1	Interleukine-1
INF-γ	Interféron de type I
iNOS	NOS inductible
IRI	Irinotecan
KIR	Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor
LAG3	Lymphocyte Activation Gene 3
MDSC	Myeloid Derived Suppressor Cells
MEC	Matrice Extracellulaire
MICA	Major histocompatibility Complex class I-related chain A
N₂O₃	Trioxyde de diazote
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

NK	Natural Killer
NKT	Natural Killer like T cells
nNOS	NOS neuronale
NO	Monoxyde d'azote
NO₂⁻	Nitrites
NOS	NO-Synthase
O₂⁻	Anion superoxyde
O₂	Oxygène
ONOO⁻	Peroxynitrite
OXA	Oxaliplatine
PBS	Phosphate Buffer Solution
PCR	Polymerase Chain Reaction
PD-1	Programmed Cell Death
PERK	Protein RNA-like endoplasmic reticulum kinase
PFA	Paraformaldéhyde
PSA	Prostate Specific Antigen
RE	Réticulum endoplasmique
RNS	Reactive nitrogen species
ROS	Reactive Oxygen Species
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RT	Reverse Transcription
Rv	Reverse
SAB	Serum Albumin Bovine
SARRP	Small Animal Radiation Research Platform
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamid Gel Electrophoresis
SVF	Sérum de Veau Foetal
TCR	T Cell Receptor
T_H	Lymphocyte T helper
Tim3	T-cell immunoglobulin mucin domain-3

TLR4	Toll-like Receptor 4
TLS	Tertiary Lymphoïd Structures
TMB	3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine
TNM	Tumor Nodes Metastasis
Topo I	Topoisomérase I
TS	Thymidilate synthase
UICC	Union for International Cancer Control
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Liste des figures

Figure 1. Classification TNM et stades UICC des carcinomes coliques	14
Figure 2. Les six caractéristiques fondamentales d'une cellule tumorale	16
Figure 3. Caractéristiques émergentes d'une cellule tumorale	17
Figure 4. Composition cellulaire du microenvironnement tumoral	18
Figure 5. Implication des cellules immunitaires dans la formation de tumeurs.....	19
Figure 6. Interactions co-activatrices (●) et inhibitrices (●) régulant la réponse des lymphocytes T..	29
Figure 7. Différentes stratégies thérapeutiques utilisées dans le traitement des CrC	30
Figure 8. Mécanismes de mort cellulaire immunogène.....	31
Figure 9. Mécanisme d'externalisation de la calréticuline	33
Figure 10. Mécanismes de sécrétion d'ATP impliqué dans la mort cellulaire immunogène.....	36
Figure 11. Principales sources de NO dans les cellules : les NOS.....	41
Figure 12. Métabolisme du Glyceryl Trinitrate (GTN).....	43
Figure 13. Influence des espèces réactives de l'oxygène sur les modifications post-traductionnelles induites par le NO.....	44
Figure 14. Mécanisme de la tyrosine nitration induit par le NO.....	45
Figure 15. Mécanisme de S-nitrosylation induit par le NO	46
Figure 16. Influence de la concentration en NO sur les propriétés des cellules cancéreuses.....	47
Figure 17. Modèles murins utilisés au cours de notre étude.....	52
Figure 18. Protocole d'étude de la combinaison FOX / GTN dans les modèles murins CT26 / Balb/c, Nude et NOD scid gamma	54
Figure 19. Protocole d'étude de la combinaison FOX / GTN / Radiothérapie dans le modèle murin CT26 / Balb/c	54
Figure 20. Protocole d'étude de la combinaison FOX / GTN dans le modèle murin CT26 / Balb/c de formation de métastases	55
Figure 21. Réactions ayant lieu lors du dosage d'ATP.....	57
Figure 22. Effet potentialisateur du Nitronal sur l'action anti-tumorale du FOX	68
Figure 23. Effet potentialisateur du Nitronal sur l'action anti-tumorale du FOX	69
Figure 24. Absence d'effet sensibilisateur du GTN sur la mort cellulaire induite par le FOX	70
Figure 25. L'effet anti-tumoral de l'association FOX / GTN est dépendante du système immunitaire	71
Figure 26. Absence d'effet synergique du GTN sur la sécrétion des facteurs immunogènes solubles induite par le FOX.....	73
Figure 27. Effet potentialisateur du GTN sur l'externalisation de la calréticuline induite par le FOX..	74

Figure 28. Effet potentialisateur du GTN sur l'externalisation de la calréticuline induite par le FOX..	74
Figure 29. La mort cellulaire induite par le FOX et par la combinaison FOX / GTN est indépendante du NO.....	76
Figure 30. La sécrétion des facteurs immunogènes solubles induite par le FOX et par la combinaison FOX / GTN est indépendante du NO	77
Figure 31. L'externalisation de la calréticuline induite par le FOX et / ou GTN est dépendante du NO	78
Figure 32. Le 5-Fu induit l'expression de la NOSII qui est inhibée par l'ajout de GTN.....	79
Figure 33. Modulation de la cinétique de phosphorylation de PERK et eIF2 α en réponse au traitement FOX et / ou GTN.....	80
Figure 34. L'ajout de GTN à des chimiothérapies non immunogènes induit une externalisation de la CRT.....	82
Figure 35. Absence d'effet additif de la radiothérapie (1 x 10 Gy) en présence de Nitronal	83
Figure 36. Absence d'effet associatif de la radiothérapie (3 x 8 Gy) en présence de Nitronal.....	84
Figure 37. Effet anti-tumoral de la radiothérapie (3 x 8 Gy) associé au Nitronal et / ou FOX.....	86
Figure 38. Absence d'effet sensibilisateur de la radiothérapie sur la mort cellulaire induite par le FOX et / ou le GTN	88
Figure 39. Absence d'effet synergique de la radiothérapie sur la sécrétion des facteurs immunogènes solubles induite par la combinaison FOX / GTN	89
Figure 40. Externalisation de la CRT en réponse à l'association FOX / GTN / Radiothérapie	90

Liste des tableaux

Tableau 1. Classification anatomopathologique TNM des carcinomes coliques.....	13
Tableau 2. Stades UICC des carcinomes coliques	14
Tableau 3. Biomarqueurs de diagnostic, de pronostic et prédictif des cancers coliques.....	15
Tableau 4. Immunogénicité de la mort cellulaire induite par des chimiothérapies	38
Tableau 5. Amorces utilisées lors des q-PCR	62
Tableau 6. Composition du tampon de lyse « phospho »	63
Tableau 7. Anticorps utilisés en western blot.....	65

INTRODUCTION

Partie A : Le cancer colorectal

1. Epidémiologie

Le cancer demeure un enjeu majeur de santé public dans les pays développés malgré la diminution globale de l'incidence et du taux de mortalité attribuée à cette pathologie ces vingt dernières années. En effet, le cancer représente encore aujourd'hui en France, la première cause de mortalité chez l'homme et la seconde chez la femme derrière les maladies cardiovasculaires.

Les carcinomes coliques (CrC) se situent parmi les trois types de cancer les plus représentés tous sexes confondus tant en termes d'incidence que de mortalité avec respectivement chez l'homme et chez la femme 23 226 et 18 926 nouveaux cas par an, et 9 275 et 8 447 décès (Inca, 2016). Cette observation à l'échelle nationale suit une tendance mondiale comme l'indiquent les derniers chiffres du rapport GLOBOCAN. En effet, les carcinomes coliques sont l'un des plus représentés dans le monde avec 1,7 millions et 1,4 millions de nouveaux cas recensés, les positionnant juste derrière les cancers mammaires et du poumon (Ferlay et al., 2015).

Dans 90% des cas, les CrC touchent des personnes âgées de 50 ans et plus, d'où la nécessité du dépistage à cet âge. En effet, lorsque le dépistage est réalisé chez des personnes dont l'âge est compris entre 55 ans et 64 ans, l'incidence des CrC est réduite de 33% et la mortalité de 43% (Jemal et al., 2011). Lors d'un diagnostic précoce, les CrC sont généralement curables avec une probabilité de survie à 5 ans de 90%. Cependant, le taux de survie à 5 ans diminue à 67% lors de l'envahissement des organes adjacents et des ganglions lymphatiques et, à seulement 8% chez les patients atteints d'un cancer colorectal métastatique (Comella et al., 2010).

Les causes des CrC peuvent être d'origine externe liée au vieillissement et/ou au mode de vie telle que l'alimentation, l'alcool, le tabac, la sédentarité mais elles peuvent également être d'origine génétique. En effet, 75% d'entre eux sont d'origine sporadique c'est-à-dire provenant principalement de mutations et 25% à prédisposition héréditaire (Boisdrion-Celle et al., 2013). Les CrC peuvent également avoir comme origine, une maladie inflammatoire chronique de l'intestin telle que la maladie de Crohn, un diabète de type II ou encore l'utilisation chronique d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (Lafay et al., 2015).

Dans le cas des CrC, une bonne prise en charge thérapeutique en vue d'un effet curatif repose sur le diagnostic précoce de la tumeur. Ainsi, l'évaluation du stade d'évolution de la pathologie au moment du diagnostic est primordiale et reflète un caractère pronostic déterminant pour le patient.

2. Classifications et stades de progression des carcinomes coliques

2.1 Classification anatomopathologique

La classification TNM (Tumor, Nodes, Metastasis) est un système de classification moderne des tumeurs solides établi sur des critères anatomiques datant des années 60s. Cette classification est aujourd'hui acceptée à l'échelle internationale et constitue encore un langage universel. Elle permet aux cliniciens et scientifiques à travers le monde de pouvoir échanger leurs observations ainsi que leurs résultats mais également d'établir un protocole thérapeutique des plus adaptés pour le patient diagnostiqué.

Les critères de classifications TNM rendent compte de l'invasion tumorale locale « T », régionale « N, ganglions » et périphériques « M, métastases » à un moment *t* (Tableau 1). De plus, des indications supplémentaires pour les cliniciens distinguant le stade clinique pré-thérapeutique « cTNM » du stade anatomopathologique post-opératoire noté « pTNM », sont nouvellement apportées afin d'orienter et/ou revoir le protocole thérapeutique après exérèse chirurgicale (Uehiro et al., 2014).

Tableau 1. Classification anatomopathologique TNM des carcinomes coliques. D'après la 7^{ème} édition du TNM, 2010

Carcinomes coliques	
T = Tumeur primitive	
T0	Absence de tumeur primitive
Tis	Carcinome <i>in situ</i> : Tumeur localisée dans la paroi interne de colon ou du rectum
T1	Invasion de la sous muqueuse
T2	Invasion de la paroi épaisse du colon ou du rectum
T3	Invasion totale de la paroi
T4	La tumeur pénètre le péritoine viscéral et envahit ou adhère aux organes périphériques
N = Ganglions lymphatiques régionaux	
N0	Absence de métastase ganglionnaire
N1	Entre 1 et 3 ganglions périphériques sont envahis par les cellules tumorales
N2	Plus de 4 ganglions sont atteints
M = Métastases	
M0	Absence de métastase à distance
M1	La tumeur s'est propagée à un ou plusieurs organes à distance

L'évolution de la pathologie est déterminée par la classification de l'UICC (Union for International Cancer Control) reposant sur les critères TNM et attribuant un score représentatif de la malignité des tumeurs en fonction de leurs invasions primaire et secondaire (*Tableau 2 ; Figure 1*). Les données épidémiologiques indiquent que ce score est inversement proportionnel aux taux de survie à 5 ans des patients et soulignent l'importance d'un dépistage précoce et d'une bonne évaluation du stade de développement tumoral au moment du diagnostic pour la réussite thérapeutique (Washington, 2008).

Tableau 2. Stades UICC des carcinomes coliques. D'après la 7^{ème} édition de la classification TNM 2010

Stades UICC	Carcinomes coliques		
	T	N	M
0	T0, Tis	N0	M0
I	T1, T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4	N0	M0
IIIA	T1, T2	N1	M0
IIIB	T1, T2, T3	N1, N2	M0
IIIC	T3, T4	N1, N2	M0
IV	Tous T	Tous N	M1

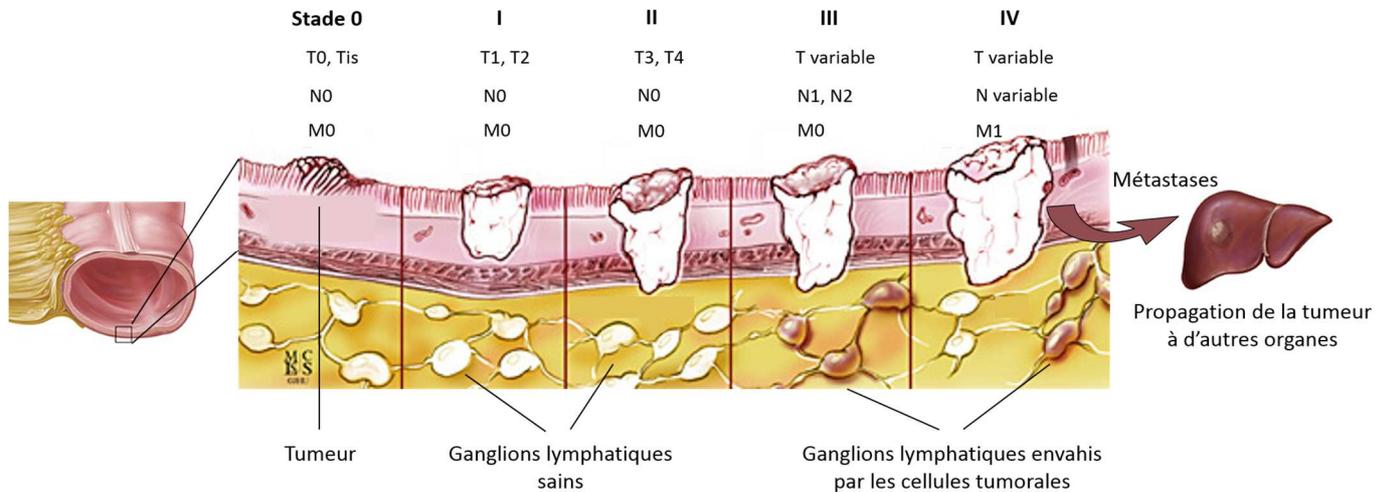


Figure 1. Classification TNM et stades UICC des carcinomes coliques. Exemple illustré des carcinomes coliques. Version modifiée d'après Johns Hopkins medicine colorectal cancer

2.2 Classification moléculaire

Afin de permettre une prise en charge personnalisée et plus efficace de la pathologie, trois grandes catégories de biomarqueurs ont été identifiées. Les biomarqueurs dits de diagnostic complètent la classification anatomique TNM et permettent d'évaluer plus précisément le stade de développement des tumeurs au moment du dépistage. Les marqueurs pronostics renseignent quant à eux sur l'évolution de la pathologie cancéreuse et ce, indépendamment du traitement. Enfin, les marqueurs prédictifs permettent de prédire la réussite ou l'échec des traitements par une chimiothérapie conventionnelle et d'orienter ainsi le protocole thérapeutique en fonction des caractéristiques moléculaires de la tumeur (Chung and Christianson, 2014; Kalia, 2015). Ces biomarqueurs sont aujourd'hui utilisés en routine sur des biopsies ou dans le sang circulant et sont principalement utilisés pour le diagnostic moléculaire des cancers du poumon, des leucémies myéloïdes chroniques, du mélanome et des cancers coliques et mammaires (*Tableau 3*).

Tableau 3. Biomarqueurs de diagnostic, de pronostic et prédictif des cancers coliques. *D'après Chung and Christianson, 2014*

Biomarqueurs	Anomalie génétique	Valeur biologique	Thérapie indiquée
EpCam	Expression	Diagnostic	
B-raf	Mutation	Mauvais pronostic	Panitumumab (Anti-EGFR)
EGFR	Expression	Prédictive d'une réponse aux inhibiteurs de la voie de signalisation induite par l'EGF	Imatinib (Anti-tyrosine kinase)
K-ras	Mutation	Prédictive d'une résistance aux anti-EGF	Cetuximab (Anti-EGFR)

EpCam : *Epithelial Cell adhesion molecule* ; **EGFR** : *Epidermal Growth Factor Receptor*

Afin de mieux prendre en charge les patients atteints de CrC, la compréhension de ce qu'est une tumeur est primordiale.

3. Physiopathologie du cancer colorectal

3.1 Généralités

Une cellule cancéreuse est une cellule dérivée du « soi », caractérisée par l'acquisition de mutations et une grande instabilité génétique et épigénétique qui affecte les gènes suppresseurs de tumeurs ainsi que les oncogènes. Ces cellules vont donc acquérir de nouvelles caractéristiques. Dans les années 2000, il a été proposé que la formation d'une

tumeur résulte de l'acquisition par la cellule tumorale de six caractéristiques majeures (*Figure 2*) : le maintien des signaux de croissance, l'insensibilité aux signaux anti-prolifératifs, la perte d'adhésion à la matrice extracellulaire (MEC) conduisant ainsi à la capacité d'invasion et à la formation de métastases, l'immortalisation c'est-à-dire une population de cellules qui présentent une réplication illimitée échappant à la senescence ainsi qu'à la mort cellulaire, la capacité anormale d'induire une néo-angiogenèse et enfin, l'échappement à la mort cellulaire programmée (Hanahan and Weinberg, 2000).

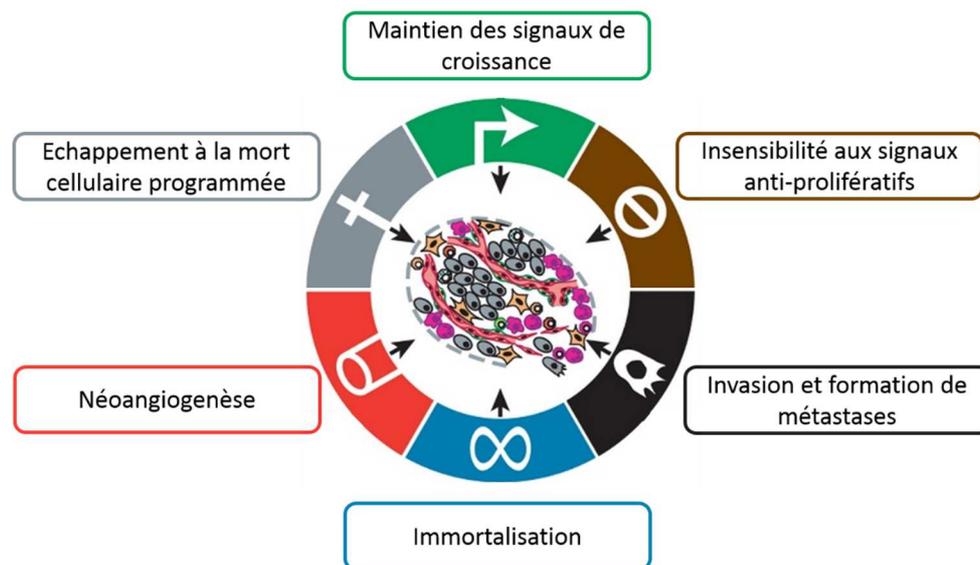


Figure 2. Les six caractéristiques fondamentales d'une cellule tumorale. D'après Hanahan and Weinberg, 2000

Plus récemment, les mêmes auteurs ont proposé quatre nouvelles caractéristiques que doit acquérir la cellule tumorale en vue du développement d'une tumeur (Hanahan and Weinberg, 2011). Ces caractéristiques illustrées sur la figure ci-contre (*Figure 3*) sont l'échappement à la surveillance du système immunitaire (permettant aux cellules cancéreuses d'éviter leur élimination par le système immunitaire, plus précisément par les lymphocytes T et B, les macrophages ainsi que les cellules NK), la capacité à induire une réponse inflammatoire par les cellules du système immunitaire inné, une grande instabilité génomique lui permettant ainsi de s'adapter rapidement aux variations du microenvironnement et enfin, la dérégulation du métabolisme énergétique.

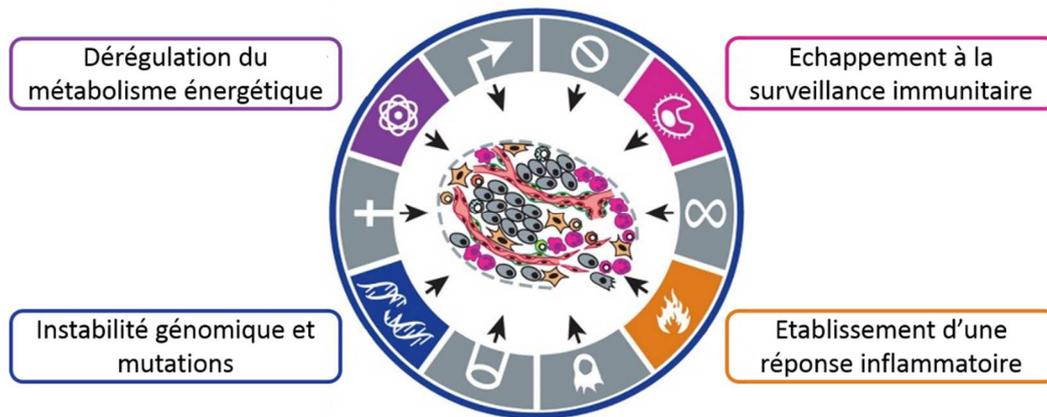


Figure 3. Caractéristiques émergentes d'une cellule tumorale. *D'après Hanahan and Weinberg, 2011*

L'établissement d'une réponse inflammatoire chronique ainsi que l'échappement à la surveillance du système immunitaire sont de nouveaux points forts dans l'implication du microenvironnement tumoral dans le développement des tumeurs. L'étude du microenvironnement tumoral prend ainsi une place importante dans la recherche en cancérologie et il est désormais admis que la cellule cancéreuse seule ne peut conduire à la formation d'une tumeur mais que le microenvironnement joue un rôle majeur dans le développement de celle-ci. Le pronostic vital du patient étant étroitement lié au caractère invasif de la tumeur primitive et à la dissémination éventuelle de métastases, une meilleure identification des acteurs du microenvironnement tumoral est nécessaire pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques et représente un enjeu majeur pour l'amélioration des traitements actuels (Zitvogel et al., 2008).

3.2 Le microenvironnement tumoral

A la suite de perturbations favorisant la transformation néoplasique des cellules, le microenvironnement subit des modifications. En effet, une tumeur solide est composée de cellules cancéreuses, mais également de cellules souches cancéreuses, de cellules immunitaires, de cellules du stroma, de la matrice extracellulaire (MEC), constituant le microenvironnement tumoral (*Figure 4*).

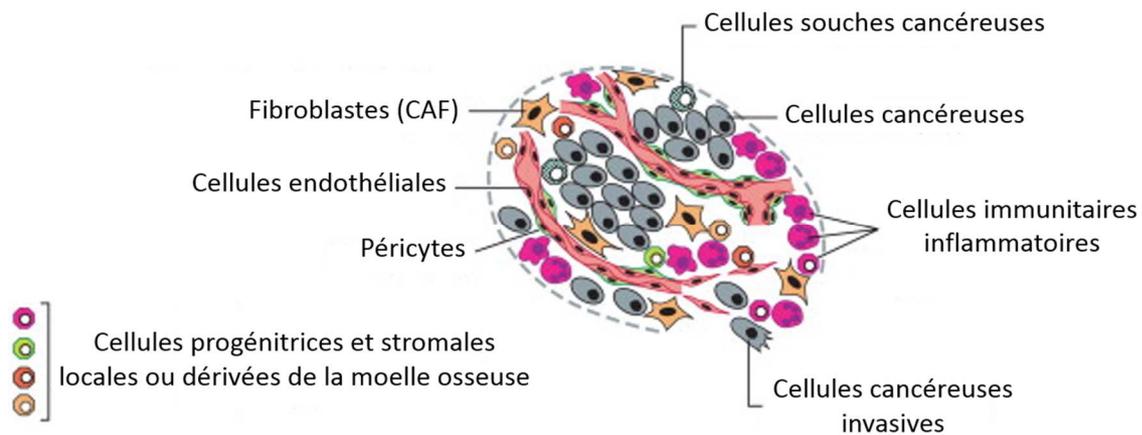


Figure 4. Composition cellulaire du microenvironnement tumoral. *D'après Hanahan and Weinberg, 2011*

3.2.1 Microenvironnement tumoral et stroma tumoral

La MEC constitue un élément fondamental du microenvironnement. Cette MEC est composée majoritairement de protéoglycanes, collagènes et de fibronectines qui sont des macromolécules sécrétées par les cellules du tissu. L'architecture principale des tissus et des organes repose sur ces fibroblastes et cette MEC adressant des signaux d'adhésion reconnus par les récepteurs cellulaires dédiés à cet effet, tels que les intégrines et permettant l'ancrage des cellules. De plus, la MEC agit sur des processus cellulaires variés tels que la différenciation, la prolifération, la survie et la migration cellulaire (Hynes, 2009).

Les nombreuses altérations génétiques acquises au cours de la transformation néoplasique permettent à la cellule tumorale de rompre ses liens avec la MEC avec par exemple la perte de récepteurs d'adhésions telles que la E-cadhérine, l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse, la protéolyse de la MEC ainsi que l'activation des fibroblastes (Gupta and Massagué, 2006) ; (Marsh et al., 2013). Tous ces mécanismes sont impliqués dans la formation de métastases qui représente aujourd'hui une des principales causes de décès de patients atteints d'un cancer.

3.2.2 Microenvironnement immunitaire des tumeurs

Le microenvironnement tumoral comprend un certain nombre de cellules du système immunitaire dont leurs rôles peuvent être variables selon le stade de développement de la tumeur.

3.2.2.1 Rôle de l'immunité dans la biologie du cancer

L'immunologie des tumeurs repose essentiellement sur deux concepts qui sont l'immunosurveillance des tumeurs et l'échappement à cette immunosurveillance par des mécanismes mis en place par les cellules tumorales afin de contourner leur élimination. En effet, au cours du développement tumoral, les cellules néoplasiques semblent être sous contrôle séquentiel des cellules immunitaires selon trois phases distinctes pouvant être qualifiées ainsi : une phase précoce dite d'élimination, une phase d'équilibre et une phase plus tardive dite d'échappement (Figure 5).

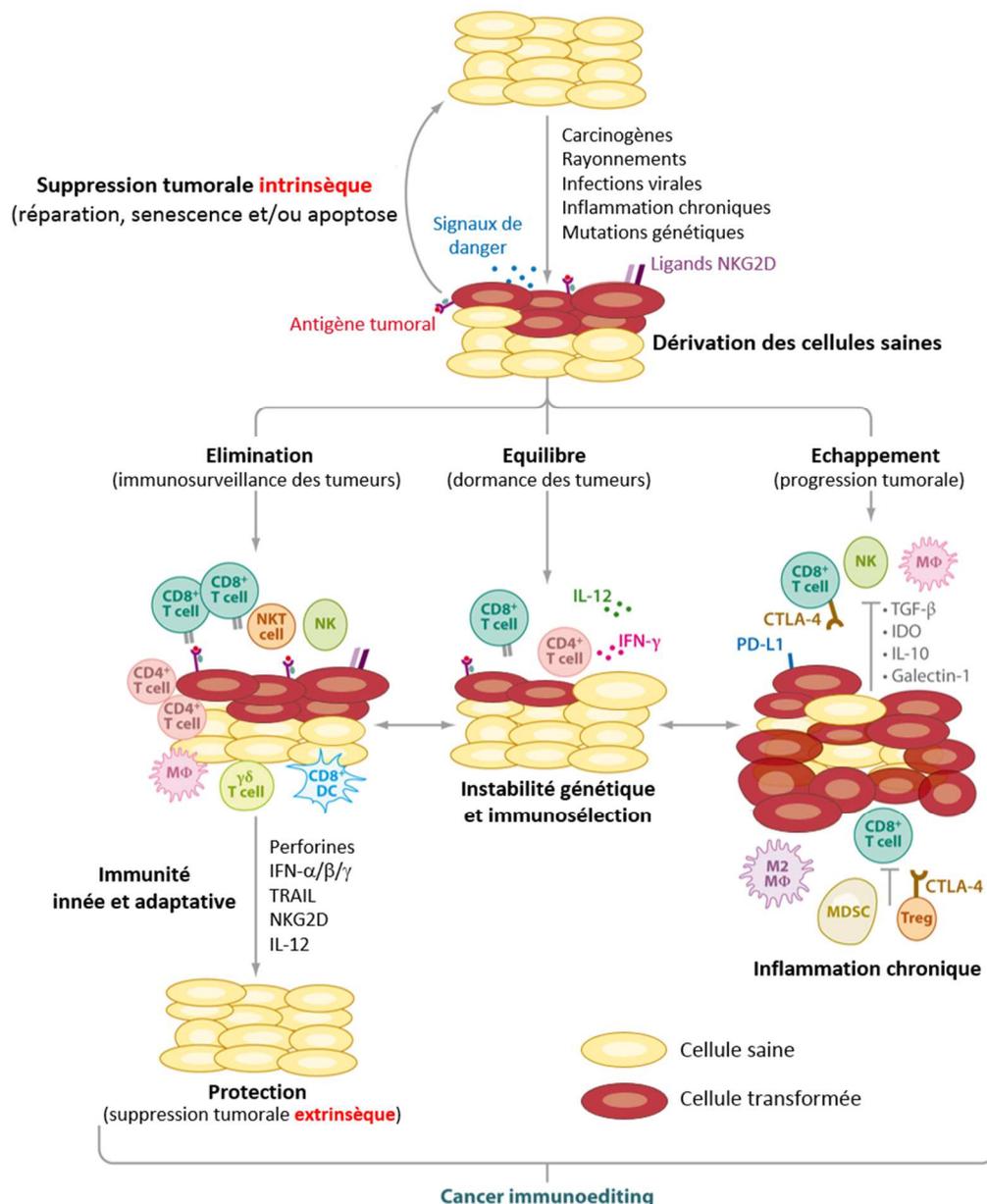


Figure 5. Implication des cellules immunitaires dans la formation de tumeurs. D'après Vesely et al., 2011

Durant la phase d'élimination, connu également sous le nom d'immunosurveillance des tumeurs, les cellules immunitaires cytotoxiques innées et adaptatives telles que les macrophages, les lymphocytes CD4⁺, CD8⁺, les cellules Natural Killer (NK), les cellules Natural Killer like T cells (NKT) et les cellules dendritiques (DC, *Dendritic Cells*) coopèrent pour inhiber le développement tumoral et favoriser le développement d'un tissu normal. Cette première étape est suivie d'une période de latence n'impliquant plus que les effecteurs de l'immunité adaptative (Lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺). Durant cette seconde phase appelée également phase d'équilibre, les cellules du système immunitaire et les cellules néoplasiques entrent dans un état d'équilibre dynamique. Cette phase voit l'apparition de cellules tumorales devenues insensibles à la surveillance immunologique et qui échappent à l'élimination par les cellules effectrices et/ou induisent un état de tolérance immunologique favorable à leur expansion. Les cellules tumorales entrent alors dans la troisième phase dite d'échappement conduisant ainsi au développement de tumeurs malignes cliniquement détectables. A ce stade, il n'y a donc plus aucune surveillance exercée par le système immunitaire, et l'apparition d'une inflammation chronique (Vesely et al., 2011).

3.2.2.2 Cellules immunitaires et microenvironnement tumoral

Le stroma tumoral contient donc des cellules immunitaires pouvant contribuer à l'inhibition ou à la progression tumorale. L'infiltrat immunitaire tumoral est hétérogène et varie selon les stades de progression de la pathologie. Il est composé majoritairement de macrophages, de DCs, de mastocytes, de cellules NK et de lymphocytes B et T, naïfs mais aussi mémoires. Ces lymphocytes T comprennent les effecteurs T CD4⁺ helper (T_{H1} et T_{H2}), les effecteurs T régulateurs (T_{reg}), les effecteurs T helper folliculaire (T_{FH}) ainsi que les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques.

Ces cellules semblent répondre à une organisation bien définie au sein des tumeurs. Ainsi, les macrophages, mastocytes, granulocytes et MDSCs (*Myeloid Derived Suppressor Cells*) suivent une répartition aléatoire au sein du lit tumoral, au centre de la tumeur ou alors au front invasif. A l'inverse, les cellules d'origine lymphoïde semblent occuper une place plus définie dans ce réseau cellulaire tumoral complexe. Les cellules NK, n'entretenant pas de liens directs avec les cellules néoplasiques intra-tumorales, sont observées en périphérie du microenvironnement tumoral. Les lymphocytes B sont quant eux majoritairement représentés dans la marge invasive et dans les structures tertiaires lymphoïdes (TLS, *Tertiary*

Lymphoid Structures). Enfin, les lymphocytes T, et plus particulièrement les lymphocytes T CD8⁺, se localisent préférentiellement dans la marge invasive mais peuvent également être observés au centre de la tumeur et dans les TLS. Enfin, les DCs, présentatrices de l'antigène, se distribuent entre le centre de la tumeur, les organes lymphoïdes secondaires et les TLS proximaux. Les cellules dendritiques immatures migrent au centre de la tumeur où elles se chargent d'antigènes tumoraux et effectuent leur maturation. Puis, les DCs matures rejoignent ensuite les ganglions lymphatiques proximaux ou les TLS où elles activent les lymphocytes T naïfs (Gajewski et al., 2013). Dans la majorité des tumeurs solides, la densité de l'infiltration lymphocytaire est le signe d'un pronostic favorable pour la survie globale du patient (Marsh et al., 2013 ; Gajewski et al., 2013). Notamment, dans le cas des carcinomes coliques, la forte densité de cellules immunitaires au centre de la tumeur et dans le front invasif est corrélée avec la survie sans récurrence de la pathologie chez ces patients (Galon et al., 2006).

Outre cet aspect quantitatif, la nature de l'infiltrat et l'orientation de ces effecteurs sont déterminantes dans l'évolution de la maladie.

4. Traitements des cancers du côlon

4.1 Traitements conventionnels des cancers du côlon

Le traitement des cancers colorectaux réside principalement en l'exérèse par chirurgie de la tumeur associée ou non à des chimiothérapies et/ou radiothérapie néo-adjuvantes ou adjuvantes. Lorsque le cancer atteint un stade avancé, c'est-à-dire métastatique, la chimiothérapie est alors utilisée comme traitement de première ligne pour soulager et contrôler les symptômes de la maladie, améliorer la qualité de vie du patient ainsi que sa survie (Aschele et al., 2009).

4.1.1 Traitement locorégional

Le traitement des CrC pour les patients diagnostiqués à un stade précoce, c'est-à-dire aux stades 0-I, est principalement locorégional. Ainsi, l'exérèse chirurgicale complète de la tumeur et d'une marge saine lorsque cela est possible peut être curatif et constitue la première décision thérapeutique. De plus, en fonction de la localisation primaire de la tumeur et de son degré d'invasion, l'ablation des vaisseaux lymphatiques la drainant et/ou

un curage ganglionnaire peuvent également être nécessaires (Giuliano et al., 1994; West et al., 2010). Cette chirurgie, dite « RO », est prescrite seule ou accompagnée d'un traitement néo-adjuvant pour les stades II et III à hauts risques.

D'une manière générale, une simple surveillance du patient après résection chirurgicale est suffisante lorsque celui-ci est diagnostiqué à un stade précoce et/ou avec un faible taux de récurrence. Par contre, lorsque des patients sont diagnostiqués à des stades plus avancés ou pour des patients à haut risque de récurrence, d'autres stratégies thérapeutiques sont appliquées telles que des thérapies néo-adjuvantes.

4.1.2 Traitements néo-adjuvants et adjuvants

Au moment du dépistage et en amont d'une intervention chirurgicale, il peut être décidé sur des critères diagnostiques, notamment moléculaires (Imagerie et/ou biopsie), au moment du dépistage, de mettre en place une thérapie néo-adjuvante en vue de diminuer le volume de la tumeur.

4.1.2.1 Radiothérapie

Ces stratégies néo-adjuvantes peuvent faire appel à la radiothérapie, qui, comme l'exérèse chirurgicale est un traitement locorégional de la tumeur. En effet, cette technique de médecine nucléaire utilise des rayonnements ionisants afin d'irradier spécifiquement les cellules de la masse tumorale, tout en essayant d'épargner les tissus sains à la périphérie et les organes avoisinants. Ces rayonnements ionisants induisent des cassures et des dommages à l'ADN de manière irréversible et provoquent donc la sénescence répliquative des cellules tumorales ou alors, la mort cellulaire via l'apoptose, la nécrose, l'autophagie, l'induction de catastrophes mitotiques (Golden and Apetoh, 2015).

La radiothérapie est proposée en fonction du type de cancer, de sa localisation ainsi que de son stade d'évolution mais également en fonction de l'état général du patient. Elle peut être utilisée dans deux buts majeurs. Selon le stade d'évolution de la maladie, son premier objectif est de guérir un cancer en visant à détruire la totalité des cellules cancéreuses, on parle alors de radiothérapie curative. Son deuxième objectif est de réduire l'évolution de la maladie et/ou d'en traiter les symptômes, on parle alors de radiothérapie palliative ou de radiothérapie symptomatique.

Concernant les CrC, la radiothérapie occupe une place importante en tant que pilier du traitement, parallèlement à la chirurgie. Une radiothérapie combinée ou non avec une chimiothérapie a démontré de meilleurs bénéfices que lorsqu'elle est proposée après intervention chirurgicale (Häfner and Debus, 2016 ; van Gijn et al., 2011).

4.1.2.2 Chimiothérapie

Tout comme la radiothérapie, la chimiothérapie néo-adjuvante va avoir comme but la diminution du volume tumoral.

Le 5-Fluorouracile (5-Fu) est couramment utilisé en tant que chimiothérapie néo-adjuvante. Il a été démontré récemment que le 5-Fu associé à de la radiothérapie avant chirurgie améliore la survie sans progression mais également la survie globale chez des patients atteints d'un cancer colorectal localement avancé, de stade T3 et T4 (Jalilian et al., 2016).

La capécitabine peut également être utilisée en tant que chimiothérapie néo-adjuvante chez des patients atteints d'un cancer colorectal localement avancé (Hofheinz et al., 2012). En effet, il a été démontré que le 5-Fu et la capécitabine associés à de la radiothérapie ont une efficacité comparable. Cependant, les complications possibles liées à l'injection du 5-Fu suggère que l'utilisation de la capécitabine combinée à de la radiothérapie peut être un choix favorable dans le traitement néo-adjuvant des CrC (Chen et al., 2012).

Plus récemment, des patients atteints d'un cancer colorectal localement avancé, de stade T3/T4 ont reçu en thérapie néo-adjuvante, une association de deux chimiothérapies composée de capécitabine et d'oxaliplatine associée à de la radiothérapie (Hess et al., 2016).

4.1.3 Traitement systémique

Le traitement systémique des cancers du côlon repose principalement sur la chimiothérapie adjuvante. Cette chimiothérapie peut être supplée par et/ou associée à l'hormonothérapie ou à une thérapie ciblée. Ces agents chimiothérapeutiques sont utilisés en clinique seulement depuis les années 70s (DeVita and Chu, 2008). Aujourd'hui, ces molécules sont utilisées seules ou en combinaison et peuvent être administrées à différents temps de la prise thérapeutique.

En ce qui concerne les chimiothérapies, il en existe de nombreuses dont les modes d'action sont très différents. Par exemple, elles peuvent potentialiser l'apoptose des cellules

cancéreuses ou inhiber la prolifération cellulaire. Néanmoins, elles peuvent entraîner à fortes doses de lourds effets secondaires. Afin de potentialiser l'efficacité du traitement tout en étant mieux toléré, des associations de chimiothérapies sont donc utilisées. Ces associations de chimiothérapies permettent de combiner différents modes d'action et ainsi diminuer la concentration de chaque composant.

Concernant les CrC, trois molécules majeures composent actuellement les protocoles thérapeutiques.

4.1.3.1 5-Fluorouracile

Parmi ces molécules, le 5-Fluorouracile est un des anti-métabolites les plus utilisés aujourd'hui pour le traitement de divers cancers (Longley et al., 2003). Il demeure à ce jour la molécule standard composant les protocoles thérapeutiques pour le traitement des carcinomes gastriques et coliques (Lescut et al., 2015).

Le 5-Fu est un analogue de l'uracile qui, par la succession de réactions enzymatiques est converti en métabolites cytotoxiques actifs que sont le 5-FdUMP, le 5-FdUDP et le 5-FdUTP. Ces métabolites actifs vont être incorporés à l'ARN et l'ADN, mais vont également inhiber la thymidilate synthase et ainsi induire l'inhibition de la biosynthèse de l'ADN, l'arrêt du cycle cellulaire ainsi que la mort par apoptose de la cellule (Thirion et al., 2004). L'efficacité du 5-Fu est accentuée par un apport exogène d'acide folique, un co-inhibiteur de la thymidilate synthase, constituant le principe actif de la leucovorine par exemple (Longley et al., 2003).

Le 5-Fu est utilisé seul ou en combinaison avec d'autres molécules et ce en fonction du stade de la tumeur, du moment de l'administration c'est-à-dire s'il s'agit d'une chimiothérapie néo-adjuvante ou adjuvante et des caractéristiques moléculaires de la tumeur.

Malheureusement, les patients ayant un cancer colorectal liés à une instabilité génétique induite par une défaillance du système de réparation de l'ADN conduisant à l'instabilité des microsatellites, acquièrent une résistance au 5-Fu. Une chimiothérapie associant le 5-Fu à l'oxaliplatine est alors plus adaptée pour ces patients (Jover et al., 2009).

4.1.3.2 Oxaliplatine

L'oxaliplatine (OXA) appartient à la famille des DACH (Diaminocyclohexane) platine qui comprend également le cisplatine et le carboplatine. Il est à noter que l'OXA est un analogue du cisplatine. Il s'agit d'une molécule composée d'un atome de platine complexé d'une part à un dianion oxalate et d'autre part, à une molécule de 1,2-diaminocyclohexane. Ces caractéristiques lui confèrent des propriétés anticancéreuses uniques qui le distinguent des autres platines. En effet, ces agents alkylants peuvent induire la formation d'adduits inter- ou intra-brins de l'ADN et inhiber par ce biais, la réplication de l'ADN des cellules cancéreuses coliques.

L'OXA est un composé qui ne présente aucune toxicité rénale mais qui présente une activité antitumorale dans le cas de cancer colorectal (Extra et al., 1990). En effet, l'OXA représente un composé majeur dans le traitement des cancers du côlon, de rectum et celui du pancréas (Soulié et al., 1997). Dans le cadre du traitement des cancers métastatiques, l'oxaliplatine a une efficacité limitée en monothérapie mais lorsque l'OXA est associé au 5-Fu et à l'acide folinique (FOLFOX), il donne de bons résultats (de Gramont et al., 2000). En effet, le FOLFOX compose aujourd'hui le protocole de référence pour le traitement des cancers du côlon métastatique.

4.1.3.3 Irinotecan

Enfin, la dernière molécule majeure qui compose actuellement les protocoles thérapeutiques est l'irinotecan (IRI).

L'IRI est un analogue semi-synthétique d'un alcaloïde naturel appelé CPT-11 ou encore Camptothecin-11. Il s'agit d'un pro-médicament métabolisé dans la cellule par différentes carboxylesterases afin de produire le métabolite actif, le SN-38. Le SN-38 inhibe la topoisomérase 1, entraînant des cassures au niveau de l'ADN simple brin et inhibe ainsi sa réplication.

L'IRI constitue aujourd'hui l'un des composants d'un protocole couramment utilisé pour le traitement des CrC, le FOLFORI qui est l'association du 5-Fu, de l'acide folinique et de l'IRI.

D'une manière générale, le 5-Fu est proposé seul chez des patients atteints de carcinomes coliques diagnostiqués à un stade II (Ribic et al., 2003). Chez les patients atteints de

carcinomes coliques diagnostiqués à un stade II à hauts risques ou à un stade III ou IV, le 5-Fu est associé à l'oxaliplatine (FOLFOX) ou à l'irinotecan (FOLFIRI). En l'absence de facteurs prédictifs disponibles à ce jour pour l'orientation thérapeutique vers l'un ou l'autre de ces protocoles, le FOLFOX demeure la combinaison de chimiothérapies privilégiée en première ligne thérapeutique des CrC. Le FOLFIRI est alors proposé en cas d'échec thérapeutique.

Malgré un potentiel effet immunostimulateur des chimiothérapies conventionnelles, la maladie va tendre vers un échappement des cellules cancéreuses à la chimiothérapie. Cet échec thérapeutique se traduit par la persistance des cellules néoplasiques à échapper à la surveillance immunitaire. En effet, de multiples mécanismes d'immunosuppression ont été caractérisés empêchant l'immunité antitumorale, d'où l'utilisation d'agents réactivant le système immunitaire.

4.2 Immunothérapie

Les immunothérapies peuvent se diviser en deux groupes distincts, selon qu'elles utilisent des molécules de l'immunité (immunothérapie passive) ou qu'elles vont avoir pour objectif d'activer le système immunitaire (immunothérapie active).

4.2.1 Immunothérapie passive ou thérapie ciblée

L'immunothérapie à base d'anticorps monoclonaux, dite « passive » occupe aujourd'hui une place majeure dans la prise en charge des patients atteints de CrC. En effet, son efficacité, sa spécificité ainsi que le peu d'effets secondaires qu'elle engendre lui confère des avantages considérables sur les autres molécules utilisées pour le traitement systémique des cancers.

Par exemple, le Cetuximab, un anticorps murin humanisé, dirigé contre l'EGF-R (Epidermal Growth Factor Receptor) améliore significativement le taux de réponse des patients atteints de CrC traités par le FOLFOX, et plus particulièrement chez les patients porteurs du gène *ras* non muté (Bokemeyer et al., 2015; De Roock et al., 2010). D'autres anticorps monoclonaux comme le Trastuzumab, dirigé contre le récepteur de l'EGF, ou le Bevacizumab, dirigé contre le récepteur du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), sont également utilisés dans les CrC (Degirmenci et al., 2010).

L'association de ces anticorps monoclonaux aux molécules de chimiothérapies conventionnelles semble prometteuse pour la prise en charge thérapeutique des cancers mais reste encore très coûteuse.

4.2.2 Immunothérapie active

L'objectif de l'immunothérapie active consiste à moduler la réponse immunitaire afin que celle-ci puisse contrecarrer les mécanismes d'échappement mis en œuvre par les cellules tumorales. On parle alors d'immunothérapie anticancéreuse, visant à éliminer la tumeur primitive mais également à éliminer les cellules tumorales ayant déjà migré et devenues potentiellement résistantes aux chimiothérapies. Cette stimulation du système immunitaire peut être aspécifique ou spécifique.

4.2.2.1 Immunothérapie active aspécifique

L'immunothérapie active aspécifique repose sur l'utilisation de composés tels que des cytokines ou des dérivés bactériens, susceptibles de stimuler le fonctionnement général du système immunitaire. Il est maintenant clairement établi que l'immunothérapie par utilisation du Bacille de Calmette et Guérin (BCG) est le traitement de référence pour contrôler l'évolution des tumeurs superficielles de vessie à haut grade (Herr et al., 1988).

Une immunothérapie à base de lipide A (partie active des lipopolysaccharides), plus précisément de l'OM-174, a également été utilisée dans différents types de cancers solides (Isambert et al., 2013). De plus, lorsque ce lipide A est associé à de l'oxaliplatine, son efficacité est alors augmentée. En effet au sein de notre équipe, il a été démontré que l'association lipide A / Oxaliplatine induit une importante régression tumorale des tumeurs colorectaux chez 95% des rats. Cette efficacité anti-tumorale est corrélée *in vivo* et *in vitro* à l'induction de la sénescence cellulaire par l'oxaliplatine et de l'apoptose induite principalement par le lipide A (Seigneur et al., 2014).

4.2.2.2 Immunothérapie active spécifique

Un autre type d'immunothérapie, impliquant la vaccination ou l'utilisation de thérapies ciblant les points de contrôles immunitaires, est également employé. On parle alors d'immunothérapie active spécifique.

L'objectif de la vaccination thérapeutique antitumorale est d'induire la réponse immunitaire spécifique due aux lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺. Plusieurs stratégies s'appuyant sur le rôle fondamental des DCs sont aujourd'hui à l'étude. En effet, des DCs peuvent être « chargées » en antigènes tumoraux *in vitro* puis réinjectées au patients. De plus, l'utilisation de particules produites par les DCs, les exosomes, ou encore leur stimulation *in vivo* sont également envisageables (Viaud et al., 2010). Par exemple, une étude clinique de phase I utilisant des exosomes pour l'immunisation de patients atteints de mélanome de stade III/IV a été réalisée (Escudier et al., 2005). Plusieurs stratégies s'appuient sur le rôle fondamental des cellules dendritiques mais aujourd'hui les thérapies révolutionnant la cancérologie reposent sur l'utilisation d'inhibiteurs de points de contrôle négatifs immunitaires.

La présence de points de contrôle négatif immunitaire est nécessaire à la survie de l'homme. En effet, dans des conditions physiologiques, ces molécules sont à l'origine de la tolérance du système immunitaire pour le « soi » afin d'éviter toutes réactions auto-immunes. Sachant qu'une cellule tumorale est une cellule du soi ayant acquis des mutations, elle a donc la capacité d'exprimer des néo-antigènes mais aussi d'exprimer à sa membrane des molécules inhibitrices des lymphocytes T, empêchant alors une réponse adaptée de l'organisme pour lutter contre les cellules cancéreuses.

Il existe deux types de points de contrôle immunitaire, les co-activateurs ainsi que les co-inhibiteurs. Lors de la fixation du TCR (*T Cell Receptor*) d'un lymphocyte T au CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) de classe I ou II d'une cellule présentatrice de l'antigène, il est nécessaire d'avoir un second signal afin d'activer les lymphocytes T. Ce second signal est apporté par la fixation de CD80 sur son ligand CD28. A l'inverse, les molécules présentes à la surface des lymphocytes T telles que KIR (Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor), LAG3 (Lymphocyte Activation Gene 3), Tim3 (T-cell immunoglobulin mucin domain-3), et les deux plus étudiées PD-1 (Programmed Cell Death) et CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4), sont des molécules co-inhibitrices du système immunitaire (Pardoll, 2012). Ces molécules régulatrices peuvent interagir avec leurs propres ligands qui sont respectivement PDL-1 et CD80, des molécules fortement exprimées au sein du microenvironnement tumoral et apparaissant comme de mauvais pronostic pour les patients (*Figure 6*).

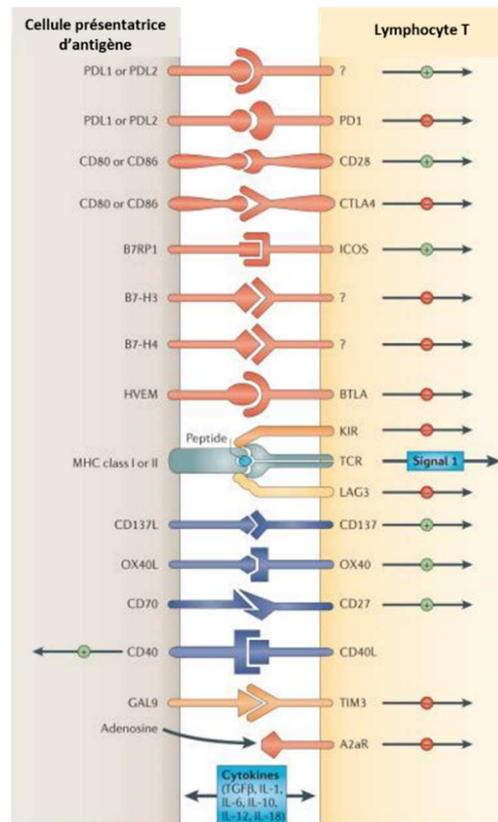
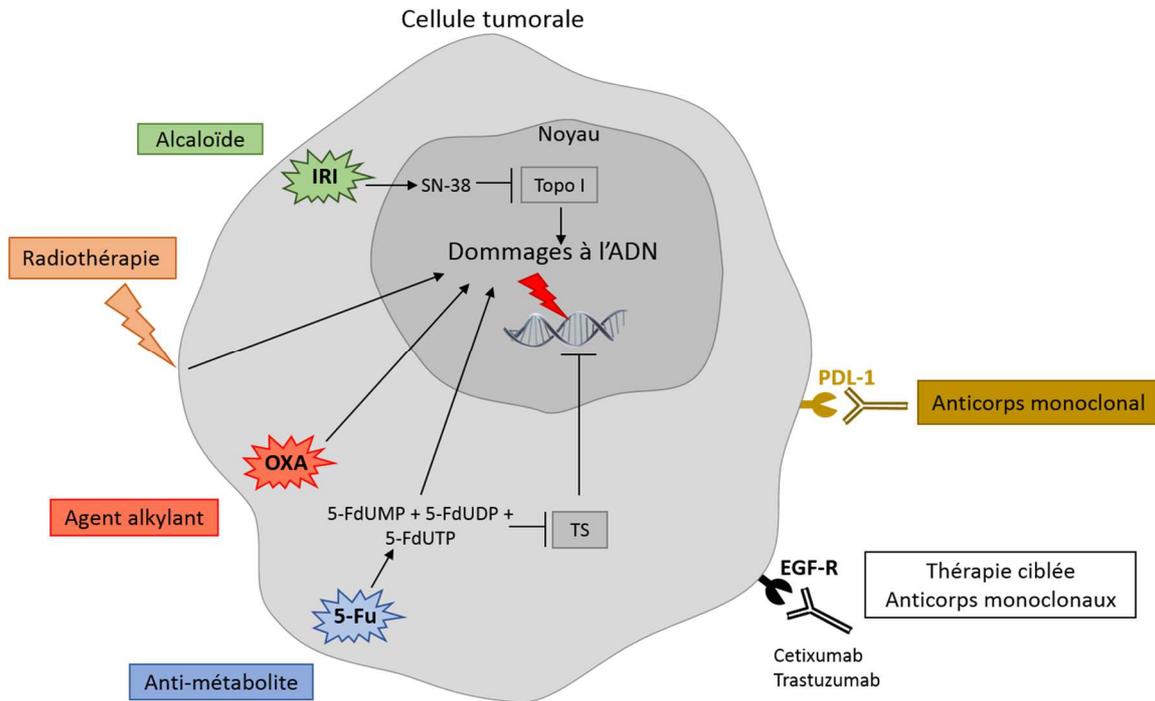


Figure 6. Interactions co-activatrices (●) et inhibitrices (●) régulant la réponse des lymphocytes T. D'après Pardoll, 2012

Ces points de contrôle négatif peuvent être bloqués par des anticorps monoclonaux ciblant ces protéines. L'utilisation de ces anticorps réactive alors le système immunitaire et lui permet ainsi de lutter plus efficacement contre les cellules tumorales. En effet, le blocage de ces points de contrôle négatif a montré une efficacité remarquable chez des patients atteints de cancers de type mélanome métastatique ou dans des cancers avancés de poumons (NSCLC), rénaux et dans les lymphomes de Hodgkin (Ansell, 2015 ; Brahmer et al., 2012 ; Hamid et al., 2013). Malgré les effets spectaculaires de ces thérapies, un grand nombre de patients ne répondent pas à ces traitements et d'autres rechutent. Concernant les CrC, l'efficacité des thérapies utilisant des inhibiteurs de points de contrôle immunitaires reste limitée (Brahmer et al., 2012; Topalian et al., 2012). Cependant, des études cliniques de phase I/II sont en cours afin d'évaluer l'efficacité de l'association de chimiothérapies avec un anticorps anti-PD-1 (Pembrolizumab) ou anti-PDL-1 (Durvalumab) chez des patients atteints d'un cancer colorectal à un stade avancé.

La Figure 7 résume les différents traitements utilisés chez les patients atteints de CrC.



5-Fu : 5-Fluorouracile ; **OXA** : Oxaliplatine ; **IRI** : Irinotecan ; **TS** : Thymidilate synthase ; **Topo I** : Topoisomérase I

Figure 7. Différentes stratégies thérapeutiques utilisées dans le traitement des CrC. Les cibles de ces thérapies peuvent être l'ADN via des dommages directs (Agent alkylant) ou indirects (Anti-métabolite et alcaloïde), mais également l'inhibition de voies de signalisation (Thérapie ciblée) ou encore le blocage des points de contrôle négatif du système immunitaire.

L'immunothérapie anticancéreuse a pour but de moduler la réponse immunitaire afin que celle-ci puisse contrecarrer les mécanismes d'échappement mis en œuvre par les cellules tumorales. Récemment, il a été mis en évidence que des traitements tels que certaines chimiothérapies mais également la radiothérapie peuvent également stimuler le système immunitaire via le mécanisme de mort cellulaire immunogène.

Partie B : La mort cellulaire immunogène

Comme évoqué précédemment, les cellules tumorales adoptent un comportement anormal caractérisé par dix caractéristiques dont l'échappement à la réponse immunitaire. Il y a donc une inefficacité des défenses immunitaires naturelles d'où l'intérêt de l'immunothérapie mais également de certaines thérapies conventionnelles qui, en plus de leurs effets cytotoxiques sur les cancers colorectaux, peuvent également activer le système immunitaire par un mécanisme appelé « mort cellulaire immunogène » ou ICD (*Immune Cell Death*) (Golden and Apetoh, 2015).

1. Caractéristiques de la mort cellulaire immunogène

La mort cellulaire immunogène présente les caractéristiques de l'apoptose classique, telles que l'externalisation des phosphatidylsérines, l'activation des caspases ainsi que la dépolarisation des mitochondries. Elle va également présenter d'autres caractéristiques importantes telles que la présentation à la surface des cellules de la calréticuline (CRT) et de protéines de chocs thermiques (HSP, *Heat Shock Protein*), mais également la sécrétion de facteurs immunogènes solubles tels que l'ATP (Adénosine Triphosphate) et HMGB1 (*High-mobility group box 1*) (Figure 8) (Rébé and Ghiringhelli, 2015).

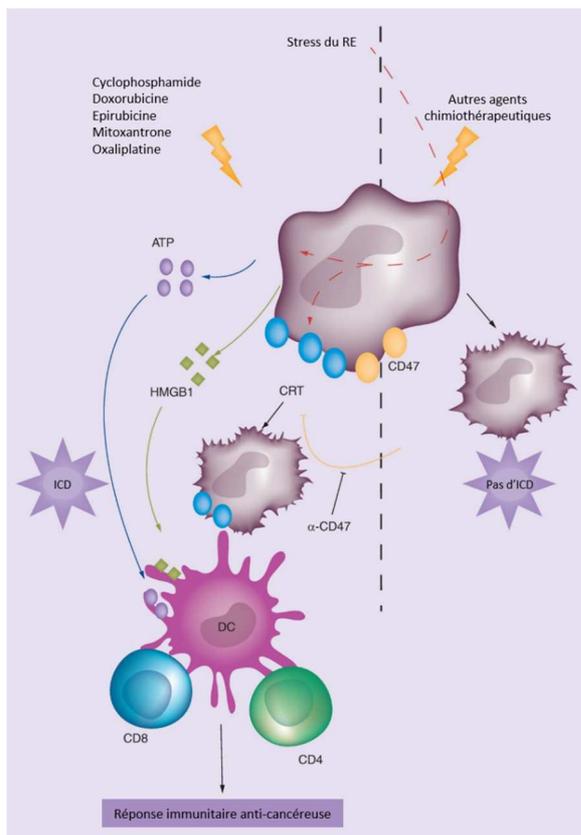


Figure 8. Mécanismes de mort cellulaire immunogène. Certaines chimiothérapies dites « immunogènes », ont la capacité de tuer les cellules cancéreuses par activation des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ après exposition à la membrane cellulaire de la CRT, sécrétion d'ATP et HMGB1 permettant ainsi d'activer les DCs. Les chimiothérapies « non immunogène », ne peuvent pas induire l'activation du système immunitaire par ce mécanisme. D'après Rébé and Ghiringhelli, 2015

Lorsqu'une tumeur est traitée par certaines chimiothérapies ou alors lorsqu'elle est irradiée, la CRT intracellulaire est rapidement externalisée à la surface des cellules tumorales et va pouvoir activer les cellules dendritiques (DCs) et ainsi activer les lymphocytes T pouvant alors venir tuer les cellules tumorales. Certaines protéines chaperons telles que HSP90, peuvent également se relocaliser à la surface des cellules tumorales, favorisant l'interaction entre les cellules tumorales et les DCs et induisant alors les premières étapes de maturation de ces dernières. Plus tardivement, les cellules tumorales libèrent une protéine constitutive de la chromatine, HMBG1, protéine appartenant à la famille des DAMPs (*Damage-Associated Molecular Patterns*), qui va reconnaître le récepteur Toll-like 4 (TLR4) sur les DCs induisant la phagocytose des cellules tumorales par les DCs. Enfin, les cellules tumorales sécrètent des signaux de maturation tels que l'ATP, l'interféron de type I (INF- γ) et l'interleukine-1 (IL-1) contribuant également à la phagocytose des cellules tumorales entraînant à son tour l'activation des L_T cytotoxiques (Rébé and Ghiringhelli, 2015; Zitvogel et al., 2008).

2. Facteurs clés de la mort cellulaire immunogène

- La calréticuline

La CRT est une protéine chaperon du réticulum endoplasmique (RE) qui, après traitement des cellules tumorales par certaines chimiothérapies ou radiothérapie, est relocalisée à la surface de ces cellules, dans un complexe avec la protéine disulfure isomérase (ERp57). Ces cellules se trouvent alors au début du stade pré-apoptotique (Obeid et al., 2007). Le RE est perturbé lorsqu'il y a une accumulation de protéines mal repliées ou alors en présence d'inducteurs de stress du RE tels que certains agents chimiothérapeutiques, qui peuvent induire une production accrue de ROS (*Reactive Oxygen Species*). Ce stress du RE est nécessaire mais pas suffisant pour induire l'externalisation de la CRT (Martins et al., 2011). En effet, lors de ce stress, trois modules sont activés à savoir un module de stress du RE, un module apoptotique ainsi qu'un module de transfert. Lors du stress du RE, la protéine RNA-like endoplasmic réticulum kinase (PERK) est activée par phosphorylation et va alors pouvoir phosphoryler le facteur d'initiation de la traduction eIF2 α . Cet événement est suivi d'une activation partielle de la caspase-8 qui va par la suite cliver Bap31, une protéine du RE qui interagit avec les protéines anti-apoptotiques telle que Bcl-2 et qui est nécessaire pour

l'externalisation de la CRT (Panaretakis et al., 2009). Ce clivage est suivi de l'activation de Bax et de Bak. Enfin, après exocytose via la fusion entre les vésicules de l'appareil de Golgi et la membrane plasmique des cellules cancéreuses via les protéines SNARE, la calréticuline est externalisée au niveau de la surface membranaire (Figure 9) (Panaretakis et al., 2009).

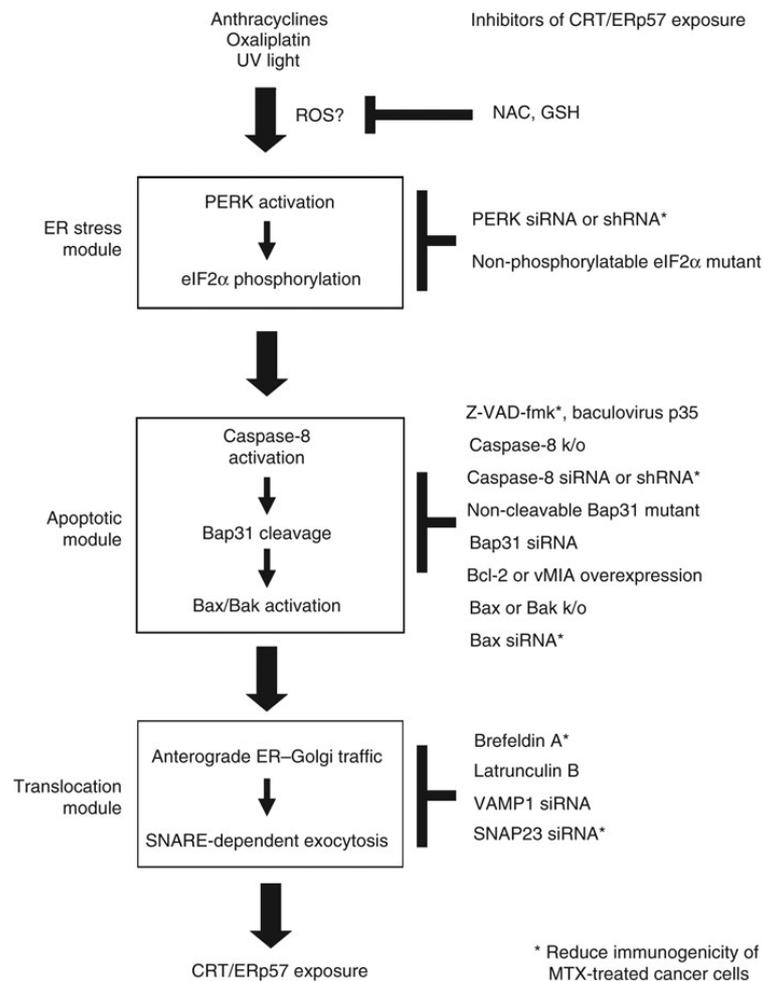


Figure 9. Mécanisme d'externalisation de la calréticuline. L'utilisation de chimiothérapies immunogènes ou d'irradiation va conduire à l'externalisation de la CRT selon un schéma séquentiel. En effet, lors du stress du RE, trois modules sont activés à savoir un module de stress du RE (Phosphorylation de PERK puis de eIF2 α), activant alors le module apoptotique (Activation de la caspase 8 puis activation de Bac / Bak), activant à son tour un module de transfert (Exocytose via les protéines SNARE puis externalisation de la CRT). D'après Panaretakis et al., 2009

Plus récemment, l'implication des intégrines a également été mise en évidence dans la régulation de l'externalisation de la CRT (Liu et al., 2016). La recherche d'un mécanisme unique régulant l'externalisation de la CRT et pouvant être modulé lors d'une thérapie reste donc un challenge déterminant.

L'externalisation de la CRT représente un signal pour les cellules présentatrices d'antigènes telles que les DCs qui phagocytent les cellules engagées dans le processus de mort. Ce signal

peut être atténué par l'expression de CD47 qui empêche la phagocytose des cellules cancéreuses (Chao et al., 2010). En revanche, plusieurs études ont pu montrer que le blocage de l'externalisation ou la déplétion de la CRT induit une inhibition de la phagocytose des cellules tumorales traitées par les anthracyclines, et conduit à une abolition de l'immunogénicité chez la souris (Tesniere et al., 2008). De plus, il a également été montré que les tumeurs possédant un défaut intrinsèque du mécanisme de translocation de la CRT deviennent résistantes aux anthracyclines en raison de leur incapacité à induire une réponse immunitaire anticancéreuse (Panaretakis et al., 2008).

- Les protéines de chocs thermiques HSP

D'autres protéines peuvent être externalisées en réponse à certaines chimiothérapies comme les protéines de chocs thermiques (HSP). En effet, en réponse à différents agents cytotoxiques, les cellules tumorales peuvent activer la transcription d'une série de molécules chaperons appartenant à la classe des HSP inductible. Ces HSP sont connues pour protéger de la mort cellulaire, via leur activité de chaperons moléculaires. Elles peuvent également inhiber l'apoptose aux niveaux pré et post-mitochondriaux. Ces HSP peuvent également stimuler le système immunitaire à plusieurs niveaux en favorisant la reconnaissance des DCs par les cellules engagées dans le processus de mort (Zitvogel et al., 2008).

- HMGB1

La protéine HMGB1 fait partie de la superfamille des protéines HMG (*High Mobility Group*) découverte en 1973 par *Goodwin* (Goodwin et al., 1973). De manière générale, HMGB1 est une protéine constitutive de la chromatine qui se lie à l'ADN double brin et facilite un nombre de fonctions nucléaires incluant la stabilisation du nucléosome, la transcription, la réplication et la recombinaison (Bustin, 1999 ; Thomas and Travers, 2001). Cette protéine est principalement localisée au niveau du noyau des cellules tumorales, cette localisation étant régulée par acétylation et par phosphorylation de son signal de localisation nucléaire (Youn and Shin, 2006). A la suite d'un stress et lorsque les cellules tumorales entrent en apoptose tardive, HMGB1 est alors externalisée dans le cytoplasme puis libérée par exocytose (Apetoh et al., 2007a). Elle est ensuite reconnue par les DCs via son interaction avec les récepteurs TLR2 ou TLR4. HMGB1 va alors permettre l'activation de la réponse immunitaire anticancéreuse, plus précisément l'activation des cellules CD4⁺ Th1, mais également

l'activation des lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺, afin d'éradiquer les cellules cancéreuses (Ladoire et al., 2014).

Une étude a pu montrer *in vitro* mais également *in vivo* sur des cellules tumorales engagées dans le processus de mort que la déplétion de la protéine HMGB1 avec des siRNA, ou sa neutralisation à l'aide d'anticorps spécifiques, inhibe la présentation aux DCs par le récepteur TLR4 de ces cellules (Apetoh et al., 2007b). La libération d'HMGB1 semble donc nécessaire pour l'immunogénicité de la mort cellulaire. Ces mêmes auteurs ont pu montrer *in vivo* que des souris TLR4^{-/-} ne peuvent pas être vaccinées par des cellules tumorales préalablement traitées par un agent immunogène (Apetoh et al., 2007b). L'activation de la réponse immunitaire par HMGB1 semble donc dépendante de son interaction avec le récepteur TLR4.

L'importance d'HMGB1 dans le mécanisme de l'ICD a également été mis en évidence en clinique puisque la perte d'HMGB1 des cellules malignes affecte négativement le pronostic chez des patients atteints de cancer du sein traités avec des chimiothérapies adjuvantes à base d'anthracyclines (Yamazaki et al., 2014). Cependant, le mécanisme de libération d'HMGB1 pour le traitement des cancers reste à élucider (Galluzzi et al., 2016).

- ATP

Le mécanisme de sécrétion de l'ATP associé à l'ICD est complexe. En effet, il implique des molécules qui sont essentielles pour des procédés tels que l'autophagie, la voie lysosomale d'exocytose (LAMP-1), l'apoptose via la cascade des caspases induisant des protrusions de la membrane plasmique ainsi que la perméabilisation de la membrane plasmique (PANX1). Un défaut moléculaire au sein de l'un de ces procédés est suffisant pour abolir la sécrétion d'ATP à partir de cellules préalablement traitées avec des agents immunogènes, laissant supposer que des modifications au sein de ces différents mécanismes peuvent contribuer au développement de résistance à la thérapie anticancéreuse (*Figure 10*) (Martins et al., 2014).

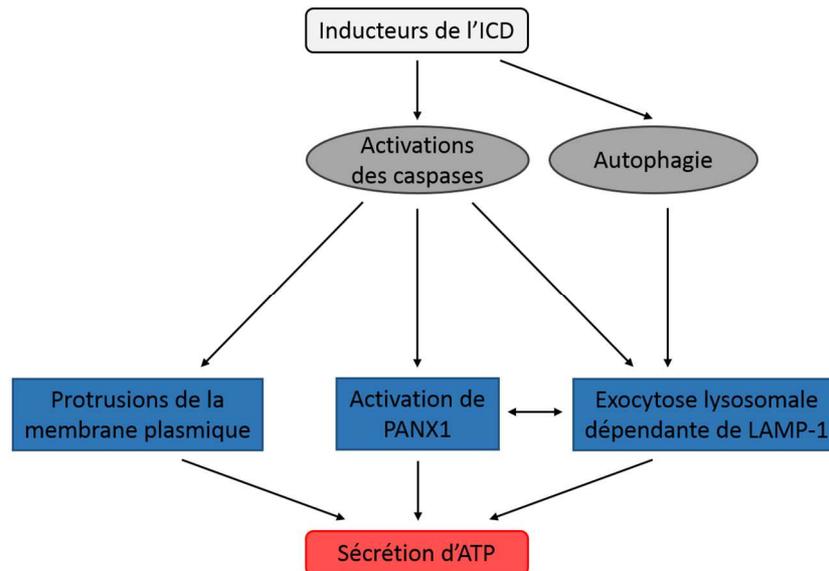


Figure 10. Mécanismes de sécrétion d'ATP impliqués dans la mort cellulaire immunogène. L'autophagie via la voie lysosomale d'exocytose (LAMP-1) et l'apoptose via l'activation des caspases induisant des protrusions ainsi que la perméabilisation de la membrane plasmique (PANX1) sont impliqués dans le mécanisme de sécrétion d'ATP. *D'après Martins et al., 2014*

L'ATP interagit alors avec ses récepteurs purinergiques P2Y2 (P2RY2) et P2X7 (P2RX7) présents à la surface membranaire des cellules présentatrices d'antigène et des lymphocytes T. Ainsi, l'immunogénicité de la mort cellulaire est abrogée non seulement lorsque l'ATP ne parvient pas à être accumulée dans le microenvironnement des cellules engagées dans le processus de mort mais également lorsque ses récepteurs P2RY2 et P2RX7 sont absents dans le compartiment myéloïde de l'hôte (Ghiringhelli et al., 2009 ; Ma et al., 2013).

Des travaux réalisés sur des cellules dendritiques de souris ont montré que la signalisation via P2X7 favorise l'activation de l'inflammasome NLRP3, qui déclenche à son tour l'activation de la caspase-1 ainsi que la maturation et la libération d'IL-1 β . Cette libération d'IL-1 β est nécessaire pour la réponse lymphoïde initiale à l'ICD conduite par l'IL-17, favorisant la prolifération des lymphocytes T $\gamma\delta$ (Ghiringhelli et al., 2009 ; Ma et al., 2011). L'interleukine 1 β va donc polariser les cellules CD8⁺ vers la production d'INF- γ (Lignée Th1). En conséquence, les souris NLRP3 ^{-/-}, les souris IL-17 ^{-/-} ainsi que les souris ayant reçu un anticorps neutralisant l'IL- β sont incapables de mettre en place une réponse immunitaire adaptée contre les cellules cancéreuses préalablement traitées par un agent immunogène (Galluzzi et al., 2016).

3. Mise en évidence de la capacité à induire la mort cellulaire immunogène

La mise en évidence de la capacité de chimiothérapies ou autres agents à induire l'ICD va nécessiter de déterminer si ces agents induisent l'externalisation de la CRT, la libération des facteurs immunogènes solubles HMGB1 et ATP mais surtout, il va falloir vérifier le caractère immunogène de ce traitement par un test de vaccination (Kepp et al., 2014). Dans ce type d'expérience, des cellules cancéreuses syngéniques préalablement traitées avec une chimiothérapie et/ou radiothérapie sont injectées en sous-cutanée dans le flanc de souris immunocompétentes. Une semaine plus tard, le même type de cellules viables est injecté en sous-cutanée dans le flanc controlatéral de ces souris. L'absence de développement de tumeur par la souris démontre un mécanisme de vaccination et prouve le caractère immunogène de la mort cellulaire induite par ces agents (Kroemer et al., 2013 ; Obeid et al., 2007).

Seuls quelques agents cliniquement approuvés comme la doxorubicine (anthracycline), la cyclophosphamide (agent alkylant) ou encore l'oxaliplatine présentent toutes les caractéristiques de la capacité à induire l'ICD (Casares et al., 2005 ; Vacchelli et al., 2014). En effet, une étude a pu montrer que la doxorubicine vaccine 80% des souris (Obeid et al., 2007). En revanche, la mitomycine C et l'étoposide sont elles, des chimiothérapies non immunogènes (Apetoh et al., 2008).

Ces différents tests caractéristiques de l'ICD ont permis d'établir une liste de chimiothérapies plus ou moins immunogènes. Certaines chimiothérapies peuvent induire une externalisation de la CRT mais pas de libération des facteurs immunogènes solubles, ou encore pas d'induction d'ICD (*Tableau 4*) (Bezu et al., 2015). Mais, pour qu'une chimiothérapie soit qualifiée d'immunogène, elle doit posséder toutes ces caractéristiques.

Tableau 4. Immunogénicité de la mort cellulaire induite par des chimiothérapies. D'après Bezu et al., 2015

Chimiothérapies	Externalisation de la CRT	Sécrétion d'ATP	Libération d'HMGB1	Induction de l'ICD*
5-Fluorouracile	Controversé	Non	Oui	n.d.
Cisplatine	Non	Oui	Oui	Non
Cyclophosphamide	Oui	Oui	Oui	Oui
Doxorubicine	Oui	Oui	Oui	Oui
Etoposide	Non	Oui	Oui	Non
Gemcitabine	Non	Partiellement	Oui	Non
Irinotecan	n.d.	n.d.	Oui	n.d.
Mitomycine C	Controversé	Non	Oui	Non
Mitoxantrone	Oui	Oui	Oui	Oui
Oxaliplatine	Oui	Oui	n.d.	Oui

CRT : Calréticuline ; **HMGB1** : High-mobility group box 1 ; **ICD** : Immunogenic cell death ; **n.d.** : non déterminé

* Déterminée par des expériences de vaccinations

En conclusion, l'ICD est principalement caractérisée par des changements de composition en protéines de la surface cellulaire, plus précisément de la CRT mais également par la libération des facteurs immunogènes solubles tels que l'HMGB1 et l'ATP.

En vue de ces résultats, il serait intéressant d'étudier la modulation de l'immunogénicité de chimiothérapies anticancéreuses non immunogènes en les associant avec d'autres molécules induisant l'ICD dans le but d'augmenter l'efficacité anti-tumorale.

4. Importance de la mort cellulaire immunogène

L'importance de l'ICD dans le traitement des cancers a été mise en évidence au sein d'études précliniques et cliniques. Une étude préclinique a montré que l'inoculation intra-tumorale de la doxorubicine peut déclencher la régression des tumeurs établies chez des souris immunocompétentes, mais non chez des souris immunodéficientes, mettant en évidence le caractère immunogène de cette chimiothérapie (Kepp et al., 2014).

En clinique, il a pu être montré chez des patients présentant des mutations dans le gène TLR4 ou P2X7 que l'efficacité des thérapies à bases d'anthracyclines et de radiothérapie était dépendante de l'induction de l'ICD. En effet, la perte de fonction du gène codant le récepteur TLR4 (récepteur à la protéine HMGB1), chez des patientes atteintes d'un cancer du sein traité par des anthracyclines, est associé à un pourcentage significativement plus élevé de métastases (Apetoh et al., 2007b). De plus, la mutation de TLR4 apporte une

diminution significative du temps sans progression de la maladie mais également de la survie globale des patients atteints de cancer colorectal métastatique traités avec une chimiothérapie à base d'oxaliplatine. Ces effets observés chez ces patients sont spécifiques à la chimiothérapie car en absence de traitement, la survie des patients est similaire, qu'ils soient porteurs ou non d'une mutation sur le gène codant le récepteur TLR4 (Tesniere et al., 2010). De la même façon, la perte de fonction du récepteur P2X7 a un impact négatif sur le pronostic en terme de survie sans métastases chez des patients atteints d'un cancer du sein traités par des anthracyclines (Ghiringhelli et al., 2009).

Malgré le développement de thérapies anticancéreuses, les échecs restent encore trop nombreux chez les patients porteurs de cancers coliques aux stades avancés, rendant la recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques nécessaire. Une des stratégies pour améliorer l'efficacité de ces traitements pourrait être de combiner ces agents chimiothérapeutiques à des molécules potentialisant leur effet anti-tumoral. L'association d'un « donneur de monoxyde d'azote » à des chimiothérapies conventionnelles pourrait être une stratégie prometteuse afin d'améliorer ces thérapies.

Partie C : Le monoxyde d'azote (NO)

1. Rôles physiologique et physiopathologique du NO

1.1 Généralités

En 1980, *Furchgott & Zawadzki* mettent en évidence pour la première fois la présence d'EDRF (*Endothelium Derived Relaxing Factor*), un facteur sécrété par les cellules endothéliales, indispensable à la relaxation du muscle lisse artériel stimulé par l'acétylcholine (Furchgott and Zawadzki, 1980). Quelques années plus tard, *Ignarro et ses collègues* montrent alors que l'EDRF n'est autre que le monoxyde d'azote (Ignarro et al., 1987). Il s'en suit en 1998, un prix Nobel de Médecine et de Physiologie pour leur travaux en physiologie cardiovasculaire et l'identification d'un régulateur clé dans ces processus biologique : le monoxyde d'azote (SoRelle, 1998).

De nombreux travaux portant sur le NO ont alors permis de mettre en évidence son implication dans des processus physiologiques très variés, allant de la vasorelaxation à la neurotransmission, en passant par les réponses immunitaires innées, l'inflammation, le choc septique, l'hypertension ou bien encore le rejet de greffes (SoRelle, 1998). Au sein de l'organisme, le NO est un radical libre présent sous forme gazeuse dans la majorité des tissus, son caractère lipophile lui permettant une diffusion passive au travers des membranes cellulaires.

1.2 Sources du monoxyde d'azote

1.2.1 Origine du NO dans l'organisme

La production de NO dans les cellules résulte de l'oxydation de la L-Arginine en L-Citrulline par des enzymes appartenant à la famille des NO-Synthases (NOS), libérant alors du NO. Cette réaction chimique nécessite la présence de co-facteurs tels que le NADPH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate), la FAD (Flavine Adénine Dinucléotide), la FMN (Flavine Mononucléotide), ainsi que la présence d'O₂ (Oxygène) et du BH₄ (Tétrahydrobioptérine) (*Figure 11*) (Mocellin et al., 2007 ; Moncada and Higgs, 1993).

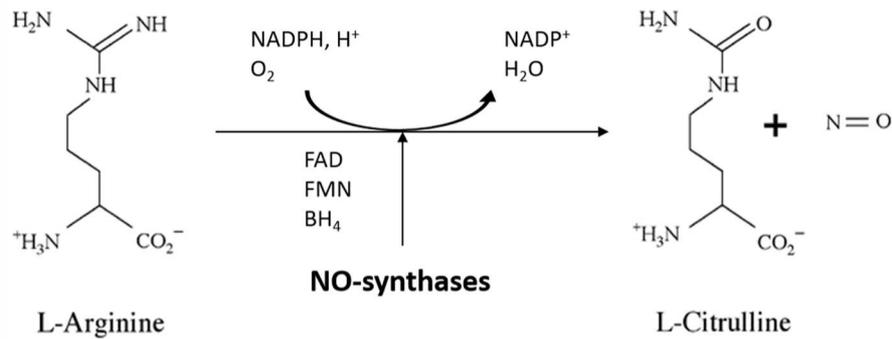


Figure 11. Principales sources de NO dans les cellules : les NOS. Dans la cellule, le monoxyde d'azote résulte de l'oxydation de la L-Arginine en L-Citrulline plus NO par une famille d'enzyme : les NOS

A ce jour, trois isoenzymes de NOS sont connues, les NOS neuronale (nNOS ou NOS-1), endothéliale (eNOS ou NOS-3) et la NOS inducible (iNOS ou NOS-2). Ces trois isoformes peuvent se différencier selon leur dépendance au calcium (Ca^{2+}) et leur expression constitutive ou non. En effet, la nNOS et la eNOS sont deux enzymes dont l'expression est constitutive et l'activité dépendante du taux de Ca^{2+} intracellulaire, respectivement dans les cellules neuronales, les myocytes et dans les cellules endothéliales. Ces deux enzymes sont caractérisées par la production de faibles concentrations de NO sur un temps court de l'ordre de la minute.

En revanche, la iNOS est une enzyme inducible dont l'expression est sous le contrôle de divers facteurs de transcription dont NF- κ B et STAT-1. C'est une enzyme dont l'activité est indépendante du taux de Ca^{2+} intracellulaire et qui va générer de fortes concentrations de NO sur des temps plus long de l'ordre du jour. Cette enzyme peut être exprimée dans divers types cellulaires tels que les cellules endothéliales, les macrophages, les cellules dendritiques ou encore les hépatocytes (Kolyada et al., 1996 ; Vannini et al., 2015). L'expression de la iNOS peut être induite dans ces différentes cellules en réponse à des cytokines inflammatoires telles que l'IL-1 β , l'INF γ , le TNF- α ou au contraire, elle peut être inhibée via des facteurs anti-inflammatoires tels que le TGF- β et le facteur de transcription p53. Plus généralement, cette enzyme est activée dans un contexte pathologique infectieux et peut être impliquée dans la carcinogenèse (Bogdan, 2001). A ce jour, de nombreux essais expérimentaux et cliniques mettent en évidence l'implication des iNOS et de la production de NO, dans la pathologie cancéreuse (Chung et al., 2003 ; Vannini et al., 2015).

1.2.2 Apport exogène de NO par des « donneurs de NO »

A ce jour, il existe plusieurs catégories de pro-drogues délivrant du NO qui peuvent se différencier selon leur mode d'action :

- Les donneurs de NO spontanés
- Les donneurs de NO nécessitant une activation enzymatique ou non (oxydation ou réduction)
- Des molécules délivrant indirectement du NO en transférant une entité NO sur leur cible (par l'intermédiaire de l'ion nitrosonium NO^+)

En clinique, il existe également plusieurs catégories de médicaments dont le principe actif repose sur la libération de NO. En effet ces médicaments regroupent les dérivés organiques nitrés, les sydnonimines, le nitroprussiate de sodium et le nicorandril (Hickok and Thomas, 2010; Thatcher et al., 2004). Ces molécules présentent des propriétés pharmacocinétiques différentes et sont principalement indiquées jusqu'à aujourd'hui pour le traitement des troubles cardiovasculaires tels que l'angine de poitrine, l'insuffisance cardiaque ou encore le traitement des crises hypertensives. Depuis quelques années, ces donneurs de NO font également l'objet de nombreuses études en cancérologie et sont porteurs de certaines promesses thérapeutiques (Hogg, 2000 ; Keefer, 2003). Parmi eux, nous nous intéressons plus particulièrement aux propriétés antitumorales du Glyceryl Trinitrate (GTN) ou nitroglycérine, retrouvé sous la forme de patchs de Trinitrine en cardiologie.

Le GTN est un donneur intracellulaire de NO. Il appartient à la famille des nitrates organiques qui ne délivrent pas de NO spontanément dans la cellule mais nécessitent d'être bioactivés, permettant ainsi la libération de formes stables du NO, les nitrites (NO_2^-). Cette bioactivation du GTN, catalysée par l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH) mitochondriale, conduit préférentiellement à la formation de 1, 2-glyceryl dinitrate (GDN) plus NO_2^- conduisant à la formation de NO ou de nitrosothiols (S)-NO. De plus le métabolisme dégradatif du GTN conduit à la formation majoritaire de 1, 3-GDN plus NO_2^- (*Figure 12*) (Klemenska and Beresewicz, 2009). Deux estérases, appartenant à la famille des ALDHs sont impliquées dans les mécanismes moléculaires permettant la libération de NO_2^- par le GTN dans les cellules : l'ALDH1 et l'ALDH2 (Chen et al., 2002). Cependant, l'isoforme

mitochondriale ALDH2 est la principale responsable de l'activation biologique du GTN qui conduit à la libération de 1, 2-GDN et de nitrites ou directement de NO (Chen et al., 2005).

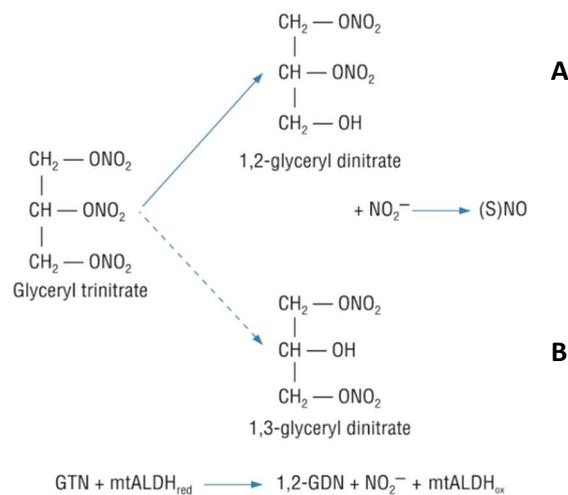


Figure 12. Métabolisme du Glyceryl Trinitrate (GTN). La bioactivation du GTN, catalysée par les ALDHs, conduit à la formation de 1, 2-glyceryl dinitrate (GDN) plus NO_2^- aboutissant à la formation de NO ou de nitrosothiols (S-NO) **(A)**. Le métabolisme dégradatif du GTN conduit à la formation de 1, 3-GDN plus NO_2^- **(B)**. L'équation globale illustre le mécanisme d'oxydoréduction impliqué dans la bioactivation du GTN. D'après Klemenska and Beresewicz, 2009

2. Mécanismes d'action du NO

D'un point de vue moléculaire, le NO possède la capacité d'agir à différents niveaux de la physiologie cellulaire. En effet, le NO possède des propriétés biochimiques permettant d'induire des modifications directes ou indirectes de ses cibles moléculaires.

2.1 Mécanismes directs

Par une action directe sur ses cibles, le NO à faible concentration peut moduler l'expression de gènes incluant les oncogènes mais également des gènes suppresseurs de tumeurs et ce par désamination des bases puriques et pyrimidines (Kawanishi et al., 2006). En effet, le NO peut induire une modification structurale de la guanylate cyclase soluble (GCs), entraînant une augmentation de la concentration d'Adénosine Monophosphate cyclique (AMPC) dans les cellules cibles. L'AMPC va alors réguler l'activation de nombreuses enzymes comme par exemple la protéine kinase A.

2.2 Mécanismes indirects

Le NO à plus forte concentration va pouvoir former des espèces réactives nitrées (RNS, *Reactive nitrogen species*) en présence d'espèces radicalaires de l'oxygène (ROS), ces RNS vont alors induire des modifications post-traductionnelles telles que la tyrosine nitration et la S-nitrosylation des cystéines.

La formation d'espèces réactives nitrées repose sur le microenvironnement redox. Au sein de l'espace inter-membranaire mitochondrial, le NO réagit avec l'oxygène moléculaire (O_2) ou avec l'anion superoxyde (O_2^-). A concentration équimolaire de NO et d' O_2^- , il est formé du peroxy-nitrites ($ONOO^-$), favorisant ainsi l'induction d'un stress oxydatif et conférant au NO la capacité de modifier les protéines par tyrosine nitration. En revanche, lorsque le NO et l' O_2^- interagissent ensemble ou encore lorsque celui-ci à une concentration plus faible que l' O_2^- , c'est-à-dire un environnement oxydant, il se forme du trioxyde de diazote (N_2O_3) générant un stress nitrosatif et pouvant affecter les protéines par S-nitrosylation des cystéines (*Figure 13*) (Leon et al., 2008).

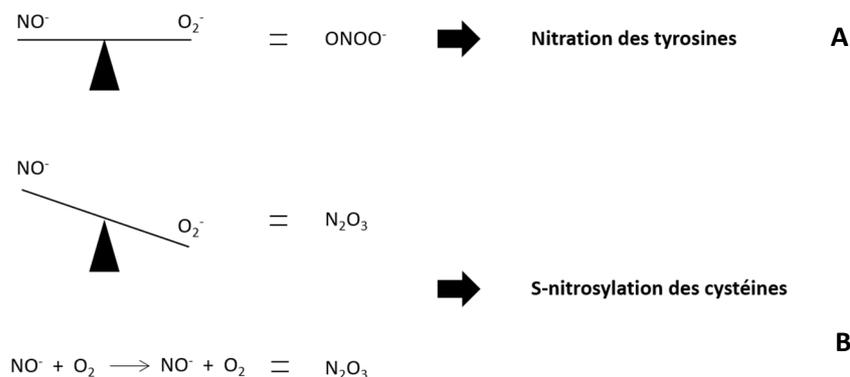


Figure 13. Influence des espèces réactives de l'oxygène sur les modifications post-traductionnelles induites par le NO. Des concentrations égales de NO et d' O_2^- conduisent à la formation de peroxy-nitrites ($ONOO^-$) et à la formation de tyrosine nitrées (**A**). Un excès de NO par rapport au O_2^- ou lorsqu'ils interagissent ensemble produit du trioxyde de diazote (N_2O_3) et conduit à la S-nitrosylation des protéines (**B**). D'après Leon et al., 2008

- Nitration des tyrosines

La nitration des protéines correspond à l'incorporation irréversible d'un groupement NO_2 sur un résidu tyrosine formant ainsi la 3-nitrotyrosine. Cette modification post-traductionnelle est dépendante de la présence de peroxy-nitrites ($ONOO^-$) ou d'autres RNS (*Figure 14*). Dans les cellules, l'incorporation du groupement NO_2 sur un résidu tyrosine peut se produire par

différents mécanismes, impliquant la présence d'une espèce radicalaire de l'azote et d'un radical tyroxy. La nitration de la tyrosine cible peut alors résulter de l'interaction directe de ces deux espèces radicalaires ou bien être catalysée par des métaux de transition ou des peroxydases (Franco and Estévez, 2014). De plus, il semblerait que toutes les tyrosines ne soient pas susceptibles d'être modifiées par le NO.

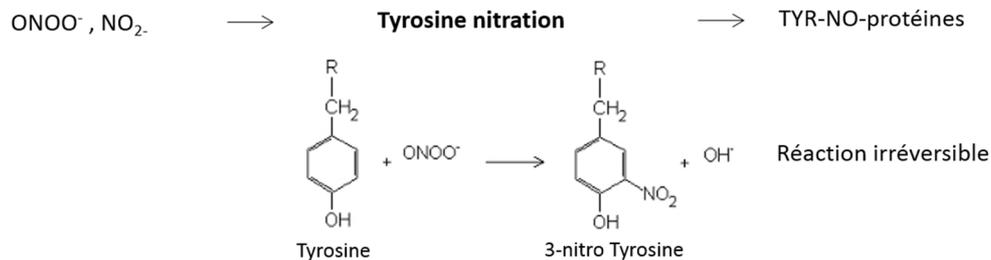


Figure 14. Mécanisme de la tyrosine nitration induit par le NO. L'incorporation irréversible d'un groupement NO_2 sur un résidu tyrosine induit la formation de 3-nitrotyrosine, dépendant de la présence de peroxynitrites (ONOO^-)

La nitration des tyrosines peut être associée à un effet antitumoral, puisqu'en effet, elle peut induire l'apoptose dans des conditions physiopathologiques variées. Comme évoqué précédemment, il a été démontré *in vitro* au sein de notre équipe, que le NO généré par l'utilisation du GTN à forte concentration induit l'apoptose des cellules coliques humaines via la tyrosine nitration de la β -caténine (Prévozat et al., 2006). A l'inverse, la nitration des tyrosines peut être corrélée à l'inhibition de l'apoptose et elle peut également être impliquée dans les mécanismes d'actions prolifératifs du NO. A titre d'exemple, la nitration du récepteur Fas induite notamment par un apport exogène de NO dans des cellules cancéreuses hépatiques humaines, inhibe la phosphorylation du récepteur et, par conséquent, la formation du complexe de mort. Ces observations offrent des cibles pour le développement de nouvelles stratégies anticancéreuses à base de NO.

- S-nitrosylation des cystéines

La S-nitrosylation correspond à la fixation non enzymatique du NO sur le groupement thiols (-SH) des cystéines conduisant à la formation de S-nitrosothiols (RSNO) (Figure 15). A la différence de la nitration des protéines, la spécificité des cystéines pouvant être les cibles du NO est relativement bien caractérisée. La S-nitrosylation affecte les résidus cystéines qui jouent eux-mêmes un rôle majeur dans la structure, la stabilité, l'activité, la fonction et la localisation subcellulaire des protéines. Cette modification post-traductionnelle est

aujourd'hui considérée comme un mécanisme majeur de régulation des protéines, affectant de nombreuses voies de signalisation cellulaire (Gould et al., 2013).

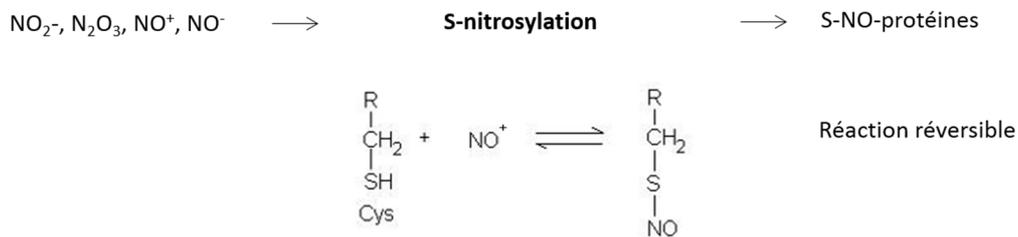


Figure 15. Mécanisme de S-nitrosylation induit par le NO. La fixation du NO sur le groupement thiols (-SH) des cystéines induit la formation de S-nitrosothiols (RSNO)

Comme la nitration des tyrosines, la S-nitrosylation peut être impliquée dans la sensibilisation à la mort de cellules tumorales. Il a été démontré au sein de l'équipe que le NO sensibilise les cellules cancéreuses coliques et mammaires à la mort induite par Fas ligand en induisant la S-nitrosylation de son récepteur Fas (Leon-Bollotte et al., 2011). A l'inverse, la S-nitrosylation peut être également impliquée dans la résistance à la mort de cellules tumorales par une perte de fonction de protéines et/ou d'enzymes pro-apoptotiques. Par exemple, les caspases, des acteurs moléculaires clés de la mort cellulaire par apoptose, possèdent au sein de leur site catalytique une cystéine indispensable à leur activité enzymatique. La S-nitrosylation des caspases participe à la résistance à l'apoptose des cellules cancéreuses et constitue l'illustration la mieux caractérisée de l'effet inhibiteur d'une telle modification induite par le NO (Kim and Tannenbaum, 2004). A ce jour, plus d'une centaine de protéines ont été décrites comme cibles de la S-nitrosylation, ces protéines pouvant être associées à la promotion tumorale comme le récepteur des androgènes, NF-κB, STAT3, PI3K/Akt, HSP90, pour lesquels des approches thérapeutiques ont été développées. Ces modifications entraînent de nombreuses modifications sur la fonction des protéines telles que la modulation de leur activité, de leur stabilité, des interactions protéine-protéine et de leur localisation subcellulaire (Bettaieb et al., Springer 2015 ; Plenchette et al., 2015). Ces mécanismes sont associés à la progression ou à l'inhibition de la progression tumorale et ce, en fonction de ses cibles qui sont nombreuses dans la pathologie cancéreuse.

3. NO et cancer

La concentration en NO semble influencer ses propriétés pro- et antitumorales (Mocellin et al., 2007). En effet, à faible concentration c'est-à-dire à des doses pharmacologiques de l'ordre du nanomolaire, le NO aurait plutôt un effet pro-tumoral en agissant sur la prolifération et l'invasion des cellules cancéreuses, l'angiogénèse ainsi que sur la formation de métastases. A l'inverse, à forte concentration, le NO serait cytotoxique et aurait donc un effet antitumoral. Dans ces conditions, le NO est capable d'induire des dommages à l'ADN, des stress radicalaires ainsi que l'apoptose conduisant à la mort des cellules cancéreuses (Figure 16) (Bal-Price et al., 2006; Siegert et al., 2002).

Au sein de l'équipe, il a été démontré *in vitro* que le NO généré par l'utilisation de GTN à forte concentration (500 μ M) induit l'apoptose des cellules coliques humaines (Millet et al., 2002). Il a également été montré *in vitro* qu'à cette concentration, le NO augmente l'expression membranaire du récepteur Fas et sensibilise les cellules tumorales à la mort induite par FasL (Leon-Bolotte et al., 2011). Cependant *in vitro*, lorsqu'il est utilisé seul à des doses pharmacologiques, le GTN perd toute toxicité. Par contre, lorsqu'il est associé à d'autres composés tels que des inhibiteurs de protéines kinases comme par exemple le H89 (isoquinolinesulfonamide), une cytotoxicité est observée (Cortier et al., 2015). De plus, la cytotoxicité de cette combinaison GTN / H89, peut être accentuée en associant un inhibiteur de kinase Akt, la triciribine (Boina-Ali et al., 2013).

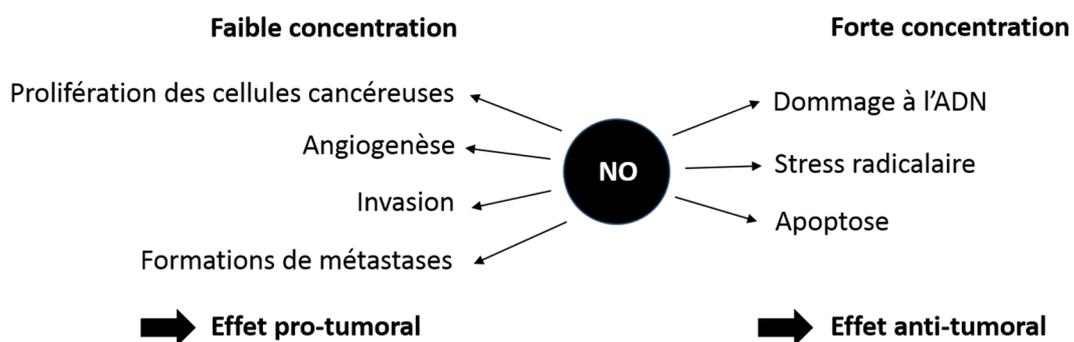


Figure 16. Influence de la concentration en NO sur les propriétés des cellules cancéreuses. Les propriétés du NO telles que la prolifération des cellules cancéreuses ou à l'inverse l'apoptose, l'invasion ou encore des dommages à l'ADN sont dépendantes de la concentration en NO

Ces propriétés antitumorales des « donneurs de NO », et du NO lui-même, font l'objet de développement de nouvelles stratégies thérapeutiques anticancéreuses afin de potentialiser et/ou de sensibiliser les patients aux molécules de chimiothérapies conventionnelles.

- Etudes précliniques

Plusieurs études *in vitro* mettent en évidence l'effet sensibilisateur de donneurs de NO à la mort par apoptose des cellules cancéreuses traitées ou non par chimiothérapies ou radiothérapie. A de fortes concentrations, le NO sensibilise les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 à la doxorubicine ou bien encore les cellules cancéreuses coliques métastatiques SW620 et les cellules cancéreuses de la prostate au cisplatine (Evig et al., 2004; Huerta et al., 2009). De plus, des travaux de l'équipe démontrent que le GTN est capable d'induire l'apoptose des cellules cancéreuses coliques humaines SW480, SW420 et HCT116 selon un effet dose-dépendant (Leon-Bollotte et al., 2011; Millet et al., 2002). Enfin, le NO sensibilise également les cellules cancéreuses coliques à la mort induite par radiation (Chung et al., 2003).

In vivo, une régression tumorale a été observée dans différents modèles murins de xénogreffes de tumeurs humaines traitées par un « donneur de NO » associée à une chimiothérapie et/ou radiothérapie. En effet, l'association d'un « donneur de NO » au cisplatine induit une régression tumorale efficace au sein de plusieurs types de cancers humains tels que le cancer du côlon (Huerta et al., 2009). Le GTN sensibilise également des tumeurs de la prostate humaine *in vivo* à la doxorubicine (Frederiksen et al., 2007).

L'ensemble de ces arguments précliniques démontrent le potentiel antitumoral de cette molécule et a ainsi motivé l'exploration de ses propriétés antitumorales chez l'homme.

- Etudes cliniques

En clinique, l'utilisation d'un « donneur de NO » comme agent anticancéreux a été confortée par plusieurs études cliniques de phase II. Un premier essai clinique de phase II montre que l'administration de GTN sous forme de patchs dermiques améliore significativement l'efficacité d'une chimiothérapie associant la vinorelbine et le cisplatine chez des patients atteints de cancers du poumon non à petites cellules à des stades avancés c'est-à-dire des stades IIIB/IV. De plus, cet effet est associé à un ralentissement de la progression de la

pathologie et à une nette augmentation du temps de survie comparativement aux patients ayant reçu la combinaison vinorelbine/cisplatine seule (Yasuda et al., 2006). Un second essai clinique de phase II démontre que l'administration de faibles concentrations de GTN chez des patients porteurs de cancers de la prostate présentant une rechute après prostatectomie et/ou radiothérapie limite le temps de doublement de PSA (*Prostate Specific Antigen*) et retarde la progression de la pathologie, comparativement aux patients n'ayant pas reçu de traitement (Siemens et al., 2009).

Plus récemment, un essai clinique de phase II a été conduit en associant le GTN avec de la radiothérapie mais également avec une chimiothérapie à base de vinorelbine et cisplatine chez des patients atteints de cancers de poumons non à petites cellules (Arrieta et al., 2014). Un essai clinique de phase I a également été conduit en associant le GTN à de la radiothérapie et une chimiothérapie à base de 5-Fu en tant que chimiothérapie néo-adjuvante chez des patients atteints de cancer du rectum (Illum et al., 2015). Lors de ces deux essais cliniques, le GTN montre un effet bénéfique.

Toutes ces données sont en faveur de la recherche d'association du GTN à des traitements anti-cancéreux dans le but de potentialiser leurs effets.

Partie D : Objectifs

Les protocoles thérapeutiques anticancéreux actuels reposent sur l'utilisation de traitements locorégionaux ainsi que l'utilisation de traitements systémiques pouvant être proposés en association en fonction du stade de la pathologie au moment du diagnostic. L'efficacité de ces traitements est cependant limitée par l'acquisition de résistances par les cellules tumorales vis-à-vis de ces traitements ainsi que par leurs nombreux effets secondaires. L'objectif aujourd'hui est donc de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à associer les chimiothérapies de référence à d'autres molécules pouvant potentialiser leurs effets ou sensibiliser à nouveau les patients ayant acquis des résistances durant le temps de leur traitement.

Dans le cas du cancer colorectal, les chimiothérapies de référence sont à base de 5-Fluorouracile combiné ou non à l'oxaliplatine et à l'acide folinique (FOLFOX) ou à l'irinotecan (FOLFIRI). Ces différents protocoles thérapeutiques bien que très efficaces, ont prouvé leurs limites par l'apparition d'un grand nombre d'échecs dû à l'apparition de ces résistances. Dans cette étude, nous nous proposons d'associer le FOX (5-Fluorouracil et Oxaliplatine) à un donneur de NO, le GTN, afin de potentialiser l'effet anti-tumoral de ces chimiothérapies. En effet, le GTN est en passe de devenir un facteur anti-tumoral prometteur comme l'attestent de nombreuses études précliniques et cliniques.

Au cours de cette étude, je me suis intéressée à l'effet potentialisateur du GTN sur l'action anti-tumorale de la combinaison chimiothérapeutique FOX, combinée ou non à de la radiothérapie en réalisant des études *in vitro* (cellules CT26) et *in vivo* dans le modèle de tumeur sous-cutanée d'origine colique CT26 chez la souris Balb/c. Après avoir mis en évidence l'implication du système immunitaire dans cet effet anti-tumoral, j'ai alors recherché le mécanisme d'action du GTN et plus particulièrement son rôle dans le mécanisme de la mort cellulaire immunogène. Le GTN s'étant révélé être un inducteur de l'externalisation de la calréticuline, mes travaux ont alors porté sur le rôle du NO dans ce mécanisme en focalisant sur les modifications post-traductionnelles pouvant être générées par le NO soit directement sur la calréticuline, soit indirectement via la régulation du mécanisme de stress du réticulum endoplasmique.

MATERIEL ET METHODES

1. Modèles murins et lignées cellulaires

1.1 Modèles murins

Au cours de ce travail, nous avons été amenés à travailler sur différents modèles murins (Charles River Laboratoires). L'ensemble de ces expérimentations s'est déroulé au centre de zootechnie de l'Université de Bourgogne (n° agrément : C2146404EA). Ces expérimentations ont été approuvées par le comité d'éthique de l'expérimentation animale du Grand Campus de Dijon (n° 105). De plus, les animaux sont traités selon la loi Européenne, en respectant la règle des 3R et selon les lignes directrices du Ministère de la Recherche et de la Technologie. La nourriture et l'eau des rongeurs sont fournis *ad libitum*.

Sur le plan génétique, la souris est très similaire à l'homme. En effet, 99% de ses gènes présentent un gène homologue chez l'humain. De plus, elle possède des atouts majeurs tels qu'une descendance nombreuse, un développement rapide ainsi qu'une taille réduite. Pour ce projet, nous avons travaillé sur des souris immunocompétentes Balb/c provenant d'une lignée consanguine albinos due à une mutation bloquant la production de mélanine mais également sur des souris immunodéficientes telles que des Nude et des NOD *scid* gamma. Les souris Nude présentent une aplasie congénitale du thymus générant une absence de lymphocytes T. Ces souris présentent des lymphocytes B normaux et une activité des cellules NK et des macrophages augmentés. Les souris NOD *scid* gamma sont quant à elles, dépourvues de récepteur γ à l'interleukine 2 et présentent une absence de lymphocytes B et T mais également une absence de cellules NK (*Figure 17*).

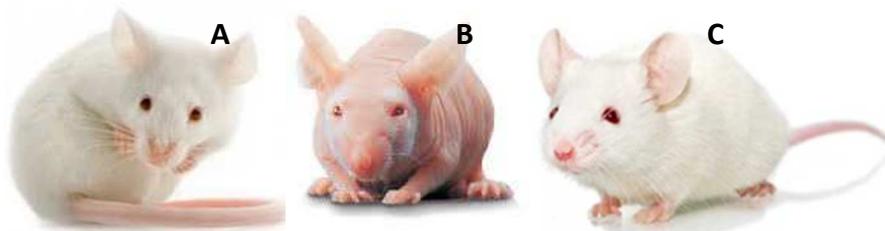


Figure 17. Modèles murins utilisés au cours de notre étude : des souris de type sauvage Balb/c (**A**) et des souris immunodéficientes Nude (**B**) et NOD *scid* gamma (**C**)

1.2 Lignées cellulaires

Notre étude a été réalisée sur une lignée de cellules cancéreuses coliques murines, les cellules CT26 (ATCC® CRL-2638™), établie à partir d'un carcinome colique.

Ces cellules cancéreuses coliques murines ont été cultivées dans un milieu Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI 1640, Dominique Dutscher), supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal (SVF, PAN Biotech), à 37°C sous atmosphère humide en présence de 5% de CO₂.

Lorsque les cellules en culture atteignent 80% de confluence, elles sont alors rincées avec une solution de Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Dominique Dutscher) qui ne contient ni calcium, ni magnésium puis, détachées de leur support à l'aide d'une solution de trypsine à 0,5 g.L⁻¹ et d'EDTA (*Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid*) à 0,2 g.L⁻¹ (Dominique Dutscher). Les cellules sont alors récupérées puis centrifugées pendant 5 minutes à 450g. Le culot cellulaire est repris dans du milieu complet, les cellules vivantes sont alors dénombrées à l'aide d'une cellule de Malassez, après coloration au bleu de Trypan (coloration d'exclusion). Les cellules sont ensuiteensemencées à la densité voulue selon le test réalisé par la suite.

1.3 Modèles de tumeurs coliques chez la souris

Afin d'étudier l'effet de la combinaison de chimiothérapies FOX avec un donneur de NO associée ou non à de la radiothérapie, des cellules cancéreuses murines syngéniques coliques (CT26) sont injectées à raison de 5.10⁵ cellules en sous-cutanée dans le flanc de souris Balb/c, Nude ou NOD *scid* gamma.

Pour l'étude de la combinaison FOX / GTN, le lendemain de l'injection des cellules cancéreuses, du Nitronal qui est la forme injectable du GTN est injecté en sous-cutanée à raison de 5mk.kg⁻¹, trois fois par semaine et ce, tout au long de l'expérimentation. Lorsque les tumeurs atteignent un volume tumoral d'environ 50 mm³ (Environ sept jours post-injection des cellules tumorales), l'injection de la chimiothérapie FOX est alors réalisée, c'est-à-dire de l'oxaliplatine à 6mg.kg⁻¹ et du 5-Fu à 5mg.kg⁻¹ en intra-péritonéale (i.p.), une fois par semaine, tout au long de l'expérimentation (*Figure 18*).

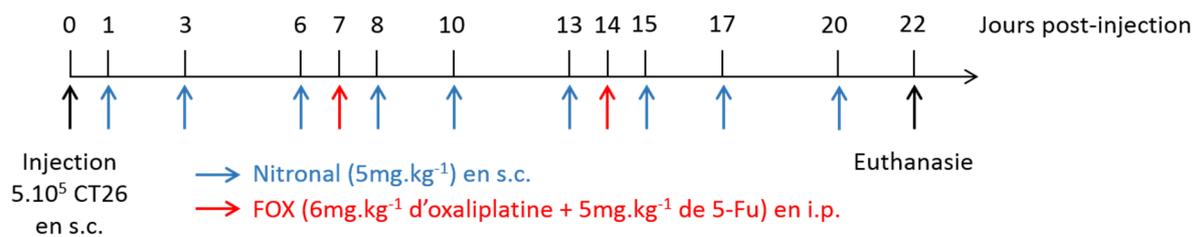


Figure 18. Protocole d'étude de la combinaison FOX / GTN dans les modèles murins CT26 / Balb/c, Nude et NOD *scid* gamma. Des cellules CT26 sont injectées en sous-cutanée dans le flanc de modèles murins. Ces souris sont par la suite traitées par du Nitronal trois fois par semaine dès J1 post-injection des cellules cancéreuses et par du FOX environ sept jours post-injection (Volume tumoral d'environ 50 mm³) puis une fois par semaine. Un suivi de croissance tumoral est réalisé trois fois par semaine. Les souris sont sacrifiées lorsque les tumeurs atteignent un volume tumoral de 2000 mm³

Pour l'étude de la combinaison FOX / GTN associée à de la radiothérapie, le même protocole que précédemment est réalisé. En revanche, le lendemain de la première injection de la combinaison chimiothérapeutique FOX, les tumeurs sont irradiées par deux faisceaux opposés de photons de 225 kV (*Figure 19*). Les tumeurs sont irradiées à 10 Gy durant 124 secondes ou alors de manière fractionnées c'est-à-dire trois fois 8 Gy durant 99 secondes à l'aide de la machine SARRP (*Small Animal Radiation Research Platform*), au Centre anticancéreux Georges François Leclerc à Dijon.

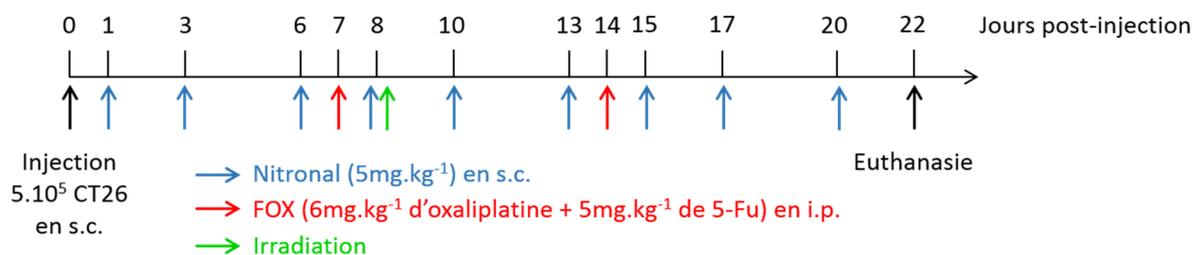


Figure 19. Protocole d'étude de la combinaison FOX / GTN / Radiothérapie dans le modèle murin CT26 / Balb/c. Des cellules CT26 sont injectées en sous-cutanée dans le flanc de souris Balb/c. Ces souris sont par la suite traitées par du Nitronal trois fois par semaine dès J1 post-injection des cellules cancéreuses et par du FOX environ sept jours post-injection (volume tumoral d'environ 50 mm³) puis une fois par semaine. Le lendemain de la première injection du FOX, les tumeurs sont irradiées de manière fractionnées ou non. Un suivi de croissance tumoral est réalisé trois fois par semaine. Les souris sont sacrifiées lorsque les tumeurs atteignent un volume tumoral de 2000 mm³

Tout au long de ces expériences, un suivi de croissance tumorale est réalisé tous les trois jours par mesure des tumeurs sous-cutanées à l'aide d'un pied à coulisse. Lorsque celles-ci atteignent un volume tumoral critique, les souris sont sacrifiées.

1.4 Formation de nodules pulmonaires dans un modèle murin

Afin d'étudier l'effet de la combinaison FOX / GTN sur un modèle mimant la formation de métastases, des cellules cancéreuses murines syngéniques d'origine colique (CT26) sont injectées à raison de $5 \cdot 10^5$ cellules en intraveineuse dans la queue de souris Balb/c. Ces cellules vont alors former des nodules pulmonaires d'origine colique. Dès le lendemain de l'injection de ces cellules, du Nitronal est injecté en sous-cutanée à $5 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ à raison de trois fois par semaine et ce, tout au long de l'expérimentation. Dix jours post-injection des cellules cancéreuses, le traitement par le FOX est réalisé, soit $6 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ d'oxaliplatine et $5 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ de 5-Fu en intra-péritonéale (i.p.). Les souris sont mises à mort cinq jours post-traitement au FOX, ce nombre de jours étant déterminé grâce à l'expérience acquise sur ce modèle mais également avant que les souris ne meurent par suffocation. Les poumons sont par la suite récupérés afin d'observer l'effet des différents traitements sur l'invasion tumorale des poumons (Figure 20).

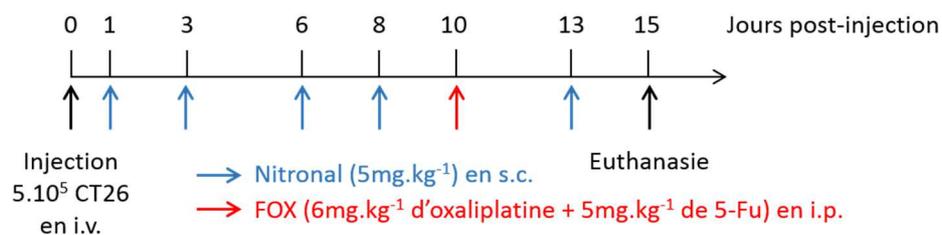


Figure 20. Protocole d'étude de la combinaison FOX / GTN dans le modèle murin CT26 / Balb/c de formation de métastases. Des cellules CT26 sont injectées en intraveineuse dans la queue de souris Balb/c. Ces souris sont par la suite traitées par du Nitronal trois fois par semaine dès J1 post-injection des cellules cancéreuses et par du FOX dix jours post-injection de ces cellules. Les souris sont sacrifiées cinq jours post-traitement au FOX

2. Traitement des cellules

Afin de réaliser différents tests *in vitro* après traitement (chimiothérapies, GTN, radiothérapie...), les cellules sont implantées dans du milieu complet RPMI contenant 10% de SVF. Le lendemain, le milieu complet est renouvelé et les différents traitements sont réalisés. Concernant le traitement par des chimiothérapies et/ou GTN à 1% dans de l'éthanol (Merck), ces traitements sont appliqués pendant 6H ou 24H à 37°C selon le test réalisé par la suite. Concernant les irradiations, ces cellules sont irradiées à 2 Gy durant 100 secondes ou 5 Gy durant 250 secondes, en plaque six puits. Cette irradiation se réalise avec des photons

d'une énergie de 225 kV. L'irradiation se réalise à l'aide de la machine SARRP au Centre anticancéreux Georges François Leclerc à Dijon.

3. Analyses par cytométrie en flux

Lors de l'analyse de la mort cellulaire ou de la calréticuline membranaire, le surnageant de culture des cellules préalablement traitées est transféré dans des tubes Facs. Les cellules sont alors récupérées par trypsination, avant d'être centrifugées 5 minutes à 450g.

3.1 Analyse de la mort cellulaire

Lorsque les cellules entrent en apoptose, une externalisation des phosphatidylsérines se produit par un phénomène de flip-flop entre les feuillettes de la membrane plasmique. Les cellules entrant en apoptose tardive ou en nécrose vont quant à elles perdre leur intégrité membranaire et vont donc devenir perméables.

Afin de suivre ce phénomène, nous avons réalisé un marquage à l'aide du kit Annexine V / 7-Aminoactinomycine D (7AAD). L'Annexine V qui est couplé à un fluorochrome FITC va se fixer sur les phosphatidylsérines alors que le 7AAD qui est un intercalant de l'ADN, va se fixer sur l'ADN.

Après avoir récupéré les cellules, ces cellules sont rincées avec une solution de PBS 1X puis centrifugées 5 minutes à 450g. Le culot cellulaire est alors repris avec un mélange contenant l'Annexine V-FITC ainsi que le 7AAD dans du tampon commercial riche en calcium (BD Biosciences), le tout incubé 15 minutes à température ambiante et à l'obscurité. Avant le passage au cytomètre (BDFacsCanto), du tampon commercial est ajouté afin de diluer les échantillons. En parallèle, des contrôles tels que les cellules seules non marquées, des cellules monomarquées avec seulement l'Annexine V-FITC ou le 7AAD sont réalisés dans le but de réaliser des réglages optimaux. Les résultats sont par la suite analysés à l'aide du logiciel FlowJo.

3.2 Immunomarquage de la calréticuline membranaire

Afin d'observer l'externalisation de la CRT en réponse à différents traitements, les cellules sont récupérées puis centrifugées 5 minutes à 450g. Elles sont ensuite incubées avec un anticorps (Ac) primaire anti-calréticuline de lapin (Abcam) pendant une heure sur la glace en solution de saturation (PBS + 1% de Sérum Albumine Bovine (SAB)). Après lavage puis

centrifugation, les cellules sont incubées une heure sur la glace à l'obscurité avec un Ac secondaire anti-lapin couplé au fluorochrome Alexa-488 (Fisher Scientific) en solution de saturation. Enfin, les cellules sont lavées, centrifugées puis resuspendues dans du PBS afin d'analyser les cellules marquées par cytométrie en flux (BDFacsCanto). En parallèle, un contrôle isotypique de l'anticorps primaire utilisé est réalisé. Les résultats sont par la suite analysés à l'aide du logiciel FlowJo.

4. Dosage de l'ATP

La sécrétion du facteur immunogène soluble ATP est un des facteurs clé du mécanisme de la mort cellulaire immunogène. Afin d'évaluer la sécrétion d'ATP, nous avons réalisé des tests de bioluminescence à l'aide du kit CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega) sur les surnageants de culture.

Ce type de dosage permet de mesurer la lumière émise par la réaction enzymatique de bioluminescence utilisant la luciférine et la luciférase de luciole, ainsi que de l'ATP. En présence d'un complexe luciférine / luciférase et d'un catalyseur, l'ATP libère de l'énergie sous forme de lumière (*Figure 21*).

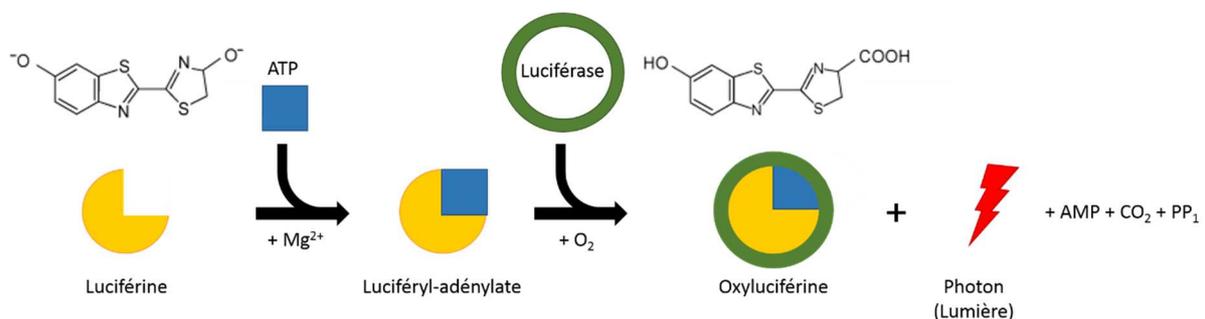


Figure 21. Réactions ayant lieu lors du dosage d'ATP. L'ATP se lie à la luciférine et va permettre d'émettre de la lumière lors de la formation du complexe luciférine / luciférase

L'ensemencement des cellules ainsi que le traitement se réalise dans un milieu complet supplémenté de 5% de BSA et de 1% d'HEPES. Dans une plaque noire 96 puits à fond plat, les surnageants de culture purs sont déposés en duplicat. En parallèle, une gamme étalon d'une solution d'ATP (Sigma) est réalisée avec des dilutions en cascades d'ordre 10 couvrant une gamme de 10 nM à 1 µM. Le révélateur contenant la luciférase est préalablement réchauffé à température ambiante pour ensuite être ajouté. Enfin, le tout est incubé 15 minutes à

température ambiante et à l'obscurité puis mesuré sur un luminomètre pendant 1 seconde (EnVision Multilabel Reader ; PerkinElmer®).

5. Dosage HMGB1

La sécrétion du facteur pro-inflammatoire HMGB1 est également un des facteurs clé du mécanisme de la mort cellulaire immunogène. Afin d'évaluer la sécrétion d'HMGB1, nous avons réalisé des tests ELISA à l'aide du kit HMGB1 (Chondrex) sur les surnageants de culture.

Dans une plaque ELISA, une solution d'Ac de capture anti-HMGB1 est tout d'abord incubée à 4°C sur la nuit. Il s'agit d'une étape dite de « coating » qui consiste en une adsorption passive de l'Ac de « capture » sur le plastique. Le lendemain, trois lavages sont réalisés à l'aide d'une solution de lavage diluée au 1/10 avant d'incuber en duplicat, les surnageants de culture préalablement centrifugés 3 minutes à 10 000 rpm, à 4°C et dilués au 1/2. En parallèle, une gamme étalon d'une solution standard d'HMGB1 est réalisée avec des dilutions en cascade d'ordre 2 couvrant une gamme de 0,8 ng.mL⁻¹ à 50 ng.mL⁻¹. Une solution d'Ac de révélation biotinylé est ensuite ajoutée, le tout est incubé une nuit à 4°C.

Le lendemain, après trois lavages, une solution de streptavidine peroxydase est ajoutée durant 30 minutes à température ambiante. Une dernière série de trois lavages est ensuite effectuée avant d'ajouter une solution de TMB (3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine), le substrat de l'enzyme. Enfin, une solution « Stop » contenant de l'acide sulfurique est ajoutée. A ce stade, le développement d'une coloration jaune est corrélé à la concentration d'HMGB1 présent dans les surnageants de culture. Le développement de cette coloration est alors mesuré par lecture de l'absorbance à 450 nm contre 630 nm par spectrophotométrie (Asys UVM 340 ; BioServ).

6. Détection en microscopie à fluorescence de la calréticuline membranaire

Afin de réaliser des marquages en immunofluorescence, les cellules sontensemencées sur des lamelles rondes (VWR international) déposées au fond des puits de plaques de culture. Afin de permettre une meilleure adhésion des cellules, les lamelles sont préalablement traitées avec une solution de 0,01% de Poly-L-Lysine (Sigma Aldrich), 10 minutes à température ambiante, stérilisées par de l'éthanol 70° puis rincées deux fois avec du PBS. Le

lendemain de l'ensemencement, les cellules sont traitées par différentes chimiothérapies associées ou non avec du GTN durant six heures.

Après six heures de traitement, les cellules sont tout d'abord fixées à l'aide de 0,25% de Paraformaldéhyde (PFA) durant 5 minutes à température ambiante. Les cellules sont par la suite lavées deux fois avec du PBS puis incubées avec une solution de PBS contenant 3% BSA 30 minutes à 4°C afin de réaliser une saturation des sites antigéniques non spécifiques. L'Ac primaire anti-calréticuline de lapin (Abcam) dilué au 1/200^{ème} en solution de saturation est ensuite incubé 30 minutes à 4°C. Les cellules sont par la suite lavées deux fois 5 minutes avec du PBS sous agitation. L'Ac secondaire anti-IgG de lapin couplé au fluorochrome Alexa-488 (Abcam) dilué au 1/500^{ème} en solution de saturation est ensuite incubé 30 minutes à 4°C et à l'obscurité. Une série de deux lavages avec du PBS à l'obscurité et sous agitation est effectuée avant de fixer les cellules avec du PFA 4%, 20 minutes à 4°C. Une dernière série de deux lavages au PBS à l'obscurité est effectuée. Enfin, les lamelles sont rincées à deux reprises avec de l'eau DNase/RNase free afin d'éliminer au maximum les sels minéraux puis montées sur des lames (Thermo Scientific) en y déposant du milieu de montage contenant du DAPI (Invitrogen), un intercalant de l'ADN qui permet de visualiser les noyaux des cellules. Après 30 minutes de séchage à température ambiante, les lamelles sont observées au microscope à fluorescence. Des images de microscopie ont été réalisées sur un microscope Axio Imager 2 (Carl Zeiss Microscopy GmbH), avec un objectif 40x. Les images obtenues sont par la suite analysées à l'aide du logiciel ImageJ. Le DAPI étant un intercalant de l'ADN, il nous a donc permis d'évaluer le nombre total de noyaux. Le fluorochrome Alexa-488 nous a quant à lui permis de déterminer les cellules externalisant la calréticuline. Cette analyse est réalisée de manière systématique sur l'ensemble des lamelles dans cinq champs choisis au hasard. Le pourcentage de cellules externalisant la calréticuline est déterminé par le rapport entre le nombre de cellules externalisant la calréticuline et le nombre total de noyaux par champs.

7. Analyse des transcrits

Afin de détecter les modifications d'expression de différents gènes en réponse aux traitements par le FOX et/ou GTN, nous avons réalisé des qRT-PCR à partir de cellules préalablement traitées ou non.

7.1 Extraction des ARN totaux

Les cellules sont lysées et les acides ribonucléiques (ARN) totaux sont extraits à l'aide d'une solution de Trizol (ThermoFisher Scientific). Après homogénéisation, une solution de chloroforme est ajoutée afin d'isoler les acides nucléiques. Les échantillons sont par la suite vortexés 15 à 20 secondes, incubés quelques minutes à température ambiante puis centrifugés à 16 000 g durant 15 minutes à 4°C. La phase aqueuse qui contient les ARN est alors récupérée. Les ARN sont par la suite précipités à l'aide d'une solution d'isopropanol. Les échantillons sont alors vortexés, incubés 10 minutes à température ambiante et centrifugés à 16 000 g durant 10 minutes à 4°C. Le culot d'ARN est ensuite lavé à deux reprises à l'aide d'une solution d'éthanol 75% puis centrifugé à 16 000 g pendant 5 minutes à 4°C. À l'issue de cette centrifugation, un maximum de surnageant est éliminé puis les culots sont laissés sous une hotte aspirante afin de permettre l'évaporation de l'éthanol. Après évaporation totale de l'éthanol, les ARN sont alors repris dans de l'eau DNase/RNase free puis dosés par densité optique (DO) à 260 nm à l'aide d'un NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

La non contamination par des protéines est vérifiée en effectuant le rapport des [DO 260nm / DO 280nm] qui doit être compris entre 1,8 et 2. De plus, l'absence de contamination par des molécules organiques est également vérifiée en effectuant le rapport des [DO 260nm / DO 230nm] qui doit être compris entre 1,8 et 2,2.

7.2 Reverse Transcription

La *Reverse Transcription* (RT) permet de synthétiser une chaîne d'acide désoxyribonucléique monocaténaire complémentaire (ADNc) à partir d'une chaîne monocaténaire d'ARN mature (ARNm). Cette technique utilise une transcriptase inverse qui est une ADN polymérase ARN dépendante. Pour cela, on utilise les réactifs du fournisseur Promega®.

La RT est effectuée à partir de 500 ng à 1 µg d'ARN. Dans un premier temps, un mélange contenant l'ARN, des Random Primers et l'enzyme RNasin Plus RNase Inhibitor est réalisé. Les Random Primers vont s'hybrider sur des sites consensus de l'ARN et permettent ainsi d'initier la transcriptase inverse. L'enzyme RNasin Plus RNase Inhibitor permet quant à elle d'inhiber les RNases qui dégradent l'ARN. Les échantillons sont ensuite agités puis chauffés à 70°C durant 5 minutes afin de permettre l'hybridation des amorces et la dénaturation des

structures secondaires de l'ARN. Ces échantillons sont ensuite directement placés 5 minutes dans la glace afin d'éviter la formation de structures secondaires qui pourraient interférer avec la réaction de transcription inverse.

Dans un second temps, un mélange contenant de l'eau RNase free, du tampon 5X, 0.7 μ M de dNTP et extemporanément 200 U/ μ L d'enzyme Transcriptase Inverse est ajouté. Le mélange de dNTP contient toutes les bases nucléiques nécessaires à la formation du brin d'ADNc. Enfin, les échantillons sont placés dans un thermocycleur (Biorad) et sont incubés 1 heure à 37°C. Ce cycle permettant la synthèse d'un brin d'ADN monocaténaire complémentaire.

7.3 RT-qPCR

La réaction de PCR (Polymerase Chain Reaction) permet de synthétiser le brin complémentaire de l'ADNc obtenu après la réaction de RT et également d'amplifier les fragments d'ADNc.

Plus précisément, la technique de RT-qPCR permet de suivre l'amplification des ADNc en temps réel grâce à l'utilisation de Syber Green, une cyanine asymétrique qui se lie au petit sillon de l'ADN. Cette cyanine asymétrique a la capacité de se lier aux acides nucléiques doubles brins nouvellement synthétisés provoquant ainsi une fluorescence. Cette fluorescence permet par la suite d'évaluer la quantité totale d'ADN amplifiée. Pour cela, on utilise une solution de Syber Green (Thermo Scientific) qui contient une polymérase catalysant la réaction ainsi que des dNTPs.

L'amplification d'ADN pouvant être réalisée à partir d'une petite quantité d'ADNc, les ADNc préalablement obtenus sont dilués au demi.

Un mélange contenant du Syber Green, 0.3 μ M d'amorce sens (Forward : Fw), 0.3 μ M d'amorce anti-sens (Reverse : Rv) et de l'eau RNase free est ajouté dans une plaque PCR. Les échantillons d'ADNc sont ensuite déposés en triplicat. En parallèle, des échantillons témoins ne contenant pas d'ADNc sont réalisés. La plaque PCR est ensuite centrifugée 1 minute à 450 g puis placée dans un thermocycleur spécifique à la Q-PCR (StepOnePlus™) suivant le programme suivant :

- 10 minutes à 95°C afin de dénaturer les brins d'ADN
 - 15 secondes à 95°C afin de dénaturer les brins d'ADN
 - 1 minute à 60°C qui permet l'hybridation des amorces ainsi que la phase d'extension
- } 40 cycles
- 15 secondes à 95°C
 - 1 minute à 60°C
 - 15 secondes à 95°C
- } Courbes de dissociation qui permet de déterminer la spécificité des amorces utilisées

A l'issue de la qPCR, les résultats sont traités à l'aide du logiciel StepOne Software qui nous permet de comparer l'expression des ARNm des différents gènes analysés à un gène de référence qui est l'actine. Cela permet d'observer les différences d'expression d'un échantillon pour un gène donné par rapport à une expression stable d'un gène exprimé de façon ubiquitaire.

Les amorces utilisées lors de notre étude sont résumées ci-dessous (*Tableau 5*).

Tableau 5. Amorces utilisées lors des q-PCR

Gène cible	Séquence du gène
Actine	Fw : TTC-TTT-GCA-GCT-CCT-TCG-TT
	Rv : ATG-GAG-GGG-AAT-ACA-GCC-CC
iNOS	Fw : ATG-CAG-CTT-GTC-CAG-GGA-TT
	Rv : GAC-CCT-AAG-AGT-CAC-CAA-AAT-GG
PDL-1	Fw : ATG-GAG-GGG-AAT-ACA-GCC-CC
	Rv : TTC-TTT-GCA-GCT-CCT-TCG-TT

Fw : Forward ; **Rv** : Reverse

8. Analyse protéique par Western Blot

8.1 Extraction protéique

Afin d'étudier la phosphorylation de certaines protéines en réponse aux traitements par le FOX et/ou GTN, des culots secs de cellules préalablement traités ou non sont obtenus.

Les cellules sont par la suite lysées durant 30 minutes sur la glace tout en vortexant régulièrement à l'aide d'un tampon de lyse « phospho » qui permet de conserver les formes phosphorylées des protéines (*Tableau 6*). Les échantillons sont par la suite centrifugés 15 minutes à vitesse maximale à 4°C. Le surnageant est alors prélevé afin de réaliser un dosage des protéines.

Tableau 6. Composition du tampon de lyse « phospho »

Composants	Concentrations
TrisHCl pH 7.5	50mM
Glycérol	10%
NP-40	0.5%
Triton 100X	0.5%
NaCl	100mM
MgCl ₂	10mM
NaF	10mM
Sodium orthovanadate	1mM
Protease inhibitor cocktail (Roch Diagnostics)	1X
Phosphatase inhibitor cocktail II (Sigma)	1X
Phosphatase inhibitor cocktail III (Sigma)	1X

8.2 Dosage protéique

Afin de doser la quantité de protéines dans nos différents échantillons, nous avons réalisé un dosage protéique sur les lysats, à l'aide du kit DCTM Protein Assay Kit II (Bio-rad) qui utilise la méthode de Folin-Lowry. Ce dosage est un dosage colorimétrique des protéines. Les protéines réagissent tout d'abord avec un réactif cuivrique alcalin, le réactif de Gornall, puis avec un second réactif, le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce réactif permet la réduction des acides aminés aromatiques conduisant à la formation d'un complexe soluble et coloré dont on mesurera l'absorbance à 690nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Dans une plaque 96 puits à fond plat, les échantillons sont déposés en duplicat. En parallèle, une gamme étalon de BSA couvrant une gamme de 0 à 6mg.mL⁻¹ est réalisée. Par la suite, un premier mélange contenant le réactif de Gornall ainsi qu'un stabilisateur est déposé puis dans un second temps, le réactif de Folin-Ciocalteu est également déposé. Enfin, après 15 minutes d'incubation à température ambiante, l'absorbance à 690 nm est lue par spectrophotométrie.

8.3 Western Blot

Le western blot permet la détection semi-quantificative de protéines. Les protéines sont séparées selon leurs masses moléculaires sur un gel SDS-PAGE (Sodium Dodécyl Sulfate - PolyAcrylamid Gel Electrophoresis) puis transférées sur une membrane de nitrocellulose. Enfin, les protéines d'intérêt sont révélées à l'aide d'un complexe anticorps primaire

spécifique de la protéine d'intérêt / anticorps secondaire couplé à la peroxydase, dirigé contre l'anticorps primaire.

Après avoir réalisé le dosage des protéines, la quantité de protéines que l'on veut, comprise entre 30 µg et 50 µg, est diluée dans un tampon de charge contenant 20% de glycérol, 10% de β-mercaptoéthanol, 4,6% de SDS, 0,125 mM de TrisHCl à pH 6,8 ainsi que du bleu de bromophénol. Les échantillons sont par la suite chauffés à 95°C pendant 5 minutes afin de dénaturer les protéines et ainsi de cliver les ponts disulfures mais également de charger négativement les protéines.

En parallèle, des gels SDS-PAGE sont réalisés. En effet, un gel de séparation dont le pourcentage d'acrylamide varie entre 7% et 10% ainsi qu'un gel de concentration à 4% sont coulés en utilisant le système Biorad. Les échantillons ainsi qu'un marqueur de poids moléculaire sont ensuite déposés au sein du gel de concentration où les échantillons sont concentrés durant 15 minutes à 50 V. Enfin, les protéines sont séparées pendant environ 1H30 à 100 V dans un tampon de migration qui contient 200 mM de Glycine, 0,1% de SDS et 25 mM de TrisHCl à pH 7,8. Après migration, les protéines initialement séparées sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose dans un tampon de transfert qui contient 50 mM de Tris-base et 50 mM d'acide borique durant 1H30 à 500 mA. Après transfert, la membrane de nitrocellulose est colorée au rouge Ponceau. Cette coloration permet de vérifier la qualité du transfert mais également de fixer les protéines.

Les membranes de nitrocellulose sont incubées 1 heure à température ambiante dans une solution de saturation contenant 5% de BSA dilué dans du PBS / Tween 0,1% afin de saturer les sites antigéniques non spécifiques. L'anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt dilué à la concentration voulue dans la solution saturante (*Tableau 7*), est ensuite incubé une nuit, sous agitation à 4°C. Le lendemain, après avoir réalisé trois lavages des membranes à l'aide d'une solution de PBS/Tween 0,1%, l'anticorps secondaire spécifique de l'anticorps primaire, couplé à l'enzyme Horseradish peroxydase (HRP) et dilué à la concentration voulue dans la solution saturante (*Tableau 7*) est alors incubé durant 45 minutes, à température ambiante et sous agitation. Après incubation, les membranes sont lavées trois fois à l'aide d'une solution de PBS/Tween 0,1% durant 10 minutes, à température ambiante et sous agitation. Enfin, la membrane est recouverte d'une solution de révélation ECL contenant le substrat qui est le luminol (Clarity™ Western ECL Substate, Biorad). Grâce à l'enzyme HRP, le

luminol va être oxydé en 3-aminophtalate accompagné d'une émission de lumière détectée à l'aide d'un ChemiDoc™ (Biorad). Les résultats sont par la suite analysés à l'aide du logiciel Image Lab.

Tableau 7. Anticorps utilisés en western blot

Anticorps	Fournisseur	Espèce	Dilution	Solutions de dilution
Anticorps primaires				
PERK	Cell Signaling	Lapin	1/1000	TBS - 0,1% Tween / 5% BSA
Phospho-PERK	Cell Signaling	Lapin		
eIF2 α	Cell Signaling	Lapin		
Phospho-eIF2 α	Cell Signaling	Lapin		
HSC70	Santa Cruz	Souris		
Anticorps secondaires				
Anti-lapin HRP	Jackson ImmunoResearch	Chèvre	1/10 000	TBS - 0,1% Tween / 5% BSA
Anti-souris HRP	Jackson ImmunoResearch	Chèvre		

9. Tests statistiques

Les expérimentations *in vitro* et *in vivo* ont été répétées trois fois (sauf si mentionné). Les résultats de ces expérimentations sont exprimés en moyenne avec l'erreur type sur la moyenne (SEM, *Standard Error of the Mean*). L'expérimentation la plus représentative est présentée pour chaque type d'expérience.

La signification statistique des tests *in vitro* de mort cellulaire par le marquage Annexine V / 7AAD mais également *in vivo* des suivis de croissances tumorales entre nos différents groupes est déterminé par un test paramétrique, le test Two-way ANOVA. Pour les comptages de cellules externalisant la calréticuline, nous avons utilisé un test non paramétrique, le test Mann-Whitney.

Ces analyses statistiques sont effectuées à l'aide du logiciel GraphPad Prism. Les différences sont considérées comme statistiquement significatives à : *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001, ****p <0,0001.

RESULTATS

1. Effet anti-tumoral de l'association FOX / GTN

L'acquisition d'une résistance à la chimiothérapie comme par exemple celle observée avec l'oxaliplatine (OXA) ou le 5-Fluorouracile (5-Fu), est responsable de nombreux échecs thérapeutiques et reste donc un problème majeur de santé publique. Le NO quant à lui, est en passe de devenir un facteur anti-tumoral pouvant jouer un rôle dans la levée de résistance des cellules cancéreuses à des agents thérapeutiques standards (Hollande et al., 2010). Dans notre étude nous utilisons le GTN, ou sa forme injectable le Nitronal comme donneur de NO, ces agents ayant démontré leur intérêt comme agent anticancéreux.

1.1 Absence de levée de résistance à l'oxaliplatine par le GTN dans des modèles *in vitro*

En collaboration avec l'équipe de Christophe Borg et Yann Godet à Besançon (EFS Besançon), nous avons pu montrer que l'utilisation de GTN ne permettait pas de lever la résistance *in vitro* à l'oxaliplatine. Ces travaux ont été réalisés à partir de lignées cancéreuses coliques humaines sensibles (Colo205S) ou résistantes à l'oxaliplatine (Colo205R). Le marquage de MICA et MICB, deux ligands d'un récepteur activateur NKG2D présent sur les cellules NK, sur ces mêmes cellules a permis de montrer que le traitement par le GTN induit une augmentation de la quantité de MICA (*Major histocompatibility Complex class I-related chain A*), à la surface des cellules tumorales. Ces données suggèrent que le NO pourrait rendre les cellules cancéreuses plus visibles par les cellules NK et donc par le système immunitaire, favorisant ainsi leur élimination. Ces résultats permettaient d'émettre l'hypothèse de l'utilisation du GTN *in vivo* combiné ou non à la combinaison chimiothérapeutique FOX (OXA + 5-Fu) afin d'augmenter l'efficacité anti-tumorale.

Nous avons donc voulu dans un premier temps étudier l'effet anti-tumoral du FOX associé au GTN.

1.2 Effet sensibilisateur du GTN à la mort tumorale induite par le FOX

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet anti-tumoral du GTN associé ou non à la chimiothérapie FOX *in vivo* chez la souris immunocompétente Balb/c. Pour cela, des souris Balb/c ont reçu en injection sous-cutanée des cellules cancéreuses coliques murines CT26 syngéniques. Ces souris sont par la suite traitées ou non par du Nitronal, forme injectable du

GTN et/ou l'association de chimiothérapies FOX. Un suivi de croissance tumorale est alors réalisé (Figure 22).

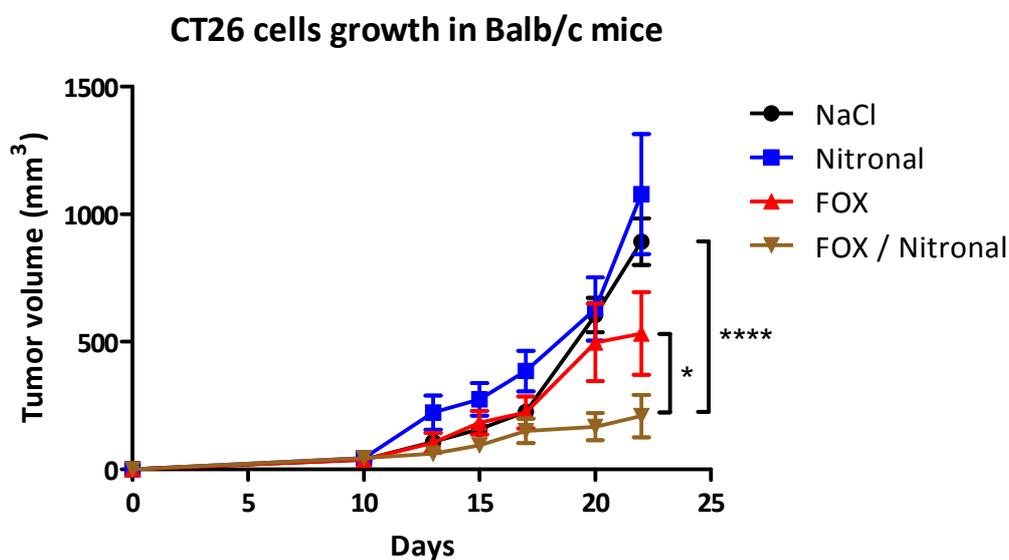


Figure 22. Effet potentialisateur du Nitronal sur l'action anti-tumorale du FOX. Des souris Balb/c ($n=15$ souris par groupe) porteuses de tumeurs sous-cutanées d'origine colique, ont été traitées ou non par du Nitronal (5 mg.kg^{-1}) en s.c. trois fois par semaine dès J1 et/ou par du FOX (6 mg.kg^{-1} d'OXA + 50 mg.kg^{-1} de 5-Fu) en i.p. une fois par semaine dès J7. Test statistique Two-way ANOVA : * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$

Les résultats nous montrent que l'utilisation du Nitronal n'influe pas sur la croissance tumorale par rapport au groupe contrôle. Comme il a déjà été décrit, la combinaison FOX induit quant à elle un ralentissement significatif de cette croissance tumorale (Gustavsson et al., 2015). Cependant, lorsque les souris sont traitées avec la combinaison FOX / Nitronal, nous mettons en évidence un effet synergique d'inhibition de la croissance tumorale. En effet, le volume tumoral moyen de ce groupe à J22 est d'environ 200 mm^3 alors qu'il est pour les groupes contrôles et FOX respectivement de 1100 mm^3 et 500 mm^3 . Nous avons donc un effet anti-tumoral de cette combinaison.

Afin de déterminer si cet effet anti-tumoral peut être retrouvé dans des modèles de cancer plus avancés, nous avons réitéré cette expérience dans un modèle de nodules pulmonaires d'origine colique mimant la formation de métastases pulmonaires. Dans ce cas, des souris Balb/c ont reçu en injection intraveineuse des cellules cancéreuses coliques murines CT26 syngéniques. Ces souris sont par la suite traitées ou non par du Nitronal et/ou du FOX (Figure 23).

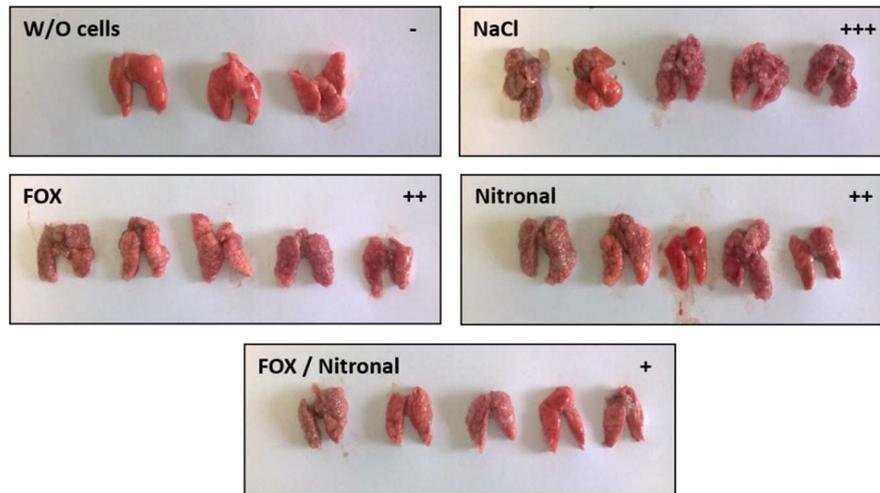


Figure 23. Effet potentialisateur du Nitronal sur l'action anti-tumorale du FOX. Des souris Balb/c ($n=5$ souris par groupe) porteuses de nodules pulmonaires d'origine colique, ont été traitées ou non par du Nitronal (5 mg.kg^{-1}) en s.c. trois fois par semaine dès J1 et/ou par du FOX (6 mg.kg^{-1} d'OXA + 50 mg.kg^{-1} de 5-Fu) en i.p. une fois par semaine dès J7. L'invasion tumorale des poumons est représenté par un score semi-quantitatif avec l'absence de nodules (-) ou l'envahissement total des poumons (+++). $N=1$ expérimentation

De manière similaire à ce que nous avons observé précédemment, l'association du FOX avec le Nitronal induit un effet synergique d'inhibition de l'invasion tumorale (+), le Nitronal seul ou le FOX seul semblant bien moins efficaces (++).

Nous avons donc pu mettre en évidence un effet anti-tumoral de la combinaison FOX / GTN *in vivo*, chez des souris porteuses de tumeurs sous-cutanées d'origine colique ou présentant des nodules pulmonaires d'origine colique. Nous nous sommes donc ensuite intéressés aux mécanismes qui pouvaient sensibiliser ces cellules tumorales à la toxicité induite par le FOX et/ou par le Nitronal.

1.2.1 Etude de la mort cellulaire induite par la combinaison FOX / GTN

Afin d'étudier les mécanismes pouvant être à l'origine de l'effet anti-tumoral de l'association FOX / GTN, nous avons étudié son effet sur la mortalité des cellules CT26 *in vitro*. Pour cela nous avons réalisé un test de détection de la mort cellulaire par marquage Annexine V / 7AAD analysé par cytométrie en flux (Figure 24).

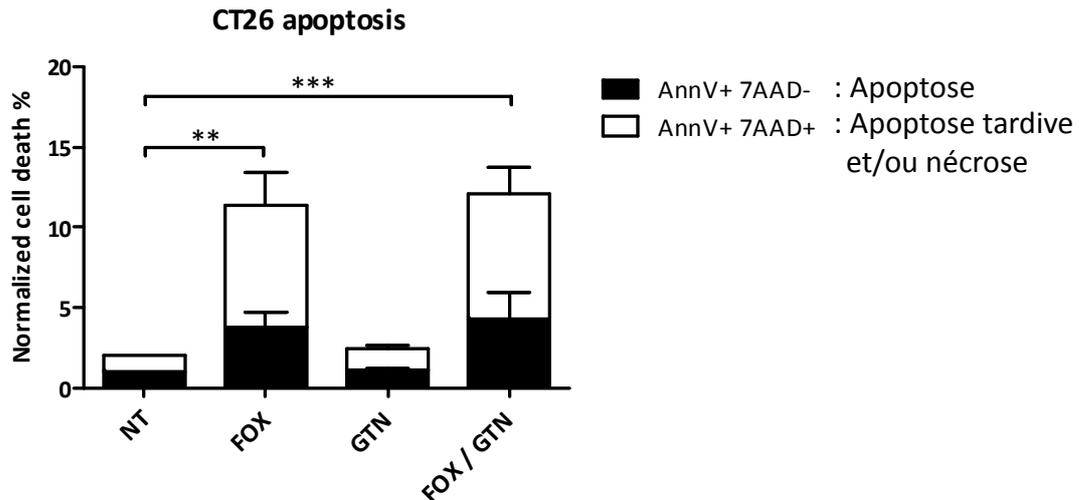


Figure 24. Absence d'effet sensibilisateur du GTN sur la mort cellulaire induite par le FOX. Des cellules CT26 ont été ensemencées à raison de $4,2 \cdot 10^4$ cellules/cm² puis traitées le lendemain par du FOX (25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ d'OXA + 5 μM de 5-Fu) et/ou par du GTN à 100 μM durant 24H. Test Two-way ANOVA : **p < 0.01, ***p < 0.001

La combinaison de chimiothérapies FOX induit environ 11% de mortalité, alors que le GTN utilisé à faible concentration n'induit aucune mortalité supplémentaire par rapport aux cellules non traitées. De plus, lorsque l'on associe le FOX au GTN, nous n'observons aucune augmentation du taux de cellules mortes, le GTN ne sensibilise donc pas *in vitro* les cellules cancéreuses à la mort induite par le FOX.

A ce stade, nous avons pu mettre en évidence *in vivo* un effet anti-tumoral de la combinaison FOX / GTN alors qu'*in vitro*, le GTN ne potentialise pas la mortalité induite par le FOX. Cependant, les résultats obtenus sur les lignées sensibles ou résistantes à l'oxaliplatine nous ont permis d'observer une augmentation du ligand MICA sur ces cellules, suggérant un rôle du système immunitaire dans l'effet anti-tumoral dû à cette combinaison.

1.2.2 Implication des cellules immunitaires dans l'effet anti-tumoral de la combinaison FOX / GTN

Afin d'observer l'implication des cellules du système immunitaire dans l'effet anti-tumoral de la combinaison FOX / GTN, nous avons réalisé des suivis de croissance tumorale dans deux modèles de souris immunodéficientes, les souris NOD *scid* gamma et les souris Nude.

En effet, les souris NOD *scid* gamma sont dépourvues de lymphocytes B et T et de cellules Natural Killer (NK) alors que les souris Nude sont elles, dépourvues de lymphocytes T.

Ces souris ont reçu en injection sous-cutanée les cellules cancéreuses murines CT26. Ces souris sont par la suite traitées ou non par du Nitronal et/ou par la combinaison de chimiothérapies FOX, un suivi de croissance tumorale est alors réalisé (Figure 25).

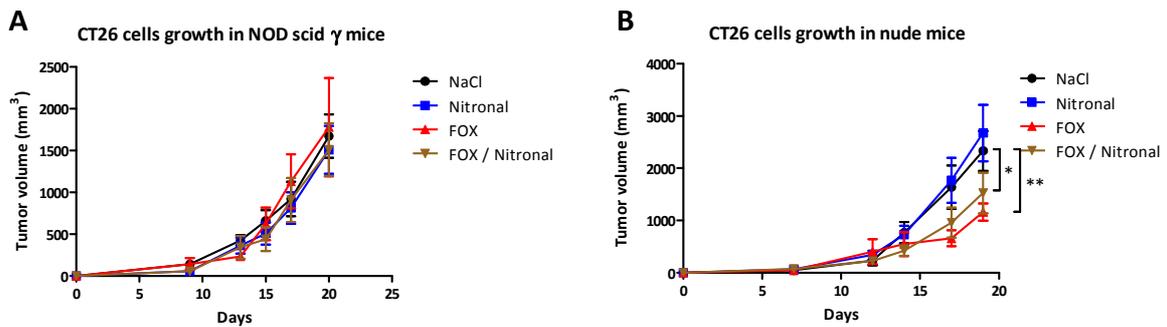


Figure 25. L'effet anti-tumoral de l'association FOX / GTN est dépendante du système immunitaire. Des souris NOS *scid* gamma (A) et Nude (B) ($n=5$ souris par groupe) porteuses de tumeurs sous-cutanées d'origine colique, ont été traitées ou non par du Nitronal (5 mg.kg^{-1}) en s.c. trois fois par semaine dès J1 et/ou par du FOX (6 mg.kg^{-1} d'OXA + 50 mg.kg^{-1} de 5-Fu) en i.p. une fois par semaine dès J7. Test statistique Two-way ANOVA : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. N=1 experimentation

D'un point de vue général, nous pouvons tout d'abord observer que la croissance tumorale est beaucoup plus rapide dans les souris immunodéficientes par rapport aux souris Balb/c (Figure 21). En effet, lorsque l'on observe le suivi de croissance tumorale du groupe contrôle à J17 post-injection des cellules cancéreuses, le volume tumoral moyen est d'environ 900 mm^3 pour les souris NOD *scid* gamma et d'environ 1500 mm^3 pour les souris Nude alors qu'il est pour les souris Balb/c, d'environ 200 mm^3 , suggérant une implication des lymphocytes T et/ou des cellules NK dans l'inhibition de la croissance tumorale.

Concernant le suivi de croissance tumoral dans les souris NOD *scid* gamma, le Nitronal associé ou non au FOX ne permet pas d'induire de façon significative l'inhibition de la croissance tumorale mettant en évidence un rôle éventuel des lymphocytes B et T et/ou des cellules NK.

En revanche, dans les souris Nude, nous pouvons observer que le FOX est capable d'induire un ralentissement de manière significative de la croissance tumorale par rapport au groupe contrôle mais aucun effet associatif n'est observé en présence de Nitronal. La comparaison des résultats obtenus chez les souris NOD *scid* gamma et les souris Nude semble indiquer

que l'effet anti-tumoral du FOX implique d'autres cellules du système immunitaires que les lymphocytes T, potentiellement les cellules NK.

L'absence d'effet anti-tumoral de la combinaison FOX / Nitronal dans les souris NOD *scid* gamma et l'absence d'effet additif de Nitronal dans les souris Nude sont en faveur de l'implication des lymphocytes T dans l'effet de cette combinaison.

➡ Pour résumer, nous avons pu mettre en évidence *in vitro* une absence d'effet synergique de la combinaison FOX / GTN sur la mort cellulaire, mais *in vivo* un effet anti-tumoral de celle-ci qui serait dépendant des lymphocytes T et/ou des cellules NK. L'effet potentialisateur du GTN sur l'efficacité anti-tumorale du FOX nécessiterait un recrutement ainsi qu'une activation des lymphocytes T.

Il est déjà connu que certaines chimiothérapies, tout comme la radiothérapie, ont une efficacité dépendante de l'activation du système immunitaire, via l'induction de la mort des cellules tumorales mais également l'induction d'une réponse immunitaire par un mécanisme appelé mort cellulaire immunogène (ICD) (Apetoh et al., 2008; Golden and Apetoh, 2015).

Nous avons donc voulu étudier si l'effet anti-tumoral de la combinaison FOX / GTN implique l'induction de la mort cellulaire immunogène. Pour cela, nous avons caractérisé les mécanismes moléculaires mis en jeu dans cet effet.

2. Caractérisation de la mort cellulaire immunogène

Afin de caractériser la mort cellulaire immunogène dû à la combinaison FOX / GTN, nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux facteurs clés de celle-ci qui sont la sécrétion d'ATP, la libération d'HMGB1 ainsi que l'externalisation de la calréticuline.

2.1 Sécrétion des facteurs immunogènes solubles

La recherche des facteurs immunogènes solubles, caractérisant la mort cellulaire immunogène, est réalisée par un test ELISA anti-HMGB1 et une détection de l'ATP par bioluminescence (*Figure 26*).

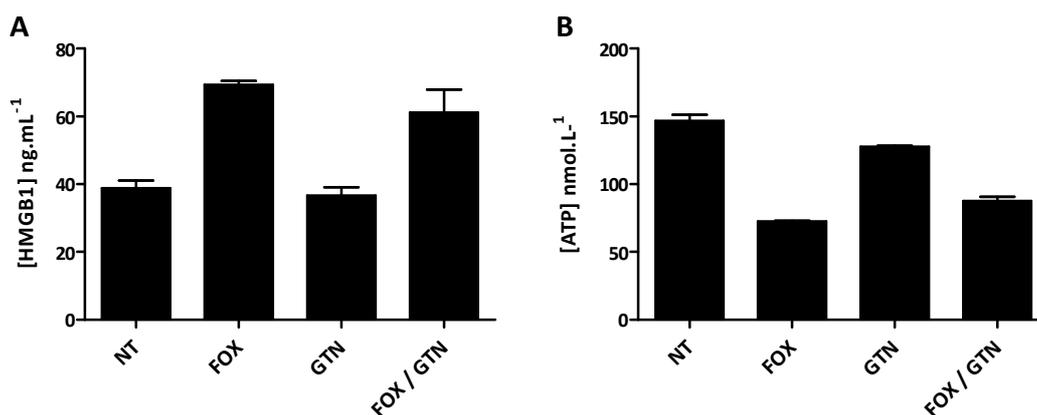


Figure 26. Absence d'effet synergique du GTN sur la sécrétion des facteurs immunogènes solubles induite par le FOX. Des cellules CT26 ont été ensemencées à raison de $4,2 \cdot 10^4$ cellules/cm² puis traitées le lendemain par du FOX ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ d'OXA + $5 \mu\text{M}$ de 5-Fu) et/ou par du GTN à $100 \mu\text{M}$. Après 24H de traitement, un dosage HMGB1 (A) ainsi qu'un dosage d'ATP (B) sont réalisés

D'après ces résultats, nous pouvons observer que le FOX induit une sécrétion deux fois plus élevée de la protéine pro-inflammatoire HMGB1 ($[\text{HMGB1}] = 70 \text{ ng.mL}^{-1}$) comparativement aux cellules non traitées ($[\text{HMGB1}] = 40 \text{ ng.mL}^{-1}$), sécrétion qui n'est pas retrouvée après traitement par le GTN seul. De plus, l'association du GTN au FOX n'induit aucune augmentation de la quantité d'HMGB1 libérée dans le milieu extracellulaire.

Concernant la libération d'ATP et contrairement à ce qui a pu être décrit dans la littérature, à ce temps de traitement (24H), nous n'observons aucune libération d'ATP en réponse au FOX. De manière similaire, l'association FOX / GTN n'induit aucune sécrétion d'ATP. L'ATP libéré pouvant déjà être dégradé 24H après traitement par l'oxaliplatine.

Malgré l'absence de sécrétion de ces facteurs immunogènes solubles à la suite du traitement GTN associé ou non à du FOX, nous nous sommes intéressés à l'externalisation de la CRT. En effet, certaines chimiothérapies non immunogènes peuvent provoquer seulement une partie des phénomènes associés à l'ICD (Bezu et al., 2015).

2.2 Externalisation de la calréticuline

Afin de mettre en évidence l'externalisation de la calréticuline qui est un facteur clé de l'ICD, nous avons réalisé un marquage membranaire de la calréticuline après traitement des cellules par le FOX et/ou GTN, que nous avons analysé par cytométrie en flux mais également par observation en microscopie à fluorescence (Figure 27).

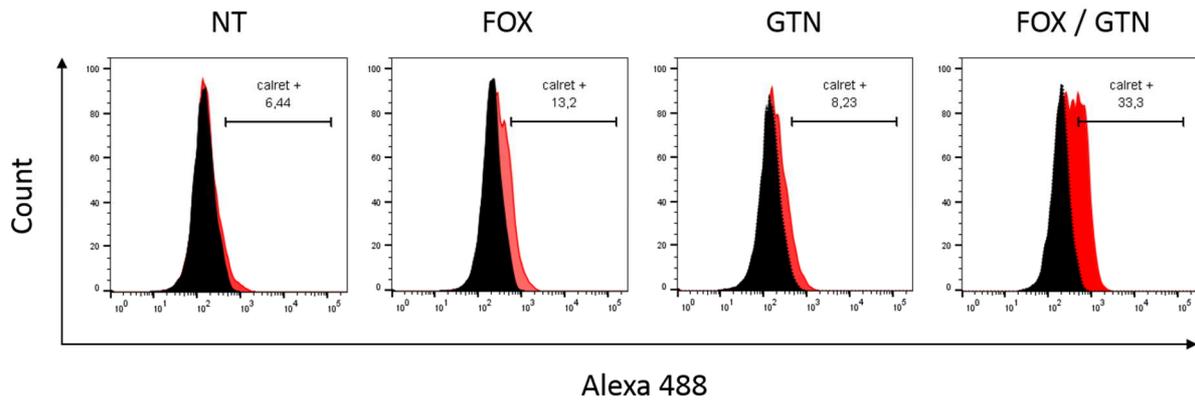


Figure 27. Effet potentialisateur du GTN sur l'externalisation de la calréticuline induite par le FOX. Des cellules CT26 ont étéensemencées à raison de 6.10^4 cellules/cm² puis traitées le lendemain par du FOX ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ d'OXA + $5 \mu\text{M}$ de 5-Fu) et/ou par du GTN à $100 \mu\text{M}$. Après 6H de traitement, un marquage membranaire de la CRT est réalisé puis analysé en cytométrie en flux

Après traitement des cellules par la combinaison FOX, 13,2% de ces cellules présentent une externalisation de la calréticuline (CRT). Le GTN induit également l'externalisation de la CRT, mais plus faiblement avec un taux de cellules positives de 8,23%. Ce taux de cellules présentant la CRT à la membrane est fortement augmenté, 33%, lorsque l'on associe le FOX au GTN. L'association FOX / GTN induit donc une augmentation de l'externalisation de la CRT.

Ces résultats ont été confirmés par détection de la CRT membranaire par marquage puis détection en microscopie à fluorescence (*Figure 28*).

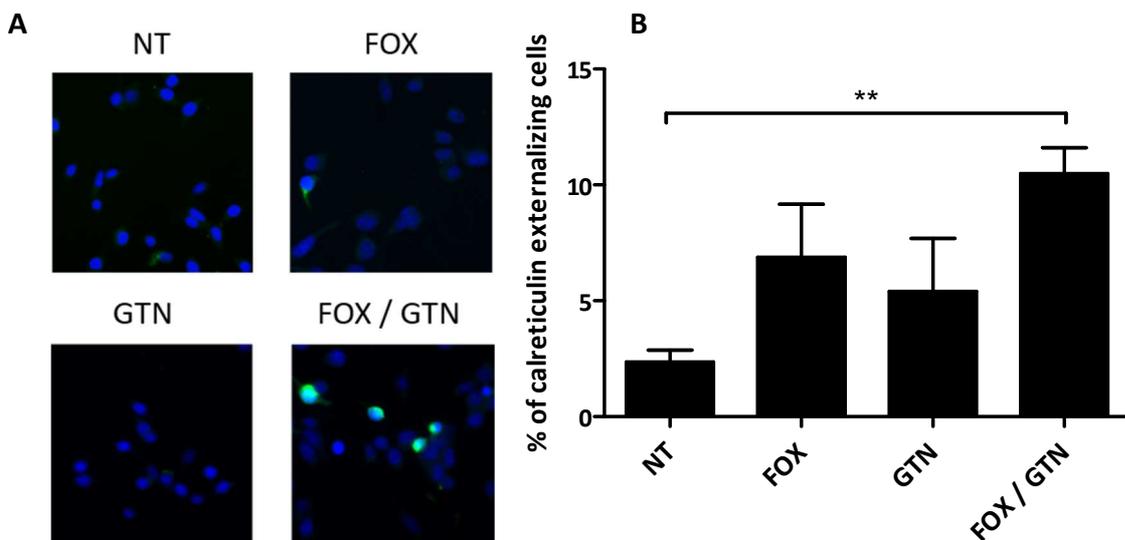


Figure 28. Effet potentialisateur du GTN sur l'externalisation de la calréticuline induite par le FOX. Des cellules CT26 ont étéensemencées à raison de $4,2.10^4$ cellules/cm² puis traitées le lendemain par du FOX ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ d'OXA + $5 \mu\text{M}$ de 5-Fu) et/ou par du GTN à $100 \mu\text{M}$. Après 6H de traitement, un marquage membranaire de la CRT et détection par microscopie à fluorescence est réalisé (**A**), puis analysé par comptage (**B**). Test statistique Mann-Whitney : $**p < 0,01$

De manière similaire à ce que nous avons observé précédemment, l'association FOX / GTN induit une augmentation significative de l'externalisation de la calréticuline comparativement aux cellules non traitées. Le FOX ainsi que le GTN seul induisent peu d'externalisation de la CRT.

➡ Pour résumer, nous avons pu mettre en évidence *in vitro* une absence d'effet synergique de la combinaison FOX / GTN sur la libération de la protéine pro-inflammatoire HMGB1. Les dosages d'ATP ne nous ont pas permis d'observer une libération d'ATP après traitement des cellules par le GTN mais également par le FOX seul. Or, il est décrit dans la littérature que le FOX induit une libération d'ATP, suggérant un problème de cinétique (Bezu et al., 2015). En revanche, nous avons pu mettre en évidence une augmentation de l'externalisation de la CRT avec cette combinaison, suggérant que l'externalisation de cette protéine pourrait jouer un rôle dans l'effet anti-tumoral de l'association FOX / GTN.

Il est déjà connu que l'oxaliplatine induit l'ICD et donc l'externalisation de la CRT (Apetoh et al., 2008). Nos travaux nous ont alors permis de mettre en évidence qu'un donneur de NO tel que le GTN peut également induire l'externalisation de la CRT. Cependant, le rôle éventuel du NO dans l'externalisation de la CRT reste encore inconnu.

Nous avons donc voulu étudier le rôle du GTN et plus particulièrement du NO sur les mécanismes d'externalisation de la CRT.

3. Rôle du NO dans l'externalisation de la calréticuline

Afin de caractériser le rôle du NO dans l'effet anti-tumoral de la combinaison FOX / GTN, nous avons utilisé un agent piégeant le NO, le carboxy-PTIO (cPTIO).

3.1 Rôle du NO dans la mort cellulaire induite par la combinaison FOX / GTN

Dans un premier temps, nous avons recherché si le NO pouvait jouer un rôle sur la mort cellulaire induite par le FOX et/ou par le GTN. Pour cela, des cellules CT26 sontensemencées puis traitées par du cPTIO avant l'addition de FOX et/ou GTN. Un test de détection de la mort cellulaire par un marquage Annexine V / 7AAD analysé en cytométrie en flux a été réalisé (Figure 29).

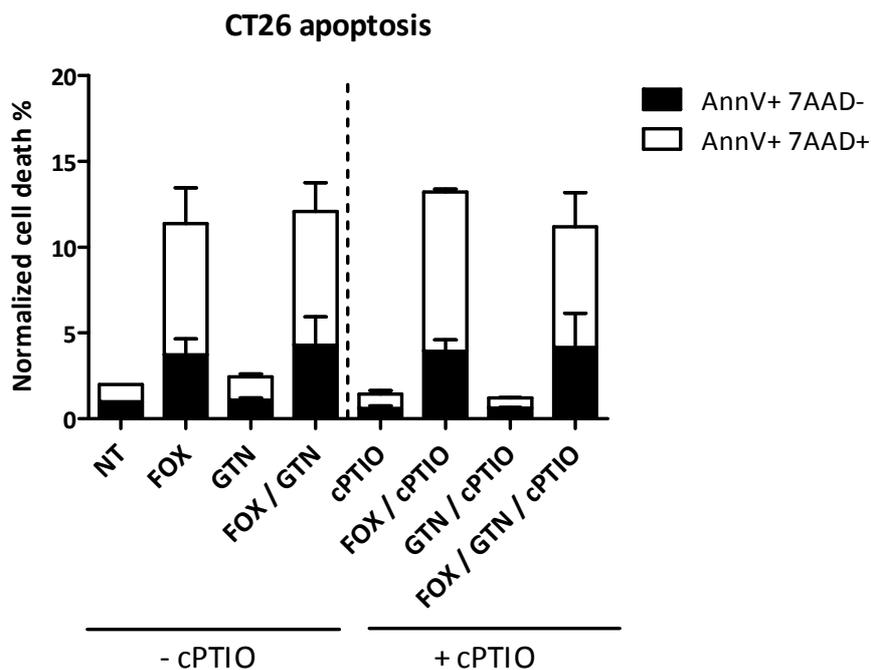


Figure 29. La mort cellulaire induite par le FOX et par la combinaison FOX / GTN est indépendante du NO. Des cellules CT26 ont étéensemencées à raison de $4,2.10^4$ cellules/cm², prétraitées ou non le lendemain pendant 1H avec 50 μ M de cPTIO puis traitées ou non avec du FOX (25 μ g.mL⁻¹ d'OXA + 5 μ M de 5-Fu) et/ou du GTN à 100 μ M durant 24H

Ces résultats montrent que les taux de mortalité induits par les traitements FOX et/ou GTN sont les mêmes, que ces cellules soient ou non pré-traitées par le cPTIO. En effet, l'association FOX / cPTIO induit environ 13% de mortalité contre 11% lorsque les cellules sont traitées seulement avec du FOX. De même, la combinaison FOX / GTN associée à du cPTIO induit environ 11% de mortalité contre 12% seule. La mort cellulaire induite par le FOX et par la combinaison FOX / GTN est donc indépendante du NO.

Cependant, le NO pourrait jouer un rôle dans l'induction de la mort cellulaire immunogène.

3.2 Rôle du NO dans la mort cellulaire immunogène

Afin de mettre en évidence un éventuel rôle du NO dans le mécanisme de la mort cellulaire immunogène, nous avons recherché la présence des facteurs immunogènes solubles HMGB1 et ATP ainsi que l'externalisation de la CRT.

3.2.1 Sécrétion des facteurs immunogènes solubles

Comme précédemment, nous avons réalisé un test ELISA pour mettre en évidence HMGB1 ainsi que la détection de l'ATP par un test de bioluminescence dans les surnageants de culture (Figure 30).

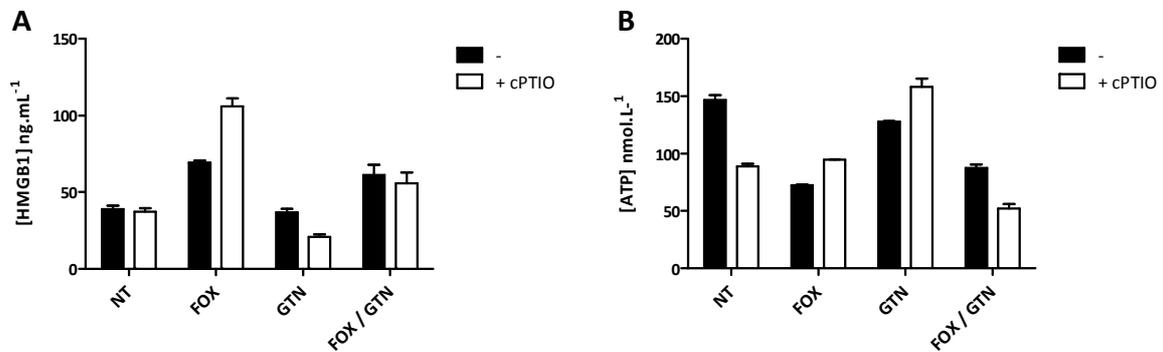


Figure 30. La sécrétion des facteurs immunogènes solubles induite par le FOX et par la combinaison FOX / GTN est indépendante du NO. Des cellules CT26 ont étéensemencées à raison de $4,2.10^4$ cellules/cm² prétraitées 1H ou non avec 50 μ M de cPTIO avant d'être traitées ou non 24H avec du FOX (25 μ g.mL⁻¹ d'OXA + 5 μ M de 5-Fu) et/ou par du GTN à 100 μ M. Après 24H de traitement, un dosage d'HMGB1 (A) ainsi qu'un dosage d'ATP (B) sont réalisés

D'après les résultats de la figure 30, l'ajout de cPTIO n'induit aucune modification sur les taux d'HMGB et ATP sécrétés en réponse aux traitements FOX et/ou GTN. Ces mécanismes semblent donc indépendants du NO.

3.2.2 Externalisation de la calréticuline

L'externalisation de la CRT a été mise en évidence après traitement des cellules CT26 par le FOX et/ou GTN. Nous avons donc réalisé un marquage de la CRT membranaire après pré-traitement par le cPTIO puis traitement par le FOX et/ou GTN, détectée par la suite par microscopie à fluorescence (Figure 31).

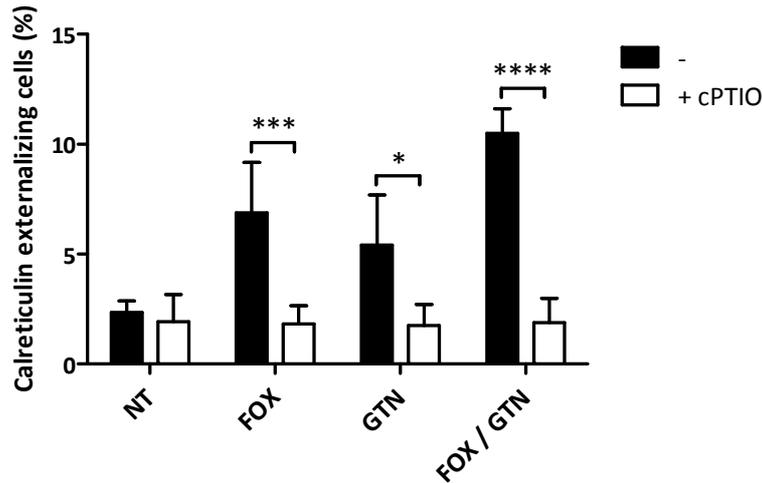


Figure 31. L'externalisation de la calréticuline induite par le FOX et / ou GTN est dépendante du NO. Des cellules CT26 ont étéensemencées à raison de $4,2.10^4$ cellules/cm², prétraitées 1H ou non avec 50 μ M de cPTIO puis traitées ou non 24H avec du FOX (25 μ g.mL⁻¹ d'OXA + 5 μ M de 5-Fu) et/ou par du GTN à 100 μ M. Après marquage de la calréticuline membranaire, les cellules sont observées au microscope à fluorescence et les cellules positives sont décomptées. Test statistique Mann-Whitney : * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

Comme nous avons pu le voir précédemment, le traitement par le FOX, le GTN et encore plus par l'association des deux induisent l'externalisation de la CRT. Cependant, lorsque ces cellules sont pré-traitées par du cPTIO, cette externalisation de la CRT est alors totalement inhibée. De manière surprenante, cette inhibition de l'externalisation de la CRT est également visualisable lorsque ces cellules sont traitées par le FOX, ce qui suggère que l'externalisation de la CRT est dépendante du NO, que l'inducteur du GTN ou une chimiothérapie immunogène.

Ces résultats semblent donc également suggérer que l'utilisation de chimiothérapies comme le FOX pourrait induire la production de NO, nécessaire à l'externalisation de la CRT. Nous avons alors recherché si ces chimiothérapies pouvaient induire l'expression de la iNOS, une enzyme génératrice de NO.

3.2.3 Expression de la NOSII en réponse à des chimiothérapies

L'étude de l'expression de la NOSII en réponse à des chimiothérapies a été réalisée par qRT-PCR (Figure 32).

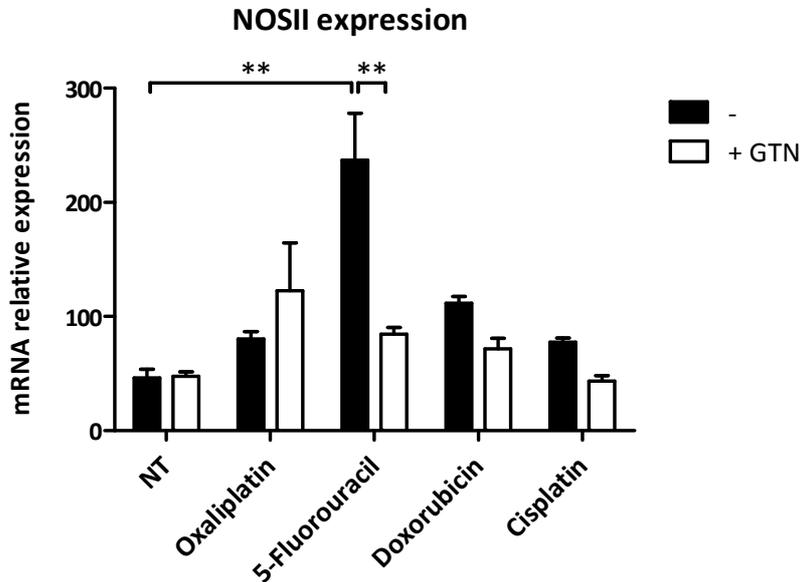


Figure 32. Le 5-Fu induit l'expression de la NOSII qui est inhibée par l'ajout de GTN. Des cellules CT26 ont étéensemencées à raison de $4,2 \cdot 10^4$ cellules/cm² puis traitées le lendemain avec $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ d'OXA, $5 \mu\text{M}$ de 5-Fu, $2 \mu\text{M}$ de doxorubicine ou $30 \mu\text{M}$ de cisplatine, le tout associé ou non au GTN à $100 \mu\text{M}$. Après 24H, une qRT-PCR sur les cellules est réalisé afin d'observer l'expression de la NOSII par rapport au gène de référence qui est l'actine. Test statistique Two-way ANOVA : $**p < 0.01$

D'après cette figure, nous pouvons observer que seul le 5-Fu induit une expression significative de NOSII comparativement aux cellules non traitées. L'oxaliplatine, la doxorubicine et le cisplatine induisent quant à eux peu d'expression de celle-ci. De plus, lorsque l'on ajoute $100 \mu\text{M}$ de GTN, nous pouvons observer que l'expression de NOSII préalablement observé en réponse au 5-Fu est inhibée de manière significative. En effet, l'expression de celle-ci est inhibée d'un facteur 3. Concernant les autres chimiothérapies, le GTN n'induit aucune modification de l'expression de NOSII.

Le fait que le 5-Fu augmente la transcription de la NOSII, suggère que cette chimiothérapie active la voie NF- κ B, une voie de signalisation majeure dans la transcription de la NOSII. Cette hypothèse est confortée par le fait que le GTN diminue cette transcription. En effet, il a été décrit que le NO utilise la voie NF- κ B par sa capacité à S-nitrosyler et à inhiber des

médiateurs de cette voie tels que l'inhibiteur de NF- κ B (IKB α) ainsi que les sous-unités de NF- κ B qui sont p50 et p65 (Marshall and Stamler, 2001; Reynaert et al., 2004).

Le NO produit dans les cellules par l'enzyme NOSII ou apporté de façon exogène par le GTN, joue donc un rôle majeur dans l'externalisation de la CRT. La suite de cette étude consiste à comprendre le rôle du NO dans ce mécanisme en se focalisant sur des protéines dans la cascade de signalisation du stress du réticulum endoplasmique comme il a été décrit par Nakato et al. en 2015 (Nakato et al., 2015; Uehara et al., 2006).

3.2.4 Voie de stress du réticulum endoplasmique

A ce jour, le mécanisme décrit pour induire l'externalisation de la CRT passe par l'induction du stress du réticulum endoplasmique générant la phosphorylation de PERK et ainsi la phosphorylation de eIF2 α (Panaretakis et al., 2009). Nous avons donc étudié l'impact du traitement par le GTN sur la phosphorylation de ces deux protéines (*Figure 33*).

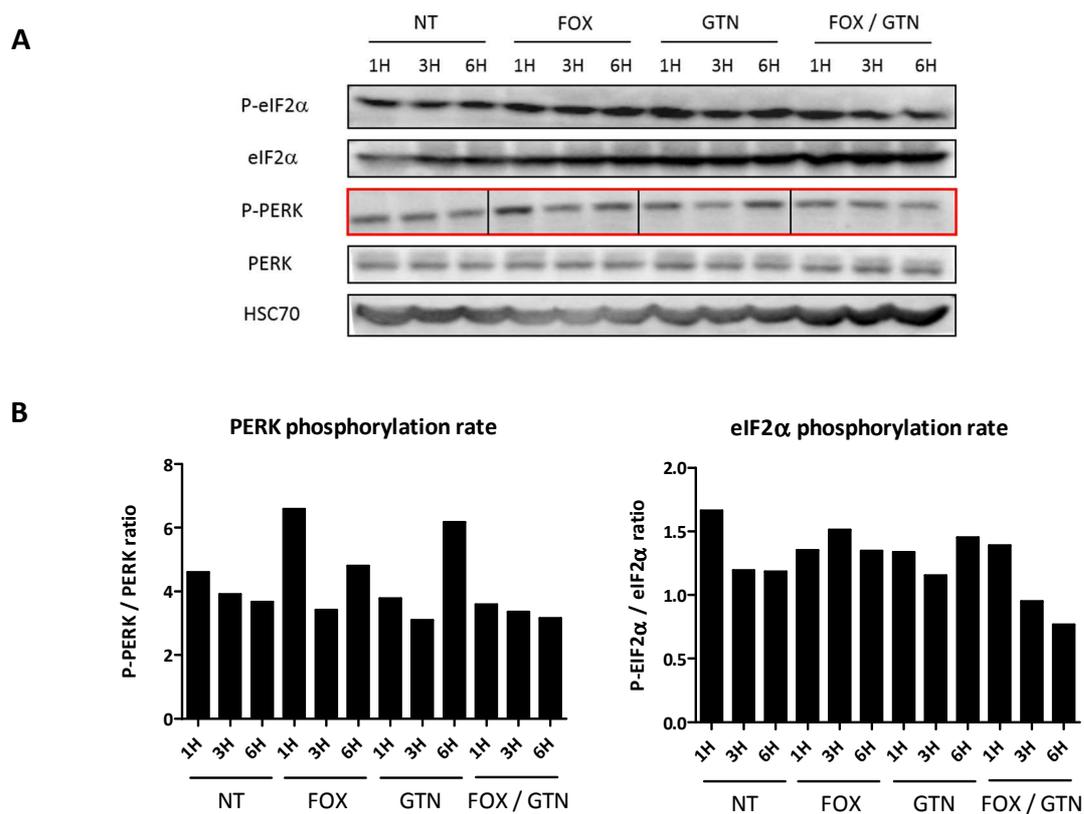


Figure 33. Modulation de la cinétique de phosphorylation de PERK et eIF2 α en réponse au traitement FOX et / ou GTN. Des cellules CT26 ont étéensemencées à raison de $4,2 \cdot 10^4$ cellules/cm² puis traitées le lendemain durant, 1H, 3H et 6H avec du FOX (25 μ g.mL⁻¹ d'OXA + 5 μ M de 5-Fu) et/ou du GTN à 100 μ M. Les protéines ont été par la suite extraites puis analysées par WB (**A**). Une quantification de l'intensité des bandes a ensuite été réalisée à l'aide du logiciel Image Lab (**B**). N=2 expérimentation

Ces résultats suggèrent que le traitement des cellules CT26 par le FOX induit une phosphorylation rapide de PERK dès 1H de traitement, alors que cette phosphorylation est induite plus tardivement, 6H post-traitement par le GTN. En revanche, cette phosphorylation n'est pas observée en présence de la combinaison FOX / GTN. Concernant la phosphorylation de la protéine eIF2 α , aucune différence n'est observée en réponse au traitement FOX et/ou GTN. Notre hypothèse est qu'une heure de traitement serait déjà trop long. Des expériences sont en cours où les cellules CT26 sont traitées par du FOX et/ou du GTN et analysées à des temps plus précoces tels que 30 minutes.

Le GTN ainsi que le FOX semblent induire des modifications de l'état de phosphorylation des protéines de la voie du stress du réticulum endoplasmique impliqué dans l'externalisation de la CRT. Après avoir réitéré cette expérience à des temps plus précoces, il restera à déterminer si ces modifications sont dépendantes du NO en utilisant comme précédemment du cPTIO, un chélateur du NO.

Nous avons par la suite voulu déterminer si le NO pouvait avoir une implication dans l'immunogénicité et l'effet anti-tumoral de traitement associant des chimiothérapies immunogènes ou non.

3.2.5 Modulation de l'effet immunogène des thérapies anticancéreuses par le NO

Comme discuté en introduction, une chimiothérapie telle que l'oxaliplatine ou la doxorubicine induit une ICD dont les caractéristiques sont la libération d'HMGB1, la sécrétion d'ATP et l'externalisation de la CRT. En revanche, la mitomycine C ou l'étoposide sont connues pour être des chimiothérapies non immunogènes (Apetoh et al., 2008). Nous avons alors voulu tester si l'association du GTN à ces chimiothérapies non immunogènes peut induire l'externalisation de la CRT, nécessaire à la mort cellulaire immunogène (*Figure 34*).

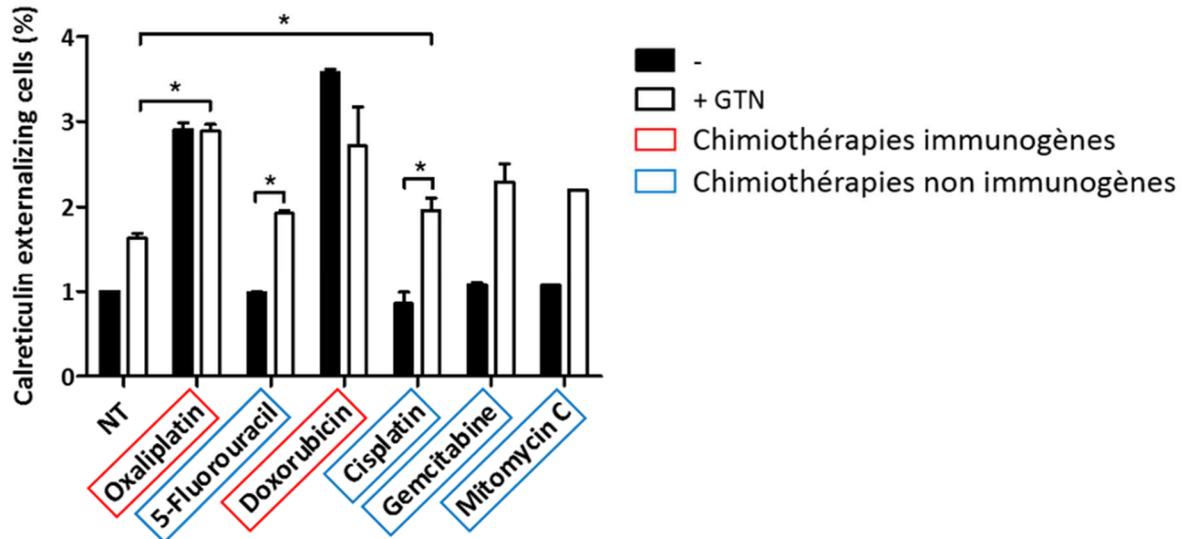


Figure 34. L'ajout de GTN à des chimiothérapies non immunogènes induit une externalisation de la CRT. Des cellules CT26 ont été ensemencées à raison de $1,5 \cdot 10^5$ cellules/puit puis traitées le lendemain par $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ d'OXA, $5 \mu\text{M}$ de 5-Fu, $2 \mu\text{M}$ de doxorubicine, $30 \mu\text{M}$ de cisplatine, 500 nM de gemcitabine et $20 \mu\text{M}$ de mitomycine C, le tout associé ou non avec $100 \mu\text{M}$ de GTN. Après 24H, un marquage membranaire de la calréticuline a été effectué puis analysé par comptages en microscopie à fluorescence. Test statistique Mann-Whitney : * $p < 0,05$

Ces résultats confirment les publications préalablement citées. En effet, l'oxaliplatine ainsi que la doxorubicine sont des chimiothérapies immunogènes et en tant que telles, induisent l'externalisation de la CRT. En revanche, le 5-Fluorouracile, le cisplatine, la gemcitabine ainsi que la mitomycine C n'induisent pas l'externalisation de la CRT et ne sont donc pas immunogènes. Comme nous avons pu le montrer précédemment, le GTN induit une externalisation de la CRT mais de manière plus faible que les chimiothérapies immunogènes. Lorsque celui-ci est associé à une chimiothérapie immunogène seule, nous pouvons observer qu'aucun effet associatif n'est observé. En revanche, lorsque le GTN est associé à des chimiothérapies non immunogènes, nous pouvons observer une forte augmentation de l'externalisation de la CRT. En effet, lorsque l'on associe le cisplatine avec le GTN, nous pouvons observer une forte augmentation significative de l'externalisation de la CRT comparativement aux cellules traitées seulement avec du GTN.

➡ Pour résumer la première partie de notre étude, nous avons pu mettre en évidence *in vivo* un effet anti-tumoral de la combinaison FOX / GTN. Cet effet anti-tumoral serait dépendant de la présence des cellules du système immunitaire, plus précisément des lymphocytes T. Nous avons en effet pu observer une augmentation de l'externalisation de la

CRT avec la combinaison FOX / GTN, la CRT étant un facteur clé de l'ICD. Nous avons alors montré que cette externalisation de la CRT est dépendante du NO puisqu'elle est totalement inhibée en présence d'un chélateur du NO, le cPTIO. L'externalisation de la CRT induite par d'autres chimiothérapies est également sous la dépendance du NO et plus précisément de l'enzyme NOSII. Enfin, nous avons pu mettre en évidence que l'association du GTN à des chimiothérapies non immunogènes, induit l'externalisation de la CRT pouvant ainsi rendre immunogène ces chimiothérapies.

Les chimiothérapies ne sont pas les seuls inducteurs de l'ICD. En effet, la radiothérapie est également inductrice de ce mécanisme (Golden and Apetoh, 2015). Nous avons ensuite étudié, l'effet de la radiothérapie associée à la combinaison FOX / GTN.

4. Association de la radiothérapie à la combinaison FOX / GTN

4.1 Effet anti-tumoral de la combinaison FOX / GTN / Radiothérapie

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet de la radiothérapie associée ou non à un donneur de NO, le Nitronal *in vivo* chez la souris Balb/c. Pour cela, des souris Balb/c ont reçu en injection sous-cutanée des cellules cancéreuses coliques murines CT26 syngéniques. Ces souris sont par la suite traitées ou non par du Nitronal et/ou irradiées une fois à 10 Gy, la croissance tumorale étant alors analysée (Figure 35).

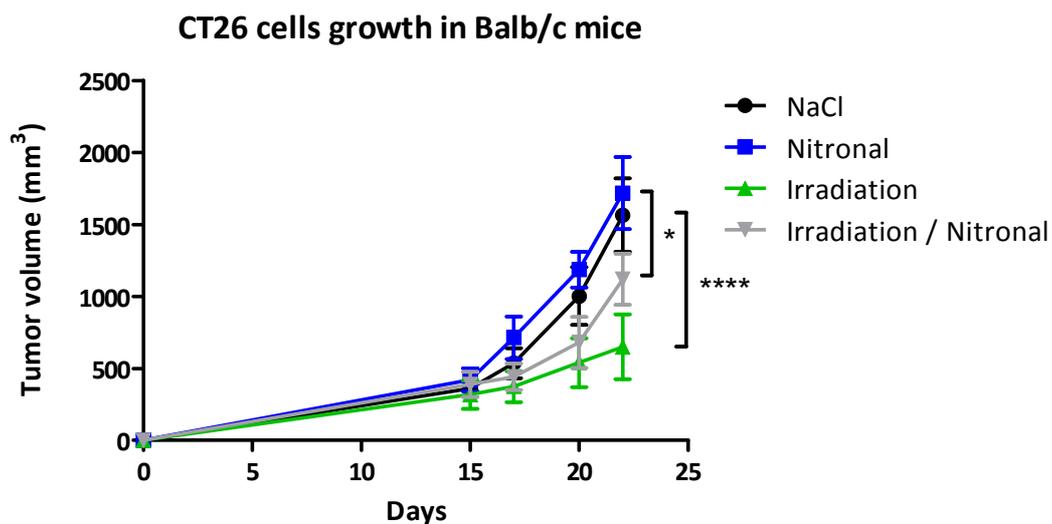


Figure 35. Absence d'effet additif de la radiothérapie (1 x 10 Gy) en présence de Nitronal. Des souris Balb/c (n=5 souris par groupe) porteuses de tumeurs sous-cutanées d'origine colique, ont été traitées ou non par du Nitronal (5 mg.kg⁻¹) en s.c. trois fois par semaine dès J1 et/ou irradiées (1 x 10Gy) à J15. Test statistique Two-way ANOVA : *p < 0.05, ****p < 0.0001. N=1 expérimentation

Comme nous avons pu le voir précédemment, le Nitronal utilisé seul n'a aucun effet sur la croissance tumorale par rapport au groupe contrôle. Lorsque les souris sont irradiées à 10 Gy au niveau de la tumeur, nous pouvons observer une forte inhibition de la croissance tumorale. En effet le volume tumoral de ce groupe à J22 est d'environ 700 mm³ alors qu'il est de 1500 mm³ pour le groupe contrôle. Cependant, l'ajout de Nitronal n'induit aucune modification de la croissance tumorale.

Nous avons par la suite étudié l'impact de la radiothérapie sur la croissance tumorale. Pour cela, le même protocole expérimental est réalisé dans les souris Balb/c porteuses de tumeurs sous-cutanées CT26, avec comme modification une irradiation fractionnée (3 x 8 Gy) (Figure 36).

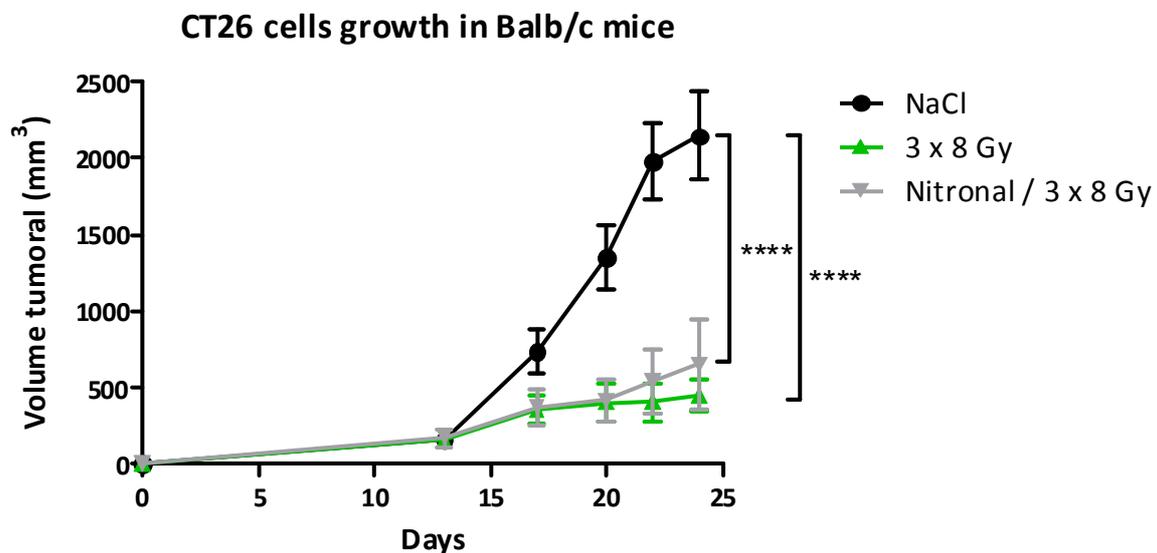


Figure 36. Absence d'effet associatif de la radiothérapie (3 x 8 Gy) en présence de Nitronal. Des souris Balb/c (n=5 souris par groupe) porteuses de tumeurs sous-cutanées d'origine colique, ont été traitées ou non par du Nitronal (5 mg.kg⁻¹) en s.c. trois fois par semaine dès J1 et/ou irradiées (3 x 8 Gy) à J15. Test statistique Two-way ANOVA : ****p < 0.0001. N=1 expérimentation

D'un point de vue général, nous pouvons tout d'abord observer que la radiothérapie fractionnée (3 x 8 Gy) a un impact nettement meilleur sur la croissance tumorale par rapport à une seule dose de radiothérapie (10 Gy) (Figure 35). En effet, lorsque l'on observe le suivi de croissance tumoral du groupe irradié à J22 post-injection des cellules cancéreuses, le volume tumoral moyen est d'environ 400 mm³ pour l'irradiation fractionnée contre 700 mm³ avec une seule dose d'irradiation montrant l'importance du fractionnement dans

l'inhibition de la croissance tumorale. En revanche, comme nous avons pu le voir avec une seule dose d'irradiation, aucun effet associatif n'est observé en présence de Nitronal.

Le GTN potentialisant l'effet anti-tumoral du FOX, nous avons alors associé la radiothérapie à cette combinaison. Le même protocole expérimental est réalisé dans les souris Balb/c, porteuses de tumeurs sous-cutanées CT26, avec comme modification l'ajout de la combinaison de chimiothérapies FOX, la veille de la radiothérapie (*Figure 37*).

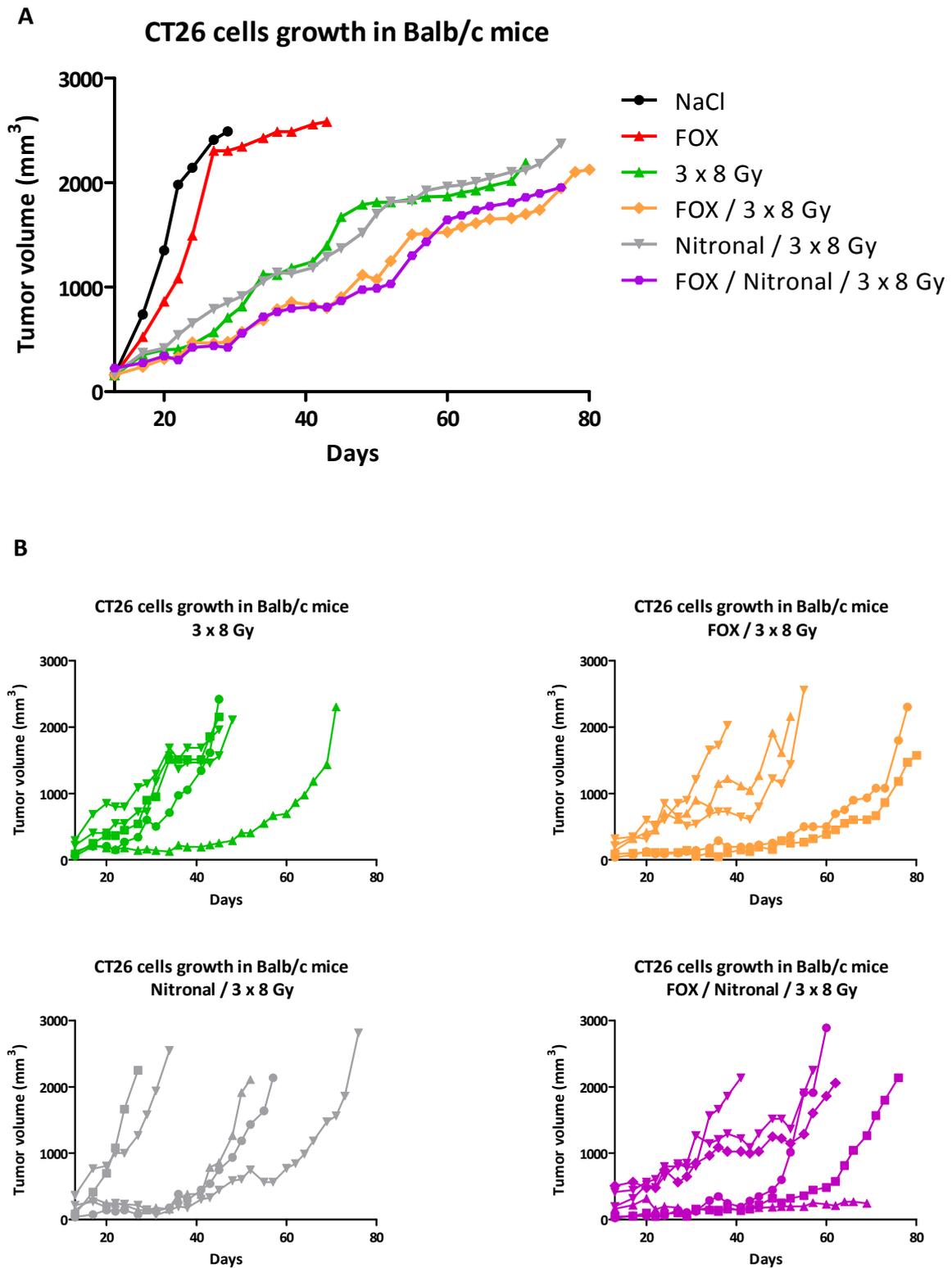


Figure 37. Effet anti-tumoral de la radiothérapie (3 x 8 Gy) associé au Nitronal et / ou FOX. Des souris Balb/c ($n=5$ souris par groupe) porteuses de tumeurs d'origine colique, ont été traitées ou non au Nitronal (5 mg.kg^{-1}) en s.c. trois par semaine dès J1 et/ou par du FOX (6 mg.kg^{-1} d'OXA + 50 mg.kg^{-1} de 5-Fu) en i.p. une fois par semaine dès J13 et/ou irradiées (3 x 8 Gy / jour) dès J14. La moyenne du volume des tumeurs par groupe de souris (**A**) et le volume des tumeurs de chaque souris par groupe (**B**) est représenté. N=1 expérimentation

Comme il est décrit dans de nombreuses publications, les chimiothérapies telles que le FOX n'ont pas d'effet à long terme. Après 23 jours post-injection des cellules cancéreuses, on peut observer un fort échappement ainsi qu'une progression tumorale. En effet, lorsque l'on observe le suivi de croissance tumorale du groupe traité au FOX seul, le volume tumoral moyen à J22 post-injection des cellules cancéreuses est d'environ 500 mm³ contre 2000 mm³ à J43. Concernant les autres groupes de souris où les tumeurs ont été irradiées et traitées au Nitronal et/ou au FOX, nous pouvons voir de manière générale que ces différents traitements induisent un fort ralentissement de la croissance tumorale mais aucune différence significative entre ces quatre groupes n'est observée.

Lorsque l'on observe les suivis de croissance tumorale des souris prises individuellement après irradiation et traitées par le Nitronal et/ou au FOX, nous pouvons observer une hétérogénéité de la réponse de ces souris à ces traitements comme ce qui a déjà été montré (Duraiswamy et al., 2013). Le premier type de réponse correspond à des tumeurs qui échappent rapidement au traitement. En effet, les souris irradiées et traitées au Nitronal échappent à ce traitement dès J18 alors qu'elles échappent à l'irradiation associée au FOX et/ou au Nitronal dès J28. Le second groupe correspond à des souris dont les tumeurs montrent une croissance tumorale plus lente signifiant que ces souris répondent très bien à ces traitements. On observe tout de même un échappement à ces traitements mais qui est beaucoup plus tardif. En effet, l'échappement à ces traitements est à J40 pour les souris irradiées et traitées au Nitronal et à J50 pour les souris irradiées associée au FOX et/ou Nitronal. De manière générale, nous pouvons observer que l'association du Nitronal et/ou du FOX à la radiothérapie induit une meilleure réponse au traitement comparativement à la radiothérapie seule. En effet, deux souris pour le groupe FOX / Radiothérapie et trois souris pour les groupes Nitronal et/ou FOX / Radiothérapie répondent très bien à ces traitements contre une souris pour que le groupe radiothérapie seule.

Au vu de ces résultats obtenus sur une expérience unique, il sera primordial de réitérer cette expérience en augmentant le nombre d'individus par groupe. De plus, il serait intéressant d'étudier de manière plus approfondie ces deux types de réponses aux traitements, en analysant par exemple le recrutement des cellules du système immunitaire au sein des tissus tumoraux. De plus, afin de contrecarrer ces mécanismes d'échappement mis en œuvre par les cellules tumorales, notre hypothèse serait d'utiliser une immunothérapie active

spécifique qui consiste à stimuler le système immunitaire en utilisant des inhibiteurs de points de contrôle négatif immunitaire (Pardoll, 2012).

Nous avons donc pu mettre en évidence une meilleure efficacité de la radiothérapie fractionnée (3 x 8 Gy) par rapport à une dose unique (10 Gy). Nous avons également pu observer que l'association du Nitronal et/ou du FOX à la radiothérapie fractionnée induit une meilleure réponse au traitement. Malgré une meilleure réponse, nous avons pu observer une hétérogénéité de la réponse à ces différents traitements. Comme auparavant, nous nous sommes donc ensuite intéressés aux mécanismes qui pouvaient sensibiliser ces cellules tumorales à la toxicité induite par l'irradiation.

4.2 Etude de la mort cellulaire induite par la radiothérapie

Afin d'étudier les mécanismes pouvant sensibiliser les cellules cancéreuses à la mort tumorale induite par la radiothérapie, nous avons étudié la mort cellulaire par un marquage Annexine V / 7AAD, analysé en cytométrie en flux (Figure 38).

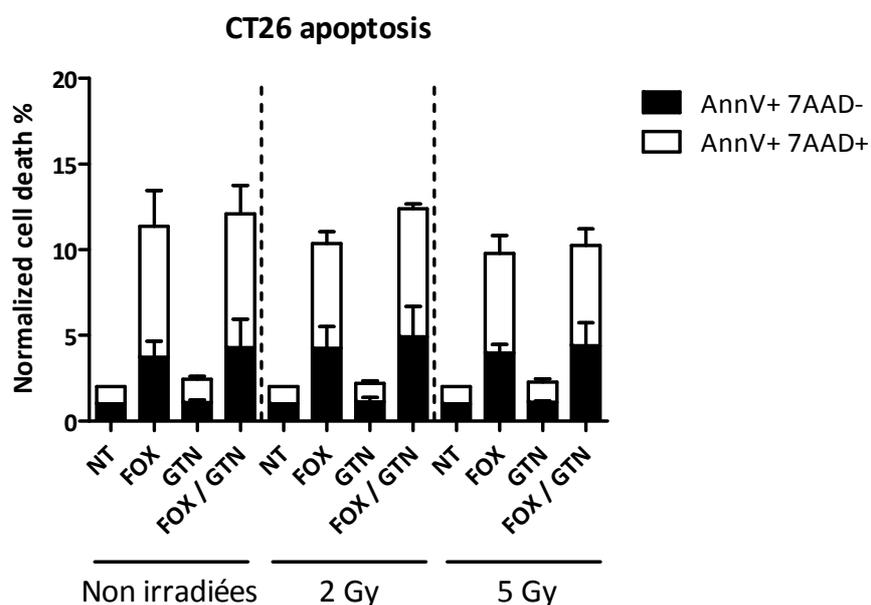


Figure 38. Absence d'effet sensibilisateur de la radiothérapie sur la mort cellulaire induite par le FOX et / ou le GTN. Des cellules CT26 ont été ensemencées à raison de $4,2 \cdot 10^4$ cellules/cm², traitées le lendemain par du FOX (25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ d'OXA + 5 μM de 5-Fu) et/ou par du GTN à 100 μM durant 20H puis irradiées à 2 Gy et 5 Gy. 6H post-irradiation, un marquage Annexine V / 7AAD est réalisé puis la mort cellulaire est analysée par cytométrie en flux

Lorsque les cellules sont irradiées à 2 Gy et 5 Gy, nous pouvons observer que l'irradiation n'induit aucun effet *in vitro* sur la mort cellulaire induite par le FOX. En effet, l'association

FOX / Irradiation induit environ 10% de mortalité contre 11% lorsque les cellules sont traitées seulement avec du FOX. La combinaison FOX / GTN associée à l'irradiation induit environ 11% de mortalité contre 12% seule.

Comme précédemment, nous nous sommes par la suite intéressés à l'induction de la mort cellulaire immunogène et plus précisément à ses caractéristiques qui sont la libération de la protéine pro-inflammatoire HMGB1, la sécrétion d'ATP et l'externalisation de la CRT.

4.3 Caractérisation de la mort immunogène

4.3.1 Sécrétion des facteurs immunogènes solubles

La recherche des facteurs immunogènes solubles, caractérisant la mort cellulaire immunogène, est réalisée par un test ELISA anti-HMGB1 et une détection de l'ATP par bioluminescence dans les surnageants de culture de cellules préalablement traitées par du FOX et/ou GTN suivi d'une irradiation (*Figure 39*).

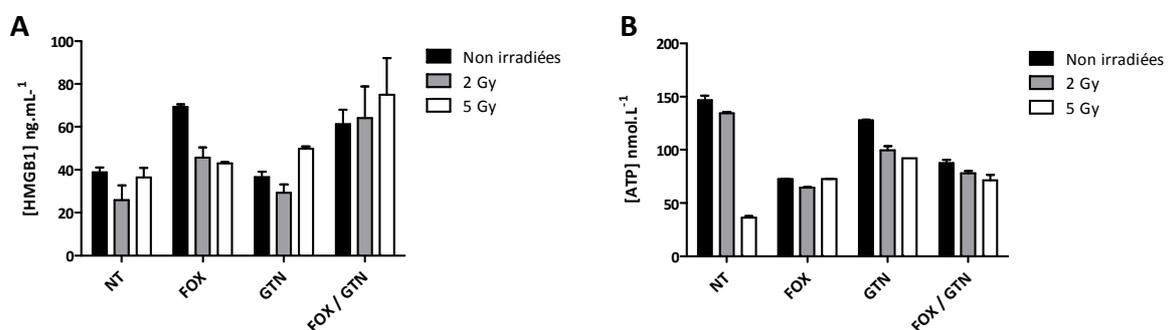


Figure 39. Absence d'effet synergique de la radiothérapie sur la sécrétion des facteurs immunogènes solubles induite par la combinaison FOX / GTN. Des cellules CT26 ont étéensemencées à raison de 4.10^5 cellules/puit, traitées le lendemain par du FOX ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ d'OXA + $5 \mu\text{M}$ de 5-Fu) et/ou par du GTN à $100 \mu\text{M}$ durant 20H puis irradiées à 2 Gy et 5 Gy. 6H post-irradiation, un dosage HMGB1 (A) ainsi qu'un dosage ATP (B) sont réalisés

L'irradiation des cellules à 2 Gy et 5 Gy n'induit pas de sécrétion des facteurs immunogènes solubles contrairement à ce qui peut être observé avec le FOX. L'association de la radiothérapie à la combinaison FOX / GTN n'induit aucune variation des taux d'HMGB1 et ATP sécrétés.

4.3.2 Externalisation de la calréticuline

Nous avons réalisé un marquage membranaire de la CRT après traitement des cellules par le FOX et/ou GTN et après irradiation, puis observé sa localisation par microscopie à fluorescence (Figure 40).

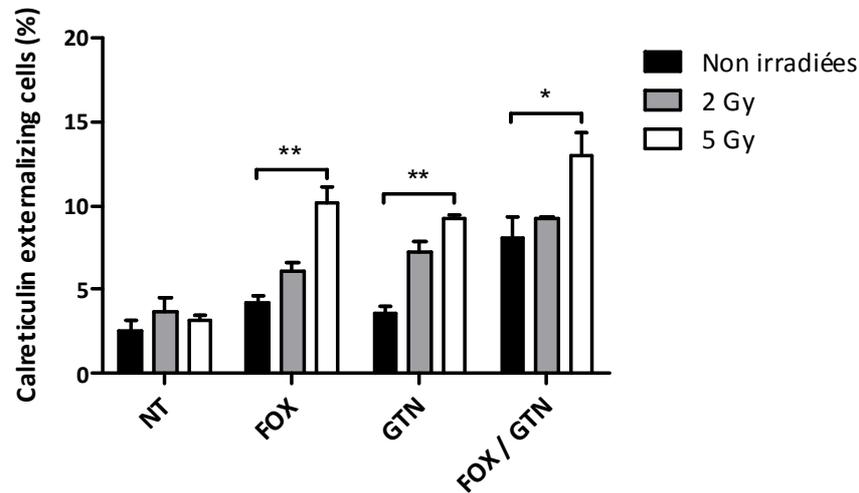


Figure 40. Externalisation de la CRT en réponse à l'association FOX / GTN / Radiothérapie. Des cellules CT26 ont été ensemencées à raison de 4.10^5 cellules/puit, traitées le lendemain par du FOX ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ d'OXA + $5 \mu\text{M}$ de 5-Fu) et/ou par du GTN à $100 \mu\text{M}$ durant 20H puis irradiées à 2 Gy et 5 Gy. 6H post-irradiation, un marquage membranaire de la calréticuline a été effectué puis analysé par comptage en microscopie à fluorescence. Test statistique Two-way ANOVA : * $p < 0.005$, ** $p < 0.01$

Lorsque les cellules sont irradiées, nous pouvons tout d'abord observer que l'irradiation seule n'induit pas d'externalisation de la CRT. Par contre, lorsqu'elle est associée au FOX et/ou au GTN, nous pouvons observer une augmentation de l'externalisation de la CRT, de manière dose dépendante. En effet, celle-ci est augmentée à 5 Gy comparativement à 2 Gy. De plus, nous pouvons constater que l'externalisation de la CRT la plus importante est lorsque les cellules sont traitées par la combinaison FOX / GTN suivi d'une irradiation à 5 Gy. Cela veut donc dire que l'irradiation pourrait avoir un effet potentialisateur sur l'externalisation de la CRT induite par la combinaison FOX / GTN.

➡ Pour résumer cette seconde partie, nous avons pu mettre en évidence *in vivo* un effet anti-tumoral de l'irradiation 1 x 10 Gy qui est nettement augmenté avec une radiothérapie fractionnée 3 x 8 Gy. Fait intéressant, nous avons également pu observer deux types de réponses lorsque les souris sont traitées par du FOX et/ou du Nitronal suivi d'une irradiation au niveau de la tumeur de 3 x 8 Gy, montrant une hétérogénéité des tumeurs, comme ce qui

a déjà pu être montré (Duraismamy et al., 2013). De plus, *in vitro*, nous avons pu mettre en évidence l'implication de l'irradiation dans l'ICD, plus précisément dans l'externalisation de la CRT. En effet, nous avons pu observer que l'externalisation de la CRT précédemment observé avec la combinaison FOX / GTN peut être accentuée avec l'irradiation 5 Gy.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Au travers de cette étude, nous nous sommes intéressés à l'effet potentialisateur du NO sur l'effet anti-tumoral de chimiothérapies associées ou non à une radiothérapie.

Nous avons dans un premier temps étudié l'effet potentialisateur du NO sur l'activité anti-tumorale du FOX. Après traitements de souris Balb/c porteuses de tumeurs sous-cutanées d'origine colique par du Nitronal associé ou non à du FOX, nous avons tout d'abord pu observer que le FOX induit un ralentissement de la croissance tumorale, comme ce qui est décrit dans la littérature (Gustavsson et al., 2015). Nous avons également pu observer que le Nitronal n'influe pas sur la croissance tumorale. En revanche lorsqu'il est associé au FOX, nous avons pu mettre en évidence un effet synergique sur l'inhibition de cette croissance (*Figure 22*). Ces résultats ont également été retrouvés dans un modèle de cancer mimant la formation de métastases pulmonaires d'origine colique (*Figure 23*). Le NO potentialise donc l'activité anti-tumorale du FOX dans des modèles plus ou moins avancés de cancer d'origine colique.

Par la suite, nous avons recherché par quels mécanismes le NO potentialisait l'effet anti-tumoral du FOX. Le NO a été décrit par notre équipe mais également par d'autres équipes, comme un agent pouvant induire la mort des cellules tumorales (Millet et al., 2002; Prévotat et al., 2006). Cependant aux doses physiologiques utilisées dans notre étude, le NO n'induit aucune toxicité *in vitro* et ne potentialise pas l'effet cytotoxique des chimiothérapies utilisées (*Figure 24*). Nous avons alors pu mettre en évidence *in vivo* l'implication des cellules du système immunitaire. En effet, l'association FOX / Nitronal ne permet pas d'induire l'inhibition de la croissance tumorale dans des souris immunodéficientes telles que les souris Nude et NOD *scid gamma* (*Figure 25*). Les lymphocytes T et/ou les cellules NK sont donc impliqués dans le rôle potentialisateur du NO sur l'action anti-tumorale du FOX. Il serait alors très intéressant de déterminer, par cytométrie en flux, la nature des cellules immunitaires recrutées dans les tumeurs et ensuite voir l'implication des différentes populations T (Th1, Th2, Th17 et Treg) et des cellules NK dans cet effet.

L'implication des cellules du système immunitaire dans l'effet anti-tumoral de la combinaison FOX / Nitronal nous a conduit à étudier la mort cellulaire immunogène. En effet, il est connu que certaines chimiothérapies telles que l'oxaliplatine et la doxorubicine, mais également la radiothérapie, peuvent induire la mort cellulaire immunogène, un mécanisme induisant la mort des cellules tumorales par l'activation d'une réponse

immunitaire (Apetoh et al., 2008; Golden and Apetoh, 2015). Nous avons alors mis en évidence certains processus associés à la mort cellulaire immunogène générée par le traitement FOX dans notre modèle, avec la libération de facteurs solubles tel qu'HMGB1 dans le milieu extra-cellulaire (*Figure 26*) et l'externalisation de la CRT (*Figure 27-28*). Nous avons alors pu montrer pour la première fois que le GTN seul était également capable d'induire l'externalisation de la CRT et augmentait le taux d'externalisation de la CRT généré par le FOX (*Figure 27-28*). Cependant, contrairement au FOX, le GTN ne semble induire aucune sécrétion d'HMGB1 (*Figure 26*) et ne pourrait donc pas induire par lui-même de mort cellulaire immunogène. Un des facteurs que nous n'avons pas réussi à mettre en évidence dans notre modèle est la sécrétion d'ATP en réponse au traitement par le FOX et/ou au par le GTN. La libération d'ATP par les cellules tumorales en réponse au FOX est un évènement connu (Bezu et al., 2015) et le fait que nous ne l'ayons pas détecté pourrait probablement venir d'un problème de cinétique de réponse. Il serait donc intéressant d'observer la libération d'ATP à des temps plus précoces tels que 6H post-traitement des cellules CT26 afin de démontrer si le traitement par le GTN peut induire cette libération ou potentialiser celle induite par le FOX.

Nous nous sommes alors intéressés aux mécanismes d'externalisation de la calréticuline induits par le GTN et avons recherché plus précisément le rôle du NO. L'utilisation d'un piègeur du NO, comme le cPTIO, nous a permis de montrer que l'externalisation de la CRT était dépendante de la présence de NO. De manière surprenante, nous avons montré que l'externalisation de la CRT induite par le FOX est elle aussi dépendante de la présence de NO, démontrant un rôle majeur du NO dans ce mécanisme (*Figure 31*). Le FOX étant une chimiothérapie, nous avons recherché par quel moyen la cellule induisait la production de NO en réponse à la chimiothérapie en ciblant tout particulièrement la NO synthase inductible (NOSII). Nous avons alors pu montrer que dans les cellules cancéreuses coliques murines CT26, seul le 5-Fu peut induire l'expression de la NOSII (*Figure 32*), suggérant que le 5-Fu active la voie NF- κ B, une voie de signalisation majeure dans la transcription de la NOSII (Vannini et al., 2015). Il serait donc intéressant de mieux comprendre le mécanisme par lequel le 5-Fu induit l'expression de la NOSII en analysant plus particulièrement la voie NF- κ B. D'autre part, nous utiliserons la technique CRISPR/Cas9 pour invalider le gène de la NOSII

dans les cellules CT26 afin de tester le rôle du NO sur l'effet anti-tumoral de la combinaison FOX / GTN dans des souris Balb/c après injection de ces cellules.

Afin de déterminer comment le NO peut jouer un rôle sur ce mécanisme d'externalisation de la CRT, nous sommes allés rechercher un mécanisme direct du NO sur la calréticuline. En effet, selon le site GPS-SNO 1.0, la CRT présente trois sites putatifs de S-Nitrosylation (cystéines 105, 137 et 163). Des expériences préliminaires nous ont alors permis de montrer pour la première fois que la CRT était S-nitrosylée en réponse au GTN ou à un autre donneur de NO, le Cys-NO. Il est nécessaire de réitérer cette expérience afin de valider la S-nitrosylation de la CRT mais également de tester si cette protéine peut être S-nitrosylée en réponse au FOX. Afin de déterminer si la S-nitrosylation de la CRT est l'évènement clé du mécanisme d'externalisation, des lignées de cellules CT26, invalidées pour le gène de CRT par shRNA et exprimant des formes mutantes de la CRT sur les différentes cystéines sont en cours de construction. L'implication de l'externalisation de la CRT dans l'effet anti-tumoral de la combinaison FOX / Nitronal sera alors analysée *in vivo* après injection de ces cellules chez la souris Balb/c traitées par du FOX et/ou du Nitronal.

L'effet direct du NO sur la CRT peut également impliquer un autre mécanisme post-traductionnel induit par le NO, la tyrosine Nitration. En effet, selon le logiciel GPS-YNO, la CRT présenterait également trois sites putatifs de tyrosine-nitration sur ses tyrosines 285, 299 et 338. Il est donc prévu d'étudier l'état de tyrosine nitration de la CRT après traitement au GTN en vue d'étudier si cette modification post-traductionnelle a un impact sur l'effet anti-tumoral de la combinaison FOX / GTN.

Le NO pourrait ne pas agir uniquement par une action directe sur la calréticuline, la voie de signalisation générant ce mécanisme d'externalisation pourrait également être sa cible. La voie du stress du réticulum passe par la phosphorylation de PERK, générant la phosphorylation d'eIF2 α (Panaretakis et al., 2009). Or, PERK est une protéine pouvant être la cible du NO via sa S-nitrosylation (Nakato et al., 2015). Nous avons alors montré que tout comme le FOX, le GTN induit la phosphorylation de PERK mais de manière plus tardive (6H avec le GTN versus 1H avec le FOX). Concernant la phosphorylation de la protéine eIF2 α , aucune différence n'est observée après traitement des cellules par du FOX et/ou par du GTN (*Figure 33*). Il se peut qu'une heure de traitement soit trop long pour observer l'effet de la combinaison FOX / GTN, l'externalisation de la CRT étant observée dès 6H de traitement.

L'implication du NO dans ce mécanisme pourra également être testée après ajout de c-PTIO à ces différents traitements. De plus, le rôle de la S-nitrosylation de PERK dans le mécanisme d'externalisation de la CRT sera recherché en déterminant si le GTN, tout comme le FOX peuvent induire cette S-nitrosylation. Des cellules CT26 mutantes pour la protéine PERK sur ses sites de S-nitrosylation seront également construites afin de déterminer l'impact de cette modification post-traductionnelle i) sur la voie d'externalisation de la CRT, via la phosphorylation d'eIF2 α , ii) sur l'effet anti-tumoral de la combinaison FOX / GTN *in vivo*, chez la souris Balb/c après injection de ces cellules.

Pour poursuivre dans l'implication du NO sur la voie d'externalisation de la CRT, nous pourrions également nous intéresser à la voie des intégrines. En effet, l'implication des intégrines a récemment été mise en évidence dans la régulation de l'externalisation de la CRT, en montrant que l' α -intégrine inhibe ce mécanisme (Liu et al., 2016). L'activation de la voie des intégrines est un mécanisme dépendant de la phosphorylation de la FAK. Or des résultats de l'équipe mettent en évidence la diminution d'expression des intégrines en réponse au GTN via l'inhibition de la phosphorylation de la FAK due à sa tyrosine nitration (données non publiées). Il serait donc intéressant d'étudier l'implication de la FAK et de sa régulation par le NO dans le processus d'externalisation de la CRT.

A ce jour, les chimiothérapies ne sont pas les seules à pouvoir induire la mort cellulaire immunogène. En effet, la radiothérapie peut également induire l'ICD en induisant un stress du réticulum endoplasmique impliqué dans la mort cellulaire immunogène (Golden and Apetoh, 2015). Afin d'accentuer l'effet anti-tumoral de la combinaison FOX / GTN observé auparavant, nous nous sommes intéressés à l'association de la combinaison FOX / GTN avec de la radiothérapie. Nous avons tout d'abord pu observer *in vivo* un impact de la radiothérapie sur la croissance tumorale de souris Balb/c porteuses de tumeurs sous-cutanées. De plus, nous avons pu démontrer qu'une irradiation fractionnée (3 x 8 Gy) induit un effet anti-tumoral supérieur à celui généré par une dose plus forte délivrée en une seule fois (1 x 10 Gy) (Figure 35-36). Ces résultats vont être le point de départ d'une étude visant à mettre en avant le bénéfice du traitement par radiothérapie fractionnée (Collaboration avec Céline Mirjolet). En revanche, aucun effet significatif n'est observé en présence de FOX et/ou de Nitronal, si ce n'est une tendance à induire une meilleure réponse antitumorale (Figure 37).

L'implication de la mort cellulaire immunogène dans cette combinaison Radiothérapie / FOX / GTN a été recherchée. Aucun effet additif n'a pu être attribué à la radiothérapie quant à la sécrétion d'HMGB1 et d'ATP (*Figure 39*). Cependant, nous avons pu mettre en évidence l'implication de l'irradiation dans l'externalisation de la CRT. En effet, *in vitro*, nous avons pu observer que l'externalisation de la CRT préalablement observée avec la combinaison FOX / GTN peut être accentuée avec une irradiation à 2 Gy et 5 Gy (*Figure 40*). L'irradiation a donc un effet potentialisateur sur l'externalisation de la CRT induite par la combinaison FOX / GTN. L'association Radiothérapie / FOX / GTN peut donc représenter une thérapie prometteuse avec comme avantage de n'utiliser que de faibles doses de radiothérapie administrée en fractionné.

Tous ces travaux sont donc en faveur de l'utilisation du GTN associé à de la chimiothérapie combinée ou non à de la radiothérapie. Le GTN favoriserait la mort immunogène en induisant et/ou accentuant l'externalisation de la CRT. Le GTN en lui-même ne peut pas être défini comme une molécule pouvant induire l'ICD puisqu'à des concentrations physiologiques, il est incapable d'induire la sécrétion des facteurs immunogènes solubles. De plus, nous ne pouvons pas réaliser les tests de vaccination nécessaires (Introduction ; Partie B ; Paragraphe 3.) pour valider son caractère immunogène puisqu'à ces mêmes concentrations, il ne tue pas les cellules tumorales. Cependant, le GTN pourrait présenter la capacité de rendre immunogène une chimiothérapie non immunogène et pourrait donc avoir un rôle très important en clinique où de nombreuses chimiothérapies utilisées comme traitement de référence ne sont pas immunogènes. En effet, nous avons pu montrer que le traitement des cellules CT26 par des chimiothérapies non immunogènes telles que le cisplatine, la gemcitabine ou la mitomycine C, n'induit aucune externalisation de la CRT, contrairement à ce que nous pouvons observer lors de l'ajout du GTN à ces chimiothérapies (*Figure 34*). Afin de valider cette hypothèse, nous testerons l'effet anti-tumoral de combinaisons de chimiothérapies non-immunogènes et de GTN et montrerons l'implication du système immunitaire, et plus précisément des lymphocytes T CD8+ en réalisant une déplétion de ces cellules dans les souris porteuses de tumeurs CT26. De plus, et afin de valider le potentiel immunogène de l'association de ces chimiothérapies non-immunogènes combinées au GTN, des tests de vaccination seront réalisés également avec ces combinaisons.

L'utilisation d'un donneur de NO en clinique n'est pas une idée nouvelle puisque des études cliniques de phase I/II ont déjà démontré l'effet bénéfique de l'ajout de patchs de GTN à des chimiothérapies telles que la vinorelbine et le cisplatine dans des cancers avancés de poumons (NSCLC). Dans cette étude, il a été montré que le taux de réponse ainsi que la médiane de temps sans progression de la maladie sont augmentés lorsque l'association vinorelbine / cisplatine et/ou radiothérapie est combinée à du GTN sous forme de patchs de trinitrine (Arrieta et al., 2014 ; Yasuda et al., 2006). Cependant, d'autres études ont montré l'absence de bénéfice de l'ajout de patchs de Trinitrine lors de la combinaison avec d'autres chimiothérapies telles que le carboplatine (Dingemans et al., 2015). Penser que le GTN pourrait rendre immunogène toutes les chimiothérapies serait alors peut-être utopique. Il faudrait pouvoir tester pour chaque chimiothérapie ou combinaison de chimiothérapies la capacité du GTN à les rendre immunogènes (Technique de vaccination) selon l'origine de la tumeur. En effet, tous ces travaux ont été obtenus à partir d'un modèle utilisant la lignée de cellules cancéreuses coliques murines CT26. Ces résultats devront être confirmés en utilisant une autre lignée de cancer colique telle que les cellules C51 et/ou les cellules MC38. De plus, afin d'élargir ce type de traitement à des cancers de diverses origines, nous analyserons également l'impact de ces associations chimiothérapeutiques sur des cellules de cancer du sein telles que les cellules 4T1 et/ou les cellules EMT-6 mais également sur des cellules de mélanome telles que les cellules B16F10.

En effet, nos expériences précliniques nous ont permis de révéler une hétérogénéité de réponse à nos traitements au sein des différents groupes de souris porteuses de tumeurs sous-cutanée (*Figure 37 B*). Si l'on observe les courbes de croissance des tumeurs prises individuellement, elles montrent une forte hétérogénéité de la croissance tumorale, tout comme avait pu l'observer Duraiswamy dans ses travaux (Duraiswamy et al., 2013). Certaines tumeurs échappent rapidement au traitement alors qu'à l'inverse d'autres tumeurs présentent une très faible croissance tumorale. L'échappement à la surveillance du système immunitaire étant en grande partie dû à l'expression de molécules inhibitrices telles que les « points de contrôles négatifs immunitaires », l'association de ces combinaisons de traitement avec un anticorps bloquant les points de contrôle immunitaire, tel que l' α -PD-1 peut être envisagé (Pardoll, 2012).

Actuellement, l'efficacité de ces thérapies dans les cancers du côlon reste limitée (Brahmer et al., 2012 ; Topalian et al., 2012). Cependant, des résultats non publiés ont pu montrer l'importance de combiner les chimiothérapies immunogènes à des inhibiteurs de point de contrôle immunitaire afin d'obtenir une immunité anti-tumorale à long terme ainsi que l'éradication de la tumeur, cet effet étant absent lors de l'utilisation d'une chimiothérapie non immunogène. De plus, une étude clinique de phase II a récemment pu montrer une réponse objective au pembrolizumab (Ac anti-PD-1) combiné à un anticorps anti-PD-1 lorsque les patients présentaient des défauts de réparation (Le et al., 2015). En effet, la réponse à ces inhibiteurs de « checks points » immunitaires semble d'autant meilleure que le taux de mutations et de néoantigènes formés sont importants. Le GTN par sa capacité à induire la désamination des bases puriques et pyrimidines pourrait donc favoriser ce type de traitement. Il serait donc intéressant d'utiliser un « immune checkpoint inhibiteur » tel qu'un anticorps anti-PD-1 qui permettrait de réactiver le système immunitaire et ainsi de lutter plus efficacement contre les cellules tumorales qui n'ont pas ou peu répondu au traitement dans le but d'obtenir un effet anti-tumoral optimal.

La totalité des résultats précliniques obtenus au cours de ces travaux servent de pierre angulaire à la mise en place d'un essai clinique au Centre anti-cancéreux Georges François Leclerc (CGFL). En collaboration avec le Dr Nicolas Isambert (Oncologue au CGFL) nous mettons en place un essai clinique de phase I/II chez des patients porteurs de cancer du côlon métastatique et traités par des chimiothérapies à base de FOLFOX, un anticorps anti-PD-1 et associé à des patchs de Trinitrine (escalade de dose).

Durant ces trois années de diplôme EPHE, j'ai également eu l'opportunité de travailler en collaboration avec une équipe de chimistes (équipe UMR 6302 CNRS, Institut de Chimie Moléculaire de Bourgogne (ICMUB)) située à Dijon. Les différents projets portaient sur la caractérisation de l'effet cytotoxique, voire anti-tumoral de nouvelles molécules telles que des phosphines couplées à une molécule d'or (Coumarine-phosphine) et des phosphoniums. L'étude des mécanismes d'action de ces molécules *in vitro*, sur des lignées cellulaires humaines mais également *in vivo*, chez le modèle de poisson *Danio rerio* nous a permis de publier un article dans *Journal of Medicinal Chemistry* (Ali et al., 2015). Dans un deuxième temps, nous avons développé et caractérisé une sonde « intelligente » à bases de coumarine-phosphine, capable de changer de couleur selon l'environnement biologique.

Cette étude a également débouché sur une publication dans le journal *Journal of Inorganic Chemistry* (Dondaine et al., 2016). Enfin, nous travaillons actuellement sur d'autres molécules chimiques de type « bodipy » couplés à une molécule d'or et étudions leurs effets anti-inflammatoires et anticancéreux *in vitro*, sur une lignée cellulaire cancéreuse humaine.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ali, M., L. Dondaine, A. Adolle, C. Sampaio, F. Chotard, P. Richard, F. Denat, A. Bettaieb, P. Le Gendre, V. Laurens, C. Goze, C. Paul, and E. Bodio. 2015. Anticancer Agents: Does a Phosponium Behave Like a Gold(I) Phosphine Complex? Let a "Smart" Probe Answer! *J Med Chem* 58:4521-4528.
- Ansell, S.M. 2015. Targeting immune checkpoints in lymphoma. *Curr Opin Hematol* 22:337-342.
- Apetoh, L., F. Ghiringhelli, A. Tesniere, A. Criollo, C. Ortiz, R. Lidereau, C. Mariette, N. Chaput, J.P. Mira, S. Delalogue, F. André, T. Tursz, G. Kroemer, and L. Zitvogel. 2007a. The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Immunol Rev* 220:47-59.
- Apetoh, L., F. Ghiringhelli, A. Tesniere, M. Obeid, C. Ortiz, A. Criollo, G. Mignot, M.C. Maiuri, E. Ullrich, P. Saulnier, H. Yang, S. Amigorena, B. Ryffel, F.J. Barrat, P. Saftig, F. Levi, R. Lidereau, C. Nogues, J.P. Mira, A. Chompret, V. Joulin, F. Clavel-Chapelon, J. Bourhis, F. André, S. Delalogue, T. Tursz, G. Kroemer, and L. Zitvogel. 2007b. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* 13:1050-1059.
- Apetoh, L., G. Mignot, T. Panaretakis, G. Kroemer, and L. Zitvogel. 2008. Immunogenicity of anthracyclines: moving towards more personalized medicine. *Trends Mol Med* 14:141-151.
- Arrieta, O., M. Blake, M.D. de la Mata-Moya, F. Corona, J. Turcott, D. Orta, J. Alexander-Alatorre, and D. Gallardo-Rincón. 2014. Phase II study. Concurrent chemotherapy and radiotherapy with nitroglycerin in locally advanced non-small cell lung cancer. *Radiother Oncol* 111:311-315.
- Aschele, C., F. Bergamo, and S. Lonardi. 2009. Chemotherapy for operable and advanced colorectal cancer. *Cancer Treat Rev* 35:509-516.
- Bal-Price, A., J. Gartlon, and G.C. Brown. 2006. Nitric oxide stimulates PC12 cell proliferation via cGMP and inhibits at higher concentrations mainly via energy depletion. *Nitric Oxide* 14:238-246.
- Bettaieb, A, S. Plenchette, C. Paul, V. Laurens, S. Romagny, and J. Jeannin. Springer 2015. S-Nitrosylation in Cancer Cells : To Prevent or to Cause? In Nitric Oxide and Cancer. *Pathogenesis and Therapy (Benjamin Bonnavida)*
- Bezu, L., L.C. Gomes-de-Silva, H. Dewitte, K. Breckpot, J. Fucikova, R. Spisek, L. Galluzzi, O. Kepp, and G. Kroemer. 2015. Combinatorial strategies for the induction of immunogenic cell death. *Front Immunol* 6:187.
- Bogdan, C. 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2:907-916.
- Boina-Ali, R, M. Cortier, N. Decolgne, C. Racoer-Godard, C. Seigne, M. Lamrani, J.F., Jeannin, C.Paul, and A. Bettaieb. 2013. Activation of Akt by the Mammalian Target of Rapamycin Complex 2 Renders Colon Cancer Cells Sensitive to Apoptosis Induced by Nitric Oxide and Akt Inhibitor. *J Carcinog Mutagen* 58:004:
- Boisdron-Celle, M, V. Guerin-Meyer, and O. Capitain. 2013. 5-Fluorouracile : MSI, pharmacocinétique, DPD, TYMS et MTHFR. *Springer-Verlag Paris* 978-2-8178-0426-2:
- Bokemeyer, C., C.H. Köhne, F. Ciardiello, H.J. Lenz, V. Heinemann, U. Klinkhardt, F. Beier, K. Duecker, J.H. van Krieken, and S. Tejpar. 2015. FOLFOX4 plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 51:1243-1252.
- Brahmer, J.R., S.S. Tykodi, L.Q. Chow, W.J. Hwu, S.L. Topalian, P. Hwu, C.G. Drake, L.H. Camacho, J. Kauh, K. Odunsi, H.C. Pitot, O. Hamid, S. Bhatia, R. Martins, K. Eaton, S. Chen, T.M. Salay, S. Alaparthi, J.F. Grosso, A.J. Korman, S.M. Parker, S. Agrawal, S.M.

- Goldberg, D.M. Pardoll, A. Gupta, and J.M. Wigginton. 2012. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* 366:2455-2465.
- Burke, A.J., F.J. Sullivan, F.J. Giles, and S.A. Glynn. 2013. The yin and yang of nitric oxide in cancer progression. *Carcinogenesis* 34:503-512.
- Bustin, M. 1999. Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal proteins. *Mol Cell Biol* 19:5237-5246.
- Casares, N., M.O. Pequignot, A. Tesniere, F. Ghiringhelli, S. Roux, N. Chaput, E. Schmitt, A. Hamai, S. Hervas-Stubbs, M. Obeid, F. Coutant, D. Métivier, E. Pichard, P. Aucouturier, G. Pierron, C. Garrido, L. Zitvogel, and G. Kroemer. 2005. Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *J Exp Med* 202:1691-1701.
- Chao, M.P., S. Jaiswal, R. Weissman-Tsukamoto, A.A. Alizadeh, A.J. Gentles, J. Volkmer, K. Weiskopf, S.B. Willingham, T. Raveh, C.Y. Park, R. Majeti, and I.L. Weissman. 2010. Calreticulin is the dominant pro-phagocytic signal on multiple human cancers and is counterbalanced by CD47. *Sci Transl Med* 2:63ra94.
- Chen, C.F., M.Y. Huang, C.J. Huang, C.H. Wu, Y.S. Yeh, H.L. Tsai, C.J. Ma, C.Y. Lu, S.J. Chang, M.J. Chen, and J.Y. Wang. 2012. A observational study of the efficacy and safety of capecitabine versus bolus infusional 5-fluorouracil in pre-operative chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 27:727-736.
- Chen, Z., M.W. Foster, J. Zhang, L. Mao, H.A. Rockman, T. Kawamoto, K. Kitagawa, K.I. Nakayama, D.T. Hess, and J.S. Stamler. 2005. An essential role for mitochondrial aldehyde dehydrogenase in nitroglycerin bioactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:12159-12164.
- Chen, Z., J. Zhang, and J.S. Stamler. 2002. Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:8306-8311.
- Chung, C., and M. Christianson. 2014. Predictive and prognostic biomarkers with therapeutic targets in breast, colorectal, and non-small cell lung cancers: a systemic review of current development, evidence, and recommendation. *J Oncol Pharm Pract* 20:11-28.
- Chung, P., T. Cook, K. Liu, Y. Vodovotz, R. Zamora, S. Finkelstein, T. Billiar, and D. Blumberg. 2003. Overexpression of the human inducible nitric oxide synthase gene enhances radiation-induced apoptosis in colorectal cancer cells via a caspase-dependent mechanism. *Nitric Oxide* 8:119-126.
- Comella, P., R. Casaretti, A. Avallone, and L. Franco. 2010. Optimizing the management of metastatic colorectal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 75:15-26.
- Cortier, M., R. Boina-Ali, C. Racœur, C. Paul, E. Solary, J.F. Jeannin, and A. Bettaieb. 2015. H89 enhances the sensitivity of cancer cells to glyceryl trinitrate through a purinergic receptor-dependent pathway. *Oncotarget* 6:6877-6886.
- de Gramont, A., A. Figer, M. Seymour, M. Homerin, A. Hmissi, J. Cassidy, C. Boni, H. Cortes-Funes, A. Cervantes, G. Freyer, D. Papamichael, N. Le Bail, C. Louvet, D. Hendler, F. de Braud, C. Wilson, F. Morvan, and A. Bonetti. 2000. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 18:2938-2947.
- De Roock, W., B. Claes, D. Bernasconi, J. De Schutter, B. Biesmans, G. Fountzilias, K.T. Kalogerias, V. Kotoula, D. Papamichael, P. Laurent-Puig, F. Penault-Llorca, P. Rougier, B. Vincenzi, D. Santini, G. Tonini, F. Cappuzzo, M. Frattini, F. Molinari, P. Saletti, S. De Dosso, M. Martini, A. Bardelli, S. Siena, A. Sartore-Bianchi, J. Tabernero, T. Macarulla,

- F. Di Fiore, A.O. Gangloff, F. Ciardiello, P. Pfeiffer, C. Qvortrup, T.P. Hansen, E. Van Cutsem, H. Piessevaux, D. Lambrechts, M. Delorenzi, and S. Tejpar. 2010. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol* 11:753-762.
- Degirmenci, M., B. Karaca, G. Gorumlu, R. Durusoy, G. Demir Piskin, M.T. Bozkurt, Y. Cirak, D. Tunali, B. Karabulut, U.A. Sanli, and R. Uslu. 2010. Efficacy and safety of bevacizumab plus capecitabine and irinotecan regimen for metastatic colorectal cancer. *Med Oncol* 27:585-591.
- DeVita, V.T., and E. Chu. 2008. A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res* 68:8643-8653.
- Dingemans, A.M., H.J. Groen, G.J. Herder, J.A. Stigt, E.F. Smit, I. Bahce, J.A. Burgers, B.E. van den Borne, B. Biesma, A. Vincent, V. van der Noort, J.G. Aerts, and N.s. group. 2015. A randomized phase II study comparing paclitaxel-carboplatin-bevacizumab with or without nitroglycerin patches in patients with stage IV nonsquamous non-small-cell lung cancer: NVALT12 (NCT01171170)†. *Ann Oncol* 26:2286-2293.
- Dondaine, L., D. Escurado, M. Ali, P. Richard, F. Denat, A. Bettaieb, P.L. Gendre, C. Paul, D. Jacquemin, C. Goze, and E. Bodio. 2016. Coumarin-Phosphine-Based Smart Probes for Tracking Biologically Relevant Metal Complexes: From Theoretical to Biological Investigations. *European Journal of Inorganic Chemistry*
- Duraiswamy, J., K.M. Kaluza, G.J. Freeman, and G. Coukos. 2013. Dual blockade of PD-1 and CTLA-4 combined with tumor vaccine effectively restores T-cell rejection function in tumors. *Cancer Res* 73:3591-3603.
- Escudier, B., T. Dorval, N. Chaput, F. André, M.P. Caby, S. Novault, C. Flament, C. Leboulaire, C. Borg, S. Amigorena, C. Boccaccio, C. Bonnerot, O. Dhellin, M. Movassagh, S. Piperno, C. Robert, V. Serra, N. Valente, J.B. Le Pecq, A. Spatz, O. Lantz, T. Tursz, E. Angevin, and L. Zitvogel. 2005. Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial. *J Transl Med* 3:10.
- Evig, C.B., E.E. Kelley, C.J. Weydert, Y. Chu, G.R. Buettner, and C.P. Burns. 2004. Endogenous production and exogenous exposure to nitric oxide augment doxorubicin cytotoxicity for breast cancer cells but not cardiac myoblasts. *Nitric Oxide* 10:119-129.
- Extra, J.M., M. Espie, F. Calvo, C. Ferme, L. Mignot, and M. Marty. 1990. Phase I study of oxaliplatin in patients with advanced cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 25:299-303.
- Ferlay, J., I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D.M. Parkin, D. Forman, and F. Bray. 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 136:E359-386.
- Franco, M.C., and A.G. Estévez. 2014. Tyrosine nitration as mediator of cell death. *Cell Mol Life Sci* 71:3939-3950.
- Frederiksen, L.J., R. Sullivan, L.R. Maxwell, S.K. Macdonald-Goodfellow, M.A. Adams, B.M. Bennett, D.R. Siemens, and C.H. Graham. 2007. Chemosensitization of cancer in vitro and in vivo by nitric oxide signaling. *Clin Cancer Res* 13:2199-2206.
- Furchgott, R.F., and J.V. Zawadzki. 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288:373-376.
- Gajewski, T.F., H. Schreiber, and Y.X. Fu. 2013. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol* 14:1014-1022.

- Galluzzi, L., A. Buqué, O. Kepp, L. Zitvogel, and G. Kroemer. 2016. Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. *Nat Rev Immunol*
- Galon, J., A. Costes, F. Sanchez-Cabo, A. Kirilovsky, B. Mlecnik, C. Lagorce-Pagès, M. Tosolini, M. Camus, A. Berger, P. Wind, F. Zinzindohoué, P. Bruneval, P.H. Cugnenc, Z. Trajanoski, W.H. Fridman, and F. Pagès. 2006. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313:1960-1964.
- Ghiringhelli, F., L. Apetoh, A. Tesniere, L. Aymeric, Y. Ma, C. Ortiz, K. Vermaelen, T. Panaretakis, G. Mignot, E. Ullrich, J.L. Perfettini, F. Schlemmer, E. Tasdemir, M. Uhl, P. Génin, A. Civas, B. Ryffel, J. Kanellopoulos, J. Tschopp, F. André, R. Lidereau, N.M. McLaughlin, N.M. Haynes, M.J. Smyth, G. Kroemer, and L. Zitvogel. 2009. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. *Nat Med* 15:1170-1178.
- Giuliano, A.E., D.M. Kirgan, J.M. Guenther, and D.L. Morton. 1994. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. *Ann Surg* 220:391-398; discussion 398-401.
- Golden, E.B., and L. Apetoh. 2015. Radiotherapy and immunogenic cell death. *Semin Radiat Oncol* 25:11-17.
- Goodwin, G.H., C. Sanders, and E.W. Johns. 1973. A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids. *Eur J Biochem* 38:14-19.
- Gould, N., P.T. Doulias, M. Tenopoulou, K. Raju, and H. Ischiropoulos. 2013. Regulation of protein function and signaling by reversible cysteine S-nitrosylation. *J Biol Chem* 288:26473-26479.
- Gupta, G.P., and J. Massagué. 2006. Cancer metastasis: building a framework. *Cell* 127:679-695.
- Gustavsson, B., G. Carlsson, D. Machover, N. Petrelli, A. Roth, H.J. Schmoll, K.M. Tveit, and F. Gibson. 2015. A review of the evolution of systemic chemotherapy in the management of colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 14:1-10.
- Hamid, O., C. Robert, A. Daud, F.S. Hodi, W.J. Hwu, R. Kefford, J.D. Wolchok, P. Hersey, R.W. Joseph, J.S. Weber, R. Dronca, T.C. Gangadhar, A. Patnaik, H. Zarour, A.M. Joshua, K. Gergich, J. Elassaiss-Schaap, A. Algazi, C. Mateus, P. Boasberg, P.C. Tumeu, B. Chmielowski, S.W. Ebbinghaus, X.N. Li, S.P. Kang, and A. Ribas. 2013. Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *N Engl J Med* 369:134-144.
- Hanahan, D., and R.A. Weinberg. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70.
- Hanahan, D., and R.A. Weinberg. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646-674.
- Herr, H.W., V.P. Laudone, R.A. Badalament, H.F. Oettgen, P.C. Sogani, B.D. Freedman, M.R. Melamed, and W.F. Whitmore. 1988. Bacillus Calmette-Guérin therapy alters the progression of superficial bladder cancer. *J Clin Oncol* 6:1450-1455.
- Hess, V., R. Winterhalder, R. von Moos, L. Widmer, P. Stocker, M. Jermann, R. Herrmann, and D. Koeberle. 2016. Capecitabine and Oxaliplatin Prior and Concurrent to Preoperative Pelvic Radiotherapy in Patients With Locally Advanced Rectal Cancer: Long-Term Outcome. *Clin Colorectal Cancer*
- Hickok, J.R., and D.D. Thomas. 2010. Nitric oxide and cancer therapy: the emperor has NO clothes. *Curr Pharm Des* 16:381-391.

- Hofheinz, R.D., F. Wenz, S. Post, A. Matzdorff, S. Laechelt, J.T. Hartmann, L. Müller, H. Link, M. Moehler, E. Kettner, E. Fritz, U. Hieber, H.W. Lindemann, M. Grunewald, S. Kremers, C. Constantin, M. Hipp, G. Hartung, D. Gencer, P. Kienle, I. Burkholder, and A. Hochhaus. 2012. Chemoradiotherapy with capecitabine versus fluorouracil for locally advanced rectal cancer: a randomised, multicentre, non-inferiority, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 13:579-588.
- Hogg, N. 2000. Biological chemistry and clinical potential of S-nitrosothiols. *Free Radic Biol Med* 28:1478-1486.
- Hollande, F., J. Pannequin, and D. Joubert. 2010. The long road to colorectal cancer therapy: searching for the right signals. *Drug Resist Updat* 13:44-56.
- Huerta, S., G. Baay-Guzman, C.R. Gonzalez-Bonilla, E.H. Livingston, S. Huerta-Yepe, and B. Bonavida. 2009. In vitro and in vivo sensitization of SW620 metastatic colon cancer cells to CDDP-induced apoptosis by the nitric oxide donor DETANONOate: Involvement of AIF. *Nitric Oxide* 20:182-194.
- Hynes, R.O. 2009. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* 326:1216-1219.
- Häfner, M.F., and J. Debus. 2016. Radiotherapy for Colorectal Cancer: Current Standards and Future Perspectives. *Visc Med* 32:172-177.
- Ignarro, L.J., G.M. Buga, K.S. Wood, R.E. Byrns, and G. Chaudhuri. 1987. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:9265-9269.
- Illum, H., D.H. Wang, J.E. Dowell, W.J. Hittson, J.R. Torrisi, J. Meyer, and S. Huerta. 2015. Phase I dose escalation trial of nitroglycerin in addition to 5-fluorouracil and radiation therapy for neoadjuvant treatment of operable rectal cancer. *Surgery* 158:460-465.
- Isambert, N., P. Fumoleau, C. Paul, C. Ferrand, S. Zanetta, J. Bauer, K. Ragot, G. Lizard, J.F. Jeannin, and M. Bardou. 2013. Phase I study of OM-174, a lipid A analogue, with assessment of immunological response, in patients with refractory solid tumors. *BMC Cancer* 13:172.
- Jalilian, M., S. Davis, M. Mohebbi, B. Sugamaram, I.W. Porter, S. Bell, S.K. Warriar, and R. Wale. 2016. Pathologic response to neoadjuvant treatment in locally advanced rectal cancer and impact on outcome. *J Gastrointest Oncol* 7:603-608.
- Jemal, A., F. Bray, M.M. Center, J. Ferlay, E. Ward, and D. Forman. 2011. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61:69-90.
- Jover, R., P. Zapater, A. Castells, X. Llor, M. Andreu, J. Cubiella, F. Balaguer, L. Sempere, R.M. Xicola, L. Bujanda, J.M. Reñé, J. Clofent, X. Bessa, J.D. Morillas, D. Nicolás-Pérez, E. Pons, A. Payá, C. Alenda, and G.O.G.o.t.S.G. Association. 2009. The efficacy of adjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil in colorectal cancer depends on the mismatch repair status. *Eur J Cancer* 45:365-373.
- Kalia, M. 2015. Biomarkers for personalized oncology: recent advances and future challenges. *Metabolism* 64:S16-21.
- Kawanishi, S., Y. Hiraku, S. Pinlaor, and N. Ma. 2006. Oxidative and nitrative DNA damage in animals and patients with inflammatory diseases in relation to inflammation-related carcinogenesis. *Biol Chem* 387:365-372.
- Keefer, L.K. 2003. Progress toward clinical application of the nitric oxide-releasing diazeniumdiolates. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43:585-607.
- Kepp, O., L. Senovilla, I. Vitale, E. Vacchelli, S. Adjemian, P. Agostinis, L. Apetoh, F. Aranda, V. Barnaba, N. Bloy, L. Bracci, K. Breckpot, D. Brough, A. Buqué, M.G. Castro, M. Cirone, M.I. Colombo, I. Cremer, S. Demaria, L. Dini, A.G. Eliopoulos, A. Faggioni, S.C.

- Formenti, J. Fučíková, L. Gabriele, U.S. Gaip, J. Galon, A. Garg, F. Ghiringhelli, N.A. Giese, Z.S. Guo, A. Hemminki, M. Herrmann, J.W. Hodge, S. Holdenrieder, J. Honeychurch, H.M. Hu, X. Huang, T.M. Illidge, K. Kono, M. Korbelik, D.V. Krysko, S. Loi, P.R. Lowenstein, E. Lugli, Y. Ma, F. Madeo, A.A. Manfredi, I. Martins, D. Mavilio, L. Menger, N. Merendino, M. Michaud, G. Mignot, K.L. Mossman, G. Multhoff, R. Oehler, F. Palombo, T. Panaretakis, J. Pol, E. Proietti, J.E. Ricci, C. Riganti, P. Rovere-Querini, A. Rubartelli, A. Sistigu, M.J. Smyth, J. Sonnemann, R. Spisek, J. Stagg, A.Q. Sukkurwala, E. Tartour, A. Thorburn, S.H. Thorne, P. Vandenabeele, F. Velotti, S.T. Workenhe, H. Yang, W.X. Zong, L. Zitvogel, G. Kroemer, and L. Galluzzi. 2014. Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death. *Oncoimmunology* 3:e955691.
- Kim, J.E., and S.R. Tannenbaum. 2004. S-Nitrosation regulates the activation of endogenous procaspase-9 in HT-29 human colon carcinoma cells. *J Biol Chem* 279:9758-9764.
- Klemenska, E., and A. Beresewicz. 2009. Bioactivation of organic nitrates and the mechanism of nitrate tolerance. *Cardiol J* 16:11-19.
- Kolyada, A.Y., N. Savikovskiy, and N.E. Madias. 1996. Transcriptional regulation of the human iNOS gene in vascular-smooth-muscle cells and macrophages: evidence for tissue specificity. *Biochem Biophys Res Commun* 220:600-605.
- Kroemer, G., L. Galluzzi, O. Kepp, and L. Zitvogel. 2013. Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annu Rev Immunol* 31:51-72.
- Ladoire, S., D. Hannani, M. Vetizou, C. Locher, L. Aymeric, L. Apetoh, O. Kepp, G. Kroemer, F. Ghiringhelli, and L. Zitvogel. 2014. Cell-death-associated molecular patterns as determinants of cancer immunogenicity. *Antioxid Redox Signal* 20:1098-1116.
- Lafay, L, and R. Ancellin. 2015. Food intake and colorectal. *Elsevier* 50,262-70:
- Le, D.T., J.N. Uram, H. Wang, B.R. Bartlett, H. Kemberling, A.D. Eyring, A.D. Skora, B.S. Luber, N.S. Azad, D. Laheru, B. Biedrzycki, R.C. Donehower, A. Zaheer, G.A. Fisher, T.S. Crocenzi, J.J. Lee, S.M. Duffy, R.M. Goldberg, A. de la Chapelle, M. Koshiji, F. Bhajee, T. Huebner, R.H. Hruban, L.D. Wood, N. Cuka, D.M. Pardoll, N. Papadopoulos, K.W. Kinzler, S. Zhou, T.C. Cornish, J.M. Taube, R.A. Anders, J.R. Eshleman, B. Vogelstein, and L.A. Diaz. 2015. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med* 372:2509-2520.
- Leon, L., J.F. Jeannin, and A. Bettaieb. 2008. Post-translational modifications induced by nitric oxide (NO): implication in cancer cells apoptosis. *Nitric Oxide* 19:77-83.
- Leon-Bolotte, L., S. Subramaniam, O. Cauvard, S. Plenchette-Colas, C. Paul, C. Godard, A. Martinez-Ruiz, P. Legembre, J.F. Jeannin, and A. Bettaieb. 2011. S-nitrosylation of the death receptor fas promotes fas ligand-mediated apoptosis in cancer cells. *Gastroenterology* 140:2009-2018, 2018.e2001-2004.
- Lescut, N., A. Lepinoy, B. Schipman, T. Cerda, V. Guimas, C. Bednarek, and J.F. Bosset. 2015. [Preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer: experience from one centre]. *Cancer Radiother* 19:98-105.
- Liu, C.C., P. Leclair, M. Monajemi, L.M. Sly, G.S. Reid, and C.J. Lim. 2016. α -Integrin expression and function modulates presentation of cell surface calreticulin. *Cell Death Dis* 7:e2268.
- Longley, D.B., D.P. Harkin, and P.G. Johnston. 2003. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 3:330-338.
- Ma, Y., S. Adjemian, S.R. Mattarollo, T. Yamazaki, L. Aymeric, H. Yang, J.P. Portela Catani, D. Hannani, H. Duret, K. Steegh, I. Martins, F. Schlemmer, M. Michaud, O. Kepp, A.Q.

- Sukkurwala, L. Menger, E. Vacchelli, N. Droin, L. Galluzzi, R. Krzysiek, S. Gordon, P.R. Taylor, P. Van Endert, E. Solary, M.J. Smyth, L. Zitvogel, and G. Kroemer. 2013. Anticancer chemotherapy-induced intratumoral recruitment and differentiation of antigen-presenting cells. *Immunity* 38:729-741.
- Ma, Y., L. Aymeric, C. Locher, S.R. Mattarollo, N.F. Delahaye, P. Pereira, L. Boucontet, L. Apetoh, F. Ghiringhelli, N. Casares, J.J. Lasarte, G. Matsuzaki, K. Ikuta, B. Ryffel, K. Benlagha, A. Tesnière, N. Ibrahim, J. Déchanet-Merville, N. Chaput, M.J. Smyth, G. Kroemer, and L. Zitvogel. 2011. Contribution of IL-17-producing gamma delta T cells to the efficacy of anticancer chemotherapy. *J Exp Med* 208:491-503.
- Marsh, T., K. Pietras, and S.S. McAllister. 2013. Fibroblasts as architects of cancer pathogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1832:1070-1078.
- Marshall, H.E., and J.S. Stamler. 2001. Inhibition of NF-kappa B by S-nitrosylation. *Biochemistry* 40:1688-1693.
- Martins, I., O. Kepp, F. Schlemmer, S. Adjemian, M. Tailler, S. Shen, M. Michaud, L. Menger, A. Gdoura, N. Tajeddine, A. Tesniere, L. Zitvogel, and G. Kroemer. 2011. Restoration of the immunogenicity of cisplatin-induced cancer cell death by endoplasmic reticulum stress. *Oncogene* 30:1147-1158.
- Martins, I., Y. Wang, M. Michaud, Y. Ma, A.Q. Sukkurwala, S. Shen, O. Kepp, D. Métivier, L. Galluzzi, J.L. Perfettini, L. Zitvogel, and G. Kroemer. 2014. Molecular mechanisms of ATP secretion during immunogenic cell death. *Cell Death Differ* 21:79-91.
- Millet, A., A. Bettaieb, F. Renaud, L. Prevotat, A. Hammann, E. Solary, B. Mignotte, and J.F. Jeannin. 2002. Influence of the nitric oxide donor glyceryl trinitrate on apoptotic pathways in human colon cancer cells. *Gastroenterology* 123:235-246.
- Mocellin, S., V. Bronte, and D. Nitti. 2007. Nitric oxide, a double edged sword in cancer biology: searching for therapeutic opportunities. *Med Res Rev* 27:317-352.
- Moncada, S., and A. Higgs. 1993. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329:2002-2012.
- Nakato, R., Y. Ohkubo, A. Konishi, M. Shibata, Y. Kaneko, T. Iwawaki, T. Nakamura, S.A. Lipton, and T. Uehara. 2015. Regulation of the unfolded protein response via S-nitrosylation of sensors of endoplasmic reticulum stress. *Sci Rep* 5:14812.
- Obeid, M., A. Tesniere, F. Ghiringhelli, G.M. Fimia, L. Apetoh, J.L. Perfettini, M. Castedo, G. Mignot, T. Panaretakis, N. Casares, D. Métivier, N. Larochette, P. van Endert, F. Ciccocanti, M. Piacentini, L. Zitvogel, and G. Kroemer. 2007. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* 13:54-61.
- Panaretakis, T., N. Joza, N. Modjtahedi, A. Tesniere, I. Vitale, M. Durchschlag, G.M. Fimia, O. Kepp, M. Piacentini, K.U. Froehlich, P. van Endert, L. Zitvogel, F. Madeo, and G. Kroemer. 2008. The co-translocation of ERp57 and calreticulin determines the immunogenicity of cell death. *Cell Death Differ* 15:1499-1509.
- Panaretakis, T., O. Kepp, U. Brockmeier, A. Tesniere, A.C. Bjorklund, D.C. Chapman, M. Durchschlag, N. Joza, G. Pierron, P. van Endert, J. Yuan, L. Zitvogel, F. Madeo, D.B. Williams, and G. Kroemer. 2009. Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. *EMBO J* 28:578-590.
- Pardoll, D.M. 2012. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 12:252-264.
- Plenchette, S., S. Romagny, V. Laurens, and A. Bettaieb. 2015. S-Nitrosylation in TNF superfamily signaling pathway: Implication in cancer. *Redox Biol* 6:507-515.

- Prévoat, L., R. Filomenko, E. Solary, J.F. Jeannin, and A. Bettaieb. 2006. Nitric oxide-induced down-regulation of beta-catenin in colon cancer cells by a proteasome-independent specific pathway. *Gastroenterology* 131:1142-1152.
- Reynaert, N.L., K. Ckless, S.H. Korn, N. Vos, A.S. Guala, E.F. Wouters, A. van der Vliet, and Y.M. Janssen-Heininger. 2004. Nitric oxide represses inhibitory kappaB kinase through S-nitrosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:8945-8950.
- Ribic, C.M., D.J. Sargent, M.J. Moore, S.N. Thibodeau, A.J. French, R.M. Goldberg, S.R. Hamilton, P. Laurent-Puig, R. Gryfe, L.E. Shepherd, D. Tu, M. Redston, and S. Gallinger. 2003. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 349:247-257.
- Rébé, C., and F. Ghiringhelli. 2015. Cytotoxic effects of chemotherapy on cancer and immune cells: how can it be modulated to generate novel therapeutic strategies? *Future Oncol*
- Seignez, C., A. Martin, C.E. Rollet, C. Racœur, A. Scagliarini, J.F. Jeannin, A. Bettaieb, and C. Paul. 2014. Senescence of tumor cells induced by oxaliplatin increases the efficiency of a lipid A immunotherapy via the recruitment of neutrophils. *Oncotarget* 5:11442-11451.
- Siegert, A., C. Rosenberg, W.D. Schmitt, C. Denkert, and S. Hauptmann. 2002. Nitric oxide of human colorectal adenocarcinoma cell lines promotes tumour cell invasion. *Br J Cancer* 86:1310-1315.
- Siemens, D.R., J.P. Heaton, M.A. Adams, J. Kawakami, and C.H. Graham. 2009. Phase II study of nitric oxide donor for men with increasing prostate-specific antigen level after surgery or radiotherapy for prostate cancer. *Urology* 74:878-883.
- SoRelle, R. 1998. Nobel prize awarded to scientists for nitric oxide discoveries. *Circulation* 98:2365-2366.
- Soulié, P., E. Raymond, S. Brienza, and E. Cvitkovic. 1997. [Oxaliplatin: the first DACH platinum in clinical practice]. *Bull Cancer* 84:665-673.
- Tesniere, A., L. Apetoh, F. Ghiringhelli, N. Joza, T. Panaretakis, O. Kepp, F. Schlemmer, L. Zitvogel, and G. Kroemer. 2008. Immunogenic cancer cell death: a key-lock paradigm. *Curr Opin Immunol* 20:504-511.
- Tesniere, A., F. Schlemmer, V. Boige, O. Kepp, I. Martins, F. Ghiringhelli, L. Aymeric, M. Michaud, L. Apetoh, L. Barault, J. Mendiboure, J.P. Pignon, V. Jooste, P. van Endert, M. Ducreux, L. Zitvogel, F. Piard, and G. Kroemer. 2010. Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin. *Oncogene* 29:482-491.
- Thatcher, G.R., A.C. Nicolescu, B.M. Bennett, and V. Toader. 2004. Nitrates and NO release: contemporary aspects in biological and medicinal chemistry. *Free Radic Biol Med* 37:1122-1143.
- Thirion, P., S. Michiels, J.P. Pignon, M. Buyse, A.C. Braud, R.W. Carlson, M. O'Connell, P. Sargent, P. Piedbois, and M.-A.G.i. Cancer. 2004. Modulation of fluorouracil by leucovorin in patients with advanced colorectal cancer: an updated meta-analysis. *J Clin Oncol* 22:3766-3775.
- Thomas, J.O., and A.A. Travers. 2001. HMG1 and 2, and related 'architectural' DNA-binding proteins. *Trends Biochem Sci* 26:167-174.
- Topalian, S.L., F.S. Hodi, J.R. Brahmer, S.N. Gettinger, D.C. Smith, D.F. McDermott, J.D. Powderly, R.D. Carvajal, J.A. Sosman, M.B. Atkins, P.D. Leming, D.R. Spigel, S.J. Antonia, L. Horn, C.G. Drake, D.M. Pardoll, L. Chen, W.H. Sharfman, R.A. Anders, J.M.

- Taube, T.L. McMiller, H. Xu, A.J. Korman, M. Jure-Kunkel, S. Agrawal, D. McDonald, G.D. Kollia, A. Gupta, J.M. Wigginton, and M. Sznol. 2012. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 366:2443-2454.
- Uehara, T., T. Nakamura, D. Yao, Z.Q. Shi, Z. Gu, Y. Ma, E. Masliah, Y. Nomura, and S.A. Lipton. 2006. S-nitrosylated protein-disulphide isomerase links protein misfolding to neurodegeneration. *Nature* 441:513-517.
- Uehiro, N., R. Horii, T. Iwase, M. Tanabe, T. Sakai, H. Morizono, K. Kimura, K. Iijima, Y. Miyagi, S. Nishimura, M. Makita, Y. Ito, and F. Akiyama. 2014. Validation study of the UICC TNM classification of malignant tumors, seventh edition, in breast cancer. *Breast Cancer* 21:748-753.
- Vacchelli, E., F. Aranda, A. Eggermont, J. Galon, C. Sautès-Fridman, I. Cremer, L. Zitvogel, G. Kroemer, and L. Galluzzi. 2014. Trial Watch: Chemotherapy with immunogenic cell death inducers. *Oncoimmunology* 3:e27878.
- van Gijn, W., C.A. Marijnen, I.D. Nagtegaal, E.M. Kranenbarg, H. Putter, T. Wiggers, H.J. Rutten, L. Pålman, B. Glimelius, C.J. van de Velde, and D.C.C. Group. 2011. Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer: 12-year follow-up of the multicentre, randomised controlled TME trial. *Lancet Oncol* 12:575-582.
- Vannini, F., K. Kashfi, and N. Nath. 2015. The dual role of iNOS in cancer. *Redox Biol* 6:334-343.
- Vesely, M.D., M.H. Kershaw, R.D. Schreiber, and M.J. Smyth. 2011. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol* 29:235-271.
- Viaud, S., C. Théry, S. Ploix, T. Tursz, V. Lapierre, O. Lantz, L. Zitvogel, and N. Chaput. 2010. Dendritic cell-derived exosomes for cancer immunotherapy: what's next? *Cancer Res* 70:1281-1285.
- Washington, M.K. 2008. Colorectal carcinoma: selected issues in pathologic examination and staging and determination of prognostic factors. *Arch Pathol Lab Med* 132:1600-1607.
- West, N.P., W. Hohenberger, K. Weber, A. Perrakis, P.J. Finan, and P. Quirke. 2010. Complete mesocolic excision with central vascular ligation produces an oncologically superior specimen compared with standard surgery for carcinoma of the colon. *J Clin Oncol* 28:272-278.
- Yamazaki, T., D. Hannani, V. Poirier-Colame, S. Ladoire, C. Locher, A. Sistigu, N. Prada, S. Adjemian, J.P. Catani, M. Freudenberg, C. Galanos, F. André, G. Kroemer, and L. Zitvogel. 2014. Defective immunogenic cell death of HMGB1-deficient tumors: compensatory therapy with TLR4 agonists. *Cell Death Differ* 21:69-78.
- Yasuda, H., M. Yamaya, K. Nakayama, T. Sasaki, S. Ebihara, A. Kanda, M. Asada, D. Inoue, T. Suzuki, T. Okazaki, H. Takahashi, M. Yoshida, T. Kaneta, K. Ishizawa, S. Yamanda, N. Tomita, M. Yamasaki, A. Kikuchi, H. Kubo, and H. Sasaki. 2006. Randomized phase II trial comparing nitroglycerin plus vinorelbine and cisplatin with vinorelbine and cisplatin alone in previously untreated stage IIIB/IV non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 24:688-694.
- Youn, J.H., and J.S. Shin. 2006. Nucleocytoplasmic shuttling of HMGB1 is regulated by phosphorylation that redirects it toward secretion. *J Immunol* 177:7889-7897.
- Zitvogel, L., L. Apetoh, F. Ghiringhelli, and G. Kroemer. 2008. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol* 8:59-73.

ANNEXES

Annexe 1. Dondaine, L., D. Escurado, M. Ali, P. Richard, F. Denat, A. Bettaieb, P.L. Gendre, C. Paul, D. Jacquemin, C. Goze, and E. Bodio. 2016. Coumarin-Phosphine-Based Smart Probes for Tracking Biologically Relevant Metal Complexes: From Theoretical to Biological Investigations. *European Journal of Inorganic Chemistry*

Trackable Therapeutic Agents

Coumarin-Phosphine-Based Smart Probes for Tracking Biologically Relevant Metal Complexes: From Theoretical to Biological Investigations

Lucile Dondaine,^[a,b] Daniel Escudero,^[c] Moussa Ali,^[d] Philippe Richard,^[d] Franck Denat,^[d] Ali Bettaieb,^[a,b] Pierre Le Gendre,^[d] Catherine Paul,^[a,b] Denis Jacquemin,^{*,[c,e]} Christine Goze,^{*,[d]} and Ewen Bodio^{*,[d]}

Abstract: Ten metal based complexes and associated ligands have been synthesized and characterized. One of the metal ligands is a coumarin-phosphine derivative, which displays tunable fluorescence properties. The fluorescence is quenched in the case of the free ligand and ruthenium and osmium complexes, whereas it is strong for the gold complexes and phosphonium derivatives. These trends were rationalized by theoretical calculations, which revealed non-radiative channels involving a dark state for the free ligands that is lower in energy

than the emissive state and is responsible for the quenching of fluorescence. For the Ru^{II} and Os^{II} complexes, other non-radiative channels involving the manifold of singlet and triplet excited states may play a role. The anti-proliferative properties of all the compounds were evaluated in cancer cell lines (SW480, HCT116, MDA-MB-231 and MCF-7); higher IC₅₀ values were obtained for gold(I) complexes, with the free ligands being only weakly cytotoxic.

Introduction

Metal-based complexes are one of the most studied and used classes of anti-cancer drugs. Indeed, cisplatin and platinum derivatives are present in more than 50 % of chemotherapeutic anti-cancer cocktails.^[1] Owing to the heavy side-effects of platinum derivatives and to the acquired or intrinsic resistance of some tumours to such treatments, numerous non-platinum metal complexes have been investigated. Among them, ruthenium and gold derivatives have provided the most promising results.^[2] Nevertheless, most of these new complexes did not

pass clinical trials due to their low efficiency in vivo and the lack of understanding of their mechanism of action [target(s), pharmacokinetics, stability]. This last criterion has become increasingly crucial recently. One possible strategy for tackling this issue is to accumulate data from a large number of biological experiments. More recently, a growing community of chemists have designed trackable therapeutic agents by tethering an imaging probe to the therapeutic moiety. Such objects are sometimes considered as theranostic agents,^[3] even though their properties are quite far from Funkhouser's original definition.^[4] This new strategy advantageously enables the real-time tracking of drugs in vitro and/or in vivo without altering the cells/animals treated. However, a recurring difficulty is ascertaining whether the whole theranostic agent is actually tracked. Indeed, proving the stability of compounds in complex biological media is not straightforward, and if the integrity of the theranostic is not conserved, it is only the probe moiety that is imaged. One elegant strategy to circumvent this problem is to use smart probes.^[5]

Recently, we reported the synthesis, characterization and biological evaluation of several gold(I) coumarin-phosphine complexes, CP-Au-1 and CP-Au-2 (Scheme 1).^[5] In this initial study we showed that the coumarin-phosphine ligand presents smart probe character: it displays strong fluorescence when complexed to Au^I, but the fluorescence is dramatically quenched in the case of decomplexation (Figure 1). This specific photophysical behaviour enabled us to study its mechanism of action.

In particular, the chlorido-gold analogue CP-Au-1 (Scheme 1) displayed promising results: a valuable cytotoxicity in human

[a] Ecole Pratique des Hautes Etudes,
75014 Paris, France
www.ephe.fr

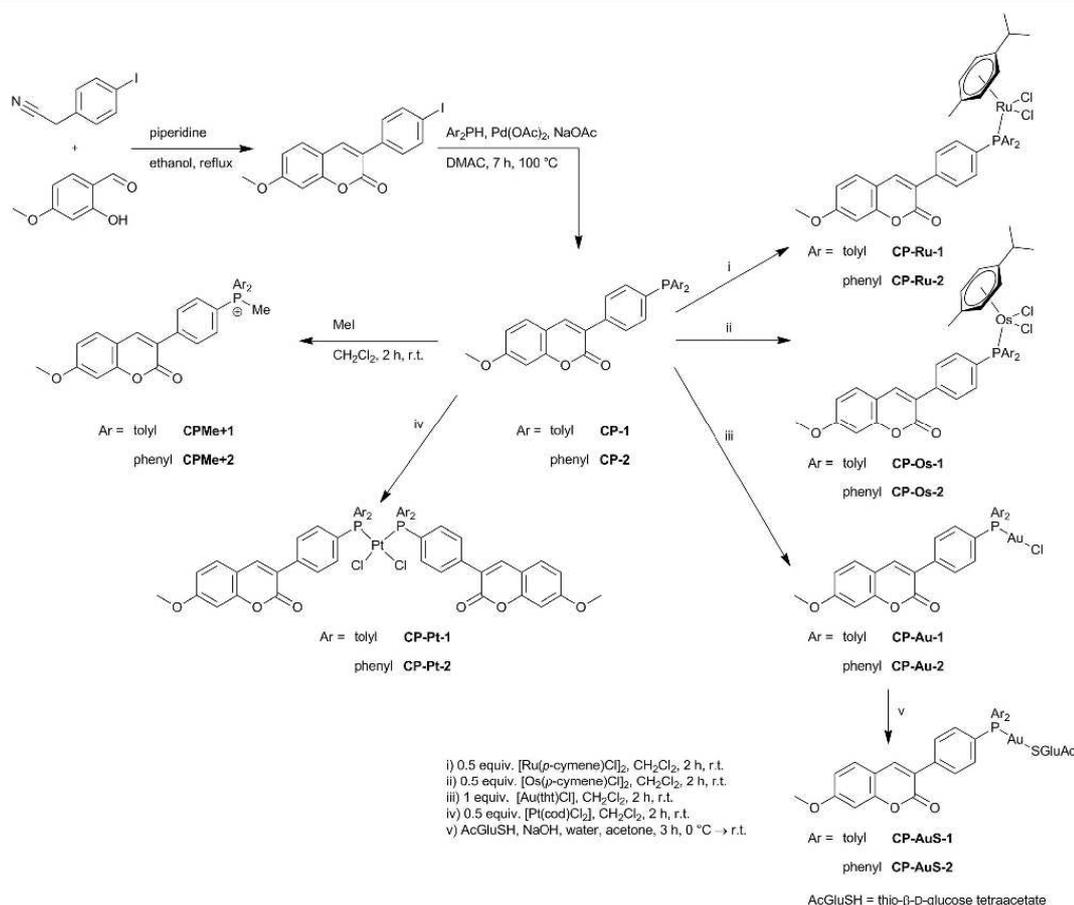
[b] Univ. Bourgogne Franche-Comté, LIIC EA7269,
21000 Dijon, France
inserm-u866.u-bourgogne.fr

[c] Chimie Et Interdisciplinarité, Synthèse, Analyse, Modélisation (CEISAM),
UMR CNRS 6320, BP 92208, Université de Nantes,
2, Rue de la Houssinière, 44322 Nantes Cedex 3, France
E-mail: Denis.Jacquemin@univ-nantes.fr
www.univ-nantes.fr/jacquemin-d

[d] Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne Franche-Comté,
ICMUB UMR CNRS 6302,
9 avenue Alain Savary, BP 47870, 21078 Dijon Cedex, France
E-mail: christine.goze@u-bourgogne.fr
ewen.bodio@u-bourgogne.fr
www.icmub.fr

[e] Institut Universitaire de France (IUF),
1 rue Descartes, 75005 Paris Cedex 05, France
www.iufrance.fr

Supporting information for this article is available on the WWW under
<http://dx.doi.org/10.1002/ejic.201501304>.



Scheme 1. Synthesis of the phosphonium CPMe+1 and CPMe+2 and of the complexes CP-Au-1, CP-Au-2, CP-AuS-1, CP-AuS-2, CP-Ru-1, CP-Ru-2, CP-Os-1, CP-Os-2, CP-Pt-1 and CP-Pt-2.

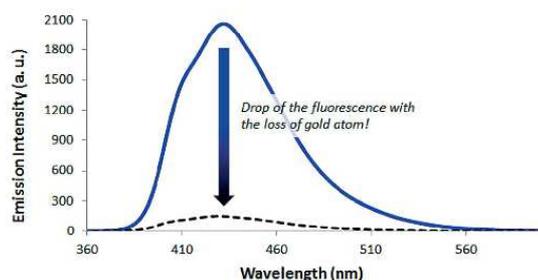


Figure 1. Decrease in fluorescence upon the decomplexation of Au' in CP-Au-1 (reproduced with permission from our previous study⁵⁵).

cancer cells and a low toxicity in healthy zebrafish larvae. In the present study, we wished to generalize this initial investigation by varying the metal centre and, to this end, we selected ruthenium, osmium and platinum, which are all of biological rele-

vance. Our aim was not only to extend the scope of our previous smart theranostics, but to determine whether the coumarin-phosphine ligand could be used as a general tool for tracking transition-metal complexes in vitro.

First, the influence of the metal on the photophysical properties was investigated and particular attention was paid to their ability to quench or otherwise the fluorescence. Theoretical calculations were performed to rationalize these trends. Next, the biological behaviour of the different complexes was evaluated.

Results and Discussion

Chemical Syntheses

The coumarin-phosphine ligands CP-1 and CP-2 were synthesized in two steps according to the procedure described by Pratt and co-workers (Scheme 1).⁶¹ The ligands were then treated either with iodomethane or with metallic precursor

([Au(tht)Cl], [(*p*-cymene)RuCl₂]₂, [(*p*-cymene)OsCl₂]₂ or [(cod)PtCl₂]; tht = tetrahydrothiophene, cod = cycloocta-1,5-diene) to afford the corresponding phosphoniums CPMe+1^[5] and CPMe+2, and the metal complexes CP-Au-1,^[5] CP-Au-2, CP-Ru-1, CP-Ru-2, CP-Os-1, CP-Os-2, CP-Pt-1 and CP-Pt-2 in excellent yields (Scheme 1).

The complexation reactions were monitored by ³¹P NMR spectroscopy. The ³¹P{¹H} NMR spectra of the ligands display a singlet at around -7 ppm, whereas the gold complexes display a singlet at around 32 ppm, the ruthenium complexes a singlet at around 22 ppm and the osmium complexes a singlet at around -14 ppm (this negative chemical shift could be regarded as surprising but it is in fact expected for osmium-phosphine complexes).^[7] The platinum derivatives gave a slightly more complex signal: the complexes display a single resonance in the ³¹P{¹H} NMR spectra with platinum satellites separated by a coupling constant ¹J(¹⁹⁵Pt-P) of 3675 Hz, which indicates the presence of the chlorine atoms *trans* to the phosphorus atoms and thus a *cis* geometry.^[8] Two additional gold(I) complexes were synthesized by treating the chlorido-gold complexes CP-Au-1 and CP-Au-2 with the in situ generated thiolate of thioglucose tetraacetate. CP-AuS-1^[5] and CP-AuS-2 were obtained in high yields (Scheme 1).

All the compounds were fully characterized and the structures of compounds CP-1,^[5] CP-2, CP-Au-1^[5] and CP-Ru-2 were confirmed by single-crystal X-ray diffraction analysis (Figure 2).^[9] CP-2 crystallizes in the *P* $\bar{1}$ space group and CP-Ru-2 crystallizes in the monoclinic *P*2₁/*n* space group. The asymmetric unit contains two independent molecules and one CH₂Cl₂ solvate molecule. The two independent molecules of the CP-Ru-2 cell share the same conformation (RMSD = 0.116 Å after

inversion of one molecule). The Ru group adopts the classical piano stool geometry.

Photophysical Studies

The photophysical characterization of the ligands CP-1 (tolyl) and CP-2 (phenyl) and the different complexes was carried out in dichloromethane and the data are summarized in Table 1.

Table 1. Photophysical data^[a] for the different compounds in CH₂Cl₂ at 298 K.

	λ_{abs} [nm]	λ_{em} [nm]	ϵ [M ⁻¹ cm ⁻¹]	Φ_f ^[b] [%]	Br [M ⁻¹ cm ⁻¹]	Br/Br(L)
CP-1	348	430	25100	3.1	778	1
CPMe+1	355	441	34300	91	31213	40 ^[c]
CP-Au-1	350	432	25700	83	21331	27
CP-AuS-1	349	432	26200	83	21746	28
CP-Ru-1	348	433	26600	5.8	1543	2
CP-Os-1	346	432	21800	9.5	2071	3
CP-Pt-1	346	432	59900	4.8	2875	4
CP-2	348	430	25000	5	1250	1
CPMe+2	360	440	23100	98	22638	18 ^[c]
CP-Au-2	348	430	28600	92	26312	21
CP-AuS-2	350	433	24300	95	23085	18
CP-Ru-2	352	428	31000	7.5	2325	2
CP-Os-2	350	430	28800	1.3	374	0.3
CP-Pt-2	350	433	58300	4	2332	2

[a] λ_{abs} = wavelength of maximal absorption; λ_{em} = wavelength of maximal emission; ϵ = molar absorption coefficient; Φ_f = fluorescence quantum yield; brightness, Br = $\epsilon \Phi_f$; Br(L) = brightness of ligand CP-1 or CP-2. [b] Reference: diphenylanthracene ($\Phi_f = 0.97$, $\lambda_{\text{exc}} = 355$ nm, in cyclohexane).^[10] [c] This ratio, which illustrates the smart-probe character of the compounds, is not relevant for the phosphonium derivatives because the "demethylation" of CPMe+1 and CPMe+2 is very unlikely.

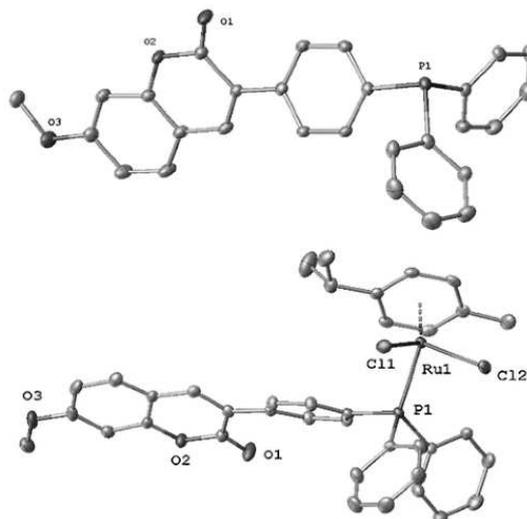


Figure 2. ORTEP views of CP-2 (top) and CP-Ru-2 (bottom). The CH₂Cl₂ molecule is not shown for clarity and only one of the two independent molecules is represented (see our previous study^[5] for the ORTEP views of CP-1 and CP-Au-1).

UV/Visible Studies

The ligands CP-1 and CP-2 each present an absorption maximum at 348 nm in CH₂Cl₂, which corresponds to the S₁ band (see Theoretical Calculations section below), and have molar absorption coefficients of 25100 and 25000 M⁻¹ cm⁻¹, respectively, which are characteristic of the coumarin signature.^[6] A small shoulder can be additionally observed for all the compounds at the beginning of the S₁ band (at around 300–320 nm), which may correspond to the S₂ transition or to a vibronic coupling effect. These bands have readily been assigned to spin-allowed $\pi-\pi^*$ transitions. Alkylation of the phosphine induces a bathochromic shift of the absorption band of about 10 nm. Complexation to Au^I, Ru^{II} or Os^{II} did not significantly influence the molar absorption coefficients. A low-intensity broad shoulder can be seen at 490 and 450 nm for the Ru^{II} and Os^{II} complexes, respectively, which correspond to metal-centred bands (see below). Finally, the presence of two coumarin chromophores in the Pt^{II} complexes CP-Pt-1 and CP-Pt-2 increases their absorption coefficients to 59900 and 58300 M⁻¹ cm⁻¹, respectively. These values are twice those obtained for structures bearing a single coumarin fluorophore.

Exemplarily, the absorption and emission spectra of CP-2 and CP-Ru-2 are represented in Figure 3 (see the Supporting Information for the spectra of the other compounds).

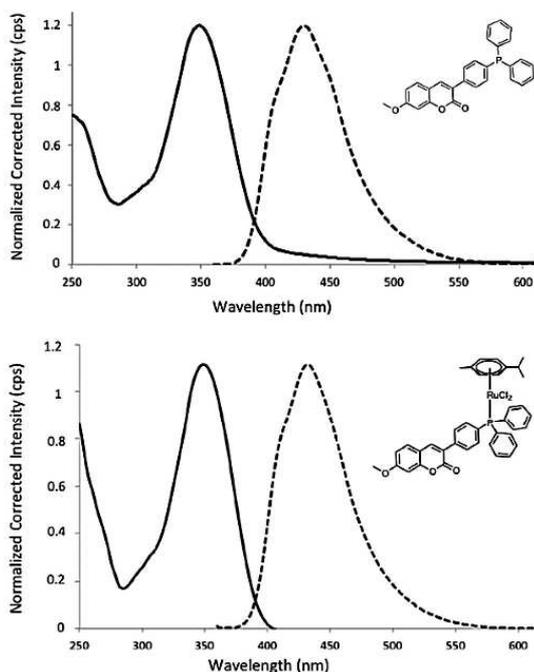


Figure 3. Absorption (solid line) and emission (dashed line) spectra of CP-2 (top) and CP-Ru-2 (bottom) in CH_2Cl_2 at 298 K.

Emission Properties

For all systems, a fluorescence band peaking at around 430 nm can be observed, which corresponds to the emission of the coumarin moiety. However, the rate of fluorescence significantly depends upon the compound. First, the quantum yields of the ligands CP-1 and CP-2 are relatively low (3.1 and 5 %, respectively). This quenching is primarily attributed in the photophysics community to a photoinduced electron transfer (PET) from the phosphine to the fluorophore. As a result of our theoretical studies (see below), we herein propose that non-radiative channels involving a dark state are responsible for the observed quenching of photoluminescence. The dark state is precisely the charge transfer that results from PET, and hence it further validates our hypothesis. Alkylation of the phosphine results in a strong enhancement of the fluorescence of the coumarin

($\Phi = 91\%$ for CPMe+1 and 98% for CPMe+2), because the non-radiative channels are efficiently suppressed. Complexation with Au^I , which is an inert d^{10} metal, induces the same phenomenon as alkylation of the phosphine, that is, blockage of the lone pair on the phosphine. The resulting quantum yields of the different Au complexes are therefore very high (between 83 and 95%).

On the other hand, complexation with Ru^{II} , Os^{II} and Pt^{II} strongly quenches the fluorescence of the coumarin. Even if the quenching mechanism is also prevented in these compounds, additional photophysical phenomena, which induce a decrease in the fluorescence quantum yields, are involved. These mechanisms could involve electron-transfer phenomena or triplet excited-state deactivation pathways that can be reached by inter-system-crossing mechanisms. Indeed, the presence of metal ions can induce the population of metal-to-ligand charge-transfer ($^3\text{MLCT}$) states and the eventual appearance of non-radiative deactivation pathways involving metal-centered (^3MC) states.

The brightness values are moderate to high. Therefore, all the complexes, except CP-Os-2 and maybe CP-Ru-1, could most probably be tracked in vitro in the micromolar range. The “smart-probe character” of the complexes can be evaluated by the ratio of the brightness of the complexes to the brightness of the corresponding coumarin-phosphine ligand CP-1 or CP-2 (Table 1). As a result of the decrease in the quantum yields for the Ru^{II} , Os^{II} and Pt^{II} complexes, this ratio is poor (0.3 to 4). Thus, the decrease in fluorescence upon decomplexation would not be sufficient to obtain an unambiguous in vitro interpretation. In contrast, all gold complexes display very good ratios, from 18 to 28, thereby confirming previous observations.^[5]

Theoretical Calculations

To gain insights into the photophysical properties of the coumarin-phosphine ligands and their complexes, we performed DFT and time-dependent DFT (TD-DFT) calculations (see Computational Details in the Exp. Sect.). Table 2 lists the TD-B3LYP vertical excitation energies and oscillator strengths for the main lowest singlet excited states of CP-1, CPMe+1, CP-Au-1 and CP-Ru-1.

Two singlet excited states of mixed $n_p/\pi_{\text{coum}} \rightarrow \pi_{\text{coum}}^*$ character (see the specific excitations in Table 2 and the orbitals involved in Figure 4, c) contribute to the main UV/Vis band of CP-1, which shows a peak experimentally at 350 nm. These excited

Table 2. TD-B3LYP/6-31G(d) vertical singlet electronic transition energies (in nm and eV) and oscillator strengths of CP-1, CPMe+1, CP-Au-1 and CP-Ru-1. The main molecular orbital contributions are given in each case.

	State	λ [nm/eV] ^[a]	f [a.u.] ^[a]	Character [Coeff.] ^[a]
CP-1	S_1	375/3.31	0.447	(H→L) $n_p\pi_{\text{coum}} \rightarrow \pi_{\text{coum}}^*$ [0.70]
		370/3.35	0.705	(H→L) $n_p\pi_{\text{coum}} \rightarrow \pi_{\text{coum}}^*$ [0.70]
	S_2	326/3.80	0.442	(H-1→L) $\pi_{\text{coum}}n_p \rightarrow \pi_{\text{coum}}^*$ [0.69]
		327/3.79	0.311	(H-1→L) $\pi_{\text{coum}}n_p \rightarrow \pi_{\text{coum}}^*$ [0.69]
CPMe+1	S_1	385/3.21	0.827	(H→L) $\pi_{\text{coum}} \rightarrow \pi_{\text{coum}}^*$ [0.70]
CP-Au-1	S_1	348/3.57	0.941	(H→L) $\pi_{\text{coum}} \rightarrow \pi_{\text{coum}}^*$ [0.70]
CP-Ru-1	S_1	550/2.25	0.007	(H→L + 1) $4d_{2g} \rightarrow 4d_{eg}\pi_{\text{arene}}^*$ [0.63]
		S_4	455/2.73	0.015
	S_{10}	350/3.55	0.843	(H-3→L) $\pi_{\text{coum}} \rightarrow \pi_{\text{coum}}^*$ [0.70]

[a] PCM-TD-B3LYP/6-31G(d) values in CH_2Cl_2 are given in italics.

states are theoretically located at 375 and 326 nm, and they gain intensity mainly from their $\pi_{\text{coum}} \rightarrow \pi_{\text{coum}}^*$ contribution. The inclusion of solvent effects leads to very small shifts of these excited states (ca. 0.01–0.04 eV, see Table 2). In the case of the methylated CPMe+1 ligand and the CP-Au-1 complex, only the S_1 state contributes to the experimental peaks observed at 355 and 350 nm, respectively; good agreement with the TD-B3LYP values (385 and 348 nm, respectively) is reached. For CP-Ru-1, the first nine singlets involve the RuCl_2 -arene core, see exemplarily the S_1 and S_4 states in Table 2. These states possess very low oscillator strengths and they accordingly contribute to the small broad tail extending up to 550 nm in the recorded spectrum (see Figure 3). The $\pi_{\text{coum}} \rightarrow \pi_{\text{coum}}^*$ excitation (S_{10}) is responsible for the main UV/Vis band of CP-Ru-1, and its position is again in very good agreement with the experimental value.

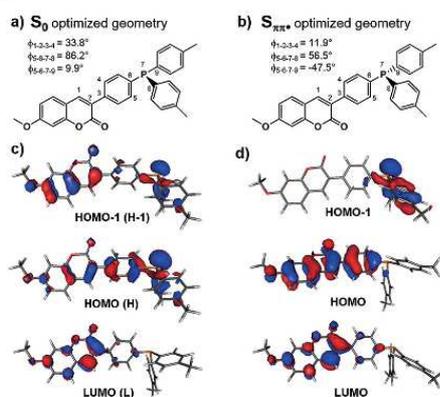


Figure 4. Main geometrical features of the S_0 (a) and $S_{\pi\pi^*}$ (b) optimized geometries of CP-1. Kohn–Sham (KS) orbitals involved in the lowest excitations of CP-1 in its S_0 (c) and $S_{\pi\pi^*}$ (d) optimized geometries.

We next evaluated the emission properties and the quenching of fluorescence in CP-1. Table 3 lists the TD-B3LYP emission energies for the optimized structures of the emissive state ($S_{\pi\pi^*}$) of CP-1 and CPMe+1. The TD-B3LYP emission energies are in reasonable agreement with experimental evidence. The main geometrical features of the S_0 and $S_{\pi\pi^*}$ optimized geometries of CP-1 are highlighted in Figure 4, a, b. Relaxation of its $S_{\pi\pi^*}$ potential energy surface (PES) leads to 1) a coplanarization of coumarin and its adjacent tolyl ligand (see the $\phi_{1-2-3-4}$ dihedral angle in Figure 4, b) and 2) a twist of the Ptol_2 moiety (compare the $\phi_{5-6-7-8}$ and $\phi_{5-6-7-9}$ dihedral angles in Figure 4, a, b). In the optimized S_0 geometry, both the HOMO–1 and HOMO orbitals are delocalized over the phosphine and coumarin moieties (see Figure 4, c). In contrast, in the optimized $S_{\pi\pi^*}$ geometry, these orbitals evolve to well-separated n_p and π_{coum} orbitals (see HOMO–1 and HOMO in Figure 4, d). Consequently, pure $n_p\pi_{\text{coum}}^*$ and $\pi_{\text{coum}}\pi_{\text{coum}}^*$ excited states are obtained for the latter geometry (see Table 3). For this geometry, the dark $n_p\pi_{\text{coum}}^*$ state is located 0.16 eV below the emissive $\pi_{\text{coum}}\pi_{\text{coum}}^*$ state. In this simplified photophysical picture for CP-1, both the S_1 and S_2 states will be populated in the Franck–Condon region. From there, internal conversion processes will

predominantly lead to the population of the lowest-lying $n_p\pi_{\text{coum}}^*$ state. A very small fluorescence rate (k_f) is expected from this state (see its negligible oscillator strength in Table 3). Therefore, instead of radiative emission from the $S_{\pi\pi^*}$ state, competing non-radiative decay channels leading to S_0 will be favoured for CP-1. These are presumably the ultimate reasons for the observed quenching of fluorescence in CP-1. We remark that this theoretical modelling provides support for a non-radiative interpretation of the quenching of fluorescence rather than an intramolecular photoinduced electron transfer (PET) mechanism. To the best of our knowledge, only one previous theoretical study proposed a similar non-radiative decay path for rhodamines.^[11] In contrast, these non-radiative decay channels are not available for CPMe+1 or CP-Au-1 (their lowest excited state is the bright $S_{\pi\pi^*}$ state, see Table 3 exemplarily for CPMe+1). Finally, other non-radiative mechanisms involving the manifold of RuCl_2 -based singlet and triplet states are opened up for CP-Ru-1. These states are known to be involved in non-radiative deactivation pathways involving crossings with the ground-state PES.^[12] These non-radiative channels might compete with PET.^[13]

Table 3. TD-B3LYP/6-31G(d) vertical singlet electronic emission energies (in nm and eV) and oscillator strengths of CP-1 and CP-Au-1 for their $S_{\pi\pi^*}$ optimized geometries. The main molecular orbital contributions are given in each case.

	State	λ [nm/eV]	f [a.u.]	Character [coeff.]
CP-1	S_1	428/2.90	0.000	$n_p \rightarrow \pi_{\text{coum}}^*$ [0.70]
	S_2	405/3.06	0.911	$\pi_{\text{coum}} \rightarrow \pi_{\text{coum}}^*$ [0.70]
CPMe+1	S_1	414/3.00	0.825	$\pi_{\text{coum}} \rightarrow \pi_{\text{coum}}^*$ [0.70]

Biological Studies

The anti-proliferative activity of the coumarin-derivatives was tested on four human cancer cell lines of mammary (MDA-MB-231 and MCF-7) or colon (SW480 and HCT116) origins (Table 4).

Table 4. IC_{50} values for the different coumarin derivatives against SW480, HCT116, MDA-MB-231 and MCF-7 cells determined in MTS assays for 48 h.

	IC_{50} [μM]			
	SW480	HCT116	MDA-MB-231	MCF-7
CP-1	160 \pm 13	122 \pm 5	>200	135 \pm 14
CPMe+1 ^[a]	25.7 \pm 0.3	10.1 \pm 0.2	33 \pm 14	28 \pm 4
CP-Au-1 ^[a]	42 \pm 11	38 \pm 17	33 \pm 15	49 \pm 1
CP-AuS-1 ^[a]	34 \pm 14	49.9 \pm 0.3	46 \pm 5	50.1 \pm 0.1
CP-Ru-1	75 \pm 25	74.9 \pm 0.1	74.9 \pm 0.1	83 \pm 15
CP-Os-1	42 \pm 14	53 \pm 14	50.0 \pm 0.1	50.0 \pm 0.3
CP-Pt-1	insoluble			
CP-2	>200	104 \pm 28	74.8 \pm 0.2	>200
CPMe+2	75.6 \pm 0.7	75.9 \pm 0.8	47 \pm 5	75.3 \pm 0.5
CP-Au-2	25.1 \pm 0.1	26 \pm 1	25.3 \pm 0.4	25.3 \pm 0.2
CP-AuS-2	25.2 \pm 0.1	25.5 \pm 0.1	24.5 \pm 0.3	24.8 \pm 0.1
CP-Ru-2	73 \pm 7	49.4 \pm 0.5	25.3 \pm 0.2	49.8 \pm 0.3
CP-Os-2	105 \pm 27	86 \pm 13	50 \pm 1	74.7 \pm 0.1
CP-Pt-2	49	64 \pm 26	58 \pm 11	>200

[a] Determined previously, see ref.^[5]

An overview of the data indicated that the CP-1 and CP-2 ligands are weakly cytotoxic and that the different metal-based coumarin complexes are more potent towards the MDA-MB-231

cell line than towards the SW480, HCT116 and MCF-7 cell lines. The complexes show substantial toxic effects with IC_{50} values ranging from 24 to 106 μM . Among the metal complexes, the gold(III) derivatives display the more promising properties (with IC_{50} ranging from 24.5 to 50.1 μM) and the general trend suggests that the phenyl derivatives are a little more potent than the tolyl derivatives. In contrast, the Os^{II} complexes present higher IC_{50} values, which may be due to their lower solubility. Additionally, we note that the "X-type"^[14] ligand present in the gold complex (chlorido or thioglucose tetraacetate ligand) does not seem to influence the in vitro cytotoxic properties of the gold complexes (CP-Au-1 and CP-AuS-1 vs. CP-Au-2 and CP-AuS-2). However, even if there is no notable difference in vitro, the pharmacokinetic properties and the biodistribution of the complexes will probably be different in vivo. Surprisingly, the phosphonium derivative CPMe+2 is significantly less cytotoxic than its tolyl analogue CPMe+1 (up to 7.5 times in HCT116). Concerning the Pt complexes CP-Pt-1 and CP-Pt-2, the IC_{50} values are not really relevant, when determined, due to their poor water solubility. CP-Pt-1 was even almost insoluble in pure DMSO.

Conclusions

We have designed, synthesized and characterized eight new metal-based theranostic agents. The photophysical properties were studied and compared. As highlighted in some of our previous work on BODIPY derivatives, gold derivatives gave the most promising results and only the gold(III)-coumarin complexes could be considered as smart theranostic compounds.^[5,7,15] The quenching of the fluorescence of the ligands and Ru^{II} complexes has been explained by theoretical calculations. Indeed, non-radiative channels involving a dark state, which is lower in energy than the emissive state, are responsible for the quenching of fluorescence. In the Ru^{II} and Os^{II} complexes, other non-radiative channels involving the manifold of singlet and triplet excited states might be operative and explain the quenching. The anti-proliferative properties of all the compounds were evaluated on SW480, HCT116, MDA-MB-231 and MCF-7 cell lines. The ligands appeared to be weakly cytotoxic, whereas the complexes produced interesting IC_{50} values, especially for the MDA cell line (with the exception of the poorly soluble Pt^{II} complex CP-Pt-1). The most interesting IC_{50} values were obtained for the gold(III) complexes as well as the phosphonium derivatives. It is worth noting that even if the smart-probe character is a bit less pronounced for the diphenylphosphine derivatives compared with the ditolylphosphines, their anti-proliferative properties are improved.

As a consequence of the results described here, we are now focusing our attention on gold(III) complexes by varying the substituent groups on the phosphorus atom combined with water-solubilizing groups.

Experimental Section

General: All the reactions were carried out under purified argon using Schlenk techniques. Solvents were dried and distilled under argon before use. All other reagents were commercially available

and used as received. CP-1, CPMe+1, CP-Au-1, CP-AuS-1 and CP-2 were synthesized according to literature procedures.^[5,6] All the analyses were performed at the Plateforme d'Analyses Chimiques et de Synthèse Moléculaire de l'Université de Bourgogne. The identities and purities ($\geq 95\%$) of the complexes were unambiguously established by HRMS and NMR spectroscopy. The exact masses of the synthesized complexes were determined with a Thermo LTQ Orbitrap XL spectrometer. ¹H (300.13 MHz), ¹³C (75.47 MHz) and ³¹P (121.49 MHz) NMR spectra were recorded with a Bruker 300 Avance III spectrometer. Chemical shifts (δ) are quoted in ppm relative to TMS (¹H and ¹³C) using the residual protonated solvent (¹H) or the deuterated solvent (¹³C) as internal standards; 85% H₃PO₄ (³¹P) was used as an external standard. The atom labelling used for the NMR assignments is presented in Figure 5. IR spectra were recorded with a Bruker Vector 22 FT-IR spectrophotometer (Golden Gate ATR).

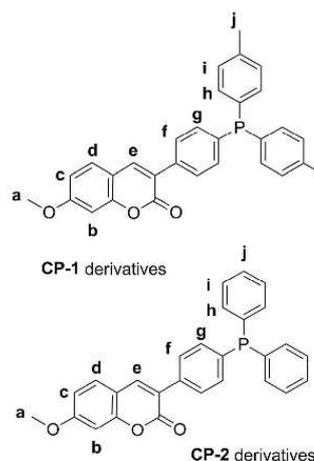


Figure 5. Arbitrary labelling of the ligand protons.

[(η^6 -*p*-Cymene)(3-{4-(di-*p*-tolylphosphanyl)phenyl}-7-methoxy-2*H*-chromen-2-one)RuCl₂] (CP-Ru-1): The reaction was carried out under argon. 3-[4-(Di-*p*-tolylphosphino)phenyl]-7-methoxy-2*H*-chromen-2-one (CP-1; 150 mg, 0.323 mmol) and [RuCl₂(*p*-cymene)]₂ (99 mg, 0.162 mmol) were dissolved in degassed CH₂Cl₂ (10 mL). The resulting mixture was stirred at room temperature for 2 h. The reaction was monitored by ³¹P NMR spectroscopy. Upon completion, the solvent was removed under reduced pressure. The ruthenium complex CP-Ru-1 was isolated as a red powder (208 mg, 84% yield). ¹H NMR (CDCl₃): δ = 1.11 [d, ³*J*_{H,H} = 6.9 Hz, 6 H, CH(CH₃)₂ *p*-cymene], 1.88 (s, 3 H, CH₃ *p*-cymene), 2.36 (6 H, H_i), 2.87 [hept, ³*J*_{H,H} = 6.9 Hz, 1 H, CH(CH₃)₂ *p*-cymene], 3.88 (s, 3 H, H_a), 4.99 (dd, ³*J*_{H,H} = 6.2, ⁴*J*_{H,P} = 1.0 Hz, 2 H, CH_{Ar} *p*-cymene), 5.21 (d, ³*J*_{H,H} = 6.2 Hz, 2 H, CH_{Ar} *p*-cymene), 6.83–6.89 (m, 2 H, H_{b,c}), 7.18 (dd, ³*J*_{H,H} = 8.2, ⁴*J*_{H,P} = 1.8 Hz, 4 H, H_j), 7.43 (d, ³*J*_{H,H} = 8.4 Hz, 1 H, H_d), 7.65 (dd, ³*J*_{H,H} = 8.5, ⁴*J*_{H,P} = 2.0 Hz, 2 H, H_f), 7.69–7.78 (m, 5 H, H_{e,h}), 7.83–7.90 (m, 2 H, H_g) ppm. ¹³C{¹H} NMR (CDCl₃): δ = 18.0, 21.5, 22.0, 30.4, 56.0, 87.4 (d, *J*_{C,P} = 5.5 Hz), 89.0 (d, *J*_{C,P} = 3.1 Hz), 96.0, 100.6, 111.2 (d, *J*_{C,P} = 3.1 Hz), 113.0, 113.4, 123.9 (d, *J*_{C,P} = 1.1 Hz), 127.7 (d, *J*_{C,P} = 9.9 Hz), 128.9 (d, *J*_{C,P} = 10.3 Hz), 129.3, 130.6 (d, *J*_{C,P} = 47.2 Hz), 134.4 (d, *J*_{C,P} = 46.2 Hz), 134.5 (d, *J*_{C,P} = 9.9 Hz), 134.5 (d, *J*_{C,P} = 9.4 Hz), 136.6 (d, *J*_{C,P} = 2.8 Hz), 140.6 (d, *J*_{C,P} = 2.8 Hz), 140.9, 155.6, 160.8, 163.1 ppm. ³¹P{¹H} NMR (CDCl₃): δ = 23.2 ppm. UV/Vis (CH₂Cl₂): λ_{max} (ϵ) = 348 nm (26600 M⁻¹ cm⁻¹). IR: $\tilde{\nu}$ = 1653

($\nu_{C=O}$) cm^{-1} . HRMS (ESI): calcd. for $\text{C}_{40}\text{H}_{39}\text{ClO}_3\text{PRu}$ 735.13712 [M - Cl]⁺; found 735.13984.

[(η^6 -*p*-Cymene)(3-[4-(*di-p*-tolylphosphanyl)phenyl]-7-methoxy-2*H*-chromen-2-one)OsCl₂] (CP-Os-1): The reaction was carried out under argon. CP-1 (132 mg, 0.285 mmol) and [OsCl₂(*p*-cymene)]₂ (113 mg, 0.142 mmol) were dissolved in degassed CH₂Cl₂ (10 mL). The resulting mixture was stirred at room temperature for 2 h. The reaction was monitored by ³¹P NMR spectroscopy (242.9 MHz, 300 K). Upon completion, the solvent was removed under reduced pressure. The osmium complex CP-Os-1 was isolated as pale-brown powder (193 mg, 79 % yield). ¹H NMR (CDCl₃): δ = 1.16 [d, ³J_{H,H} = 6.9 Hz, 6 H, CH(CH₃)₂ *p*-cymene], 1.98 (s, 3 H, CH₃ *p*-cymene), 2.36 (6 H, H₁), 2.76 [hept, ³J_{H,H} = 6.9 Hz, 1 H, CH(CH₃)₂ *p*-cymene], 3.88 (s, 3 H, H₃), 5.18 (d, ³J_{H,H} = 5.7 Hz, 2 H, CH_{Ar} *p*-cymene), 5.42 (d, ³J_{H,H} = 5.7 Hz, 2 H, CH_{Ar} *p*-cymene), 6.83–6.88 (m, 2 H, H_{b,c}), 7.18 (dd, ³J_{H,H} = 8.2, ⁴J_{H,P} = 1.8 Hz, 4 H, H₁), 7.43 (d, ³J_{H,H} = 8.4 Hz, 1 H, H_d), 7.62–7.70 (m, 6 H, H_{f,h}), 7.77–7.85 (m, 3 H, H_{c,g}) ppm. ¹³C{¹H} NMR (CDCl₃): δ = 18.0, 21.5, 22.4, 30.2, 56.0, 80.1 (d, *J*_{C,P} = 5.1 Hz), 80.3 (d, *J*_{C,P} = 2.5 Hz), 88.6, 100.6, 103.5 (d, *J*_{C,P} = 4.0 Hz), 113.0, 113.4, 123.9, 127.6 (d, *J*_{C,P} = 10.4 Hz), 128.8 (d, *J*_{C,P} = 10.4 Hz), 129.3, 130.1 (d, *J*_{C,P} = 54.4 Hz), 134.0 (d, *J*_{C,P} = 52.6 Hz), 134.6 (d, *J*_{C,P} = 9.8 Hz), 134.7 (d, *J*_{C,P} = 9.8 Hz), 136.6 (d, *J*_{C,P} = 2.7 Hz), 140.7 (d, *J*_{C,P} = 2.1 Hz), 140.9, 155.6, 160.8, 163.0 ppm. ³¹P{¹H} NMR (CDCl₃): δ = -14.1 ppm. UV/Vis (CH₂Cl₂): λ_{max} (ϵ) = 346 nm (26600 M⁻¹ cm⁻¹). IR: $\tilde{\nu}$ = 1653 ($\nu_{C=O}$) cm^{-1} . HRMS (ESI): calcd. for $\text{C}_{40}\text{H}_{39}\text{ClO}_3\text{POs}$ 825.194 [M - Cl]⁺; found 825.19609.

[Bis(3-[4-(*di-p*-tolylmethylphosphanyl)phenyl]-7-methoxy-2*H*-chromen-2-one)PtCl₂] (CP-Pt-1): The reaction was carried out under argon. 3-[4-(*Di-p*-tolylphosphino)phenyl]-7-methoxy-2*H*-chromen-2-one (CP-1; 150 mg, 0.323 mmol) and cyclooctadiene-platinum(II) dichloride (60.4 mg, 0.161 mmol) were dissolved in degassed CH₂Cl₂ (10 mL). The resulting mixture was stirred at room temperature for 2 h. The reaction was monitored by ³¹P NMR spectroscopy (242.9 MHz, 300 K). Upon completion, the solvent was removed under reduced pressure. The platinum complex CP-Pt-1 was isolated as a yellow powder (360 mg, 92 % yield). ¹H NMR (CDCl₃): δ = 2.34 (12 H, H₁), 3.89 (s, 6 H, H₃), 6.82–6.90 (m, 4 H, H_{b,c}), 6.99 (br. d, ³J_{H,H} = 7.1 Hz, 8 H, H₁), 7.34–7.58 (m, 18 H, H_{d,f,g,h}), 7.81 (br. s, 2 H, H_e) ppm. ¹³C{¹H} NMR (CDCl₃): δ = 21.4, 55.8, 100.4, 113.1 (d, *J*_{C,P} = 20.5 Hz), 123.1, 126.4, 127.4, 128.6, 128.7, 128.8, 129.4, 134.2, 135.0, 135.1, 141.2, 141.3, 155.5, 160.6, 163.0 ppm. ³¹P{¹H} NMR (CDCl₃): δ = 12.6 (s+d, ¹J_{Pt} = 3675 Hz) ppm. UV/Vis (CH₂Cl₂): λ_{max} (ϵ) = 346 nm (59900 M⁻¹ cm⁻¹). IR: $\tilde{\nu}$ = 1653 ($\nu_{C=O}$) cm^{-1} . HRMS (ESI): calcd. for $\text{C}_{60}\text{H}_{50}\text{ClO}_3\text{P}_2\text{Pt}$ 1158.24183 [M - Cl]⁺; found 1158.24245.

3-[4-(Methyldiphenylphosphonium)phenyl]-7-methoxy-2*H*-chromen-2-one iodide (CPMe+2): The reaction was carried out under argon. CP-1 (100 mg, 0.229 mmol) and iodomethane (49 mg, 0.343 mmol) were dissolved in degassed CH₂Cl₂ (7 mL). The resulting mixture was stirred at room temperature for 2 h. The reaction was monitored by ³¹P NMR spectroscopy. Upon completion, the solvent was removed under reduced pressure. The phosphonium CPMe+2 was isolated as a yellow powder (127 mg, 96 % yield). ¹H NMR (CDCl₃): δ = 3.16 (d, ²J_{H,P} = 13.4 Hz, 3 H, P-CH₃), 3.89 (s, 3 H, H₃), 6.82 (d, ⁴J_{H,H} = 2.4 Hz, 1 H, H_b), 6.88 (dd, ³J_{H,H} = 8.6, ⁴J_{H,H} = 2.4 Hz, 1 H, H_c), 7.61–7.86 (m, 13 H, H_{d,g,h,i,j}), 8.11 (dd, ³J_{H,H} = 8.7, ⁴J_{H,P} = 3.1 Hz, 2 H, H_f), 8.20 (s, 1 H, H_e) ppm. ¹³C{¹H} NMR (CDCl₃): δ = 11.6 (d, *J*_{C,P} = 57.3 Hz), 56.1, 100.6, 113.2 (d, *J*_{C,P} = 14.0 Hz), 117.8 (d, *J*_{C,P} = 89.9 Hz), 118.5, 119.7, 121.5 (d, *J*_{C,P} = 1.2 Hz), 130.3, 130.3 (d, *J*_{C,P} = 13.2 Hz), 130.6, 130.8, 133.4 (d, *J*_{C,P} = 10.9 Hz), 133.6 (d, *J*_{C,P} = 11.4 Hz), 135.4 (d, *J*_{C,P} = 2.8 Hz), 142.2 (d, *J*_{C,P} = 3.0 Hz),

143.1, 155.9, 160.5, 163.8 ppm. ³¹P{¹H} NMR (CDCl₃): δ = 21.2 ppm. UV/Vis (CH₂Cl₂): λ_{max} (ϵ) = 360 (23100 M⁻¹ cm⁻¹). IR: $\tilde{\nu}$ = 1653 ($\nu_{C=O}$) cm^{-1} . HRMS (ESI): calcd. for $\text{C}_{29}\text{H}_{24}\text{O}_3\text{P}^+$ 451.14576 [M - I]⁺; found 451.14421.

[(3-[4-(Diphenylphosphanyl)phenyl]-7-methoxy-2*H*-chromen-2-one)AuCl] (CP-Au-2): The reaction was carried out under argon. 3-[4-(Diphenylphosphino)phenyl]-7-methoxy-2*H*-chromen-2-one (CP-2; 200 mg, 0.46 mmol) and [Au(tht)Cl] (147 mg, 0.46 mmol) were dissolved in degassed CH₂Cl₂ (12 mL). The resulting mixture was stirred at room temperature for 2 h. The reaction was monitored by ³¹P NMR spectroscopy. Upon completion, the solvent was removed under reduced pressure. The gold complex CP-Au-1 was isolated as a yellow powder (285 mg, 93 % yield). ¹H NMR (CDCl₃): δ = 3.90 (s, 3 H, H₃), 6.87 (d, ⁴J_{H,H} = 2.4 Hz, 1 H, H_b), 6.90 (dd, ³J_{H,H} = 8.4, ⁴J_{H,H} = 2.4 Hz, 1 H, H_c), 7.43–7.63 (m, 13 H, H_{d,g,h,i,j}), 7.80 (dd, ³J_{H,H} = 8.4, ⁴J_{H,P} = 2.1 Hz, 2 H, H_f), 7.84 (s, 1 H, H_e) ppm. ¹³C{¹H} NMR (CDCl₃): δ = 56.0, 100.6, 113.3 (d, *J*_{C,P} = 11.9 Hz), 123.1 (d, *J*_{C,P} = 1.2 Hz), 124.8, 128.2, 128.7 (d, *J*_{C,P} = 62.6 Hz), 129.0, 129.3 (d, *J*_{C,P} = 15.5 Hz), 129.4 (d, *J*_{C,P} = 12.1 Hz), 132.2 (d, *J*_{C,P} = 2.6 Hz), 134.3 (d, *J*_{C,P} = 14.0 Hz), 138.9 (d, *J*_{C,P} = 2.6 Hz), 141.4, 155.8, 160.6, 163.4 ppm. ³¹P{¹H} NMR (CDCl₃): δ = 32.7 ppm. UV/Vis (CH₂Cl₂): λ_{max} (ϵ) = 350 (25700 M⁻¹ cm⁻¹). IR: $\tilde{\nu}$ = 326.83 ($\nu_{\text{Au-Cl}}$), 1653 ($\nu_{C=O}$) cm^{-1} . HRMS (ESI): calcd. for $\text{C}_{28}\text{H}_{21}\text{AuClO}_3\text{PNa}$ 691.04746 [M + Na]⁺; found 691.04815.

[(3-[4-(Diphenylphosphanyl)phenyl]-7-methoxy-2*H*-chromen-2-one)gold(I)(thio- β -D-glucose tetraacetate)] (CP-AuS-2): The reaction was carried out under argon. [(3-[4-(Diphenylphosphanyl)phenyl]-7-methoxy-2*H*-chromen-2-one)AuCl] (CP-Au-2; 128 mg, 0.193 mmol) was dissolved in degassed CH₂Cl₂ (10 mL). 1-Thio- β -D-glucose tetraacetate (70.3 mg, 0.193 mmol) dissolved in distilled acetone (5 mL), NaOH (7.7 mg, 0.193 mmol) and four drops of water were introduced into a Schlenk tube. The reaction mixture was stirred for 10 min at room temperature in the dark. This mixture was slowly added to the first one at 0 °C and then stirred for 3 h at room temperature in the dark. The reaction mixture was filtered to remove salts and the solvent was removed under reduced pressure. The complex CP-AuS-2 was isolated as a yellow powder (177 mg, 92 % yield). ¹H NMR (CDCl₃): δ = 1.90 [s, 3 H, CH₃C(O)], 1.97 [s, 3 H, CH₃C(O)], 2.02 [s, 3 H, CH₃C(O)], 2.05 [s, 3 H, CH₃C(O)], 3.74–3.80 (m, s, CH₂ sugar), 3.90 (s, 3 H, H₃), 4.13 (dd, ³J_{H,H} = 12.3, ²J_{H,H} = 2.6 Hz, 1 H, CH₂ sugar), 4.22 (dd, ³J_{H,H} = 12.3, ³J_{H,H} = 4.8 Hz, 1 H, CHCH₂ sugar), 5.0–5.2 (m, 4 H, CH sugar), 6.86 (d, ⁴J_{H,H} = 2.4 Hz, 1 H, H_b), 6.89 (dd, ³J_{H,H} = 8.4, ⁴J_{H,H} = 2.4 Hz, 1 H, H_c), 7.45–7.65 (m, 13 H, H_{d,g,h,i,j}), 7.83 (dd, ³J_{H,H} = 8.4, ⁴J_{H,P} = 2.0 Hz, 2 H, H_f), 7.88 (s, 1 H, H_e) ppm. ¹³C{¹H} NMR (CDCl₃): δ = 20.7, 20.7, 20.7, 21.1, 55.9, 74.2, 74.8, 100.5, 113.1 (d, *J*_{C,P} = 1.3 Hz), 123.1 (d, *J*_{C,P} = 1.2 Hz), 128.9, 129.1, 129.3, 129.3 (d, *J*_{C,P} = 11.4 Hz), 131.9 (d, *J*_{C,P} = 2.8 Hz), 134.3 (d, *J*_{C,P} = 13.6 Hz), 138.6, 141.3, 155.6, 160.5, 163.3, 169.6, 170.3, 170.8 ppm. ³¹P{¹H} NMR (CDCl₃): δ = 36.2 ppm. UV/Vis (CH₂Cl₂): λ_{max} (ϵ) = 350 (24300 M⁻¹ cm⁻¹). IR: $\tilde{\nu}$ = 370.55 ($\nu_{\text{Au-Sucre}}$), 1653 ($\nu_{C=O}$) cm^{-1} . HRMS (ESI): calcd. for $\text{C}_{42}\text{H}_{40}\text{O}_{12}\text{SPAuNa}^+$ 1019.15413 [M + Na]⁺; found 1019.15672.

[(η^6 -*p*-Cymene)(3-[4-(diphenylphosphanyl)phenyl]-7-methoxy-2*H*-chromen-2-one)RuCl₂] (CP-Ru-2): The reaction was carried out under argon. 3-[4-(Diphenylphosphino)phenyl]-7-methoxy-2*H*-chromen-2-one (CP-2; 150 mg, 0.344 mmol) and [RuCl₂(*p*-cymene)]₂ (105 mg, 0.172 mmol) were dissolved in degassed CH₂Cl₂ (10 mL). The resulting mixture was stirred at room temperature for 2 h. The reaction was monitored by ³¹P NMR spectroscopy. Upon completion, the solvent was removed under reduced pressure. The ruthenium complex CP-Ru-2 was isolated as a red powder (222 mg, 87 %

yield). ¹H NMR (CDCl₃): δ = 1.10 [d, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, 6 H, CH(CH₃)₂ *p*-cymene], 1.88 (s, 3 H, CH₃ *p*-cymene), 2.84 [hept, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, 1 H, CH(CH₃)₂ *p*-cymene], 3.87 (s, 3 H, H_a), 5.02 (d, ³J_{H,H} = 6.2 Hz, 2 H, CH_{Ar} *p*-cymene), 5.21 (d, ³J_{H,H} = 6.2 Hz, 2 H, CH_{Ar} *p*-cymene), 6.80–6.89 (m, 2 H, H_{b,c}), 7.33–7.45 (m, 7 H, H_{d,g}, H_{ph}), 7.67 (dd, ³J_{H,H} = 8.4, ⁴J_{H,P} = 2.1 Hz, 2 H, H_f), 7.75 (s, 1 H, H_e), 7.81–7.94 (m, 6 H, H_{ph}) ppm. ¹³C{¹H} NMR (CDCl₃): δ = 17.9, 22.0, 30.4, 55.8, 87.3 (d, *J*_{C,P} = 5.4 Hz), 89.1 (d, *J*_{C,P} = 3.3 Hz), 96.2, 100.6, 111.2 (d, *J*_{C,P} = 3.3 Hz), 113.0, 113.3, 123.8 (d, *J*_{C,P} = 1.0 Hz), 127.8 (d, *J*_{C,P} = 10.4 Hz), 128.2 (d, *J*_{C,P} = 9.9 Hz), 129.3, 130.4 (d, *J*_{C,P} = 2.1 Hz), 133.7 (d, *J*_{C,P} = 45.7 Hz), 134.0 (d, *J*_{C,P} = 45.7 Hz), 134.5 (d, *J*_{C,P} = 9.4 Hz), 134.7 (d, *J*_{C,P} = 9.4 Hz), 136.9 (d, *J*_{C,P} = 2.8 Hz), 141.0, 155.6, 160.8, 163.1 ppm. ³¹P{¹H} NMR (CDCl₃): δ = 23.9 ppm. UV/Vis (CH₂Cl₂): λ_{max}(ε) = 348 (31000 M⁻¹ cm⁻¹). IR: ν̄ = 1653 (ν_{C=O}) cm⁻¹. HRMS (ESI): calcd. for C₃₈H₃₅Cl₂O₃PRu 707.10577 [M – Cl]⁺; found 707.10608; calcd. for C₃₈H₃₅Cl₂O₃PRuNa 765.06412 [M + Na]⁺; found 765.06388.

[(η⁶-*p*-Cymene)(3-{4-(diphenylphosphanyl)phenyl}-7-methoxy-2H-chromen-2-one)OsCl₂] (CP-Os-2): The reaction was carried out under argon. CP-2 (150 mg, 0.344 mmol) and [OsCl₂(*p*-cymene)]₂ (136 mg, 0.172 mmol) were dissolved in degassed CH₂Cl₂ (12 mL). The resulting mixture was stirred at room temperature for 2 h. The reaction was monitored by ³¹P NMR spectroscopy. Upon completion, the solvent was removed under reduced pressure. The osmium complex CP-Os-2 was isolated as a pale-brown powder (215 mg, 75 % yield). ¹H NMR (CDCl₃): δ = 1.16 [d, ³J_{H,H} = 6.9 Hz, 6 H, CH(CH₃)₂ *p*-cymene], 1.99 (s, 3 H, CH₃ *p*-cymene), 2.74 [hept, ³J_{H,H} = 6.9 Hz, 1 H, CH(CH₃)₂ *p*-cymene], 3.88 (s, 3 H, H_a), 5.20 (d, ³J_{H,H} = 5.9 Hz, 2 H, CH_{Ar} *p*-cymene), 5.41 (d, ³J_{H,H} = 5.9 Hz, 2 H, CH_{Ar} *p*-cymene), 6.83–6.89 (m, 2 H, H_{b,c}), 7.33–7.41 (m, 6 H, H_{d,g}, H_{ph}), 7.43 (d, ³J_{H,H} = 8.4 Hz, 1 H, H_d), 7.68 (dd, ³J_{H,H} = 8.4, ⁴J_{H,P} = 2.1 Hz, 2 H, H_f), 7.75–7.88 (m, 7 H, H_e, H_{ph}) ppm. ¹³C{¹H} NMR (CDCl₃): δ = 18.0, 22.3, 30.2, 56.0, 80.1 (d, *J*_{C,P} = 5.0 Hz), 80.6 (d, *J*_{C,P} = 2.8 Hz), 88.8, 100.6, 103.5 (d, *J*_{C,P} = 3.9 Hz), 113.1, 113.4, 123.8 (d, *J*_{C,P} = 1.1 Hz), 127.8 (d, *J*_{C,P} = 10.4 Hz), 128.1 (d, *J*_{C,P} = 10.2 Hz), 129.3, 130.5 (d, *J*_{C,P} = 2.2 Hz), 133.2 (d, *J*_{C,P} = 52.3 Hz), 133.6 (d, *J*_{C,P} = 52.3 Hz), 134.6 (d, *J*_{C,P} = 9.4 Hz), 134.9 (d, *J*_{C,P} = 9.4 Hz), 136.8 (d, *J*_{C,P} = 2.4 Hz), 141.0, 155.6, 160.8, 163.1 ppm. ³¹P{¹H} NMR (CDCl₃): δ = –13.3 ppm. UV/Vis (CH₂Cl₂): λ_{max}(ε) = 350 (28800 M⁻¹ cm⁻¹). IR: ν̄ = 1653 (ν_{C=O}) cm⁻¹. HRMS (ESI): calcd. for C₃₈H₃₅Cl₂O₃POs – Cl 797.1628 [M – Cl]⁺; found 797.16421.

[Bis(3-{4-(diphenylphosphanyl)phenyl}-7-methoxy-2H-chromen-2-one)PtCl₂] (CP-Pt-2): The reaction was carried out under argon. CP-2 (150 mg, 0.344 mmol) and cyclooctadieneplatinum(II) dichloride (64.3 mg, 0.172 mmol) were dissolved in degassed CH₂Cl₂ (10 mL). The resulting mixture was stirred at room temperature for 2 h. The reaction was monitored by ³¹P NMR spectroscopy. Upon completion, the solvent was removed under reduced pressure. The platinum complex CP-Pt-2 was isolated as a yellow powder (360 mg, 92 % yield). ¹H NMR (CDCl₃): δ = 3.89 (s, 6 H, H_a), 6.83 (d, ⁴J_{H,H} = 2.4 Hz, 1 H, H_b), 6.87 (dd, ³J_{H,H} = 8.6, ⁴J_{H,H} = 2.4 Hz, 1 H, H_c), 7.18–7.26 (m, 8 H, H_d), 7.32–7.80 (m, 22 H, H_{d,f,g,h,i,j}), 7.83 (br. s, 2 H, H_e) ppm. ¹³C{¹H} NMR (CDCl₃): δ = 56.0, 100.5, 113.2 (d, *J*_{C,P} = 12.4 Hz), 123.2, 127.8 (pseudo t, *J* = 5.6 Hz), 128.2 (pseudo t, *J* = 5.6 Hz), 129.6, 131.2, 134.5 (pseudo t, *J* = 5.4 Hz), 135.2 (pseudo t, *J* = 5.2 Hz), 137.4, 141.4, 155.6, 160.7, 163.2 ppm. ³¹P{¹H} NMR (CDCl₃): δ = 13.5 (s+d, ¹J_{Pt} = 3675 Hz) ppm. UV/Vis (CH₂Cl₂): λ_{max}(ε) = 350 (58300 M⁻¹ cm⁻¹). IR: ν̄ = 1653 (ν_{C=O}) cm⁻¹. HRMS (ESI): calcd. for C₅₆H₄₂ClO₆P₂Pt 1102.17921 [M – Cl]⁺; found 1102.17991.

Photophysical Characterization: UV/Vis absorption spectra were recorded with a JASCO V630BIO spectrometer. The steady-state fluorescence emission spectra were recorded with a JASCO FP8560 spectrofluorimeter. All fluorescence spectra were corrected for in-

strument response. The fluorescence quantum yields (Φ_F) were calculated from Equation (1)

$$\frac{\Phi_F}{\Phi_{FR}} = \frac{n^2}{n_R^2} \times \frac{\int_0^\infty I_F(\lambda_E, \lambda_F) d\lambda_F}{\int_0^\infty I_{FR}(\lambda_E, \lambda_F) d\lambda_F} \times \frac{1 - 10^{-A(\lambda_E)}}{1 - 10^{-A(\lambda_E)}}$$
 (1)

in which Φ_F and Φ_{FR} are the fluorescence quantum yields of the compound and the reference, respectively, A(λ_E) and A_R(λ_E) are the absorbances at the excitation wavelength of the compound and the reference, respectively, and *n* is the refractive index of the medium, and *I*_F and *I*_{FR} are the fluorescent intensities of the compound and the reference, respectively. 9,10-Diphenylanthracene (Φ_F = 0.97 in cyclohexane) was used as standard.^[10] In all the Φ_F determinations, correction for the solvent refractive index (*n*) was applied.

X-ray Structures: Suitable crystals of CP-2 and CP-Ru-2 were selected and mounted on a Bruker APEX-II CCD diffractometer. The crystals were kept at 115 K during data collection. Using Olex2,^[16] the structures were solved by direct methods using the SHELXT^[17] structure solution program and refined by least squares minimization using the SHELXL^[18] refinement package. Except for the minor component of a disordered isopropyl group in CP-Ru-2 (C47a and C48a), all non-hydrogen atoms were refined by using anisotropic thermal parameters. Hydrogen atoms were refined by using a riding model.

CCDC 1420552 (for CP-2) and 1420553 (for CP-Ru-2) contain the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge from The Cambridge Crystallographic Data Centre.

Computational Details: The geometries of the singlet ground state (S₀) and the emissive state (S_{1,ππ*}) were optimized at the B3LYP^[19] and TD-B3LYP levels of theory, respectively, for CP-1, CPMe+1, CP-Au-1 and CP-Ru-1. For these optimizations the 6-31G(d) atomic basis set was selected. Relativistic effects were included for the Ru and Pt atoms by using the ECP-28-mwb and ECP-60-mwb Stuttgart/Dresden pseudopotentials.^[20] The nature of the stationary points was confirmed by computing the Hessian at the same level of theory. The UV/Vis absorption spectrum was obtained by calculating vertical singlet electronic excitations using TD-B3LYP at the S₀ geometries. Some of the TD B3LYP calculations were performed in CH₂Cl₂ solution using the polarization continuum model (PCM).^[21] The emission excitation energies were obtained by computing the TD-B3LYP excitations for the optimized S_{1,ππ*} geometries. All the TD-B3LYP calculations were performed with the same basis set as in the optimizations. All calculations were performed by using the Gaussian09 program package.^[22]

Acknowledgments

The authors are grateful to the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) (ICMUB, UMR CNRS 6302) for financial support. Support was also provided by the Université de Bourgogne and the Conseil Régional de Bourgogne through the 3MIM integrated project (Marquage de Molécules par les Métaux pour l'Imagerie Médicale) and PARI SSTIC n°1 and n°6. Dr. Fanny Picquet, Marie José Penouilh and Dr. Michel Picquet are acknowledged for technical support. E. B. thanks COST Action TD1004 for financial support. D. E. acknowledges the European Research

Council (ERC) (Marches-278845) and the Région des Pays de la Loire for his postdoctoral grant. D. J. acknowledges the European Research Council (ERC) and the Région des Pays de la Loire for financial support within the framework of a starting grant (Marches-278845) and the LUMOMAT project, respectively. This research used the resources of the GENCI-CINES/IDRIS, the Centre de Calcul Intensif des Pays de Loire (CCIPL) and a local Troy cluster.

Keywords: Bioinorganic chemistry · Theranostic agents · Antitumor agents · P ligands · Fluorescent probes

- [1] a) A. V. Klein, T. W. Hambley, *Platinum-Based Anticancer Agents*, in: *Ligand Design in Medicinal Inorganic Chemistry* (Ed.: T. Storr), Wiley, Chichester, UK, **2014**, p. 9–10; b) T. C. Johnstone, K. Suntharalingam, S. J. Lippard, *Phil. Trans. R. Soc. A* **2015**, 373:20140185.
- [2] a) N. Muhammad, Z. Guo, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *19*, 144–153; b) C. G. Hartinger, P. J. Dyson, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 391–401; c) S. Komeda, A. Casini, *Curr. Top. Med. Chem.* **2012**, *12*, 219–235; d) A. F. A. Peacock, P. J. Sadler, *Chem. Asian J.* **2008**, *3*, 1890–1899; e) G. Gasser, I. Ott, N. Metzler-Nolte, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 3–25; f) E. R. Tiekink, *Inflammopharmacology* **2008**, *16*, 138–142; g) S. Nobili, E. Mini, I. Landini, C. Gabbiani, A. Casini, L. Messori, *Med. Res. Rev.* **2010**, *30*, 550–580; h) I. Ott, *Coord. Chem. Rev.* **2009**, *253*, 1670–1681; i) B. Bertrand, A. Casini, *Dalton Trans.* **2014**, *43*, 4209–4219; j) W. Fiskus, N. Saba, M. Shen, M. Ghias, J. Liu, S. Das Gupta, L. Chauhan, R. Rao, S. Gunewardena, K. Schorno, C. P. Austin, K. Maddocks, J. Byrd, A. Melnick, P. Huang, A. Wiestner, K. N. Bhalla, *Cancer Res.* **2014**, *74*, 2520–2532; k) for examples of clinical trials in progress in 2014–2015, see: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01747798>, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01419691> and http://www.cancer.gov/clinicaltrials/search/view?cdrid=743608&version=HealthProfessional#StudyIdInfo_CD0000743608.
- [3] R. Kumar, W. S. Shin, K. Sunwoo, W. Y. Kim, S. Koo, S. Bhuniya, J. S. Kim, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, DOI: 10.1039/C5CS00224A.
- [4] S. S. Kelkar, T. M. Reineke, *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 1879–1903.
- [5] M. Ali, L. Dondaine, A. Adolle, C. Sampaio, F. Chotard, P. Richard, F. Denat, A. Bettaieb, P. Le Gendre, V. Laurens, C. Goze, C. Paul, E. Bodio, *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 4521–4528.
- [6] J. J. Hanthorn, E. Haidasz, P. Gebhardt, D. A. Pratt, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 10141–10143.
- [7] S. Tasan, O. Zava, B. Bertrand, C. Bernhard, C. Goze, M. Picquet, P. Le Gendre, P. Harvey, F. Denat, A. Casini, E. Bodio, *Dalton Trans.* **2013**, *42*, 6102–6109.
- [8] The value of the coupling constant $^1J_{P-Pt}$ depends on the nature of the other ligands coordinated to the Pt center and notably on the nature of the ligand *trans* to the P atom. $^1J_{P-Pt} > 3000$ Hz values are generally observed for *trans*-[P–PtXY–Cl] complexes, whereas lower coupling constants ($^1J_{P-Pt} < 3000$ Hz) are reported for *trans*-[P–PtXY–P] and *trans*-[P–PtXY–olefin] complexes, see, for example: a) L. Rigamonti, A. Forni, M. Manassero, C. Manassero, A. Pasini, *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 123–135; b) A. Massard, V. Rampazzi, A. Perrier, E. Bodio, M. Picquet, P. Richard, J.-C. Hlerzo, P. Le Gendre, *Organometallics* **2012**, *31*, 947–958; c) J. A. Feducia, M. R. Gagne, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 592–599.
- [9] Crystal data for CP-2: C₂₈H₂₁O₃P (*M* = 436.42 g/mol), triclinic, space group *P*1̄ (no. 2), *a* = 6.5730(4), *b* = 10.3480(6), *c* = 16.5877(10) Å, α = 84.354(2)°, β = 81.001(2)°, γ = 87.0180(10)°, *V* = 1108.19(11) Å³, *Z* = 2, *T* = 115 K, μ (Mo–K α) = 0.152 mm^{−1}, *D*_{calcd.} = 1.308 g/cm³, 34563 reflections measured (4.994° ≤ 2 θ ≤ 55.23°), 5143 unique (*R*_{int} = 0.0223, *R*_{sigma} = 0.0126), which were used in all calculations. The final *R*_i value was 0.0322 [*I* > 2 σ (*I*)] and *wR*₂ was 0.0879 (all data). Crystal data for CP-Ru-2: C₇₇H₇₁Cl₆O₆P₂Ru₂ (*M* = 1569.11 g/mol), monoclinic, space group *P*2₁/*n* (no. 14), *a* = 12.3001(6), *b* = 25.1497(12), *c* = 22.1034(12) Å, β = 99.4300(10)°, *V* = 6745.2(6) Å³, *Z* = 4, *T* = 115 K, μ (Mo–K α) = 0.788 mm^{−1}, *D*_{calcd.} = 1.545 g/cm³, 88328 reflections measured (3.726° ≤ 2 θ ≤ 55.168°), 15493 unique (*R*_{int} = 0.0527, *R*_{sigma} = 0.0415), which were used in all calculations. The final *R*_i value was 0.0377 [*I* > 2 σ (*I*)] and *wR*₂ was 0.0889 (all data). CCDC 1420552 (for CP-2) and 1420553 (for CP-Ru-2) contain the supplementary crystallographic data for this paper. These data are provided free of charge by The Cambridge Crystallographic Data Centre.
- [10] A. M. Brouwer, *Pure Appl. Chem.* **2011**, *83*, 2213–2228.
- [11] M. Savarese, U. Raucci, C. Adamo, P. A. Netti, I. Ciofini, N. Rega, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16*, 20681–20688.
- [12] a) D. Escudero, E. Heuser, R. J. Meier, M. Schäferling, W. Thiel, E. Holder, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 15639–15644; b) J.-L. Heully, F. Alary, M. Boggio-Pasqua, *J. Chem. Phys.* **2009**, *131*, 184308.
- [13] A. R. Santos, D. Escudero, L. González, G. Orellana, *Chem. Asian J.* **2015**, *10*, 622–629.
- [14] “X-type” ligands are ligands that donate one electron to the metal and accept one from it when using the neutral ligand method of electron counting.
- [15] a) S. Tasan, C. Licona, P.-E. Doulain, C. Michelin, C. P. Gros, P. Le Gendre, P. D. Harvey, C. Paul, C. Gaiddon, E. Bodio, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2015**, *20*, 143–154; b) P. D. Harvey, S. Tasan, C. P. Gros, C. H. Devillers, P. Richard, P. Le Gendre, E. Bodio, *Organometallics* **2015**, *34*, 1218–1227.
- [16] O. V. Dolomanov, L. J. Bourhis, R. J. Gildea, J. A. K. Howard, H. Puschmann, *J. Appl. Crystallogr.* **2009**, *42*, 339–341.
- [17] G. M. Sheldrick, *Acta Crystallogr., Sect. A* **2015**, *71*, 3–8.
- [18] G. M. Sheldrick, *Acta Crystallogr., Sect. A* **2008**, *64*, 112–122.
- [19] a) A. D. Becke, *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648–5652; b) C. T. Lee, W. T. Yang, R. G. Parr, *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785–789.
- [20] D. Andrae, U. Häusermann, M. Dolg, H. Stoll, H. Preuss, *Theor. Chim. Acta* **1990**, *77*, 123–141.
- [21] a) M. Cossi, V. Barone, B. Menucci, J. Tomasi, *Chem. Phys. Lett.* **1998**, *286*, 253–260; b) B. Menucci, J. Tomasi, *J. Chem. Phys.* **1997**, *106*, 5151–5158.
- [22] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, D. J. Fox, *Gaussian 09*, revision A.1, Gaussian, Inc., Wallingford, CT, **2009**.

Received: November 9, 2015
Published Online: January 5, 2016

Annexe 2. Ali, M., L. Dondaine, A. Adolle, C. Sampaio, F. Chotard, P. Richard, F. Denat, A. Bettaieb, P. Le Gendre, V. Laurens, C. Goze, C. Paul, and E. Bodio. 2015. Anticancer Agents: Does a Phosponium Behave Like a Gold(I) Phosphine Complex? Let a "Smart" Probe Answer! *J Med Chem* 58:4521-4528

Anticancer Agents: Does a Phosphonium Behave Like a Gold(I) Phosphine Complex? Let a “Smart” Probe Answer!

Moussa Ali,[†] Lucile Dondaine,^{‡,§} Anais Adolle,^{‡,§} Carla Sampaio,^{‡,§} Florian Chotard,[†] Philippe Richard,[†] Franck Denat,[†] Ali Bettaieb,^{‡,§} Pierre Le Gendre,[†] Véronique Laurens,^{‡,§} Christine Goze,[†] Catherine Paul,^{*,‡,§} and Ewen Bodio^{*,†}

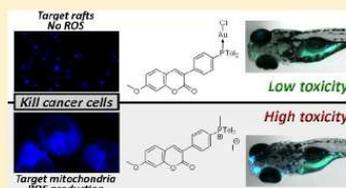
[†]Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne, ICMUB UMR CNRS 6302, 9 Avenue Alain Savary, BP 47870, Dijon Cedex, 21078, France

[‡]École Pratique des Hautes Études, Paris, F-75014, France

[§]EA7269 EPHE-University of Burgundy, University of Burgundy, Dijon, F-21000, France

S Supporting Information

ABSTRACT: Gold phosphine complexes, such as auranofin, have been recognized for decades as antirheumatic agents. Clinical trials are now underway to validate their use in anticancer or anti-HIV treatments. However, their mechanisms of action remain unclear. A challenging question is whether the gold phosphine complex is a prodrug that is administered in an inactive precursor form or rather that the gold atom remains attached to the phosphine ligand during treatment. In this study, we present two novel gold complexes, which we compared to auranofin and to their phosphonium analogue. The chosen ligand is a phosphine-based smart probe, whose strong fluorescence depends on the presence of the gold atom. The *in vitro* biological action of the gold complexes and the phosphonium derivative were investigated, and a preliminary *in vivo* study in healthy zebrafish larvae allowed us to evaluate gold complex biodistribution and toxicity. The different analyses carried out showed that these gold complexes were stable and behaved differently from phosphonium and auranofin, both *in vitro* and *in vivo*. Two-photon microscopy experiments demonstrated that the cellular targets of these gold complexes are not the same as those of the phosphonium analogue. Moreover, despite similar IC₅₀ values in some cancer cell lines, gold complexes displayed a low toxicity *in vivo*, in contrast to the phosphonium salt. They are therefore suitable for future *in vivo* investigations.



■ INTRODUCTION

Among metal-based therapeutic agents, gold(I) derivatives have attracted an increasing interest mainly due to their antirheumatic and anticancer properties.¹ Two molecules, auranofin and aurothiomalate, are currently undergoing clinical trials for the treatment of certain cancers.² Several mechanistic studies support the idea that mitochondria, thioredoxin reductase, and pathways of oxidative phosphorylation are among the primary intracellular targets.³ Nevertheless, there is a lack of information concerning the understanding of the chemical behavior of gold complexes, in particular the gold phosphine compounds. It is still unclear which of the whole complex, the phosphine ligand, the gold atom, or degradation products is responsible for the biological activity of these gold complexes. Phosphonium derivatives are well-known for being cytotoxic and for targeting mitochondria.⁴ If the P–Au bond is not strong enough, the phosphine may be toxic itself, alkylated *in situ* to generate the phosphonium salt or oxidized to phosphine oxide. Moreover, when the structures of the gold complexes are examined, it can be seen that the gold(I) is isolobal to H⁺. This could give a phosphonium character to the phosphine–Au fragment. It is possible that phosphonium-like

behavior could explain the biological properties of these compounds.

In the present study, we aimed to address this issue. More precisely, we set out to answer the following three questions:

- (1) When Au(I) is electronically isolobal to the proton, do phosphonium and the phosphine–Au(I) complex behave in the same way?
- (2) Is the P–Au bond stable both *in vitro* and *in vivo*, or does the phosphine–Au(I) complex function as a prodrug?
- (3) If the phosphine decoordinates from the metal center, does it induce the generation of a phosphonium salt *in situ* or is the phosphine itself toxic?

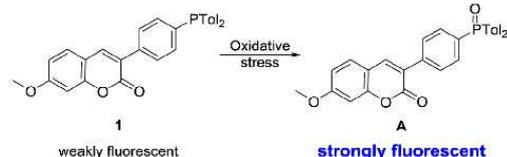
To answer these questions, we used two different compounds, which are structurally very similar to each other: a gold complex and its phosphonium derivative. Furthermore, we studied an auranofin analogue of this complex. To assess their behavior, it is essential to be able to track these compounds, at least *in vitro*. One way to follow such compounds is through fluorescent analysis, where the

Received: January 8, 2015

Published: May 14, 2015

fluorescence intensity changes dramatically, depending on the presence, or not, of the gold atom on the phosphorus atom. We were particularly interested by previous studies concerning coumarinphosphines.⁵ In these analyses, the fluorescence of coumarin was quenched by the phosphine group, but a strong fluorescence enhancement was observed upon phosphine oxidation (Scheme 1).^{5a} This phenomenon enabled the authors

Scheme 1. Coumarinphosphine ligand 1 and the corresponding oxide (A) described by Pratt and colleagues^{5a}



to study biological behavior such as oxidative stress. In the present study, we wanted to take advantage of this property by masking the phosphorus lone pair of the probe either by alkylation or by complexing it to a metal atom. As a result, the phosphonium derivative and the gold complex would become strongly fluorescent, in contrast to the free ligand. This would allow us to determine the biological stability of the phosphine–Au bond by fluorescence imaging and to compare the behavior of the coumarinphosphine–Au derivatives to that of the phosphonium analogue.

Thus, below we present the synthesis, characterization, and photophysical properties of three new derivatives, as well as studies of the different compounds *in vitro* and *in vivo* in zebrafish larvae.

RESULTS AND DISCUSSION

Chemical Syntheses. The coumarinphosphine ligand **1** was synthesized in two steps according to the procedure described by Pratt and colleagues (Scheme 2).^{5a} This compound was then reacted with [Au(tht)Cl] (tht = tetrahydrothiophene) to afford quantitatively the gold complex **2**. In previous studies, we and others found that replacing the chlorido ligand of a phosphine–Au(I) complex by thioglucose

tetraacetate often resulted in a significant improvement of its biological properties.⁶ This reaction was carried out in high yield, by reacting the Au–Cl complex **2** with *in situ* generated thiolate to obtain complex **3**. The phosphonium analogue **4** was quantitatively prepared by alkylating ligand **1** with iodomethane.

The formation of these derivatives was monitored by ³¹P NMR. A significant shift of the NMR signal was observed when ligand **1** (singlet at –7.6 ppm) was reacted to give the complexes (singlets at 31.4 ppm for complex **2** and at 35.6 ppm for complex **3**) or phosphonium derivative **4** (singlet at 21.2 ppm). The broad shape of the complex **3** singlet is characteristic of P–Au–S compounds.^{6a,c} The far-infrared spectrum of complex **3** displayed a new band at 371 cm^{–1}, confirming the formation of an S–Au bond.⁷

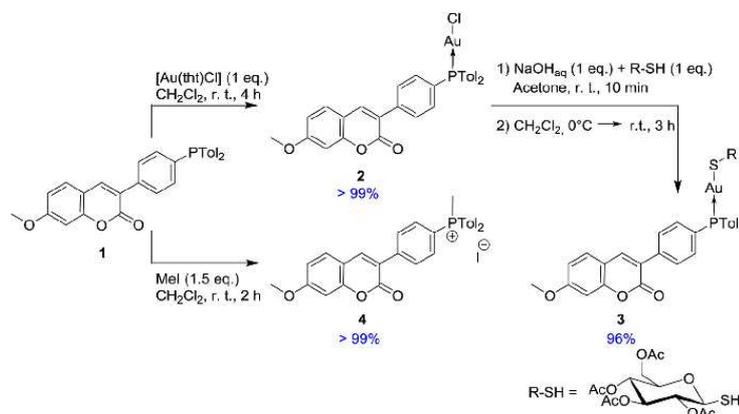
All the products were fully characterized, and the structures of compounds **1**, **2**, and **4** were confirmed by X-ray diffraction analysis of monocrystals (Figure 1; see Supporting Information for the ORTEP representation of ligand **1**). The comparison of complex **2** and phosphonium **4** ORTEP views combined with a PM6⁹ theoretical study indicates that compounds **2** and **4** are very similar in terms of three-dimensional structure (see Supporting Information for details). This hypothesis was confirmed by their similar UV–visible spectra; see Supporting Information.

Photophysical Studies. The photophysical properties of coumarinphosphine ligand **1** and the different complexes were studied in dichloromethane and are presented in Table 1.

The coumarinphosphine ligand **1** had an absorption maximum at 348 nm in CH₂Cl₂, with a molar absorption coefficient of 25 100 M^{–1}·cm^{–1}.^{5a} Alkylation of the phosphine induced a bathochromic shift of the absorption and emission spectra. Furthermore, this alkylation resulted in an increase of ϵ to 34 300 M^{–1}·cm^{–1}. Complexing the phosphine onto Au(I) did not significantly influence the epsilon value.

The photophysical spectra of complex **3** are shown in Figure 2. A fluorescence curve corresponding to the coumarin moiety can be observed around 430 nm for compounds **1**, **2**, and **3** (Figure 2 and Supporting Information) and 441 nm for compound **4** (see Supporting Information).

Scheme 2. Synthesis of Compounds 2, 3, and 4



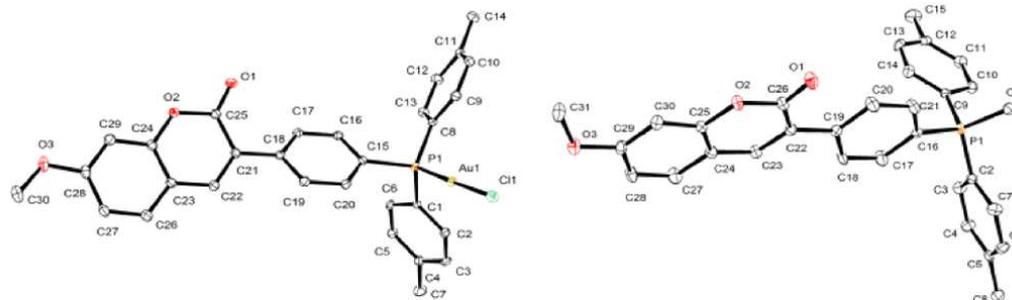


Figure 1. (Left) ORTEP view of complex 2. (Right) ORTEP view of a phosphonium 4.⁸

Table 1. Photophysical Data^a of the Different Compounds in CH₂Cl₂ at 298 K

compd	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	ϵ (M ⁻¹ ·cm ⁻¹)	Φ_f (%) ^b	B_f (M ⁻¹ ·cm ⁻¹)	$B_f/B_{f(1)}$
1	348	430	25100	3	753	1
2	350	432	25700	83	21330	28
3	349	432	26200	83	21750	29
4	355	441	34300	91	31210	41

^a λ_{abs} = wavelength of maximum absorption; λ_{em} = wavelength of maximum emission; ϵ = molar absorption coefficient; Φ_f = fluorescence quantum yield; brightness $B_f = \epsilon\Phi_f$; $B_{f(1)}$ = brightness for compound 1. ^bReference: diphenylanthracene ($\Phi_f = 0.97$; $\lambda_{\text{exc}} = 355$ nm, in cyclohexane).¹⁰

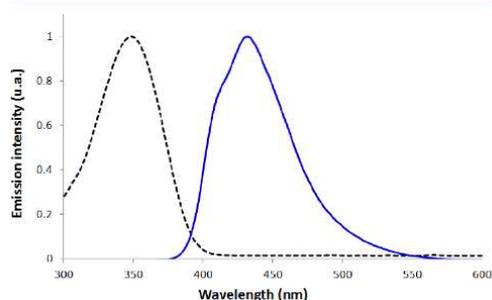


Figure 2. Absorption (black dashed line) and emission (blue solid line) spectra of complex 3. Spectra were determined in CH₂Cl₂ at 298 K.

The quantum yield of the coumarinphosphine ligand 1 is low (3%). This quenching can be explained by intramolecular photoinduced electron transfer (PET) from the phosphine to the fluorophore. We verified that the PET mechanism was not intermolecular by recording the fluorescence spectrum of phosphonium 4 in the presence of 10 mol equiv of tricyclohexylphosphine. Effectively, during this experiment no change in fluorescence emission was recorded, whereas if the PET were intermolecular, a significant quenching of phosphonium 4 fluorescence would have been observed. Alkylation of the phosphine strongly enhanced the coumarin fluorescence by preventing PET ($\Phi = 91\%$). Complexing of Au(I) to 1 induced the same phenomenon, with a quantum yield of fluorescence of 83% of the resulting complexes 2 and 3.

Another important factor, which characterizes a fluorophore for biological applications, is the brightness $B_f = \epsilon\Phi_f$. This takes into account both the absorption and emission properties of the fluorescent probe. Alkylation of the coumarinphosphine ligand 1 induced an increase of brightness by a factor of 41, while that of the Au(I) complexes was increased by a factor of 29.

The difference in fluorescence efficiency between coumarinphosphine ligand 1 and the gold complexes 2 and 3 could be exploited to monitor the stability of the complexes and their behavior in vitro. The release of Au(I) should induce a strong quenching of fluorescence. To trace this phenomenon, the fluorescence intensity of complex 2 was followed in the presence of 10 mol equiv of tricyclohexylphosphine as a competitor ligand (see Supporting Information for details of the corresponding NMR study). The release of Au(I) from complex 2 was almost immediate, and this was accompanied by strong quenching of the coumarin fluorescence (Figure 3). This validates our concept of smart probe.

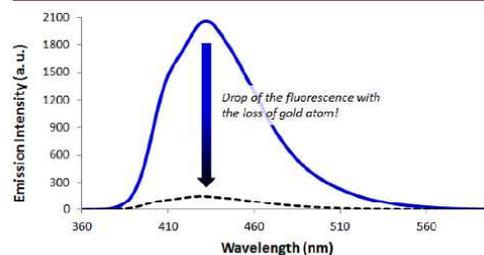


Figure 3. Emission intensity of complex 2 before (blue solid line) and after (black dashed line) the addition of 10 mol equiv of tricyclohexylphosphine (a.u. = arbitrary unit).

Biological Studies. The antiproliferative activity of the four compounds was tested in human cancer cell lines from mammary (MDA-MB-231 and MCF-7) or colon (SW480 and HCT-116) origins. These cell lines in particular were chosen for two reasons. First, mammary and colon cancers are very frequent cancers, with poor prognosis when diagnosed at a late stage. Second, these cells differ in their status of the p53 tumor suppressor gene. HCT-116 and MCF-7 cells express WT p53, whereas SW480 and MDA-MB-231 cells express a mutated form of the p53 gene. The sensitivity of cancer cells in general toward treatment is often dependent on p53,¹¹ which

is mutated in almost 50% of all human cancers.¹² These mutations are associated with a lack of response to certain chemotherapeutic drugs.¹³ Auranofin is an interesting compound in this context, as it has been reported to induce apoptosis via oxidative stress but independently of p53.¹⁴ Such compounds could be used for the elaboration of new strategies to overcome chemotherapy resistance. The gold phosphine complexes **2** and **3** displayed substantial toxic effects with similar IC_{50} values ranging between 33 and 50.1 μM in mammary and colon cancer cell lines. However, these compounds were less potent cytotoxic agents than the phosphonium analogue **4**, which gave an IC_{50} value of 10.1–33.4 μM (Table 2). The toxicity of these compounds was

Table 2. Determination of the IC_{50} Values of Compounds **1, **2**, **3**, and **4** in SW480, MDA-MB-231, MCF-7, and HCT-116 Cells^a**

compd	SW480	MDA	MCF7	HCT116
1	ND	ND	ND	ND
2	42.0 \pm 11.7	33.1 \pm 14.8	49.0 \pm 1.3	37.8 \pm 17.1
3	33.6 \pm 14.1	46.5 \pm 4.8	50.1 \pm 0.1	49.9 \pm 0.3
4	25.7 \pm 0.3	10.1 \pm 0.2	33.4 \pm 14.2	28.4 \pm 4.5

^aThe IC_{50} values (μM) of compounds **1**, **2**, **3**, and **4** were determined at 48 h in SW480, MDA-MB-231, MCF-7, and HCT-116 cells by MTS assays. The indication ND (not determined) means that IC_{50} was >100 μM .

independent of the p53 status, since no difference was observed between cells expressing WT p53 and cells expressing mutated p53. No IC_{50} value could be attributed to the coumarinphosphine ligand **1**, confirming its nontoxicity.

We used two-photon fluorescence microscope and a fluorimeter to investigate whether the differences in toxicity between gold complexes and phosphonium could be due to variability in cell accumulation or subcellular location of the different compounds. SW480 cells or MDA-MB-231 cells were incubated for a short time (15 min) with 25 or 50 μM coumarinphosphine derivatives (compounds **1**–**4**), and fluorescence was measured at different times after treatment. Phosphonium **4** accumulated rapidly in the cells as was attested by the high fluorescence intensity (see Supporting Information for details) and localized to the cytoplasm (Figure 4). In

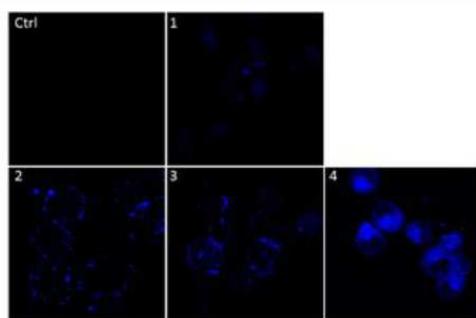


Figure 4. Two-photon fluorescence microscopy experiments in the MDA-MB-231 cell line. Cells were treated with 50 μM metal compounds **1**, **2**, **3**, and **4** for 15 min at 37 $^{\circ}C$, and excitation was at 750 nm.

contrast, gold phosphine complexes **2** and **3** accumulated at the plasma membrane as small aggregates. The coumarinphosphine ligand **1** gave a very weak fluorescent signal, localized in the cytoplasm, confirming that free coumarinphosphine corresponds to the inactive form of the probe (Figure 4). Fluorescence measured with all the compounds is dose-dependent and stable when observed 48 h after application to the cells (data not shown). These results demonstrated that both the fluorophore and the P–Au bond are stable in vitro for at least 48 h. The weak fluorescence observed in the case of coumarinphosphine ligand **1** indicated that this molecule did not undergo protonation, alkylation, or oxidation in vitro. The results concerning oxidation are in agreement with the study of Pratt's group.^{5a}

The punctuated and plasma membrane localization of complexes **2** and **3** seem to occur in lipid rafts, which are cellular domains that concentrate plasma membrane proteins and lipids involved in the regulation of numerous cell functions, including signaling, trafficking, adhesion, migration, and growth. These functions seem to be due to the location in the rafts of a large panel of receptors and signaling proteins involved in carcinogenesis and metastasis, such as EGFR, VEGFR, Ras (a small GTPase), focal adhesion kinase, Src (a tyrosine-protein kinase proto-oncogene).¹⁵ To verify this hypothesis, cells were pretreated with methyl- β -cyclodextrin (m β CD) (10 mM, Figure 5) or nystatin A (50 $\mu g/mL$; see Supporting

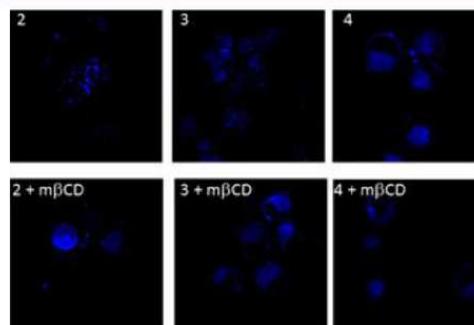


Figure 5. Two-photon fluorescence microscopy experiments of MDA-MB-231 cells treated with metal compound **2**, **3**, or **4**. Cells were treated with 50 μM metal compounds for 15 min at 37 $^{\circ}C$ after incubation with (lower panels) or without (upper panels) methyl- β -cyclodextrin (m β CD) (10 mM, 1 h at 37 $^{\circ}C$). Excitation was at 750 nm.

Information) to disrupt these microdomains. Nystatin A is a cholesterol scavenger that disrupts the rafts and forces the cytoplasmic accumulation of their components (see Supporting Information for details). In the presence of either m β CD or nystatin A, the gold phosphine complexes **2** and **3** relocated to the cytoplasm, lending weight to the hypothesis of their accumulation in lipid rafts in cancer cells.

It can be proposed that the location of the two phosphine gold complexes in lipid rafts would increase their interaction with these oncogenic proteins and affect their cell toxicity.

To investigate the molecular mechanisms leading to gold phosphine-mediated cell death, we tested the effects of these compounds on superoxide production, as phosphonium salts and auranofin are known to induce the production of

mitochondrial superoxide anions.⁴ SW480 and MDA-MB-231 cells were incubated for 1 h with these compounds (50 μM) before treatment with dihydroethidium (a fluorescent superoxide indicator) and flow cytometry analysis. The phosphonium analogue 4 and auranofin induced a high production of ROS in mammary or colorectal cancer cells, which was time dependent, whereas no superoxide anion production was observed with the coumarinphosphine ligand 1 or the gold complexes 2 and 3 (Figure 6 and Figure S24). These results

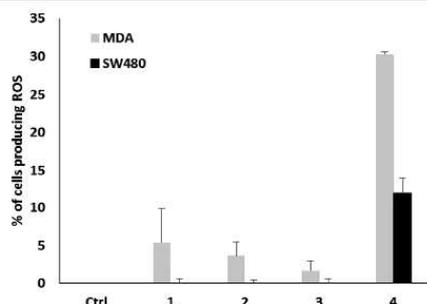


Figure 6. ROS detection in MDA-MB-231 and SW480 cells measured by flow cytometry using the dihydroethidium dye after incubation with compounds 1, 2, 3, and 4. Cells were treated with gold compounds at 50 μM for 1 h. Results are expressed as the % of cells that produce ROS, after subtraction of control fluorescence.

showed that the signaling pathways induced by the gold phosphine complexes 2 and 3 must be different from those induced by the phosphonium analogue 4. For example, ROS is produced in the presence of auranofin but not in the presence of complex 3. One hypothesis for this difference is the location of complexes in the lipid rafts. Thus, cells were pretreated with nystatin A (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Then, ROS production was no longer detected, confirming that the mechanism of action of gold complexes 2 and 3 differs from that of phosphonium analogue 4 and auranofin.

The previous results also highlight the strong influence of the phosphine substituents on mitochondria. Indeed, we recently observed this same phenomenon with another phosphine fluorophore.^{6a}

The biological behavior of these different compounds was studied *in vivo* using the zebrafish larvae model. We observed dose-dependent toxicity in 4dpf larvae treated with compounds 2, 3, and 4 but not with the coumarinphosphine ligand 1 (Table 3). In this assay (Table 3), compounds 3 and 4 at 100 μM both killed all larvae, although compound 4 was more toxic than complex 3 as evidenced by a lower threshold for 100% larvae death. In contrast, complex 2 was only mildly toxic at 100 μM . Ligand 1 did not show significant *in vivo* toxicity, in

agreement with *in vitro* results. *In vivo* toxicity thus depends on the nature of the ligand linked to the gold atom. These results suggest that despite its relatively modest IC_{50} value, compound 2 is worth investigating further *in vivo*.

Biodistribution analyses were also performed *in vivo* in 6dpf zebrafish larvae (see Figure 7 for details and Supporting

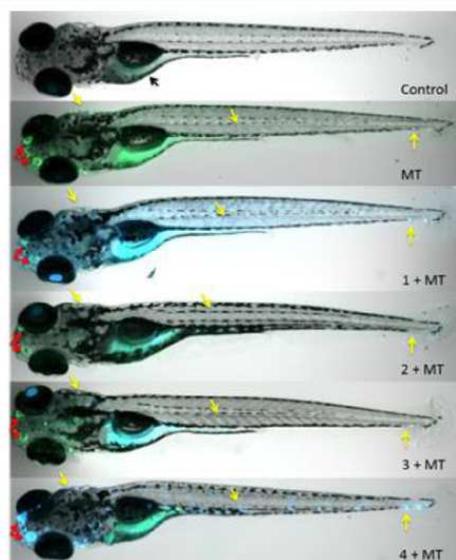


Figure 7. Biodistribution of compounds 1, 2, 3, and 4 in 6dpf zebrafish larvae. Zebrafish larvae were subjected to fluorescence imaging after a 1 h incubation with 10 μM of one of the four biological compounds under study, as indicated (1–4), followed by 1 h labeling with 25 nM MT. The experimental compounds give a blue fluorescence, whereas MT gives a green one: yolk sac, black arrow; nasal epithelium, red arrows; representative cranial and trunk neuromasts, yellow arrows.

Information for additional images). A MitoTracker Green FM dye (MT, a fluorophore that targets mitochondria) was used for colocalization purposes because phosphoniums are known to target mitochondria. Thus, a blue signal corresponds to the biological molecule indicated (1–4, emission recorded at 445 nm) and a green one to MT (emission recorded at 525 nm). Mitochondria rich cells (MRCs) present in neuromasts and the nasal epithelium were labeled using MT. Cranial and trunk neuromasts appear as punctuate dots. Representative signals are indicated by yellow arrows and epithelial nasal cells by red ones (MT larvae).¹⁶ All the compounds tested were detected in the digestive system, with the highest accumulation being observed

Table 3. Determination of Mortality of 4dpf Zebrafish Larvae after a 24 h Incubation with the Different Compounds^a

compd	10 μM	25 μM	50 μM	75 μM	100 μM
1	3.7 \pm 3.2	7.9 \pm 3.4	7.9 \pm 3.4	10.8 \pm 5.0	4.2 \pm 3.6
2	3.7 \pm 3.2	3.7 \pm 3.2	4.2 \pm 3.6	12.0 \pm 6.3	22.7 \pm 14.6
3	15.3 \pm 8.4	7.4 \pm 6.4	14.9 \pm 3.2	76.8 \pm 11.4	100.0 \pm 0.0
4	0.0 \pm 0.0	14.5 \pm 2.4	81.8 \pm 11.7	100.0 \pm 0.0	100.0 \pm 0.0

^aMortality was evaluated by % larvae death. Total larvae death is in boldface font and high mortality in italic font. For DMSO control larvae 1.8 \pm 1.6% mortality was observed.

for coumarinphosphine ligand **1**, then complex **3**, whereas only moderate signals were observed in this area for compounds **2** and **4**. For coumarinphosphine ligand **1**, a diffuse staining was observed throughout the larval body. This is not due to native phosphine but to that which has undergone oxidation to phosphine oxide (**A**, Scheme 1). Indeed, coumarinphosphine ligand **1** oxidizes when it is left for a prolonged time in an aerobic solution, here aquarium water. This indicated that the *in vivo* toxicity of compound **A** is not significant.^{5a} Concerning compound **4**, a clear specific phosphonium staining was observed. This corresponded to MRCs of the nasal epithelium and hair cells of neuromasts, as evidenced by the MT signal. While phosphine oxide **A** staining also overlaps with the MT dye, neither compound **2** nor **3** interfered with MT labeling, suggesting that gold complexes **2** and **3** do not target mitochondria. No more MT staining was observed in mitochondria after treatment with compound **4**, suggesting a mitochondria-dependent toxic effect of **4**. In control larvae, a green background signal of autofluorescence was observed in the yolk sac (black arrows) whereas no blue background signal was observed.

CONCLUSION

In this study, we report the synthesis of three new phosphine derivatives that display strong fluorescence properties. Two of these were gold complexes, whereas the third was a phosphonium analogue. Their characterization and especially the combination of X-ray diffraction analyses and theoretical calculations highlighted their structural similarities. We studied the stabilities of the two gold complexes both *in vitro* in cancer cells and *in vivo* in the zebrafish larvae model. The P–Au bond is stable in these systems for at least 48 h, and the difference in terms of *in vivo* toxicity between complexes **2** and **3** suggests the importance of the nature of the ligand attached to the gold atom. The coumarinphosphine ligand **1** did not display toxicity, either *in vitro* or *in vivo*. The absence of fluorescence *in vitro* indicated that no alkylation or oxidation of the phosphorus had occurred at least over 48 h after treatment, while diffuse *in vivo* fluorescence suggested the oxidation of compound **1**. So even if the phosphine is decoordinates from the metal center, it should not immediately be toxic.

Functional studies showed that even if the molecules tested are closely related structurally, their cytotoxicity, subcellular location, and biodistribution in the zebrafish larval model are clearly distinct. The cytoplasmic location of the phosphonium derivative **4** and its concentration in mitochondria-rich cells (MRCs) of the nasal epithelium and neuromasts (cluster of hair cells), combined with its ability to induce ROS production, could explain its toxicity *in vitro* and *in vivo*. In contrast, gold complexes **2** and **3** are unable to produce ROS and they accumulate in lipid rafts. This suggests a different mechanism of action from that of phosphonium derivatives and auranofin. Gold complexes **2** and **3** may induce cell toxicity by interaction with protein(s) contained in lipid rafts. Furthermore, the cytotoxicity of compounds **2–4** seems to be p53-independent, which should allow new avenues to be explored to overcome chemotherapy resistance.

Interestingly, compound **2** is toxic in tumor cells *in vitro*, especially in colon cancer cells, whereas it shows low toxicity in healthy zebrafish larvae. Thus, it may be an interesting drug to control the development of colon cancer cells, as it is distributed throughout the digestive system, with limited side effects in normal cells. However, more studies are needed to

precisely characterize the targets and the signaling pathways that these compounds could induce, before they can be considered as a new strategy for cancer therapy.

Finally, this study highlighted the value of designing traceable therapeutic agents to help identify targets and clarify the mechanisms of action of new drugs.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Procedures to synthesize compounds **2–4**; structural characterization data and spectra of compounds **1–4**; photophysical characterization data for these compounds and their spectra; X-ray structure data of compounds **1**, **2**, and **4**; theoretical calculation of phosphonium analogue **4**; *in vitro* tests on compounds **1–4** (IC₅₀ determination, two-photon fluorescence microscopy images, ROS measurements, and uptake observations in living cells by fluorescence); *in vivo* tests on compounds **1–4** (toxicity assay and fluorescence imaging in zebrafish larvae). The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b00480.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*C.P.: e-mail, catherine.paul@u-bourgogne.fr; phone, +33 (0)3 80 39 34 19; fax, +33 (0)3 80 39 34 34.

*E.B.: e-mail, ewen.bodio@u-bourgogne.fr; phone, +33 (0)3 80 39 60 76; fax, +33 (0)3 80 39 60 98.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the "Centre National de la Recherche Scientifique" (ICMUB, UMR CNRS 6302) for financial support. Support was also provided by the "Université de Bourgogne" and the "Conseil Régional de Bourgogne" through the 3MIM integrated project ("Marquage de Molécules par les Métaux pour l'Imagerie Médicale") and PARI SSTIC No. 6. Dr. Fanny Picquet, Marie José Penouilh, and Dr. Michel Picquet are acknowledged for technical support. E.B. thanks Dr. Malacea for the crystallization of compound **4**, and V.L. thanks Dr. Charles Thomas for the MitoTracker dye. P.R. thanks Dr. Fleurat-Lessard for helpful discussions concerning the molecular modeling study. We are grateful to Pr. Johanna Chluba for her oversight of the zebrafish facility and to Tatiana Lopez for fish handling and care and to Pascale Winckler (DimaCell, UMR PAM A 02.102, Université de Bourgogne/Agrosup) and Benoît Gasquet (Cellmap, IFR Santé Sûc, Université de Bourgogne) for their help in two-photon and confocal microscopy studies. E.B. thanks COST Action TD1004 for financial support.

REFERENCES

- (1) (a) Liu, N.; Li, X.; Huang, H.; Zhao, C.; Liao, S.; Yang, C.; Liu, S.; Song, W.; Lu, X.; Lan, X.; Chen, X.; Yi, S.; Xu, L.; Jiang, L.; Zhao, C.; Dong, X.; Zhou, P.; Li, S.; Wang, S.; Shi, X.; Dou, P. Q.; Wang, X.; Liu, J. Clinically used antirheumatic agent auranofin is a proteasomal deubiquitinase inhibitor and inhibits tumor growth. *Oncotarget* **2014**, *5*, 5453–5471. (b) Bertrand, B.; Casini, A. A golden future in medicinal inorganic chemistry: the promise of anticancer gold organometallic compounds. *Dalton Trans.* **2014**, *43*, 4209–4219. (c) Nobili, S.; Mini, E.; Landini, L.; Gabbiani, C.; Casini, A.; Messori, L. Gold compounds as anticancer agents: chemistry, cellular pharmacol-

- ogy, and preclinical studies. *Med. Res. Rev.* **2010**, *30*, 550–580. (d) Ott, L. Auranofin versus placebo in rheumatoid arthritis. *Coord. Chem. Rev.* **2009**, *253*, 1670–1681. (e) Tiekink, E. R. Anti-cancer potential of gold complexes. *Inflammopharmacology* **2008**, *16*, 138–142. (f) Suarez-Almazor, M. E.; Spooner, C. H.; Belseck, E.; Shea, B. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2000**, *2*, CD002048. (g) Jessop, J. D.; O'Sullivan, M. M.; Lewis, P. A.; Williams, L. A.; Camilleri, J. P.; Plant, M. J.; Coles, E. C. A long-term five-year randomized controlled trial of hydroxychloroquine, sodium aurothiomalate, auranofin and penicillamine in the treatment of patients with rheumatoid arthritis. *Br. J. Rheumatol.* **1998**, *37*, 992–1002. (h) Mirabelli, C. K.; Johnson, R. K.; Sung, C. M.; Faucette, L.; Muirhead, K.; Crooke, S. T. A murine model to evaluate the ability of in vitro clonogenic assays to predict the response to tumors in vivo. *Cancer Res.* **1985**, *45*, 32–39. (i) Simon, T. M.; Kunishima, D. H.; Vibert, G. J.; Lorbe, A. Inhibitory effects of a new oral gold compound on HeLa cells. *Cancer* **1979**, *44*, 1965–1975.
- (2) (a) Fiskus, W.; Saba, N.; Shen, M.; Ghias, M.; Liu, J.; Das Gupta, S.; Chauhan, L.; Rao, R.; Gunewardena, S.; Schorm, K.; Austin, C. P.; Maddocks, K.; Byrd, J.; Melnick, A.; Huang, P.; Wiestner, A.; Bhalla, K. N. Auranofin induces lethal oxidative and endoplasmic reticulum stress and exerts potent preclinical activity against chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res.* **2014**, *74*, 2520–2532. (b) For clinical trial in progress see the following, for example: http://www.cancer.gov/clinicaltrials/search/view?cdrid=743608&version=HealthProfessional#StudyIdInfo_CDR0000743608 (protocol identifiers MC1125, NCI-2012-00518, NCT01737502); <http://www.kucancercenter.org/cancer-clinical-trials/featured-trials/auranofin>. (c) Kim, I. S.; Jin, J. Y.; Lee, I. H.; Park, S. Auranofin induces apoptosis and when combined with retinoic acid enhances differentiation of acute promyelocytic leukaemia cells in vitro. *Br. J. Pharmacol.* **2004**, *142*, 749–755.
- (3) (a) Fan, C.; Zheng, W.; Fu, X.; Li, X.; Wong, Y.-S.; Chen, T. Enhancement of auranofin-induced lung cancer cell apoptosis by selenocystine, a natural inhibitor of TrxR1 in vitro and in vivo. *Cell Death Dis.* **2014**, *5*, e1191. (b) Berners-Price, S. J.; Filipovska, A. Gold compounds as therapeutic agents for human diseases. *Metalomics* **2011**, *3*, 863–873. (c) Bindoli, A.; Rigobello, M. P.; Scutari, G.; Gabbiani, C.; Casini, A.; Messori, L. Thioredoxin reductase: A target for gold compounds acting as potential anticancer drugs. *Coord. Chem. Rev.* **2009**, *253*, 1692–1707. (d) Hickey, J. L.; Ruhayel, R. A.; Barnard, P. J.; Baker, M. V.; Berners-Price, S. J.; Filipovska, A. Mitochondria-targeted chemotherapeutics: the rational design of gold(I) N-heterocyclic carbene complexes that are selectively toxic to cancer cells and target protein selenols in preference to thiols. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12570–12571.
- (4) For biological study on a large scope of phosphonium see the following: Millard, M.; Pathania, D.; Shabaik, Y.; Taheri, L.; Deng, J.; Neamat, N. Preclinical evaluation of novel triphenylphosphonium salts with broad spectrum activity. *PLoS One* **2010**, *5*, e13131.
- (5) (a) Hanthorn, J. J.; Haidasz, E.; Gebhardt, P.; Pratt, D. A. A versatile fluorescence approach to kinetic studies of hydrocarbon autoxidations and their inhibition by radical-trapping antioxidants. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 10141–10143. (b) Pan, J.; Downing, J. A.; McHale, J. L.; Xian, M. A fluorogenic dye activated by S-nitrosothiols. *Mol. BioSyst.* **2009**, *5*, 918–920. (c) Soh, N.; Ariyoshi, T.; Fukaminato, T.; Nakajima, H.; Nakano, K.; Imato, T. A fluorescent photochromic compound for labeling biomolecules. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 3762–3768. (d) Soh, N.; Sakawaki, O.; Makihara, K.; Odo, Y.; Fukaminato, T.; Kawai, T.; Irie, M.; Imato, T. Design and development of a fluorescent probe for monitoring hydrogen peroxide using photoinduced electron transfer. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 1131–1139. (e) Lemieux, G. A.; de Graffenried, C. L.; Bertozzi, C. R. A fluorogenic dye activated by the Staudinger ligation. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4708–4709. (f) It is worth noting that another coumarin derivative was used by Hambley and colleagues to study platinum complexes in vitro behaviors: New, E. J.; Duan, R.; Zhang, J. Z.; Hambley, T. W. Investigations using fluorescent ligands to monitor platinum(IV) reduction and platinum(II) reactions in cancer cells. *Dalton Trans.* **2009**, 3092–3101.
- (6) (a) Doulain, P.-E.; Decréau, R.; Racoeur, C.; Goncalves, V.; Dubrez, L.; Bettaieb, A.; Le Gendre, P.; Denat, F.; Paul, C.; Goze, C.; Bodio, E. Towards the elaboration of new gold-based optical theranostics. *Dalton Trans.* **2015**, *55*, 4874–4883. (b) Bertrand, B.; Bodio, E.; Richard, P.; Picquet, M.; Le Gendre, P.; Casini, A. Gold(I) N-heterocyclic carbene complexes with an “activable” ester moiety: Possible biological applications. *J. Organomet. Chem.* **2015**, *775*, 124–129. (c) Wenzel, M.; Bigaeva, E.; Richard, P.; Le Gendre, P.; Picquet, M.; Casini, A.; Bodio, E. New heteronuclear gold(I)-platinum(II) complexes with cytotoxic properties: Are two metals better than one? *J. Inorg. Biochem.* **2014**, *141*, 10–16. (d) Vergara, E.; Cerrada, E.; Clavel, C.; Casini, C.; Laguna, M. Thioloate gold(I) complexes containing water-soluble phosphane ligands: a characterization of their chemical and biological properties. *Dalton Trans.* **2011**, 10927–10935.
- (7) Allen, E. A.; Wilkinson, W. The vibrational spectra of some dialkyl sulphide complexes of gold(III) and gold(I) halides. *Spectrochim. Acta, Part A* **1972**, *28*, 2257–2262.
- (8) Crystal data. For **1**, $C_{30}H_{25}O_3P$, $M = 464.47$, triclinic, $P\bar{1}$ (No. 2), $a = 6.2898(2)$ Å, $b = 9.5330(3)$ Å, $c = 20.7433(5)$ Å, $\alpha = 99.499(1)^\circ$, $\beta = 95.427(1)^\circ$, $\gamma = 102.793(2)^\circ$, $V = 1185.1(12)$ Å³, $T = 115$ K, $Z = 2$, $\mu(\text{Mo K}\alpha) = 0.146$, 40 464 reflections measured, 6822 unique ($R_{\text{int}} = 0.0295$) which were used in all calculations. The final $wR2$ was 0.1054 (all data), and $R1$ was 0.0399 ($I > 2(I)$). $CCDC = 1014821$. For **2**, $C_{30}H_{25}AuClO_3P$, $M = 696.89$, monoclinic, $P2_1/c$ (No. 14), $a = 9.4608(2)$ Å, $b = 13.6407(3)$ Å, $c = 19.9564(4)$ Å, $\beta = 92.341(1)^\circ$, $\alpha = \gamma = 90^\circ$, $V = 2573.26(9)$ Å³, $T = 115(2)$ K, $Z = 4$, $\mu(\text{Mo K}\alpha) = 5.914$, 71 125 reflections measured, 11 461 unique ($R_{\text{int}} = 0.0683$) which were used in all calculations. The final $wR2$ was 0.0636 (all data), and $R1$ was 0.0313 ($I > 2(I)$). $CCDC = 1014822$. For **4**, $C_{65}H_{42}Cl_4I_2O_4P_2$, $M = 1467.58$, orthorhombic, $Pca2_1$ (No. 29), $a = 18.6546(7)$ Å, $b = 18.6191(7)$ Å, $c = 18.5054(7)$ Å, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$, $V = 6427.5(4)$ Å³, $T = 100$ K, $Z = 4$, $\mu(\text{Mo K}\alpha) = 1.327$, 34 584 reflections measured, 13 908 unique ($R_{\text{int}} = 0.0245$) which were used in all calculations. The final $wR2$ was 0.0975 (all data), and $R1$ was 0.0414 ($I > 2(I)$). $CCDC = 1014823$. The asymmetric unit contains two phosphonium cations, two iodide anions and three CH_2Cl_2 solvate molecules. The two phosphonium moieties exhibit the same conformation (the rms overlay is only 0.10 Å). For clarity, only one phosphonium moiety is shown.
- (9) (a) Stewart, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods V: Modification of NDDO approximations and application to 70 elements. *J. Mol. Model.* **2007**, *13*, 1173–1213. (b) Stewart, J. J. P. MOPAC2012; Stewart Computational Chemistry: Colorado Springs, CO, USA, 2012; <http://OpenMOPAC.net>. (c) Allouche, A. R. A graphical user interface for computational chemistry softwares. *J. Comput. Chem.* **2011**, *32*, 174–182.
- (10) Brouwer, A. M. Standards for photoluminescence quantum yield measurements in solution. *Pure Appl. Chem.* **2011**, *83*, 2213–2228.
- (11) (a) Vidimar, V.; Meng, X.; Klajner, M.; Licona, C.; Fetzler, L.; Harlepp, S.; Hebraud, P.; Sidhoum, M.; Sirlin, C.; Loeffler, J.-P.; Mellitzer, G.; Sava, G.; Pfeffer, M.; Gaiddon, C. Induction of caspase 8 and reactive oxygen species by ruthenium-derived anticancer compounds with improved water solubility and cytotoxicity. *Biochem. Pharmacol.* **2012**, *84*, 1428–1436. (b) Zawacka-Pankau, J.; Krachulec, J.; Grulkowski, L.; Bielawski, K. P.; Selivanova, G. The p53-mediated cytotoxicity of photodynamic therapy of cancer: recent advances. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2008**, *232*, 487–497.
- (12) Benosman, S.; Gross, I.; Clarke, N.; Jochemsen, A. G.; Okamoto, K.; Loeffler, J. P.; Gaiddon, C. Multiple neurotoxic stresses converge on MDMX proteolysis to cause neuronal apoptosis. *Cell Death Differ.* **2007**, *14*, 2047–2057.
- (13) Bertheau, P.; Lehmann-Che, J.; Varna, M.; Dumay, A.; Poirot, B.; Porcher, R.; Turpin, E.; Plassa, L. F.; de Roquancourt, A.; Bourstyn, E.; de Cremoux, P.; Janin, A.; Giachetti, S.; Espié, M.; de Thé, H. p53 in breast cancer subtypes and new insights into response to chemotherapy. *Breast* **2013**, No. Suppl. 2, S27–S29.
- (14) (a) Park, S.-H.; Lee, J. H.; Berek, J. S.; Hu, M. C.-T. Auranofin displays anticancer activity against ovarian cancer cells through

FOXO3 activation independent of p53. *Int. J. Oncol.* **2014**, *45*, 1691–1698. (b) Nandy, A.; Dey, S. K.; Das, S.; Munda, R. N.; Dinda, J.; Das Saha, K. Gold (I) N-heterocyclic carbene complex inhibits mouse melanoma growth by p53 upregulation. *Mol. Cancer* **2014**, *13*, 57. (c) Pearson, S.; Scarano, W.; Stenzel, M. H. Micelles based on gold-glycopolymer complexes as new chemotherapy drug delivery agents. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 4695–4697.

(15) Head, B. P.; Patel, H. H.; Insel, P. A. Interaction of membrane/lipid rafts with the cytoskeleton: impact on signaling and function: membrane/lipid rafts, mediators of cytoskeletal arrangement and cell signaling. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1838*, 532–545.

(16) Ton, C.; Parnig, C. The use of zebrafish for assessing ototoxic and otoprotective agents. *Hear. Res.* **2005**, *208*, 79–88.

Etude du rôle d'un donneur de monoxyde d'azote (Glycéryl Trinitrate) dans la mort cellulaire immunogène induite par des chimiothérapies (FOX) et/ou radiothérapie dans le cancer colique

Lucile DONDAINE

Le cancer colorectal se situe au 3^{ème} rang mondial des cancers les plus fréquents derrière les cancers du sein et du poumon. Dans le cas de cancer colorectal métastatique, la première ligne thérapeutique repose sur l'utilisation d'une association de chimiothérapies : le FOLFOX (acide **FOL**inique, 5-Fluorouracile et **OX**aliplatine). Malgré une forte efficacité anti-tumorale de cette combinaison, de nombreuses rechutes apparaissent nécessitant l'utilisation de nouvelles stratégies basées sur l'association du FOLFOX à d'autres agents anti-cancéreux ou stimulant le système immunitaire. Cette étude a eu comme objectif d'étudier l'effet anti-tumoral de l'association du FOX (5-Fluorouracile et **OX**aliplatine) à un donneur de monoxyde d'azote (NO) tel que le Glycéryl Trinitrate (GTN) combiné ou non à de la radiothérapie dans le cancer colique. En clinique, l'utilisation du GTN, un agent couramment utilisé dans le traitement des angines de poitrine, a montré un bénéfice réel chez des patients porteurs de cancer du poumon non à petites cellules et traités par chimiothérapies associées ou non à de la radiothérapie. Dans nos modèles précliniques de cancer du côlon, nous avons montré que l'association du GTN au FOX potentialisait l'effet anti-tumoral de ces chimiothérapies. L'utilisation de modèles murins immunodéficients nous a permis de montrer l'importance du système immunitaire dans l'activité anti-tumorale de cette combinaison. Nous avons alors recherché par quel mécanisme le GTN pouvait induire l'activation du système immunitaire et avons alors montré que le GTN induisait l'externalisation de la calréticuline, un des éléments nécessaires à l'induction de la mort cellulaire immunogène (ICD). Cette mort immunogène est caractérisée par la libération de facteurs immunogènes (HMGB1 et ATP) et par l'externalisation de la calréticuline. Cette ICD représente un des mécanismes par lequel la radiothérapie mais également certaines chimiothérapies peuvent activer le système immunitaire et ainsi potentialiser l'efficacité de ces thérapies. Ainsi et pour la première fois, nous avons montré le rôle primordial du NO dans le mécanisme d'externalisation de la calréticuline induit par l'ajout d'un donneur de NO, ou par ajout de chimiothérapies pouvant induire la production de NO. Tous ces travaux montrent l'importance du NO dans l'efficacité des thérapies conventionnelles (chimiothérapies, radiothérapie) et mettent en exergue l'utilisation de GTN en association à des thérapies non immunogènes afin de potentialiser leur efficacité anti-tumorale.

Mots-clés : Cancer, colon, monoxyde d'azote, chimiothérapies, radiothérapie, mort cellulaire immunogène, calréticuline