

Université du Québec
Institut national de la recherche scientifique
INRS-Institut Armand-Frappier

Vers une nouvelle thérapie contre la galectine-1 pour le traitement du gliome

Par
Samy Ajarrag

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences expérimentales de la santé

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Dr. Charles Ramassamy
INRS-Institut Armand Frappier

Examineur externe

Dr. Samy Cecioni
Université de Montréal

Directeur de recherche

Dr. Yves Saint-Pierre
INRS-Institut Armand Frappier

REMERCIEMENTS

Je tiens particulièrement à remercier mon directeur de recherche, Dr Yves St-Pierre, de m'avoir donné la chance de travailler dans son laboratoire. Il a été un excellent mentor, et m'a donné le goût de poursuivre mes études. J'ai pu apprécier sa patience, son humanité, sa bonne humeur et tous ses excellents conseils!

Je voudrais également remercier l'équipe de Glycovax d'avoir collaboré avec moi tout au long de ce projet, et tout particulièrement le Dr. Tze Chieh Shiao, directeur scientifique.

Je tiens aussi à remercier tous les membres de mon équipe, les étudiants du professeur David Chatenet, et tous les autres membres du Centre Armand-Frappier avec qui j'ai eu la chance de collaborer pour mon projet.

LISTE DES RÉALISATIONS SCIENTIFIQUES

Publications

Ajarrag, S. St-Pierre, Y. (2021). Galectins in Glioma: Current Roles in Cancer Progression and Future Directions for Improving Treatment. *Cancers* 13(21), 5533.

Fuselier C, Dumoulin A, Paré A, Nehmé R, **Ajarrag S**, Granger Joly de Boissel P, Chatenet D, Doucet N, St-Pierre Y. (2023) Placental Galectins in Cancer: Why We Should Pay More Attention. *Cells* 12(3), 437

Présentation orale

Communication orale : “Nanovaccine for glioblastoma therapy”,
Réunion Annuelle, EuroNanoMed, 23 février 2022 (Réunion par vidéo
conférence)

Présentation par affiche

Ajarrag, S. St-Pierre, Y. (2021). Le développement d’une nouvelle thérapie contre la Galectine-1 pour le traitement du gliome. *12e Congrès Armand-Frappier*, 9-11 novembre 2021, INRS-Centre Armand-Frappier Santé Technologie.

RÉSUMÉ

Le cancer est une maladie qui touche chaque année plusieurs millions de personnes à travers le monde. Il se manifeste sous diverses formes, et les thérapies actuelles ne sont malheureusement pas toujours efficaces. Le gliome est le cancer intracrânien le plus répandu, mais aussi un des plus mortels. À un stade avancé, connu sous le nom de glioblastome, la survie moyenne est inférieure à deux ans. Sa localisation intracrânienne réduit considérablement les possibilités chirurgicales. De plus, le développement de traitements efficaces contre le gliome rencontre plusieurs obstacles, notamment l'hétérogénéité de la tumeur et l'imperméabilité relative de la barrière hématoencéphalique, qui empêche l'acheminement de molécules thérapeutiques à la tumeur. L'utilisation de l'immunothérapie, une nouvelle approche prometteuse basée sur l'activation du système immunitaire de l'hôte, se heurte également à l'environnement immunosuppresseur créé par la tumeur. Parmi les facteurs immunosuppresseurs produits et sécrétés par le gliome, la protéine galectine-1 joue un rôle important. L'accumulation de galectine-1 dans l'environnement péri-tumoral est bien connue pour réduire la réponse antitumorale en induisant notamment la mort par apoptose des cellules T activées. Des études récentes ont démontré que cette protéine pourrait être une cible thérapeutique prometteuse dans le cas du gliome. Par conséquent, notre projet propose de développer une thérapie ciblant spécifiquement la galectine-1 au niveau de la tumeur, afin de traiter efficacement le gliome.

L'objectif principal de ce projet vise à développer une plateforme technologique visant à faciliter la livraison de molécules inhibitrices de la galectine-1 vers les tumeurs cérébrales. Plus spécifiquement, nous proposons : 1) d'établir un modèle d'étude *in vitro* pour le développement d'inhibiteurs de galectine-1, et 2) développer de nouvelles approches thérapeutiques visant à surmonter l'imperméabilité de la barrière hématoencéphalique. Pour atteindre ces objectifs, nous proposons d'utiliser des modèles cellulaires de gliomes humains, dont le modèle U-87 MG, une lignée cellulaire de glioblastome humain qui exprime de façon constitutive la galectine-1. Nous allons élaborer une approche pharmacologique visant à inhiber la galectine-1 grâce à l'utilisation de siRNA combinés à des nanoparticules non toxiques capables de franchir la barrière hématoencéphalique et de libérer spécifiquement les siRNA dans les cellules tumorales. En résumé, ce projet de recherche vise à développer des méthodes non invasives pour cibler efficacement la galectine-1 dans les tumeurs.

ABSTRACT

Cancer is a disease that annually affects millions of people worldwide. It manifests in various forms, and, unfortunately, current therapies are not always effective. Glioma, the most common intracranial cancer, is also one of the deadliest. In its advanced stage, glioblastoma, the average survival rate is less than two years. The intracranial location considerably reduces surgical options. Furthermore, developing effective glioma treatments faces multiple obstacles, including tumor heterogeneity and the relative impermeability of the blood-brain barrier, which hinders the delivery of therapeutic molecules to the tumor. In addition, immunotherapy, a promising treatment method based on the activation of the host's immune system, is hampered by the immunosuppressive peritumoral environment. Among the immunosuppressive factors produced and secreted by glioma, galectin-1 plays a significant role. The accumulation of galectin-1 in the tumor environment is well-known to reduce the anti-tumor response, particularly by inducing apoptosis of activated T cells. Recent studies have demonstrated that galectin-1 could be a therapeutic target for glioma. In this research project, we aim to develop a therapy that targets galectin-1 at the tumor level for treating glioma.

The main objective of this project aims to develop a technological platform with the potential to facilitate the delivery of galectin-1 inhibitor molecules to brain tumors. Specifically, we propose the following aims: 1) Establishing an in vitro study model for developing galectin-1 inhibitors, and 2) Developing novel therapeutic approaches to overcome the impermeability of the blood-brain barrier. To achieve these objectives, we will utilize cellular models of human gliomas, particularly the U-87 MG model, which constitutively expresses galectin-1. We will employ a pharmacological approach that combines siRNA with non-toxic nanoparticles, enabling their penetration through the blood-brain barrier and subsequent release of siRNA into tumor cells. In summary, the research project focuses on non-invasive strategies for targeting galectin-1 in tumors.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	2
LISTE DES RÉALISATIONS SCIENTIFIQUES	3
RÉSUMÉ	4
ABSTRACT	5
TABLE DES MATIÈRES	6
LISTE DES ABRÉVIATIONS :	8
LISTE DES TABLEAUX :	10
LISTE DES FIGURES :	11
LISTE DES ANNEXES :	13
CHAPITRE 1	14
1.2 Le gliome	23
1.2.1 Présentation du gliome	23
1.2.2 Les défis associés au traitement du gliome	24
2.1 Présentation	29
2.2 Comment franchir la BHE?	30
3.1 L'histoire des galectines	32
3.2 Structure des galectines	33
3.3 Rôles des galectines :	34
3.4 Galectin-1 une cible pour le gliome?	35
3.4.1 Présentation de la Gal-1	35
3.4.2 L'expression de la Gal-1 dans le gliome	36
3.4.3 Le rôle immunosuppresseur de la Gal-1	36
3.4.5 Mécanismes cellulaires pro-ontogéniques de la Gal-1	38
3.5 Le rôle des autres galectines dans le gliome	41
3.5.1 La galectine-3	41
3.5.2 La galectine-8	43
3.5.3 La galectine-9	45
4.1 Présentation du siRNA et son fonctionnement	47
5.1 Définition et présentation des nanoparticules	49
5.2 Particule lipidique	50
5.3 Dernier développement de nanotransporteur	55
5.4 Les Glycolipides de Glycovax Pharma.	56
5.5 Les avantages des nanovaccins	57
CHAPITRE 2	60
CHAPITRE 3	62
Assemblage des nanovaccins :	63
Culture cellulaire :	63
Analyse par cytométrie de la cytotoxicité :	63

Assemblage du complexe nanovaccins/siRNA :	64
Mesure par <i>Nanoparticle tracking analysis (NTA)</i> :	64
Mesure par diffusion dynamique de la lumière (DLS) :	64
Microscopie électronique :	65
RT-PCR :	66
Immunobuvardage de type Western:	67
Inhibition de la traduction de Gal-1 par <i>KnockDown</i> :	67
Densitométrie :	68
Test de protection :	68
Test de retardation.	68
Statistiques :	69
CHAPITRE 4	70
1. Étapes préliminaires pour l'étude des nanovaccins.	71
2. Caractérisation et assemblage des nanovaccins	74
3. Étude de la cytotoxicité des nanovaccins	86
4. Expression de la galectine-1 dans le glioblastome	88
5. Validation de l'inhibition de l'expression de Gal-1 par les siRNA.	89
6. Interaction des nanovaccins avec les siRNA	91
CHAPITRE 4	96
CHAPITRE 5	108
CHAPITRE 6	110
ANNEXE	144

LISTE DES ABRÉVIATIONS :

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ATCC	American Type Culture Collection
BHE	Barrière hémato-encéphalique
CRD	Carbohydrate recognition domain
CAR-T	Chimeric antigen receptor - T cell
DLS	Dynamic Light Scattering
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EtOH	Éthanol
Gal-1	Galectine-1
Gal-3	Galectine-3
Gal-8	Galectine-8
Gal-10	Galectine-10
Gal-13	Galectine-13
GBM	Glioblastomes
GLUT1	Glucose transporter 1
IP	iodure de propidium
LNPs	Nanoparticules lipidiques
NPs	Nanoparticules
PDI	Polydispersity Index
ddPCR	Digital droplet polymerase chain reaction
PCR	Polymerase chain reaction
PTA	Phosphotungstic acid
MHC-1	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
Nano-1	Nanovaccin 1
Nano-2	Nanovaccin 2
Nano-3	Nanovaccin 3
Nano-4	Nanovaccin 4

Nano-5	Nanovaccin 5
Nano-6	Nanovaccin 6
Nano-7	Nanovaccin 7
Nano-8	Nanovaccin 8
NK cell	Natural Killer cell
RNase	Ribonuclease
RISC	RNA-induced silencing complex
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
siRNA	Silencer Ribonucléotide Acid
SNC	Système Nerveux Central
SDF-1	stromal cell-derived factor 1
TEM	Microscopie à Transmission électronique
TMZ	Témozolomide
UA	Uranyl acetate
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
ZO1	Zonula Occludens-1

LISTE DES TABLEAUX :

TABLEAU 1 : NANOVACCINS DE GLYCOVAX AVEC LEURS STRUCTURES CHIMIQUES	71
TABLEAU 2 : RÉSUMÉ DES RÉSULTATS SUR LA SOLUBILITÉ DES NANOVACCINS EN MILIEU AQUEUX.	74
TABLEAU 3 : DIAMÈTRE ET INDICE DE POLYDISPERSITÉ (PDI) DES NANOVACCINS À T0 ET T24.	80
TABLEAU 4 : DIAMÈTRE ET INDICE DE POLYDISPERSITÉ (PDI) DES NANOVACCINS SELON LA CONCENTRATION ET LE MILIEU.	82
TABLEAU 5 : ÉTUDE DE LA CHARGE DES NANOVACCINS.	83

LISTE DES FIGURES :

FIGURE 1 : LES SIX MARQUEURS DU CANCER ÉTABLIS EN 2000.	16
FIGURE 2 : LES MARQUEURS DU CANCER ADMIS EN 2011.	18
FIGURE 3 : LES QUATRE MARQUEURS DU CANCER AJOUTÉS EN 2022.	20
FIGURE 4 : CLASSIFICATION DE 2016 DES DIFFÉRENTS TYPES DE TUMEURS INTRACRÂNIENNES PAR WHO.	24
FIGURE 5 : SCHÉMA DE LA BARRIÈRE HÉMATOENCÉPHALIQUE ET SON ACTION ANTI-CHIMIO THÉRAPEUTIQUE DANS LE CONTEXTE DU GLIOME.	30
FIGURE 6 : LA FAMILLE DES GALECTINES.	34
FIGURE 7 : STRUCTURE D'UN HOMODIMÈRE DE LA GALECTINE-1 HUMAINE.	35
FIGURE 8 : SCHÉMA REPRÉSENTANT LES RÔLES DE LA GAL-1 DANS L'IMMUNOMODULATION DU MICRO-ENVIRONNEMENT TUMORAL.	38
FIGURE 9 : SCHÉMA DES RÔLES DE LA GALECTINE-1 INTRACELLULAIRE DANS LE CANCER.	40
FIGURE 10 : PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT DE L'INHIBITION DE TRADUCTION PROTÉIQUE PAR LE SIRNA.	48
FIGURE 11 : LES DIFFÉRENTS TYPES DE LIPIDE ET LES PARTICULES QU'ILS FORMENT EN MILIEU AQUEUX.	52
FIGURE 12 : INFLUENCE DE LA COMPOSITION DU MILIEU SUR LES LIPOSOMES.	53
FIGURE 13 : SCHÉMA PRÉSENTANT LA DIFFÉRENCE ENTRE UN LIPOSOME ET UN PHYTOSOME.	54
FIGURE 14 : STRUCTURE ET AUTOASSEMBLAGE DES GLYCOLIPOSOMES DE GLYCOVAX.	57
FIGURE 15 : CYTOTOXICITÉ DU DMSO POUR LA LIGNÉE CELLULAIRE U-87 MG.	72
FIGURE 16 : CYTOTOXICITÉ DE L'ÉTHANOL POUR LA LIGNÉE CELLULAIRE U-87 MG	73
FIGURE 17 : ANALYSE NTA DES NANOVACCINS 2 À 8 À PARTIR DES SOLUTIONS STOCKS DE DMSO.	77
FIGURE 18 : ANALYSE NTA DES NANOVACCINS 2, 4, 5 ET 6 À PARTIR DES SOLUTIONS STOCKS D'ÉTHANOL.	78
FIGURE 19 : OBSERVATION EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE DU NANOVACCIN 4.	85
FIGURE 20 : OBSERVATION EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE DU NANOVACCIN 7.	85
FIGURE 21 : OBSERVATION EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE DU NANOVACCIN 8.	86
FIGURE 22 : COURBE DE CYTOTOXICITÉ DES NANOVACCINS AVEC LES CELLULES U-87 MG.	88
FIGURE 23 : EXPRESSION DE GALECTINE-1 DANS LA LIGNÉE CELLULAIRE U-87 MG.	89
FIGURE 24 : IMMUNOBUVARDAGE DE TYPE WESTERN DE L'EXPRESSION DE GAL-1 EN ABSENCE OU PRÉSENCE DE SIRNA.	90
FIGURE 25 : ANALYSE DENSITOMÉTRIQUE DE L'IMMUNOBUVARDAGE DE TYPE WESTERN DE LA FIGURE 24.	90

FIGURE 26 : GEL DU TEST DE PROTECTION A LA RNASE DU NANO 7.	91
FIGURE 27 : TEST DE PROTECTION DES SIRNA COMPLEXÉS AUX NANOVAACCINS.	92
FIGURE 28 : TEST DE RETARDATION AVEC LE NANOVAACCIN 6.	93
FIGURE 29 : TEST DE RETARDATION DU NANOVAACCIN 8.	94
FIGURE 30 : VISUALISATION DES SIRNA AVEC LE NANOVAACCIN 8.	95

LISTE DES ANNEXES :

ANNEXE 1: PRÉSENCE DE LGALS1 ET GAPDH DANS LES CELLULES U-87 MG (PCR)	144
ANNEXE 2: PRÉSENCE DE GAL-1 DANS LES CELLULES U-87 MG (WESTERN BLOT)	144

CHAPITRE 1

Revue de littérature

1. Le cancer :

Le cancer est actuellement la deuxième cause de mortalité dans le monde, avec près de 10 millions de décès et plus de 18 millions de nouveaux cas diagnostiqués chaque année (Sung et al., 2021). Ces chiffres sont en constante augmentation, ce qui est attribuable à de multiples facteurs tels que le vieillissement de la population, l'exposition à des agents cancérigènes, le mode de vie moderne et l'hérédité. Le traitement du cancer constitue donc un défi majeur de notre société, nécessitant des efforts constants de recherche et le développement de nouvelles thérapies.

Le cancer est une pathologie complexe résultant de la combinaison de multiples conditions qui entraînent la transformation de cellules normales en cellules cancéreuses. Ces dernières possèdent plusieurs caractéristiques biologiques distinctes. À partir des années 2000 la communauté scientifique a convenu de définir les marqueurs du cancer tels que : la suppression de la sénescence répllicative (immortalité cellulaire) ; la résistance à la mort cellulaire (apoptose) ; la capacité d'induire d'angiogenèse; l'échappement aux suppresseurs de croissance; l'infiltration de tissus (métastase) et enfin la division cellulaire incontrôlée (**Figure 1**) (Hanahan et al., 2000; Hanahan et al., 2011).

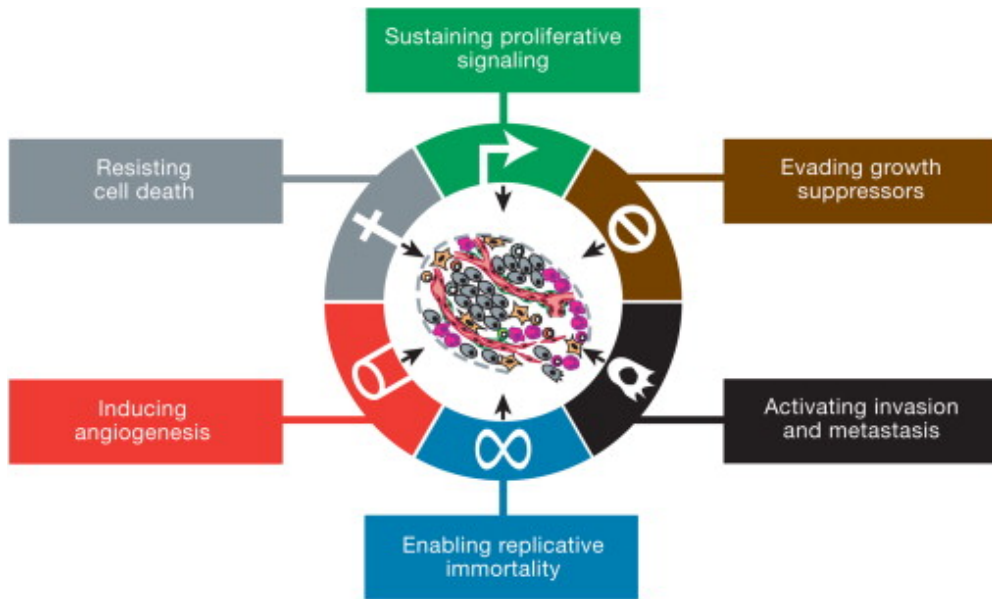


Figure 1 : Les six marqueurs du Cancer établis en 2000. Figure originale de (Hanahan et al., 2011)

La division cellulaire joue un rôle crucial dans la progression du cancer. Les cellules cancéreuses se multiplient rapidement et de manière anarchique, formant des amas cellulaires appelés tumeurs. Cette caractéristique est le résultat de leur capacité à résister aux signaux antiprolifératifs tout en favorisant les facteurs de croissance cellulaire. En effet, les cellules cancéreuses présentent des mutations génétiques qui les rendent insensibles à ces signaux de régulation, leur permettant alors de se diviser et de se propager de manière anarchique (Moses et al., 1990; Fynan et al., 1993; Markowitz et al., 1995; Ikushima et al., 2010). De plus, elles expriment anormalement des gènes codant pour des facteurs de croissance, ainsi que des gènes mutés qui favorisent la prolifération des cellules (Wu et al., 2021; Witsch et al., 2010; Burkhart et al., 2008). Le cas d'école est le gène *p53*, reconnu comme un « suppresseur de tumeur » car il contrôle de nombreuses voies de signalisation. Lorsque ce gène est muté sa fonction est altérée, ce qui entraîne une augmentation de la prolifération cellulaire, considérée dans le contexte du cancer comme étant indéfinie (Chen et al., 1990; Mantovani et al., 2019). Les cellules cancéreuses ont en effet la capacité de subir un nombre illimité de mitoses, en partie grâce à une surexpression de la télomérase qui protège les

télomères de la sénescence télomérique. Ainsi, contrairement aux cellules saines, les télomères sont préservés à chaque division, ce qui évite d'atteindre la limite de réplication des cellules saines (Blasco, 2005; Shay et al., 2000; Sherr et al., 2000). De plus, dans cette classification des marqueurs du cancer nous trouvons l'invasion. Il s'agit d'une caractéristique qui permet aux cellules cancéreuses de se propager dans d'autres parties du corps et former des métastases. Les cellules cancéreuses acquièrent la capacité d'envahir les tissus environnants via l'action de protéines d'adhésion telles que les cadhérines et les intégrines, ainsi que d'enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire. Cela leur permet d'envahir les tissus adjacents et périphériques notamment (Cavallaro et Christofori, 2004; Talmadge et Fidler, 2010).

Un autre point important décrit par le groupe de Weinberg est l'angiogenèse, qui correspond au processus de formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Comme toutes les autres cellules de l'organisme, les cellules cancéreuses ont besoin de nutriments et d'oxygène. De plus, leur demande est encore plus élevée en raison de leur division cellulaire énergivore. L'angiogenèse est permise par des facteurs tels que le VEGF (« *vascular endothelial growth factor*») qui stimule la formation de nouveaux vaisseaux sanguins permettant alors de fournir les éléments nécessaires à la croissance cellulaire. On observe également la présence de protéase comme MMP-9 (« *matrix metalloprotease-9* »), qui induit le remodelage de la matrice cellulaire du micro-environnement tumoral, favorisant ainsi la progression et la formation de nouveaux tissus endothéliaux (Hanahan et al., 1996; Ferrara, 2009; Carmeliet, 2005; Kessenbrock et al., 2010). Finalement, un des marqueurs sans doute les plus importants est l'apoptose, un processus de mort cellulaire programmée nécessaire au maintien de l'homéostasie cellulaire. Or, les cellules cancéreuses présentent des mutations qui les rendent résistantes à cette mort programmée et capables de survivre en présence de signaux de mort cellulaire, notamment ceux émis par les cellules du système immunitaire ou encore par l'exposition à des agents chimio-thérapeutiques (Lotem et al., 1996; Lowe et al., 2004; Pfeffer et al., 2018).

En 2011 grâce aux avancées dans le domaine de la recherche sur le cancer et à l'accumulation de données probantes, la classification des marqueurs biologiques cellulaires du cancer a été mise à jour. Quatre nouveaux marqueurs ont ainsi été ajoutés (**Figure 2**) : Le dérèglement énergétique cellulaire, l'échappement au système immunitaire, l'instabilité génomique et la promotion de l'inflammation (Hanahan et Weinberg, 2011).

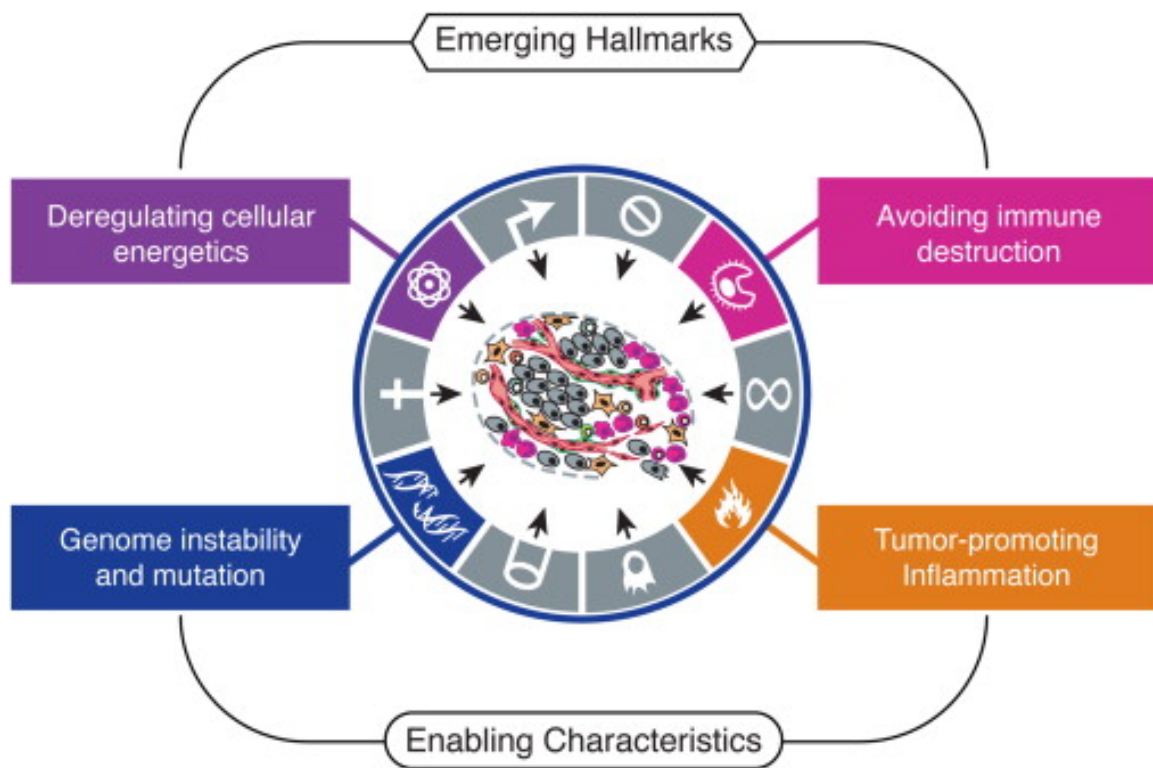


Figure 2 : Les marqueurs du cancer admis en 2011. Figure originale de (Hanahan et Weinberg, 2011)

Un ajout important au schéma de Hanahan et Weinberg est la reconnaissance des mécanismes d'échappement à la réponse immunitaire et le rôle de l'inflammation dans l'initiation du cancer. Il est bien établi que le système immunitaire joue un rôle crucial dans la surveillance et la défense contre le cancer. Habituellement, le système immunitaire est capable de reconnaître les cellules cancéreuses comme

des cellules anormales et de les éliminer. L'immunothérapie exploite cette capacité en renforçant la réponse immunitaire contre le cancer. Par exemple, les anticorps tel que les anti-PD-1 et anti-CTLA-4, peuvent neutraliser la surexpression de ces points de contrôle, facilitant ainsi la détection des cellules tumorales par le système immunitaire (Zhang et al., 2021; Yamaguchi et al., 2022; Seidel et al., 2018).

Il existe aussi d'autres mécanismes qui permettent aux cellules tumorales d'échapper à la réponse immunitaire (Jiang et al., 2019; Beatty et Gladney, 2015). Cela peut se faire, par exemple, en réduisant l'expression d'antigènes tumoraux ou la production de molécules immunosuppressives telles que les galectines qui inhibent l'activité des cellules immunitaires incluant les lymphocytes T et les cellules tueuses naturelles (NK) (Golden-Mason et al., 2013; Wang et al., 2014; Shah et al., 2021; Zhu et al., 2005; Matarrese et al., 2005; Perillo et al., 1995). Il faut toutefois bien distinguer la réponse anti-tumorale de l'inflammation « pro-tumorale ». L'inflammation est une partie intégrante de la réponse immunitaire et vise normalement à protéger l'organisme contre les agents pathogènes, à éliminer les cellules endommagées ou mortes, et à favoriser la réparation des tissus. Or, il est bien connu maintenant qu'une inflammation chronique peut favoriser le développement et la progression tumorale. Cette découverte a d'ailleurs valu à Barry Marshall et Robien Warren un prix Nobel pour leurs travaux montrant un lien entre une infection par *Helicobacter pylori*, une inflammation chronique et le cancer de l'estomac (Warren et Marshall, 1983; Marshall et Windsor, 2005; Ahmed, 2005). En effet, l'inflammation chronique peut causer des dommages répétés aux cellules et aux tissus, ce qui peut entraîner des mutations de l'ADN et favoriser l'initiation du cancer. Elle peut également induire la production de médiateurs inflammatoires tels que les cytokines, les facteurs de croissance et les prostaglandines. Cela favorisera alors la prolifération, l'angiogenèse et la métastase des cellules cancéreuses. Enfin, l'acquisition des caractéristiques tumorales pour les cellules du cancer repose également sur des changements au niveau génétique. Les cellules cancéreuses peuvent présenter une instabilité génomique qui peut entraîner des erreurs lors de la réplication de l'ADN et une accumulation de mutations dans les cellules tumorales. Ces effets sont accentués par la présence

de mutations dans les gènes responsables des mécanismes de réparation de l'ADN, de même que l'exposition à des agents cancérigènes (chimiques, radiations ionisantes, et même virus oncogènes) mutagènes (Berdasco et Esteller, 2010; Negrini et al., 2010; Ostroverkhova et al., 2023; Mantovani et al., 2019).

Récemment, la communauté scientifique a procédé à une mise à jour de la liste des marqueurs biologiques du cancer. Tout en conservant les dix marqueurs précédents, quatre nouveaux marqueurs ont été ajoutés en 2022: le déverrouillage de la plasticité cellulaire ; la reprogrammation épigénétique sans mutation ; la sénescence cellulaire ; le polymorphisme microbien (**Figure 3**) (Hanahan, 2022).

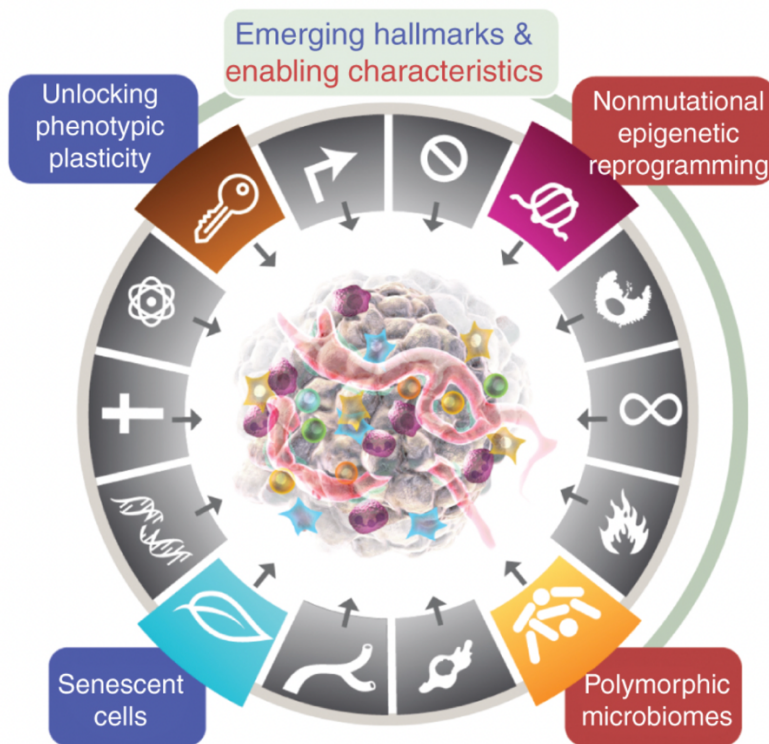


Figure 3 : Les quatre marqueurs du cancer ajoutés en 2022. Figure originale de (Hanahan 2022)

Dans les tissus sains, la différenciation cellulaire complète limite la prolifération nécessaire à la formation de tumeur. Cependant, les cellules cancéreuses ont la capacité de se dédifférencier en cellules progénitrices, d'effectuer une différenciation partielle ou de se transdifférencier en adoptant des caractéristiques de différentes lignées cellulaires (Yuan et al., 2019). Cette plasticité cellulaire est

observée dans de nombreux types de cancer. Cependant, il est important de souligner que la plasticité cellulaire n'est pas une caractéristique exclusive aux cellules cancéreuses car ce mécanisme est constamment utilisé lors des différentes phases du développement de l'organisme, notamment pour la régénération tissulaire (Miao et al., 2020). Ainsi les auteurs de cette classification nous expliquent que ce qui distingue des cellules cancéreuses, c'est leur capacité à débloquent de manière opportuniste les points de contrôles et à exploiter cette plasticité pour favoriser le développement (Hanahan, 2022; Merrell et Stanger, 2016).

Un autre changement dans la liste des marqueurs du cancer est la reconnaissance du rôle des modifications épigénétiques qui s'ajoutent ainsi aux modifications (mutations) génétiques. En effet, la reprogrammation épigénétique non mutagène peut permettre aux cellules cancéreuses d'acquérir des caractéristiques clés qui leur permettent de proliférer dans des conditions anormales telles que l'hypoxie et la privation de nutriments (Gameiro et al., 2018; Thienpont et al., 2016). Cette reprogrammation participe également à la plasticité phénotypique des cellules cancéreuses, c'est à dire leur capacité à se différencier et arborer des caractéristiques phénotypiques différentes malgré qu'elles proviennent du même précurseur, et par conséquent joue également un rôle dans l'hétérogénéité intratumorale (Torres et al., 2016). Les derniers développements des technologies de profilage multiomiques pourraient aider à mieux comprendre les rôles respectifs des régulations génétiques et épigénétiques dans la progression de la maladie (Hanahan, 2022; Lu et al., 2020).

Un autre aspect fondamental de cette nouvelle classification est la reconnaissance du rôle du microbiome dans la progression du cancer. Des études ont en effet démontré que la présence de certaines espèces microbiennes (bactériennes) peut contribuer à la progression du cancer (Helmink et al., 2019). De plus, on a observé des différences dans le microbiome d'un individu sain et d'un individu atteint d'une tumeur (Byrd et al., 2021).

En général, les microorganismes qui interagissent de manière symbiotique avec les tissus barrières du corps ont un impact profond sur la santé, notamment dans

le tractus gastro-intestinal, les poumons, le sein, et le système urogénital. Les technologies de séquençage de nouvelle génération combinées aux avancées en bio-informatique ont permis d'identifier des microorganismes pouvant avoir des effets protecteurs ou délétères sur le développement du cancer et la réponse à la thérapie (Sears et al., 2014; Dzutsev et al., 2017). Il a ainsi été démontré que le microbiote résidant dans les tissus est capable d'immunomodulation et d'influencer la présence de mutations dans le génome, ce qui suggère un rôle dans le développement et la progression tumorale. Bien que ces avancées aient été réalisées initialement avec des études sur le microbiome intestinal, il est logique de croire que le microbiome d'autres tissus puisse également jouer un rôle (Davar et al., 2021; Griffin et al., 2021).

Pendant longtemps la sénescence a été considérée comme un mécanisme de protection qui maintient l'homéostasie tissulaire et en empêchant ainsi la prolifération anarchique des cellules à la source de l'apparition de néoplasie. Cependant, les découvertes récentes ont démontré que le rôle de la sénescence est controversé et que dans certains cas la sénescence favorise la progression du cancer (Hanahan, 2022). En effet, les cellules tumorales peuvent entrer dans un état de sénescence transitoire, souvent associé à une résistance thérapeutique (S. Yuan et al., 2019). De plus, il semble que les cellules cancéreuses sénescents favorisent les phénotypes tumoraux en sécrétant des molécules de signalisation et des protéases dans l'environnement péri-tumoral. Même les cellules saines en état de sénescence peuvent favoriser les phénotypes tumoraux (Wang et al., 2020) : par exemple, les fibroblastes sénescents dans les tissus normaux peuvent promouvoir la progression tumorale en adoptant une fonction paracrine dans le micro-environnement tumoral (Faget et al., 2019; Hanahan, 2022).

Ainsi, les marqueurs biologiques du cancer sont des caractéristiques essentielles à prendre en compte pour comprendre la complexité de cette pathologie dévastatrice. Avec l'avènement de nouvelles technologies, la recherche dans ce domaine est en constante évolution. Néanmoins il reste encore beaucoup de travail à accomplir pour développer de nouvelles stratégies de diagnostic et de traitement plus efficaces (Hanahan, 2022).

1.2 Le gliome

1.2.1 Présentation du gliome

Le gliome est la tumeur intracrânienne la plus fréquente, constituant plus de 80 % des tumeurs cérébrales malignes (Ostrom et al., 2014). En 2007, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a classé les principales tumeurs gliales en quatre grades, selon leur agressivité croissante : les tumeurs de stade 1 comprennent les astrocytomes pilocytiques, les xanthoastrocytomes pléomorphes et les astrocytomes à cellules géantes sous-épendymaires; les tumeurs de grade 2 comprennent des gliomes infiltrants plus courants, tels que les oligodendrogliomes et les astrocytomes de grade 2; le troisième grade comprend des tumeurs telles que les oligodendrogliomes anaplasiques, les astrocytomes anaplasiques, les oligoastrocytomes anaplasiques et les épendymomes anaplasiques; enfin, les tumeurs de grade 4 les plus agressives, dont les glioblastomes (GBM) (Louis et al., 2007). Les GBM représentent environ la moitié de tous les gliomes, et plus de 12000 nouveaux cas sont recensés chaque année aux États-Unis (Ostrom et al. 2014; 2016; Weller et al., 2021).

Depuis 2016, l'OMS a adopté une nouvelle classification pour les tumeurs gliales (**Figure 4**). Cette nouvelle classification divise les tumeurs du système nerveux central en deux catégories principales : les tumeurs neuro-épithéliales et les tumeurs mésoenchymateuses. Dans la première catégorie, les tumeurs sont classées en fonction de leur grade de malignité, allant du grade I au grade IV. Parmi les tumeurs neuro-épithéliales, les glioblastomes multiformes ont été à leur tour subdivisés en deux groupes distincts, basés sur des caractéristiques moléculaires (glioblastome IDH sauvage vs glioblastome IDH mutant) (Louis et al., 2016). Cette nouvelle classification fournit une base plus précise et plus complète en mettant l'accent sur l'analyse moléculaire et cellulaire pour déterminer le diagnostic et le traitement le plus approprié. Elle permet notamment de prendre en compte l'hétérogénéité des tumeurs et la nécessité de développement des

thérapies personnalisées et adaptées en fonction des différents types de tumeurs des patients (Chen et al., 2017).

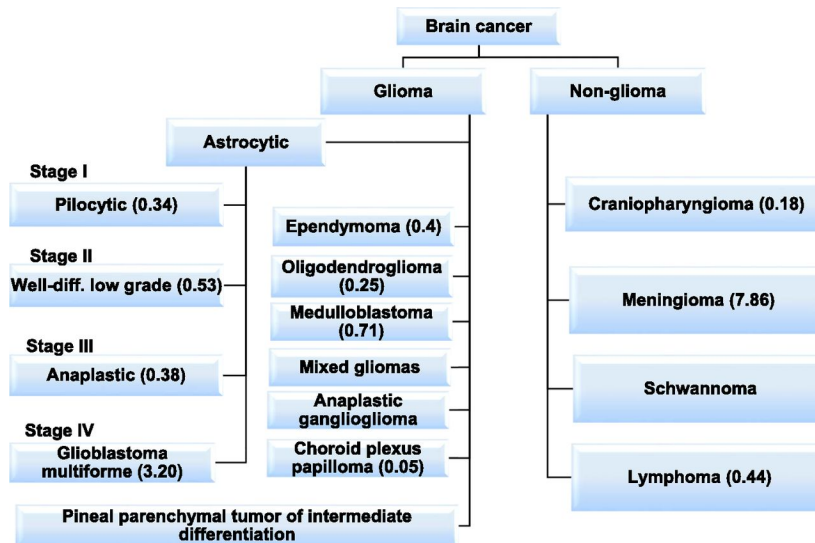


Figure 4 Classification de 2016 des différents types de tumeurs intracrâniennes par WHO. Les chiffres entre parenthèses indiquent l'incidence des cas pour 100 000 individus et sont ajustés en fonction de l'âge de la population standard des États-Unis de 2000. Figure originale tirée de (Shergalis et al., 2018)

1.2.2 Les défis associés au traitement du gliome

Pour les patients atteints d'un gliome de haut grade, le taux de survie après cinq ans est inférieur à 10% (Ostrom et al., 2016; Grochans et al., 2022). Il est donc essentiel de continuer les efforts de recherche afin de développer de nouvelles thérapies plus efficaces. En effet, le gliome présente plusieurs défis en matière de traitement en raison de différents facteurs. Comme de nombreux autres cancers, il est confronté à des obstacles tels que l'hétérogénéité cellulaire, les mécanismes de résistance à la mort cellulaire induite par les médicaments, et la radiorésistance (Fisher et al., 2013; Janku, 2014; Vasan et al., 2019; Tang et al., 2018). De plus, en raison de sa localisation intracrânienne, le gliome rend l'option du traitement chirurgical difficile. En effet, selon l'emplacement de la tumeur, l'intervention

chirurgicale comporte des risques de complications, voire de décès du patient (Vives et al., 1999; Karsy et al., 2018). Ces défis s'expliquent en partie par la présence de la barrière hématoencéphalique (BHE). Cette barrière naturelle protège le cerveau en étant imperméable aux médicaments. Elle complique alors la mise en place de stratégie de traitements basés sur la chimiothérapie ou encore l'immunothérapie.

1.2.3 Les traitements actuels

Actuellement, les thérapies disponibles contre le gliome ne permettent pas de guérir efficacement cette maladie. Elles consistent surtout en une approche thérapeutique multimodale comprenant une chirurgie élective combinée à la radiothérapie lorsque la localisation de la tumeur le permet. À cela s'ajoute l'utilisation de témozolomide (TMZ), un agent alkylant de l'ADN administré par voie orale et connu pour induire l'arrêt du cycle cellulaire à G2/M. Malheureusement, le taux de réponse à ce traitement reste relativement faible. En raison de la BHE, seulement 20 à 30% du TMZ plasmatique parvient à se rendre dans le liquide cébrospinal (Agarwala et al., 2000; Ostermann et al., 2004).

Depuis quelques années, de nombreuses nouvelles alternatives thérapeutiques ont été étudiées, notamment l'ajout de bevacizumab, un anticorps monoclonal ciblant le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), au traitement par le TMZ (Fecci et al., 2019; Xu et al., 2020; Hata et al., 2020). L'utilisation de cet anticorps est de plus en plus répandue avec un certain succès, bien que les avantages de ce médicament restent quelque peu controversés car les données sur son impact sur la survie des patients sont encore limitées.

Des stratégies supplémentaires basées sur l'utilisation d'inhibiteurs de point de contrôle immunitaire sont également en cours d'étude. Cependant, encore une fois, ils n'ont pas encore conduit à un bénéfice significatif en termes de survie. En effet, le traitement du gliome est confronté à un d'autre obstacle majeur en plus de la BHE, soit celui d'un micro-environnement tumoral immunosuppresseur (Zhang et al., 2022; Binnewies et al., 2018). Par conséquent, de nombreux efforts ont

récemment été déployés pour comprendre les facteurs responsables, tant au niveau cellulaire que moléculaire, afin de développer des thérapies surmontant cet obstacle. Une revue de la littérature scientifique à ce sujet met en évidence l'immunothérapie comme l'une des approches les plus prometteuses (Khalil et al., 2016; Fecci et Sampson, 2019; Murciano-Goroff et al., 2020). Son histoire captivante remonte au début du XXe siècle, lorsque le chercheur William Coley a fait une découverte intrigante. En observant des patients atteints de sarcomes, il a noté des cas de régression tumorale survenant après l'injection de streptocoques (Coley, 1936). Ces injections de bactéries, désormais célèbres sous le nom de « Toxine de Coley », marquent les prémices de l'immunothérapie. En stimulant le système immunitaire de l'hôte, Coley a remarqué une amélioration spectaculaire dans la lutte contre le cancer (McCarthy, 2006).

Au fil des ans et des avancées scientifiques, les stratégies thérapeutiques basées sur l'immunité ont considérablement évolué, donnant lieu à plusieurs axes de recherche simultanés (Khan et al., 2021). Ce n'est toutefois dans les dernières décennies que l'immunothérapie a connu des avancées spectaculaires, notamment avec les inhibiteurs de points de contrôle immunitaire (ICI), tels que les anti-PD-1 et anti-CTLA-4 (Pardoll, 2012; He et al., 2020). Prenons l'exemple du récepteur de surface CTLA-4, exprimé par les cellules cancéreuses. Par le biais de son interaction avec les protéines CD80/CD86, le CTLA-4 peut inhiber l'action des lymphocytes T. Les médicaments basés sur les ICI ont donc la capacité de bloquer les mécanismes utilisés par les cellules cancéreuses pour échapper à la vigilance du système immunitaire. Les ICI ont démontré des taux de succès impressionnants, avec des rémissions prolongées chez certains patients atteints de cancers avancés. En effet, l'inhibition de point de contrôle afin d'annuler l'immunosuppression induite des tumeurs avec des agents tels que le nivolumab et le pembrolizumab a montré des résultats prometteurs dans les essais cliniques pour les patients atteints de gliome avancé (Xu et al., 2020).

Cependant, l'immunothérapie basée sur les ICIs présente des défis importants. Tout d'abord, les taux de succès varient considérablement d'un patient à l'autre et donnent de meilleurs résultats lorsqu'ils sont combinés avec une chimiothérapie.

De plus, les effets secondaires des ICI, qui affectent le fonctionnement normal du système immunitaire, peuvent être graves et nuire au patient (Friedman et al., 2016; Kumar et al., 2017). Un autre défi majeur est le coût élevé de l'immunothérapie, ce qui limite l'accès à cette thérapie pour de nombreux patients (Pichler et al., 2021; Ding et al., 2020; Verma et al., 2018). Néanmoins, la recherche se poursuit pour identifier de nouvelles méthodes permettant de prédire la réponse des patients à l'immunothérapie.

L'utilisation de thérapie génique dans le traitement du cancer est une autre approche largement décrite dans la littérature. Elle implique notamment la modification génétique des cellules du corps pour renforcer leur capacité à combattre le cancer (Somia et al., 2000; Dunbar et al., 2018). Plusieurs axes sont étudiés dans ce domaine, dont l'utilisation de vecteurs viraux permettant de délivrer des acides nucléiques de façon spécifique aux cellules, ce qui est d'ailleurs un des champs de recherche les plus étudiés (Dunbar et al., 2018; Somia et al., 2000; Manikandan et al., 2020). On trouve également des outils basés sur l'utilisation de CRISPR /CAS9, qui permettent de modifier le génome des cellules cibles en coupant les brins ADN à des endroits spécifiques. De nombreuses applications telles que l'inhibition de certains gènes par excision peuvent être ainsi envisagées (Li et al., 2023). Cependant, la thérapie génique qui semble la plus prometteuse est celle des lymphocytes T portant des récepteurs antigéniques chimériques (CAR-T). Elle utilise des lymphocytes T modifiés génétiquement du patient pour cibler les cellules cancéreuses (Waldman et al., 2020). Le récepteur CAR est conçu pour reconnaître une protéine spécifique présente à la surface des cellules cancéreuses, souvent une protéine que le système immunitaire ne parvient pas à identifier par lui-même (Sadelain et al., 2013; Kuhn et al., 2019). Une fois les cellules T génétiquement modifiées pour exprimer le récepteur CAR, elles sont multipliées en laboratoire pour obtenir une grande quantité de cellules T CAR-T (Levine et al. 2016). Les cellules sont ensuite injectées dans le patient, où elles attaquent sélectivement les cellules cancéreuses (Qi et al., 2022; Sadelain et al., 2003).

La thérapie génique CAR-T a démontré des taux de réussite encourageants pour le traitement de certaines formes de cancer, dont le lymphome (Cappell et al., 2023). Dans le cas du gliome, certaines études ont montré une régression des tumeurs grâce à cette thérapie. Cependant la communauté scientifique s'accorde à dire que les résultats des études précliniques et cliniques ne sont pas suffisamment cohérents pour affirmer avec certitude son efficacité contre le gliome. En effet, cette thérapie rencontre certains obstacles, dont une résistance importante à la thérapie. De plus, il semble nécessaire d'améliorer la biodisponibilité pour augmenter son efficacité notamment en contournant la BHE afin d'accéder aux tumeurs. Par ailleurs, des effets secondaires, parfois graves, peuvent survenir en raison de la réponse immunitaire engendrée par les cellules CAR-T et la toxicité qui y est associée. La Food and Drug Administration (FDA) des États-Unis a d'ailleurs annoncé très récemment qu'elle enquêtait sur des cas de cancer du sang apparemment causés par la thérapie CAR-T (Couzin-Frankel, 2023). En outre, le recours à la thérapie génique CAR-T reste coûteuse et complexe, limitant ainsi son accessibilité pour de nombreux patients (Choi et al., 2022; Levine et al., 2016).

Enfin, de manière générale, on s'aperçoit depuis quelques années que la thérapie ciblée, qui consiste en un traitement sélectif des cellules tumorales, est devenue une option de plus en plus courante pour les patients atteints de gliomes. Les inhibiteurs de kinase tels que l'erlotinib ont démontré des résultats prometteurs lors des essais cliniques, avec une prolongation de la survie de patients atteints de gliome avancé. Ainsi les thérapies ciblées deviennent de plus en plus utilisées pour les patients atteints de gliomes. Néanmoins la mise en place de ces nouvelles thérapies se heurte constamment à la difficulté d'accès aux sites tumoraux.

2. La barrière hématoencéphalique

2.1 Présentation

La BHE est une structure physiologique formée d'une monocouche de cellules endothéliales maintenues entre elles par des jonctions serrées, créant ainsi une barrière plus ou moins imperméable qui sépare le compartiment sanguin et le système nerveux central (SNC). Cette barrière joue un rôle crucial dans le maintien de l'environnement stable du cerveau en régulant sélectivement les substances qui peuvent passer de la circulation sanguine vers le cerveau. En plus de protéger le SNC des agents pathogènes présents dans le sang, elle joue un rôle dans la régulation de neurotransmetteur et dans l'homéostasie ionique du cerveau (Kadry et al., 2020). Le nombre de molécules qui peuvent traverser la BHE de façon passive est limité à celles qui peuvent traverser les jonctions serrées, comme les petites molécules hydrophiles ou les ions, et les petites molécules suffisamment lipophiles comme certains gaz ou acides aminés. Ainsi, le passage au travers de la BHE est finement régulé au moyen de différents mécanismes de transcytose, notamment celle médiée par des récepteurs de surface de la cellule, celle impliquant la transcytose d'absorption, et enfin la transcytose à médiation cellulaire. Dans ce dernier cas, les molécules sont transportées au travers de la BHE par des cellules de l'immunité. La transcytose à médiation cellulaire est d'ailleurs un des mécanismes d'infection des cellules de SNC par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Obermeier et al., 2013; Kadry et al., 2020; Zhou et al., 2021). On y trouve également des transporteurs exprimés à la membrane des cellules endothéliales, comme GLUT1 (*Glucose Transporter 1*), une protéine membranaire qui facilite le transport du glucose à travers les membranes cellulaires.

Les études sur les fonctions biologiques de la BHE font ainsi l'objet de nombreuses recherches avec l'objectif que ces avancées puissent permettre de trouver des moyens de la contourner ou de la franchir afin de mettre en place des thérapies efficaces (**Figure 5**).

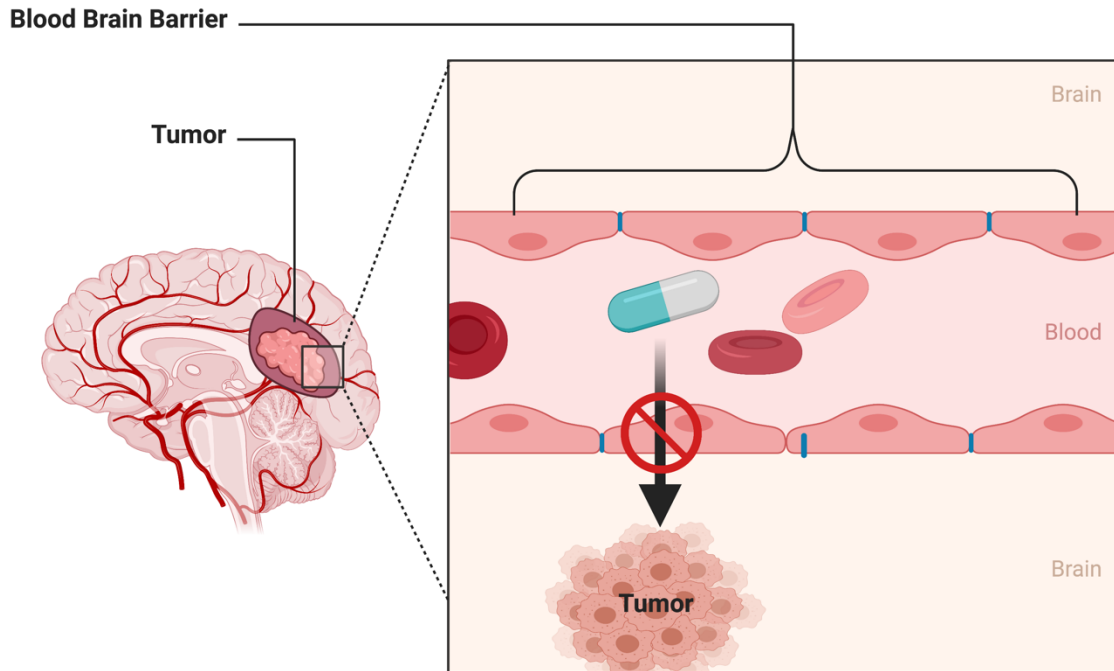


Figure 5 : Schéma de la barrière hématoencéphalique et son action anti-chimio thérapeutique dans le contexte du gliome.

2.2 Comment franchir la BHE?

Il a été observé que, dans certaines pathologies, l'intégrité de la BHE est altérée, entraînant ainsi une perte de ses fonctions et de son imperméabilité. Ce phénomène a notamment été observé dans certains cas de gliome et pourrait être dû à une régulation des protéines des jonctions serrées ZO1 (Zonula Occludens-1) et Occludine (Kadry et al., 2020). Cela pourrait être considéré comme un avantage dans la perspective visant à contrecarrer les défis associés au transport de médicaments à travers la BHE pour le traitement du gliome.

Une autre façon de contourner la perméabilité de la BHE a été étudiée à la fin des années 80 lorsqu'il a été démontré qu'une injection intranasale permet à des médicaments de se rendre au liquide céphalorachidien et d'atteindre le SNC via les neurones et le bulbe olfactifs. Ce mécanisme a été décrit par William Frey, souvent considéré comme l'inventeur de l'injection intranasale (Balin et al., 1986;

Thorne et al., 1995; Crowe et al., 2018). Depuis lors, plusieurs applications ont été étudiées, notamment celle de livraison de médicaments dans le contexte du gliome. Des études ont notamment expérimenté l'injection intranasale de nanoparticules couplées à des siRNA contre la galectine-1 (Gal-1) et mis en évidence une réduction significative de l'expression de la protéine, illustrant le potentiel de cette méthode pour le traitement du gliome (Van Woensel et al., 2016; Crowe et al., 2018).

D'autres groupes de recherche se sont penchés sur la perturbation transitoire de la BHE par d'autres méthodes telles que les radiations ou le ciblage des jonctions serrées de la BHE. Ces approches restent toutefois controversées car elles risquent de perturber les fonctions de la BHE et d'augmenter la vulnérabilité du SNC (Han, 2021).

Une autre manière de contourner la BHE qui a été décrite dans la littérature scientifique concerne l'utilisation de nanotransporteurs (Wu et al., 2023). Les avancées les plus récentes dans ce domaine incluent l'utilisation de nanoparticules pour améliorer la pénétration des médicaments dans le cerveau et cibler sélectivement les cellules tumorales. Nous discuterons plus en détail cette approche un peu plus tard dans notre revue de littérature.

Un autre axe de recherche en émergence est le développement de molécules thérapeutiques capables de traverser la BHE. Par exemple, dans le domaine de l'immunothérapie, le développement d'anticorps comme des nanobodies capables de franchir la BHE, est un champ de recherche qui ouvre plusieurs perspectives (Ruiz-López et Schuhmacher, 2021; Zheng et al., 2022).

Les thérapies basées sur l'utilisation de vecteurs viraux sont aussi de plus en plus étudiées et exploitées. Nous y trouvons notamment les peptides responsables de la traversée des virus à travers la BHE couplés à d'autres peptides ou molécules qui ont une utilité thérapeutique (Zhou et al., 2021).

3. Les galectines

La prochaine section se veut un résumé d'une revue scientifique que nous avons récemment publié et qui passe en revue le rôle des galectines dans le développement du gliome. Nous y aborderons également les dernières perspectives retrouvées dans la littérature scientifique, mettant en relief l'influence des galectines dans divers mécanismes biologiques et leur implication potentielle en tant que cibles thérapeutiques pour le cancer.

3.1 L'histoire des galectines

La découverte des galectines fait suite à des études mettant en évidence une protéine capable de lier les β -D-galactosides dans les homogénats tissulaires de l'anguille électrique par Vivian Teichberg (Teichberg et al., 1975). Au fil des décennies, plusieurs autres « galectines » ont été identifiées chez de nombreuses espèces, allant des invertébrés aux humains (Kasai et Hirabayashi, 1996; Vasta et al., 2012).

Au cours de ces années, les études ont démontré que les galectines sont capables de se lier à des ligands intracellulaires et extracellulaires via des interactions indépendantes des glucides (Mey et al., 1996, 3; Gauthier et al., 2002; Lepur et al., 2012; Yıldırım et al., 2015; Advedissian et al., 2017). Les galectines remplissent ainsi de nombreuses fonctions intracellulaires et extracellulaires, tant au niveau du développement que lors de divers processus physiologiques, y compris la régulation de la réponse immunitaire. Depuis plus de vingt ans, nous savons également qu'elles jouent un rôle important dans le cancer. Elles sont pour cela considérées aujourd'hui comme des cibles thérapeutiques potentielles. La revue de littérature du groupe de recherche de Gabriel Rabinovich offre un excellent résumé des principaux rôles joués par les galectines dans plusieurs types de cancers (Liu et Rabinovich, 2005). Ces connaissances associées au développement concomitant de nouvelles générations d'inhibiteurs de galectines et de technologies d'administration de médicaments, offrent ainsi de nouvelles

perspectives pour le développement de nouvelles thérapies efficaces pour les patients atteints de gliome (Mariño et al. 2023).

3.2 Structure des galectines

Aujourd'hui, les galectines sont reconnues comme une famille de lectines animales structurellement apparentées, présentant un niveau élevé de conservation évolutive (Kasai et Hirabayashi, 1996). Toutes les galectines possèdent un domaine de reconnaissance des glucides (*carbohydrate recognition domain*, CRD) composé d'environ 130 acides aminés, qui adopte une conformation avec deux feuillets bêta distincts. Ce domaine contient un site de liaison aux glycanes (*glycan binding site*, GBS) qui lui permet de se lier aux β -galactosides et à d'autres structures monosaccharidiques (Chan et al., 2018).

Les galectines ont été divisées en trois groupes distincts (Yang et al., 2008) : (1) les galectines prototypiques, qui possèdent un seul CRD pouvant former des homodimères ; (2) le type de répétition en tandem (*tandem repeats*), constitué d'un seul polypeptide codant pour deux domaines CRD reliés par un lien peptidique ; et (3) les galectines de type chimérique, qui ont un seul CRD en C-terminal lié à une chaîne peptidique en N-terminal riche en proline et en glycine, leur permettant entre autres de pouvoir former des structures pentamériques (Ahmad et al., 2004). Il est important de noter que même si toutes les galectines possèdent un domaine CRD, cela ne leur confère pas *de facto* une capacité à se lier aux sucres. Un exemple classique est la galectine-10 (Gal-10), connue pour former les cristaux de Chardot-Leyden que l'on retrouve dans de nombreux tissus, en particulier chez les éosinophiles (Su et al., 2018). En effet, il a récemment été démontré que la Gal-10 se lie aux ribonucléases cationiques des granules d'éosinophiles de manière indépendante des glucides (Grozdanovic et al., 2020). Par ailleurs, cette protéine est surtout connue pour son rôle critique dans l'asthme, car ses cristaux induisent une inflammation chronique des voies respiratoires (Persson et al., 2019). Nous savons maintenant que la Gal-10 n'est pas la seule galectine qui ne lie pas les β -galactosides. Un autre exemple est la galectine-13 (Gal-13) qui forme

un homodimère unique, stabilisé par des liaisons disulfures et incapables de lier le lactose (Su et al., 2018)..

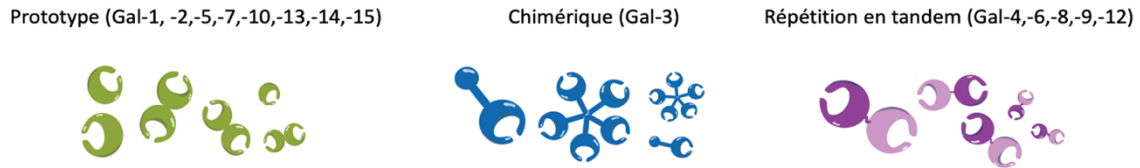


Figure 6 : La famille des galectines. Les galectines sont classées en trois sous-familles en fonction de leurs structures tridimensionnelles. Figure modifiée de (Yang et al., 2008)

3.3 Rôles des galectines :

Les galectines jouent un rôle important dans de nombreux processus physiologiques, tels que l'inflammation, la prolifération cellulaire et la migration cellulaire. Ces dernières années les recherches sur les galectines ont connu une expansion considérable, révélant de nouvelles fonctions et mécanismes d'action associés à la progression du cancer, tels que le cancer du sein, le cancer du foie, le cancer du poumon, le gliome et bien d'autres (Martínez-Bosch et al., 2019; Ajarrag et St-Pierre, 2021; Mariño et al., 2023). En effet, les galectines peuvent favoriser la progression de la maladie par le biais de multiples mécanismes, tels que la stimulation de la prolifération cellulaire, l'inhibition de l'apoptose, et l'augmentation de la résistance aux traitements anticancéreux. De plus, les galectines peuvent favoriser la migration et l'invasion des cellules tumorales, augmentant ainsi le risque de métastases. Des études ont montré que les galectines sont impliquées dans la régulation de la réparation de l'ADN et la résistance à la thérapie (Liu et Rabinovich, 2005; Mariño et al., 2023). Par ailleurs, les galectines peuvent moduler l'inflammation en interagissant avec les cellules immunitaires, notamment les cellules T et les macrophages (Derosiers et al., 2022).

En résumé, les galectines jouent une myriade de rôles dans le développement du cancer, et sont de ce fait considérées comme des cibles thérapeutiques de choix.

3.4 Galectin-1 une cible pour le gliome?

3.4.1 Présentation de la Gal-1

La Gal-1 tire son nom du fait qu'elle fut la première des galectines à avoir été découverte en 1976 (De Waard et al., 1976). Elle demeure à ce jour l'une des plus étudiées avec plus de 2,000 articles publiés à son sujet, dont un tiers au cours des cinq dernières années. La Gal-1 est un monomère de 14 KDa avec un domaine CRD de 130 acides aminés capable de former un homodimère. De l'angiogenèse aux métastases dans les gliomes de haut grade, la Gal-1 joue de nombreux rôles dans le cancer. Nous avons écrit une revue de littérature qui résume les rôles de la Gal-1 dans le gliome (Ajarrag et St-Pierre, 2021).

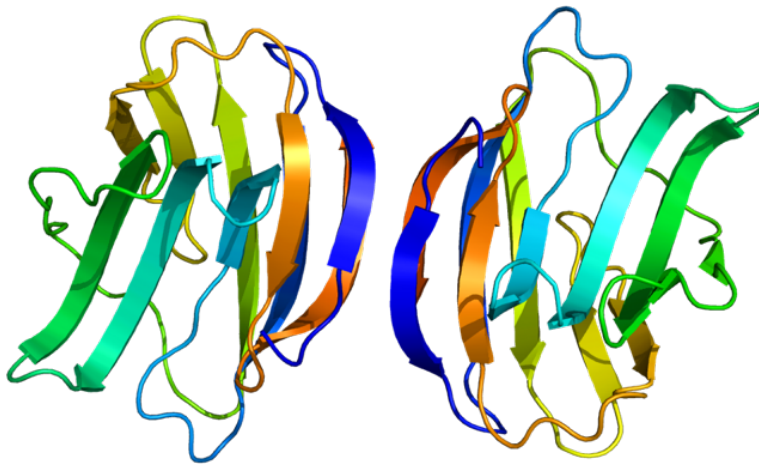


Figure 7 : Structure d'un homodimère de la Gal-1 humaine. Les unités de Gal-1 sont formées de feuillets bêta et ne sont pas liées par un lien peptidique. Figure originale tirée de (López-Lucendo et al., 2004)

3.4.2 L'expression de la Gal-1 dans le gliome

Il y a 20 ans, les premiers rapports indiquant que Gal-1 pourrait être une cible précieuse pour le traitement du gliome ont été publiés, avec de nombreuses études menées par le groupe de Robert Kiss et ses collègues à Bruxelles. Ce groupe a publié des études montrant que l'expression de Gal-1 dans le gliome corrélait avec son agressivité et avec une faible survie des patients (Camby et al., 2001; Rorive et al., 2001; Toussaint et al., 2012). Ils ont également observé que Gal-1 est préférentiellement exprimée dans la marge tumorale, ce qui est cohérent avec un rôle possible dans la migration et le caractère invasif du GBM. Par ailleurs, il convient de noter que l'expression de la Gal-1, observé dans plusieurs types de cancer du cerveau ne se limite pas à celui-ci (Rorive et al., 2001; Chen et al., 2019). Des études ont confirmé que des taux anormalement élevés de Gal-1 étaient associés à une faible survie, en particulier chez les patients atteints de GBM recevant une radiothérapie adjuvante (Chou et al., 2018; Zhu et al., 2022). De manière intéressante, ce niveau anormalement élevé de Gal-1 peut être détecté dans le sérum des patients, fournissant ainsi un outil intéressant pour identifier les patients à risque et susceptibles de bénéficier de thérapies dirigées par Gal-1. Cette observation est d'autant plus pertinente que l'expression de la Gal-1 varie considérablement entre les différents sous-types cellulaires du gliome. En effet, son expression est la plus élevée dans les gliomes de haut grade, et il existe une corrélation entre son expression et le sous-type de gliome. Les gliomes de type mésenchymales ont tendance à exprimer davantage de Gal-1 que les sous-types neuronaux (Zhu et al., 2022; Guda et al., 2022; Martínez-Bosch et al., 2023).

3.4.3 Le rôle immunosuppresseur de la Gal-1

Compte tenu d'une part, des avancées récentes et du succès de l'immunothérapie dans le contrôle de la progression du cancer, et d'autre part, du rôle bien documenté de Gal-1 dans le contrôle de la réponse immunitaire, notamment

contre les cellules immunitaires cytotoxiques, il est légitime de se demander si l'inhibition de la Gal-1 peut contribuer à améliorer l'efficacité de l'immunothérapie contre le gliome. Cette possibilité a été largement étudiée dans la littérature scientifique (van der Burg et al., 2016; Rodríguez et al., 2018; Alard et al., 2020; Berois et Osinaga, 2014). Des études portant sur différents types de cancers, y compris le gliome, ont révélé que l'effet immunosuppresseur de la Gal-1 pouvait être médié par plusieurs mécanismes d'action. Par exemple, Gal-1 favorise l'infiltration de lymphocytes T régulateurs immunosuppresseurs (Cagnoni et al., 2021), induit la polarisation des macrophages vers un phénotype inflammatoire (Van Woensel et al., 2017), entrave la capacité des cellules NK par la voie miRNA-TLR7-IFN beta à éliminer les cellules cancéreuses (Lowenstein et al., 2014; Shah et al., 2021), et inhibe les fonctions des lymphocytes T suite à la liaison de Gal-1 extracellulaire à leurs glycorécepteurs de surface (**Figure 8**) (Perillo et al., 1995; Matarrese et al., 2005; Liu et Rabinovich, 2005). Dans ce dernier cas, cette liaison induit l'apoptose des cellules immunitaires activées, comme l'a démontré une étude pionnière du groupe de Linda Baum, qui a rapporté que la Gal-1 induit la mort des cellules T activées (Perillo et al., 1995). De plus, la Gal-1 pourrait également jouer un rôle dans la régulation des lymphocytes T via l'induction de la Gal-9. Par exemple dans les cancers de la tête et du cou, il a été observé que la Gal-1 favorise l'expression de PD-L1 et de la Gal-9 au niveau de la membrane cellulaire, contribuant ainsi à l'échappement précoce de la réponse immunitaire médiée par les lymphocytes T (Nambiar et al., 2019). En outre, l'inactivation de la Gal-1 a été démontrée pour améliorer l'efficacité des ICI et de l'immunothérapie basée sur les cellules dendritiques (Nambiar et al., 2019; Capalbo et al., 2019; Verschuere et al., 2014). Dans l'ensemble, les éléments de preuve s'accumulent en faveur de l'utilisation de l'inhibition de la Gal-1 comme une stratégie précieuse pour surmonter l'immunosuppression locale associée au micro-environnement tumoral du GBM.

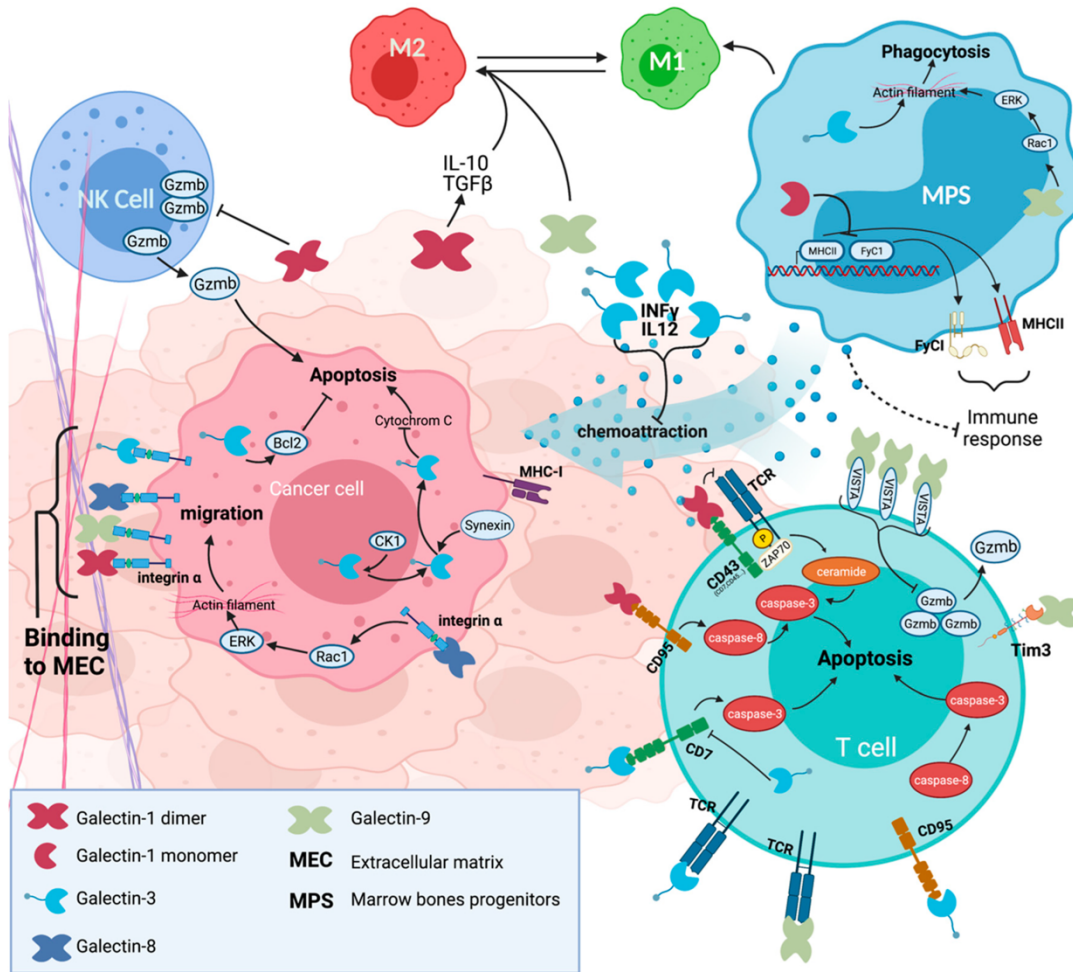


Figure 8 : Schéma représentant les rôles de la Gal-1 dans l'immunomodulation du micro-environnement tumoral. Figure originale tirée de (Ajarrag et St-Pierre, 2021).

3.4.5 Mécanismes cellulaires pro-ontogéniques de la Gal-1

Les premières études se sont principalement intéressées au rôle de Gal-1 dans la migration cellulaire. Dans les cellules du gliome, l'inactivation du gène *LGALS1*, qui code pour la Gal-1, a révélé que celle-ci régule l'expression de plusieurs gènes liés à la motilité et à la migration, notamment *CapG* et *Map-2*. Ces gènes influent sur la dynamique du cytosquelette d'actine et la cadhérine 6. Nous y trouvons également d'autres protéines, comme Adam15, connue pour leur interaction avec l'intégrine $\alpha 9 \beta 1$, jouant un rôle dans la modulation de l'adhésion intercellulaire et de l'invasion cellulaire (Shih et Yamada, 2012; Eto et al., 2000; Paulus et al., 1996;

D'Abaco et Kaye, 2007). Le rôle de Gal-1 dans la promotion du caractère invasif des cellules du gliome ne se limite pas à ses fonctions intracellulaires, car d'autres études ont montré qu'elle favorise également l'invasion cellulaire en stimulant l'adhésion des cellules aux protéines de la matrice extracellulaire, telles que la fibronectine et la laminine, ainsi qu'aux intégrines $\beta 1$ présentes à la surface cellulaire (Ozeki et al., 1995; Moiseeva et al., 1999; Moiseeva et al., 2003; Fortin et al., 2010). Il a notamment été montré que la migration cellulaire est dépendante de la Gal-1 par l'activation de la voie RhoA/ROCK, ce qui entraîne un réarrangement du squelette d'actine favorisant la migration et l'invasion (Camby et al., 2002; Bros et al., 2019). D'autres études ont également démontré que la Gal-1 peut non seulement être impliquée dans le contrôle de l'invasion cellulaire du GBM, mais également être responsable de la résistance à la chimiothérapie et à la radiothérapie. Le Mercier et ses collègues ont discuté en détail de ce mécanisme d'action qui implique la Gal-1 intracellulaire dont l'expression est déclenchée en conditions d'hypoxie (Le Mercier et al., 2010). En effet, en réponse au stress du réticulum endoplasmique, une surexpression de la Gal-1 induit la transcription de protéines chaperonnes ainsi que des facteurs de transcription tels que Gadd153, qui sont impliqués dans la survie cellulaire, et ATF3 et Gadd45A, qui sont associés à la chimiorésistance (Le Mercier et al., 2008). Cependant, à notre connaissance, cette association entre la Gal-1 et la chimiorésistance dans le GBM n'a pas été étudiée de manière approfondie depuis, bien que de nombreuses études aient démontré que l'utilisation de siRNA spécifique à la Gal-1 sensibilise la tumeur à la chimiothérapie et à la radiothérapie.

Ces études ont également révélé que la Gal-1 se lie à H-Ras pour stabiliser sa forme activée (phosphorylée), ce qui active la voie de ERK (Gao et Wang, 2019; Zhang et al., 2019; Haiyan Zhu et al., 2017; Zhang et al., 2014; Chung et al., 2012; Meng et al., 2011). Par exemple, dans le carcinome épithélial de l'ovaire, il a été rapporté que l'activation de la voie ERK par la Gal-1 induit la transcription de p21 et Bcl2, ce qui conduit à la chimiorésistance (Zhang et al., 2014). D'autres études ont également démontré que la Gal-1 facilite la translocation de FAM289 vers le noyau (**Figure 9**), activant ainsi la voie de ERK pour réguler positivement les

DMNT, une famille de protéines qui régulent la méthylation de l'ADN, favorisant ainsi l'angiogenèse, la progression tumorale et la chimiorésistance (Guo et al., 2019).

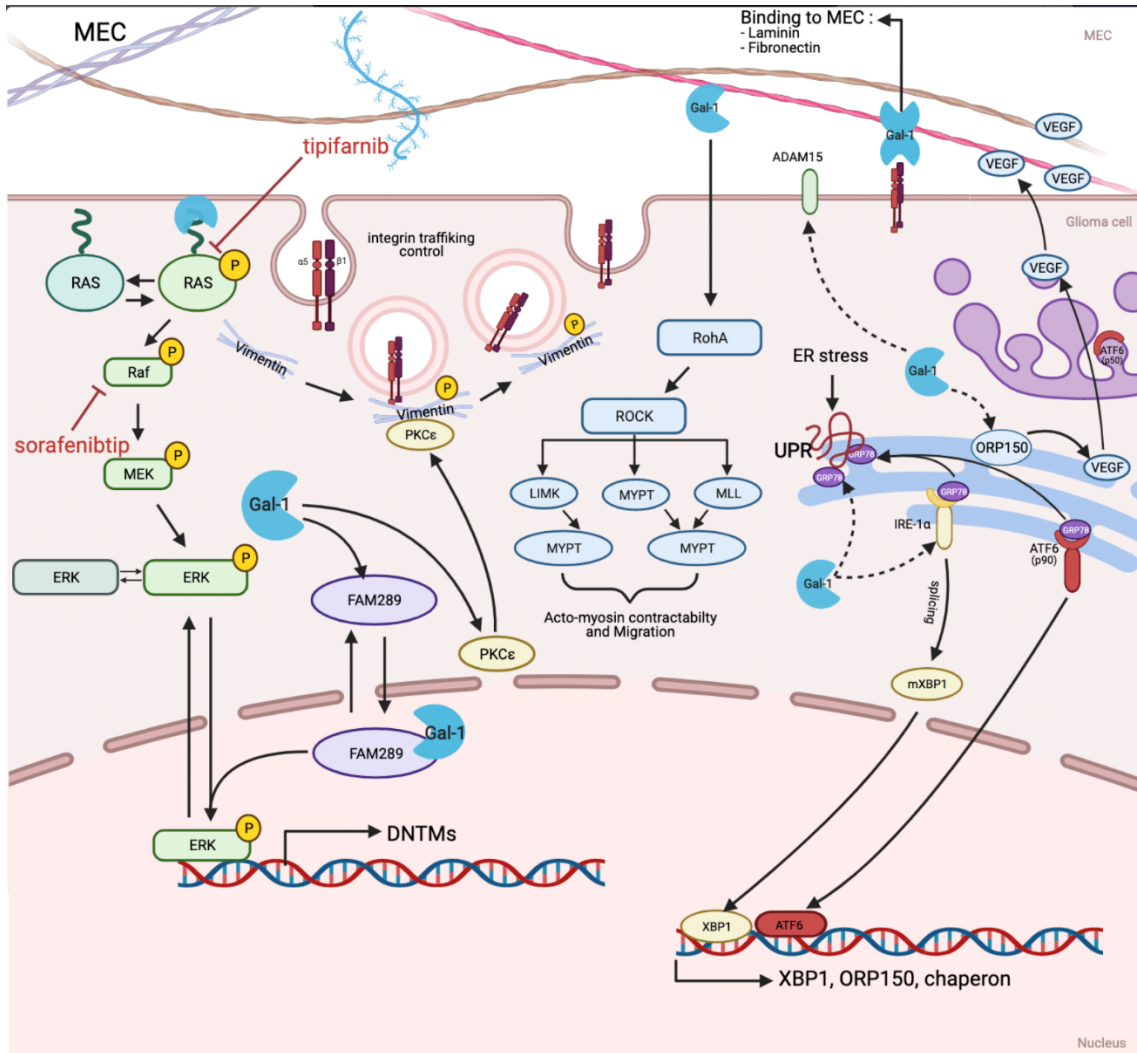


Figure 9 : Schéma des rôles de la Gal-1 intracellulaire dans le cancer. Figure originale réalisée par Samy Ajarrag.

3.5 Le rôle des autres galectines dans le gliome

3.5.1 La galectine-3

L'implication potentielle de la Gal-3 dans la progression des gliomes a fait l'objet d'études depuis des décennies, mais a récemment suscité un intérêt croissant au cours des 10 dernières années. La Gal-3 est exprimée dans les cellules astrocytaires et microgliales, bien que la plupart des recherches se soient concentrées sur le sous-type mésenchymateux du GBM (Binh et al., 2013; Yoo et al., 2017; Hu et al., 2020; Seguin et al., 2021). En effet, une surexpression de la Gal-3 est associée à un mauvais pronostic et un potentiel malin élevé du GBM (Wang et al., 2019; He et al., 2019; Hu et al., 2020).

Les études sur Gal-3 ont contribué à établir le paradigme selon lequel les galectines ont de multiples rôles dans la progression du cancer en plus de leur rôle dans la régulation de la réponse immunitaire. Les études sur son mode d'action se sont d'abord concentrées sur son rôle dans l'invasion des cellules de gliome et la chimiorésistance (Le Mercier et al., 2010).

Ce rôle dans l'invasion a été confirmé dans un modèle 3D *in vitro* élégant, mettant en évidence une interaction potentiellement critique entre Gal-3 et l'intégrine $\beta 1$ et la migration unicellulaire et, par extension, un rôle possible dans la métastase (Saleh et al., 2019). Des indications récentes suggèrent que la Gal-3 pourrait également jouer un rôle dans la chimiorésistance dans le GBM. En effet, en utilisant à la fois des modèles *in vitro* et *in vivo*, Ikemori et ses collègues ont ainsi démontré que la suppression de l'expression de la Gal-3 dans les cellules humaines U-87 MG a retardé la prise de greffe tumorale et réduit la croissance tumorale, soutenant ainsi la possibilité de cibler la Gal-3 pour sensibiliser les cellules de gliome à la mort cellulaire (Ikemori et al., 2014). Cependant, il reste à déterminer si une telle inhibition perturbe les voies intracellulaires initialement soupçonnées d'être impliquées dans la résistance à la mort cellulaire, telles que les voies Bcl-2, Ras ou CD95, ou si elle nécessite la phosphorylation de Gal-3 sur

des résidus critiques (Akahani et al., 1997; Fukumori et al., 2004; Takenaka et al., 2004; Shalom-Feuerstein et al., 2008).

Étant donnée l'activité immunosuppressive des galectines en général, on ne peut ignorer l'implication potentielle de la Gal-3 dans la contribution à l'environnement tumoral immunosuppresseur typique des GBM (Nangia-Makker et al., 2008; Fortuna-Costa et al., 2014; Gordon-Alonso et al., 2018). L'implication de Gal-3 peut être résumée par au moins trois fonctions distinctes : la reconnaissance des antigènes tumoraux, la régulation de l'apoptose et la neutralisation des cytokines. Par exemple, la Gal-3 sécrétée module directement la reconnaissance des antigènes par le récepteur des cellules T (TcR) exprimé par les cellules T effectrices CD8-positives en formant des réseaux extracellulaires, éloignant ainsi le TcR du récepteur accessoire CD8 (Demotte et al., 2010). L'inhibition de la Gal-3 par la N-acétyllactosamine, un ligand naturel des galectines, rétablit la colocalisation TcR et du CD8.

Un autre mécanisme d'action impliqué dans l'immunosuppression médiée par la Gal-3 est sa capacité à induire l'apoptose des cellules immunitaires activées, tout comme d'autres galectines telle que Gal-1. Ce rôle de la Gal-3 dans l'induction de l'apoptose a été largement discuté dans plus de 500 publications. Un autre mécanisme d'action récemment décrit par lequel la Gal-3 régule la réponse immunitaire locale est via son interaction avec la protéine *chitinase-3-like-1*, une glycoprotéine sécrétée par une variété de cellules cancéreuses, qui augmente sa capacité à reprogrammer les macrophages dérivés de monocytes en un phénotype immunosuppresseur protumoral de type M2 (Chen et al., 2021; Cachia et al., 2023).

Enfin, un autre mécanisme d'action qui n'a pas reçu beaucoup d'attention est la capacité de Gal-3 à piéger et neutraliser les cytokines essentielles pour le développement d'une réponse immunitaire efficace. Ce mécanisme a été mis en évidence pour la première fois par le groupe de Pierre Van der Bruggen, qui a démontré que l'accumulation de Gal-3 dans le microenvironnement tumoral conduit à la capture d'Interferon gamma (IFN γ) et d'IL-12 glycosylés (Gordon-Alonso et al., 2017). On ne sait pas encore si ce rôle est limité à Gal-3 ou partagé

par d'autres galectines. Néanmoins, toutes ces fonctions liées à l'immunité ont jeté les bases pour tester si la Gal-3 peut potentialiser l'effet des ICIs. Une étude récente utilisant le belapectin, un polymère de polysaccharides contenant du galactose et d'autres sucres, a rapporté que cet inhibiteur peut potentialiser l'effet des ICIs et des agonistes anti-OX-40 dans des études précliniques de plusieurs modèles de cancer (Curti et al., 2021; Sturgill et al., 2021; Zhang et al., 2021). La faiblesse de ces études repose toutefois sur l'absence de données prouvant que ces effets sont spécifiques à Gal-3. Il convient de noter qu'une récente analyse *in silico* menée par Takashima et ses collègues a identifié les gènes codant pour Gal-3 et Gal-9 parmi les 20 principaux gènes liés à l'immunothérapie dont l'expression était significativement modulée. Cependant, cette étude a démontré de manière surprenante qu'une faible surexpression à la fois de *LGALS3* et *LGALS9* était associée à un mauvais pronostic (Takashima et al., 2019). Bien que ces résultats puissent être importants pour établir une signature génétique à des fins de pronostic, ils soulignent la complexité de Gal-3, dont les fonctions dépendent de sa localisation intra- et extracellulaire ainsi que de sa modification post-traductionnelle, telle que la phosphorylation.

3.5.2 La galectine-8

Un autre membre de la famille des galectines, la Gal-8, joue un rôle dans diverses fonctions cellulaires telles que l'adhésion cellulaire, la migration, la prolifération et la survie cellulaire. Dans le cancer du poumon, la Gal-8 régule l'adhésion et la migration cellulaire en se liant aux intégrines et en activant la voie de FAK (*Focal adhesion kinase*) (Levy et al., 2001). Des études suggèrent que la Gal-8 favorise la migration cellulaire en interagissant avec ALCAM (*activated leukocyte cell adhesion molecule*) à la surface des cellules (Ferragut et al., 2019). Dans un modèle de cancer du sein, l'inhibition par antisens de Gal-8 et d'ALCAM simultanément retarde la croissance tumorale (Ferragut et al., 2019). Chez les lymphocytes T, la Gal-8 se lie aux intégrines induisant Rac1 et conduit à la réorganisation de l'actine par la voie de ERK. Cette fonction semble être partagée

par un large éventail de types cellulaires, y compris les cellules cancéreuses, et pourrait influencer divers processus immunitaires médiés par les lymphocytes T (Cárcamo et al., 2006). La Gal-8 est toutefois mieux connue pour son rôle dans l'autophagie depuis la publication d'une étude importante de Teresa Thurston en 2012 qui expliquait que la Gal-8 agit comme un signal de danger et protège les cellules des dommages causés par les bactéries et les virus en modulant l'intégrité des compartiments endosomaux et lysosomaux (Thurston et al., 2012; Staring et al., 2017). Cependant, on ignore toujours si la Gal-8 a la capacité de moduler la croissance tumorale via un mécanisme dépendant de l'autophagie, bien que celle-ci joue un rôle central dans la progression du cancer (Kondo et al., 2005). Dans le cas du gliome, l'autophagie est considérée comme un mode d'action adaptatif utilisé par les cellules de gliome pour faire face à des conditions défavorables (Jandrey et al., 2021). Il est ainsi logique de croire que la Gal-8 est impliquée dans la progression des gliomes, et représente potentiellement une cible thérapeutique. Jusqu'à présent, seules deux études ont été menées sur ce sujet. Tout d'abord, Metz et ses collègues ont réalisé des expériences de Knockdown de la Gal-8, comparant cela à l'utilisation de la Gal-8 humaine recombinante dans un modèle *in vitro* de gliome (U-87 MG). Leurs résultats ont mis en évidence que la Gal-8 favorise la migration cellulaire, la prolifération et la résistance à la mort cellulaire (Metz et al. 2016). Ensuite, une étude récente menée par Liu et al. a démontré que la Gal-8 est surexprimée en conditions d'hypoxie, favorisant la survie des cellules du gliome via l'axe Gal-8-mTOR-TFEB. Ils ont notamment constaté, un ralentissement de la croissance tumorale accompagné d'une prolongation de la survie dans un modèle murin lors de la suppression de la Gal-8 (Liu et al., 2023). Une perspective intéressante qui n'a pas été explorée dans le contexte des gliomes est le rôle de la Gal-8 dans l'induction de la sécrétion de cytokines par les cellules endothéliales et cancéreuses, notamment le *stromal cell-derived factor 1* (SDF-1) et la *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) (Shatz-Azoulay et al., 2020). Cette capacité a été démontrée dans de nombreux modèles de tumeurs. L'augmentation de la sécrétion de SDF-1 est particulièrement intrigante. Une revue récente sur le rôle de CXCL12, le gène codant SDF-1, décrit en détail

comment cette chimiokine s'accumule dans le micro-environnement tumoral et contribue à la résistance aux ICIs, tandis que l'inhibition de cette cytokine améliore l'efficacité des ICIs (Portella et al., 2021). Dans un modèle de cancer du sein *in vivo*, Correia et ses collègues ont récemment démontré que cette accumulation de CXCL12 dans le micro-environnement tumoral est nécessaire pour induire la dormance tumorale médiée par les cellules NK (Correia et al. 2021). Ce mécanisme d'action pourrait expliquer pourquoi l'inhibition de CXCL12 et de ses récepteurs (CXCR4) augmente la réponse aux ICIs (Chen et al., 2019; Feig et al., 2013).

Malgré les études intéressantes sur le rôle de la Gal-8, il est important de mentionner que son rôle dans la progression du cancer n'est pas binaire. Bien que la Gal-8 puisse induire l'apoptose dans les cellules T immatures, à l'instar des autres galectines (Tribulatti et al., 2007; Norambuena et al., 2009), des études récentes effectuées par le groupe de Maria Tribulatti dans divers systèmes expérimentaux suggèrent que la Gal-8 a des fonctions immunostimulantes importantes dans les cellules T naïves périphériques et favorise l'internalisation des antigènes par les cellules présentatrices d'antigènes (Tribulatti et al., 2009; Prato et al., 2020). De manière intéressante, il a été démontré que Gal-3 peut inhiber l'effet immunostimulant de Gal-8 sur les cellules T naïves, soulignant la nécessité de développer des inhibiteurs de galectine qui soient hautement spécifiques (Tribulatti et al., 2012).

3.5.3 La galectine-9

La Gal-9 est exprimée dans le sous-type mésenchymateux des GBM et est principalement localisée dans le noyau de la tumeur, contrairement à son homologue Gal-1 qui est principalement exprimé dans les cellules en marge de la tumeur. (Toussaint et al., 2012; Yuan et al., 2020). Bien que la Gal-9 ait été étudiée pendant de nombreuses années, elle reçoit une attention particulière depuis qu'elle a été démontrée comme capable de se lier à la protéine TIM-3 (Zhu et al., 2005). Les auteurs de cette étude ont démontré que la liaison de Gal-9 à TIM-3

induit la mort des cellules Th1 par des mécanismes apoptotiques et nécrotiques. De plus, l'injection de Gal-9 recombinante chez la souris réduit le nombre de cellules Th1 sécrétant de l'IFN γ . Des études ultérieures ont révélé que l'interférence avec les voies TIM-3 et PD1/PDL1 est plus efficace que le ciblage de chaque voie individuellement pour restaurer l'immunité antitumorale (Fourcade et al., 2010; Sakuishi et al., 2010).

Depuis lors, l'axe Gal-9/TIM-3 a reçu une attention particulière dans le domaine de l'immunothérapie du cancer et est maintenant considéré comme un mécanisme de résistance à l'utilisation d'ICI chez les patients atteints de cancer (Wolf et al. 2020; Nguyen et Ohashi, 2014; Waldman et al., 2020; Pardoll, 2012). Cette relation fonctionnelle entre Gal-9, TIM-3 et les ICIs a été confirmée par une étude récente qui a démontré que la Gal-9 se lie également à PD1 et joue un rôle majeur dans la résistance des cellules T TIM-3-positives à la mort cellulaire (Yang et al., 2021). Les auteurs de cette étude ont également démontré qu'une thérapie combinant des anticorps anti-Gal-9 et des anti-PDL-1 bloquants améliorait la survie par rapport à la monothérapie. Ainsi, le ciblage de Gal-9 est une voie prometteuse à explorer dans le contexte du gliome. Nous savons en effet maintenant que la Gal-9 est exprimée dans le gliome et que son expression varie en fonction de la progression tumorale et du type cellulaire, étant associée à TIM-3 (Yuan et al., 2020; Knudsen et al. 2021; Liu et al., 2016). De plus, une forte expression de Gal-9 chez les patients atteints de gliome avec une forte expression de Gal-9 est associée à un risque accru de développer des tumeurs malignes et constitue un indicateur indépendant de mauvais pronostic (Liang et al., 2019).

Les tumeurs de GBM présentent également des sous-populations de cellules qui coexpriment Gal-9 et PD-L1, suggérant une relation étroite entre Gal-9 et la voie PD-1 dans le gliome. L'expression de Gal-9 est également corrélée à une augmentation des macrophages associés à M2, ce qui est en accord avec des études précédentes montrant que la Gal-9 favorise la transition de M1 vers M2 pour favoriser la croissance tumorale (Enninga et al., 2016; Lv et al., 2017; Yuan et al., 2020). Dans l'ensemble, l'identification de Gal-9 en tant que ligand pour TIM-3 a ouvert une nouvelle ère prometteuse dans la recherche sur le cancer du

gliome, offrant des perspectives excitantes pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

4. Cibler la galectine-1

4.1 Présentation du siRNA et son fonctionnement

Pour cibler la Gal-1, une des approches envisagées est de réduire son expression cellulaire en utilisant le principe de l'interférence ARN (ARNi). Cette méthode théoriquement capable d'inhiber l'expression de manière sélective et spécifique, fait des *small interfering RNA* (siARN) une modalité thérapeutique prometteuse. Les siRNA sont de courts fragments d'ARN double brin d'environ une vingtaine de nucléotides qui recréent le mécanisme naturel d'interférence. L'introduction de siRNA dans la cellule permet, par l'intermédiaire du complexe RNA-induced silencing complex (RISC), de dégrader des ARN messagers spécifiques et ainsi d'empêcher la traduction d'une protéine spécifique (Dautry et al., 2007; Elbashir et al., 2001) (**Figure 10**). Cette approche s'inscrit dans le domaine des thérapies géniques qui visent spécifiquement les ARN messagers des protéines d'intérêt. Il s'agit d'une thérapie prometteuse offrant un traitement plus précis et personnalisé de diverses pathologies. C'est pourquoi, au début des années 2000, la recherche sur les siRNA a suscité un vif engouement dans le monde de la recherche (Anguela et High, 2019).

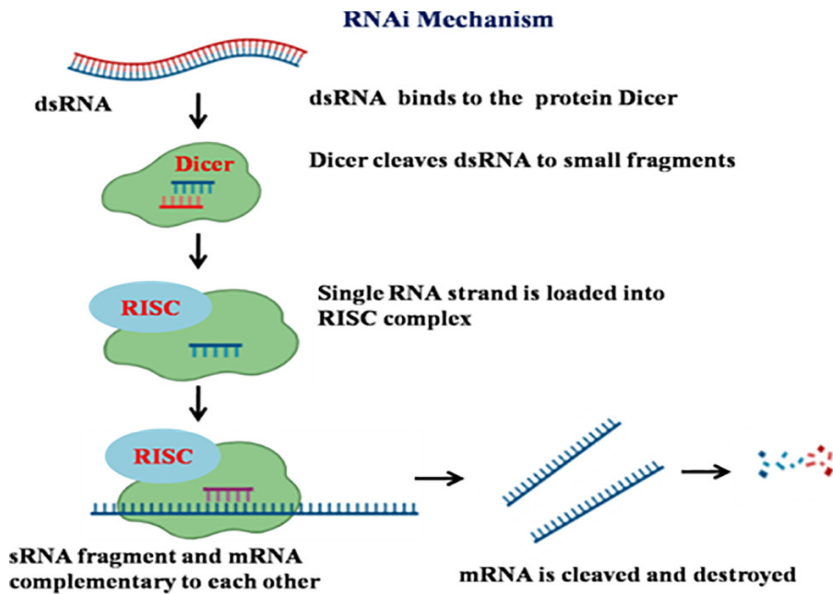


Figure 10 : Principe de fonctionnement de l'inhibition de traduction protéique par le SiRNA. Figure modifiée de (Mujtaba et al., 2021)

4.2 Thérapie actuelle et recherche sur les siRNA

La recherche sur les siRNA a débuté au début des années 2000 (Elbashir et al., 2001). Depuis lors, plusieurs études cliniques ont démontré leur efficacité, au point que ces 5 dernières années, plusieurs thérapies basées sur les siARN ont été approuvées par la FDA et sont disponibles sur le marché (Traber et Yu 2023; Ahn et al., 2023). En effet, la thérapie génique utilisant les siRNA présente de nombreux avantages, notamment la capacité à s'attaquer à différentes cibles, ce qui la rend applicable à un large éventail de pathologies. C'est pourquoi plusieurs thérapies de ce genre sont actuellement à l'étude en phase clinique, comme ONPATRO® (patisiran, ALN-TTR02), le premier traitement de ce genre, approuvé en 2018, ainsi que le leqvio de Novartis (Inclisiran), utilisé pour traiter l'hypercholestérolémie, et récemment le vutrisiran d'Alnylam, utilisé pour certains types d'amylose héréditaire (Adams et al., 2022; Soffer et al., 2022).

La Gal-1, qui est au centre de notre étude, n'échappe pas à cette tendance, et plusieurs groupes de recherche travaillent sur le développement d'une thérapie basée sur les siRNA contre la Gal-1 pour différents types de cancer. Le *KnockDown* de Gal-1 diminue un environnement immunosuppresseur à la tumeur

et, de surcroît, sensibilise la tumeur à la chimiothérapie et à la radiothérapie, en particulier dans le cas du gliome (Chen et al., 2019; Van Woensel et al., 2017; 2016; Danhier et al., 2015). Dans le contexte du cancer, certaines thérapies à base de siRNA sont actuellement au stade des études cliniques, comme l'Atu027 pour l'adénocarcinome du pancréas, qui a déjà passé la phase II (Schultheis et al., 2020). Les résultats des recherches précliniques sont tous encourageants et mettent en évidence un effet anti-oncogénique.

5. Nanoparticules

5.1 Définition et présentation des nanoparticules

Selon la définition de l'Organisation Internationale de Normalisation (ISO), une nanoparticule est un objet dont les trois dimensions ne dépassent pas 100 nm (Mansoori et Soelaiman, 2005). Les nanoparticules ont été mentionnées pour la première fois dans la littérature scientifique par Richard Feynman en 1959 lors de son discours "*There's Plenty of Room at the Bottom*" (Feynman, 2002; Bayda et al., 2019; Banerjee et al., 2021). Depuis, les nanoparticules ont fait l'objet d'études de plus en plus nombreuses dans le domaine médical en raison de leurs propriétés uniques qui les rendent attractives pour des applications thérapeutiques. Elles peuvent être utilisées comme agents conservateurs, comme adjuvants ou encore comme transporteurs de médicaments (Kinnear et al., 2017). Les nanoparticules ont révolutionné le domaine biomédical en offrant de nouvelles possibilités thérapeutiques.

Par exemple, dans le cas du gliome, les nanoparticules d'or peuvent être utilisées pour améliorer la détection de la maladie en accentuant le contraste lors de l'imagerie par résonance magnétique (Lin et al., 2014; Cai et al., 2019). De plus, elles pourraient être utilisées pour sensibiliser spécifiquement les cellules tumorales à la radiothérapie (Dong et al. 2021). En raison de leurs propriétés uniques, les nanoparticules d'or pourraient même être utilisées en tant qu'agent thérapeutique à part entière pour prévenir la récurrence du cancer (Wahab et al., 2019). Elles sont également capables de traverser la BHE et peuvent être utilisées

comme transporteurs d'agents thérapeutiques tels que la doxorubicine (Feng et al., 2017) ou du matériel génétique. Par exemple, des nanoparticules d'or sont actuellement étudiées en étude clinique de phase I pour délivrer des siRNA par injection systémique aux tumeurs du gliome (Kumthekar et al., 2021).

Il convient de noter que nous avons pris l'exemple des particules d'or, qui sont des outils très utilisés et bien connus dans le domaine biomédical, pour illustrer la multitude d'applications possibles des nanoparticules. Il faut garder à l'esprit que cela s'applique également à tous les autres types de nanoparticules, et qu'il reste ainsi encore beaucoup à apprendre sur l'utilisation des nanoparticules pour le traitement du cancer. En général, il est important de se rappeler que les nanoparticules sont des outils polyvalents et efficaces dans de nombreuses applications (Ferrari, 2005; Zhang et al., 2019; Cheng et al., 2021).

5.2 Particule lipidique

Une fois assemblés par différents procédés, les lipides peuvent former diverses structures en milieu aqueux. Lorsqu'elles mesurent moins de 100nm, on les appelle des nanoparticules lipidiques. Dans le domaine de la recherche scientifique, on distingue principalement deux catégories : les liposomes et les micelles. La principale différence réside dans la couche lipidique qui délimite la lumière intérieure et le milieu extérieur. Les micelles sont constituées d'une monocouche lipidique qui sépare l'intérieur de l'extérieur tandis que les liposomes sont composés d'une bicouche lipidique. La nature de ces particules lipidiques est déterminée par la structure, la charge des molécules qui les composent, ainsi que le milieu et le processus de formation. Elles peuvent prendre différentes formes et tailles, y compris des structures comportant plusieurs couches lipidiques (**Figure 11**). L'équilibre entre les interactions hydrophobes et hydrophiles ainsi que la géométrie des molécules détermine la conformation des particules formées. En effet, la tête polaire et les deux chaînes carbonées de ces lipides forment un angle. Un angle aigu conduit à la formation d'une micelle, l'absence d'angle a une bicouche lipidique plane, tandis qu'un angle obtus produit des micelles inversées,

où les têtes polaires sont orientées vers l'intérieur et les chaînes carbonées vers l'extérieur (**Figure 11**) (Balazs et Godbey, 2010; Li et al., 2015).

Afin de créer un liposome avec une cavité distincte du milieu aqueux extérieur, il est nécessaire que les molécules constitutives possèdent une architecture spécifique. Ces molécules doivent être dotées d'une tête polaire reliée à deux chaînes lipidiques dont la structure stérique globale s'apparente à un cylindre, à l'image des phospholipides qui constituent les membranes cellulaires biologiques (Balazs et Godbey, 2010; Li et al., 2015).

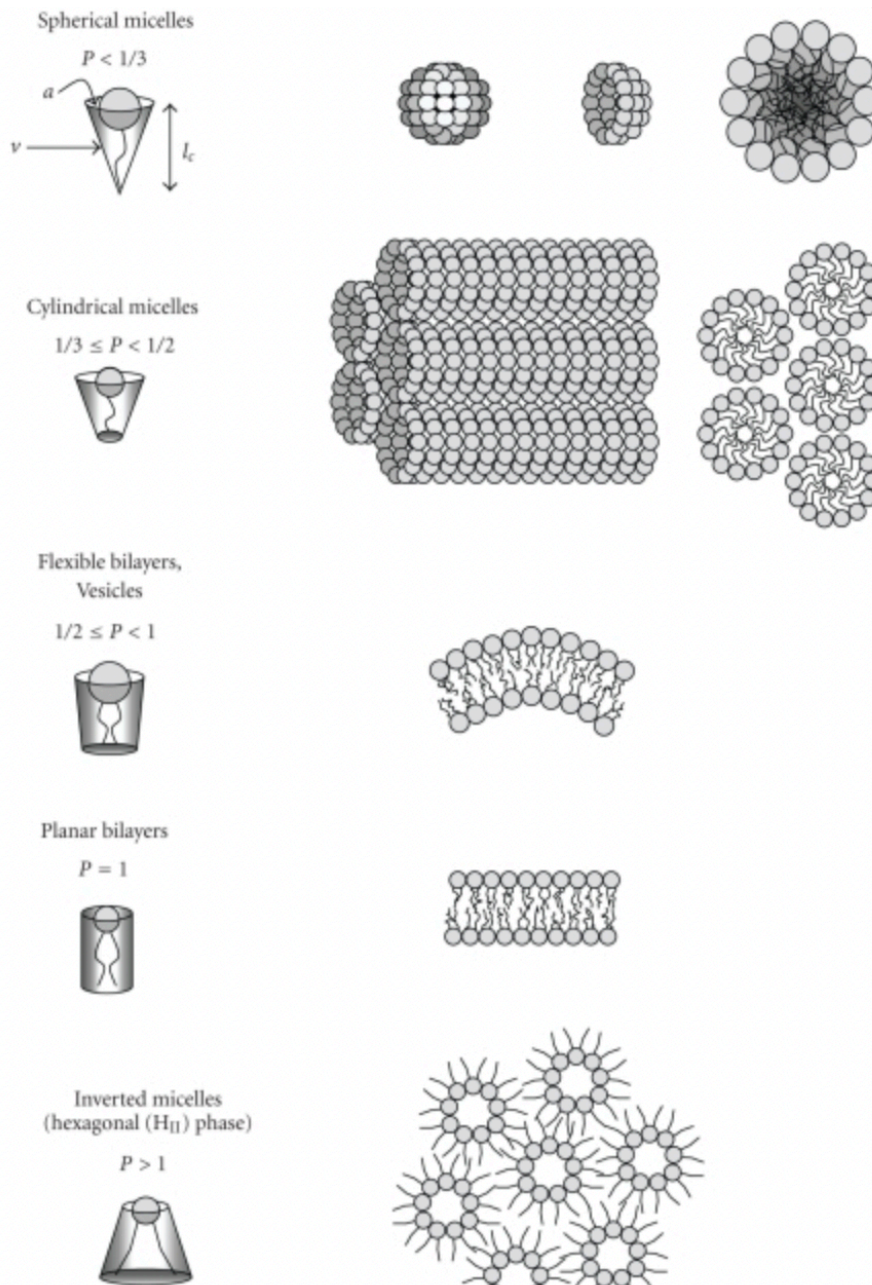


Figure 11 : Les différents types de lipide et les particules qu'ils forment en milieu aqueux. Figure modifiée de (Balazs et Godbey, 2010).

En raison de leur taille et de leur caractère hydrophobe et hydrophile, les liposomes représentent des systèmes prometteurs pour l'administration de médicaments. Les interactions moléculaires au sein du milieu, telles que le pH, la polarité et la présence d'agents réducteurs, influencent les propriétés physiques

des liposomes. Par exemple, l'ajout d'agent oxydant fort comme les ions calcium favorisera une conformation en rouleau plutôt qu'une en liposome, tandis qu'un agent réducteur aura un effet inverse (**Figure 12**) (Li et al., 2015). Ainsi, les propriétés intrinsèques des liposomes varient considérablement en fonction de la composition lipidique, de la charge de surface, de la taille et de la méthode de préparation utilisée (Akbarzadeh et al., 2013; Mkam Tsengam et al., 2022). Il existe une multitude de types de liposome et d'autres particules lipidiques possédant d'autres conformations. Afin de se familiariser un peu plus à ce sujet, nous recommandons la lecture de la revue de Lombardo qui présente les principaux protocoles de formation de transporteurs lipidiques utilisés dans le domaine biomédical (Lombardo et Kiselev 2022).

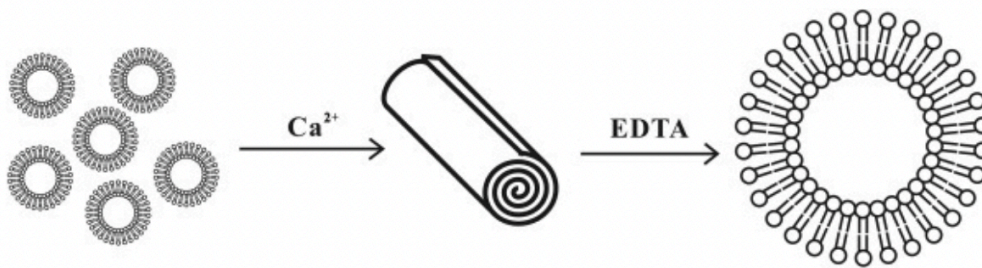


Figure 12 : Influence de la composition du milieu sur les liposomes. Figure modifiée de (Li et al., 2015).

Dans le cadre de la complexation d'un liposome avec un siRNA, il est intéressant d'examiner comment ces deux entités interagissent. Le siRNA peut être encapsulé à l'intérieur de la cavité du liposome ou peut interagir avec sa surface extérieure, ce qu'on appelle un phytosome (**Figure 13**). Cette interaction se produit généralement lorsque l'on travaille avec des particules cationiques. En effet, en raison de l'attraction des charges, le squelette phosphorylé négatif du siRNA tend à interagir avec les têtes polaires cationiques des molécules lipidiques (Li et al., 2015; Blakney et al., 2019).

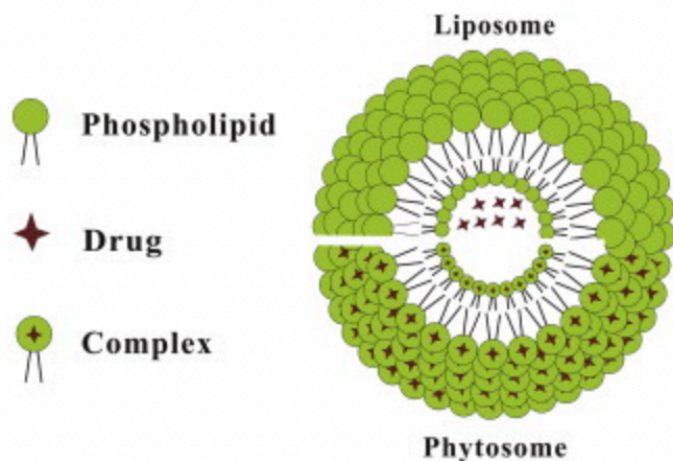


Figure 13 : Schéma présentant la différence entre un liposome et un phytosome.
Figure modifiée de (Li et al., 2015).

Actuellement, il existe une variété de liposomes sur le marché et décrits dans la littérature scientifique. Ces liposomes sont couramment utilisés pour encapsuler et/ou transporter des molécules. Deux caractéristiques principales sont généralement étudiées. La première concerne la capacité d'encapsulation, c'est-à-dire la quantité de médicament que le transporteur peut contenir. La deuxième caractéristique est la capacité de délivrance, qui représente la capacité du liposome à libérer le médicament dans le compartiment cellulaire d'intérêt. L'encapsulation des médicaments dépend à la fois de la composition chimique du transporteur et du médicament lui-même. Des observations ont montré que l'ajout de certaines molécules telles que le cholestérol dans les particules lipidiques peut faciliter l'encapsulation. De plus, les concentrations et les proportions des lipides constitutifs du transporteur peuvent également influencer l'encapsulation. En d'autres termes, il est souvent possible d'optimiser la formulation des particules lipidiques pour les adapter aux besoins spécifiques de l'application. Par exemple, l'encapsulation d'un médicament anionique peut être facilitée par l'utilisation de lipides cationiques (Pattni et al., 2015; Hald Albertsen et al., 2022). Certains groupes de recherche ont ainsi réussi à encapsuler de l'ARN dans des nanoliposomes avec un taux d'encapsulation de plus de 90 %, démontrant ainsi l'efficacité de cette technologie (Raval et al., 2019).

À l'heure actuelle, il n'existe pas de consensus sur la manière dont la substance active transportée par une particule lipidique pénètre dans les cellules. Il semble qu'il existe plusieurs mécanismes différents. Les plus communément décrits seraient ceux de la macropinocytose, soit un passage non spécifique à travers la membrane, et celui de l'endocytose médié par la Clathrine et la Dynamine. Dans ce mécanisme, un motif moléculaire d'un lipopolysaccharide (LPS) est reconnu par une protéine à la surface de la cellule, formant ainsi un complexe qui est ensuite internalisé. (Vranic et al., 2013; Kanasty et al., 2013; Alshehri et al., 2018; Lin et al., 2020).

Une autre voie possible de libération des substances actives par les particules lipidiques est la fusion de ces particules avec les lipides membranaires de la cellule cible. Cette voie d'entrée présente l'avantage d'éviter la dégradation potentielle de la substance active lors de la dégradation de l'endosome dans le cas de macropinocytose. Ainsi, une plus grande quantité de la substance active pourrait potentiellement être distribuée (Yang et al., 2016). Pour approfondir vos connaissances et avoir une idée plus précise du domaine des particules lipidiques, nous vous recommandons la lecture de la revue de littérature de Tenchov et collaborateurs (Tenchov et al., 2021).

5.3 Dernier développement de nanotransporteur

En 1995, la FDA a approuvé la première thérapie à base de liposomes, le Doxil (un liposome chargé de doxorubicine), pour le traitement du cancer (Barenholz, 2012). Depuis lors, de nombreuses avancées ont été réalisées dans le domaine des nanoparticules lipidiques. Elles ont évolué et se sont classées en différentes générations. La première génération est composée de simples liposomes utilisés comme vecteurs pour transporter des médicaments dans les tissus biologiques. Les dernières générations comprennent des nanoparticules lipidiques capables de contourner le système immunitaire, de cibler spécifiquement un organe ou un type cellulaire, et de contrôler la libération du médicament (Barriga et al., 2019; Yingchoncharoen et al., 2016; Mitchell et al., 2021).

L'une des avancées les plus récentes concerne les nanotransporteurs à base de lipides (LNP), qui ont montré des résultats prometteurs en termes de transport, de toxicité et de stabilité. De manière générale, les nanoparticules lipidiques ont un avenir prometteur dans le domaine pharmaceutique, comme en témoigne leur utilisation généralisée dans la formulation des vaccins contre la COVID-19 (Tenchov et al., 2021). Les nanoparticules lipidiques ne font pas exception dans le contexte des gliomes. En effet, en 2015 un groupe de recherche a présenté la particule NP-TMZ-CTX capable de transporter le tébuconazole (TMZ) à traverser la BHE pour augmenter sa biodisponibilité intracrânienne (Fang et al., 2015). De plus, un nanoliposome capable de traverser la BHE et de livrer des radio-isotopes pour le traitement du glioblastome a fait l'objet d'études cliniques (Brenner et al., 2021; Plus Therapeutics, 2022).

5.4 Les Glycolipides de Glycovax Pharma.

Certaines molécules amphiphiles, telles que les sphingolipides présents dans les membranes cellulaires, sont capables de s'auto-assembler en utilisant l'hydrophobicité de leurs chaînes lipidiques et la nature hydrophile de leur tête polaire. Cela conduit à la formation d'émulsions contenant des structures telles que des micelles, ou des liposomes lorsqu'une bicouche lipidique se forme. En s'inspirant de la technologie des liposomes, l'entreprise Glycovax Pharma a développé des glycolipides qui s'auto-assemblent en glycoliposomes (**Figure 14**). Ils possèdent une taille relativement petite, comparable à celle des nanoparticules, et sont communément appelés « nanovaccins ».

A



B

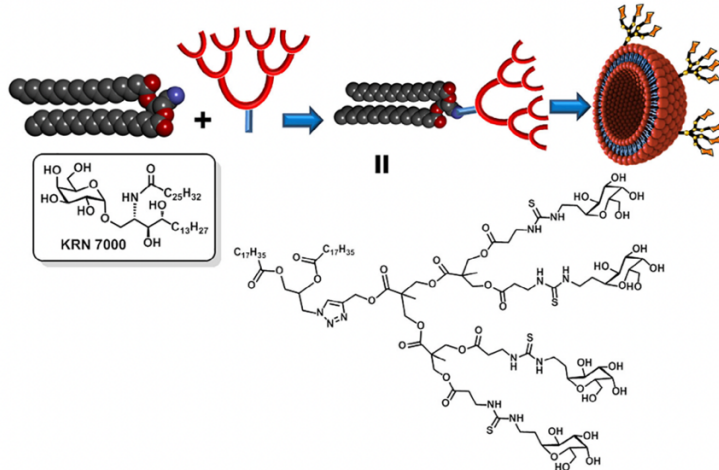


Figure 14 : Structure et autoassemblage des Glycoliposomes de Glycovax.

A. Schéma de la structure moléculaire des nanovaccins **B.** Glycolipides capables de s'autoassembler en liposomes. Le sucre à la tête de ces lipides permet entre autres de lier un dendrimère pour créer un glycodendrosome. Figure modifiée de (Moffett et al., 2021).

La composition chimique unique des nanovaccins leur permettrait de traverser la BHE, un atout considérable pour le traitement du gliome dans le cas où ces liposomes seraient utilisés comme transporteurs (Goyard et al., 2016).

5.5 Les avantages des nanovaccins

Comme mentionné précédemment, la recherche sur les liposomes a été entreprise il y a plusieurs années. En 2016, Van Woensel *et al.* ont étudié l'utilisation de liposomes de chitosan pour délivrer une thérapie à base de siRNA ciblant la GAL-1 à la tumeur. En effet le chitosan est un polymère de sous-unités de D-glucosamine et N-acétyl-D-glucosamine liées via des liaisons glycosidiques, qui ont des charges positives à un pH physiologique ce qui leur permet de se lier aux

siRNA chargés négativement et ainsi de les transporter. Pour contourner l'imperméabilité de la BHE, ils ont proposé d'administrer les liposomes par voie intranasale, ce qui a donné des résultats *in vivo* encourageants pour le développement de cette thérapie. En effet ils ont pu observer la délivrance des siRNA à la tumeur et une diminution significative de la quantité de Gal-1 intra tumorale (Van Woensel et al., 2016). L'année suivante, le même groupe a démontré une diminution marquée de la quantité de Gal-1 accompagnée d'une augmentation de l'espérance de vie des souris traitées avec cette méthode d'injection (Van Woensel et al., 2017).

En comparaison avec les recherches déjà effectuées avec les liposomes dans le gliome, les nanoparticules de Glycovax présentent potentiellement plusieurs avantages majeurs. Elles ont la capacité de délivrer des médicaments à travers la BHE, ce qui n'est normalement pas possible pour plusieurs médicaments (Goyard et al., 2016). Ces glycoliposomes se caractérisent par leur faible toxicité et leur capacité d'autoassemblage, ce qui les rend relativement plus simples à produire à grande échelle. Ils peuvent également s'associer à des dendrimères pour former des dendrimérosomes (**Figure 14**). Les dendrimères sont des macromolécules synthétiques hautement ramifiées et tridimensionnelles, généralement symétriques. Leur architecture en forme d'arbre comprend un noyau central, des branches répétitives appelées générations, et des groupes terminaux à leur périphérie. Cette structure unique leur confère des propriétés physico-chimiques particulières, telles que la solubilité, la réactivité et la capacité à encapsuler des molécules, ce qui les rend utiles dans diverses applications, notamment la livraison de médicaments (Lee et al., 2005). Cette technologie développée par Glycovax actuellement en cours d'étude, pourrait mener à des avancées notables dans le traitement du gliome, et dans de nombreuses autres thérapies (Goyard et al., 2016; Mignani et al., 2019; Lewicky et al., 2020; Moffett et al., 2021; Mignani et al., 2021).

L'un des facteurs intéressants de cette technologie réside principalement dans les sucres présents en surface. Tout d'abord, ces sucres sont capables de mimer les interactions physiologiques cellulaires normales médiées par les sucres. Ainsi, ils

se lie à de nombreuses protéines à la surface des cellules, ce qu'on appelle le « *cluster glycoside effect* » (Lundquist et Toone, 2002). Ces interactions avec les galectines, présentes à la surface des membranes, déclenchent une variété de mécanismes tels que la reconnaissance intercellulaire, l'adhésion cellulaire, l'activation de voies de signalisations, etc. (Kiessling et al., 2000; Bertozzi et Kiessling, 2001; Moffett et al., 2021). Ces nanoparticules « sucrées » sont également capables de moduler la réponse immunitaire en interagissant avec le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (MHC I) (Trant et al., 2016). Toutes ces interactions expliquent en partie leur faible toxicité, mais surtout elles leur confèrent un avantage en termes de délivrance de la charge thérapeutique à travers la BHE.

Il a été montré que la livraison de siRNA à travers de la BHE est possible avec des nanoparticules (NPs) glycosylées. Le mécanisme responsable semble être le suivant: les sucres sur les LPS se lient au récepteur GLUT1 et suivent l'internalisation du récepteur lors de son recyclage, déclenchant ainsi la transcytose soit l'internalisation des NPs et leur passage à travers la BHE. (Baenziger et Fiete, 1980; Kanasty et al., 2013; Min et al., 2020; Zhou et al., 2020). Il a notamment été observé que lorsque l'expression de GLUT1 est augmentée, la livraison de siRNA aux tumeurs via les liposomes est également augmentée (Anraku et al., 2017). Au niveau des cellules endothéliales, après la macropinocytose induite par la liaison avec GLUT1, il y a une externalisation de l'endosome formé, et ainsi on observe une transcytose et la traversée de la BHE. Cependant, ce mécanisme reste peu élucidé pour le moment (Preston et al., 2014; Lin et al., 2020; Jones et Minshall, 2022). Ainsi, si l'on applique ce principe à nos nanovaccins, les motifs sucrés pourraient suivre le même mécanisme, d'autant plus que les récepteurs du glucose et du mannose sont abondants au niveau de la BHE (Régner-Vigouroux, 2003; Mousavifar et al., 2022).

CHAPITRE 2

Hypothèses et objectifs

2.1 But de l'étude

Procéder à une étude comparative visant à caractériser une série de nanovaccins développés par la compagnie Glycovax afin d'évaluer leur potentiel comme transporteur dans le contexte du gliome pour le transport de siRNA ciblant la Gal-1.

2.2 Hypothèses et Objectifs

La recherche actuelle a permis de mettre en évidence l'importance du développement de thérapies basées sur des nanotransporteurs pour le traitement du gliome. Les thérapies ciblées, particulièrement contre la Gal-1 dans les tumeurs gliales, émergent comme une perspective prometteuse. Les nanovaccins développés par Glycovax, bien qu'en phase de développement, présente un potentiel significatif pour une thérapie ciblée contre la Gal-1. La proposition de recherche s'articule autour de trois objectifs spécifiques. Le premier objectif vise à caractériser les nanovaccins en étudiant notamment leur autoassemblage à l'aide de diverses méthodes telles que la microscopie électronique, l'analyse par diffusion dynamique de la lumière (DLS, *dynamic light scattering*). Nous avons également comparé leur cytotoxicité par les méthodes standards de cytométrie en flux. Notre deuxième objectif a consisté à établir un modèle cellulaire de gliome humain exprimant la Gal-1 au niveau de l'ARNm et de la protéine. Un *knockdown* en ensuite été effectué à partir de ce modèle en utilisant un siRNA spécifique à Gal-1. Finalement, nous avons étudié la capacité des nanovaccins à encapsuler les siARN, point central de l'étude sur l'instauration d'une thérapie basée sur ces nanotransporteurs dans le gliome. Pour ce faire, nous avons utilisé diverses méthodes basées sur électrophorèse sur gel d'agarose et un test de protection contre la Ribonuclease (RNase) pour évaluer la rétention des siARN par les nanovaccins. Nous avons également examiné la complexation des siRNA aux nanovaccins par microscopie électronique couplée à un marquage *immunogold*.

CHAPITRE 3

Matériel et méthodes

Assemblage des nanovaccins :

À partir des molécules de nanovaccins lyophilisés fournies par Glycovax (**Tableau 1**, page 71), nous avons préparé des solutions mères à une concentration de 100 mM pour chaque nanovaccin dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) (Sigma Aldrich, USA). Ces solutions ont été ensuite stockées à -20°C. Par la suite, ces solutions ont été diluées pour préparer des solutions filles dans le DMSO à des concentrations spécifiques pour chaque étude. Les nanovaccins ont été assemblés en diluant une solution fille dans l'eau milliQ stérile, de manière à obtenir une solution finale contenant 1% de DMSO (v/v). La solution finale a été vortexée trois fois pendant trois secondes, puis laissée à reposer pendant 15 min à température ambiante.

Culture cellulaire :

Les cellules U-87 MG ont été obtenues de l'American Type Culture Collection (ATCC, Burlington, ON, Canada) et ont été cultivées dans du milieu complet EMEM (Wisent, St-Bruno, Qc, Canada) contenant 10% (v/v) de sérum foetal bovin (FBS, Gibco) à une température de 37°C avec 5 % CO₂.

Analyse par cytométrie de la cytotoxicité :

Un total de 5×10^5 cellules ont été incubées avec différentes concentrations de nanoparticules ou de véhicules comme témoins (DMSO ou EtOH) pendant 16 heures à 37°C, sans sérum. Les cellules ont ensuite été récoltées en utilisant un traitement à la trypsine et diluées dans le PBS. Pour évaluer la mort cellulaire, le pourcentage de cellules mortes a été mesuré par cytométrie en flux en utilisant l'iodure de propidium (IP) (Invitrogen™ P1304MP, Thermo Fisher Scientific). Chaque échantillon a été analysé par cytométrie en flux à l'aide d'un FacsCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA).

Assemblage du complexe nanovaccins/siRNA :

Pour complexer les nanovaccins avec les brins de siRNA, nous avons préparé une solution des stocks de siRNA souhaitée à une concentration de 100 nM dans de l'eau MilliQ stérile, puis nous y avons ajouté une dilution de nanovaccin pour permettre leur assemblage dans la solution de siRNA, selon la méthode décrite précédemment, de sorte que la concentration finale de nanovaccin soit de 10 μ M et celle de DMSO soit de 1% (v/v).

Mesure par *Nanoparticle tracking analysis* (NTA):

La NTA a été réalisée à l'aide du système NanoSight NS300 (Malvern Panalytical). La collecte de donnée et l'analyse ont été effectuées à l'aide du logiciel intégré NanoSight NTA3.3.301. Le niveau de la caméra a été réglé à 16 et le seuil de détection sur 5, afin d'avoir une vue d'ensemble des particules tout en excluant celles qui sont indistinctes. Les échantillons ont été dilués dans de l'eau milliQ jusqu'à obtention d'un volume final de 1 ml, et leur concentration a été ajustée en observant un taux compris entre 30 et 100 particules/image. Pour chaque mesure, trois vidéos consécutives de 60 secondes ont été enregistrées dans les conditions suivantes : température de la cellule 20°C et une vitesse d'injection à - 22 μ L/s. Les particules (EV) ont été détectées à l'aide d'un laser à 488 nm et d'une caméra CMOS («*complementary metal-oxide-semiconductor*»). Parmi les informations fournies par le logiciel, la taille moyenne des particules et l'homogénéité de l'échantillon ont été étudiées.

Mesure par diffusion dynamique de la lumière (DLS) :

Les mesures ont été effectuées à l'aide d'un appareil Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments, Royaume-Uni), équipé d'un laser hélium-néon (HeNe) de 4 mW émettant une longueur d'onde de 633 nm, et d'une photodiode à avalanche positionnée à 175° par rapport au faisceau et au porte-cuvette à température contrôlée. Pour l'étude de la taille, chaque échantillon a été analysé en triplicata à l'aide d'un programme d'analyse de la taille intégré dans le logiciel de l'appareil, en utilisant des cuvettes adaptées (Cuvette Semi-micro 1,5 mL, Thermo

Fischer Scientific, USA). Les paramètres de l'instrument ont été automatiquement déterminés, y compris les temps de mesure, conformément aux recommandations du guide d'utilisation fourni par le fabricant (Malvern Panalytical Ltd., Malvern, Royaume-Uni). Les résultats ont été présentés sous la forme de la taille moyenne des particules avec l'indice de polydispersité respectif (PDI) \pm SD de trois expériences distinctes. Pour l'analyse de la charge, chaque échantillon a été analysé en triplicata à l'aide du programme d'analyse de la taille intégré dans le logiciel de l'appareil et de cuvettes adaptées (Folded Capillary Zeta Cell, DTS1070, Malvern Panalytical, USA) avec les réglages de lecture automatiques.

Microscopie électronique :

Afin de visualiser les nanovaccins, nous avons utilisé la microscopie électronique à l'état frais (échantillon non fixé et en suspension) avec une coloration négative. Une goutte de la préparation des nanovaccins assemblés (10 μ M) a été absorbée pendant 1 minute sur une grille de cuivre recouverte d'un film de résine formvar (Formvar films-Copper, AGS138, Agar Scientific) préalablement stabilisée par évaporation de carbone. Ensuite, l'excès de liquide a été retiré à l'aide de papier filtre, et la grille a été placée pendant 10 secondes sur une goutte d'acétate d'uranyle (UA) à 2% v/v (pH 7,0) ou d'acide phosphotungstique (PTA) à 3% v/v (pH 7,0).

L'observation de complexes formés par l'association des nanovaccin et des siRNA contre Gal-1 en utilisant un marquage à la biotine à l'extrémité 3' du siRNA (5'-UUG CUG UUG CAC ACG AUG GUG UUG G-3'-Biotine) obtenu commercialement (Integrated DNA Technologies, Coralvill, IA, USA) par une coloration *immunogold* en microscopie électronique à transmission (TEM). Pour ce faire, nous avons utilisé des anticorps monoclonaux de souris anti-biotine (4C7.D5, 200-301-098, Thermo Fisher Scientific), et des anticorps secondaires couplés à des nanoparticules d'or de 6 nm (Goat anti-mouse IgG, ab105285, Abcam). Après que les liposomes se soient fixés à la grille, nous avons effectué trois étapes de lavage de 5 min avec du PBS, suivies d'un blocage avec du tampon PBS+ (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, 5 % w/v

BSA, 1,5 % (v/v) glycine ; pH 7,4) pendant 10 minutes. Le lendemain, les grilles ont été placées sur des gouttes contenant les solutions d'anticorps primaires diluées 1/500 dans du tampon PBS+, et incubées pendant toute la nuit à 4°C. Le lendemain, les grilles ont été lavées trois fois pendant 5 minutes dans du PBS+, puis incubées avec les anticorps secondaires dilués 1/50. Une coloration négative, comme décrite précédemment, a été réalisée à la suite.

RT-PCR :

L'expression du gène *LGALS1* dans la lignée cellulaire U-87 MG a été effectuée par une approche standard de RT-PCR. L'ARN cellulaire total a été isolé en utilisant le réactif TRIzol (Life Technologies) conformément aux instructions du fabricant. L'ADN complémentaire (ADNc) du premier brin a été préparé à partir de 2 µg d'ARN cellulaire dans un volume réactionnel total de 20 µL en utilisant la transcriptase inverse Omniscript (QIAGEN, Mississauga, ON, Canada). Après la transcription inverse, l'ADNc a été amplifié avec l'aide des amorces suivantes : (gène ID 3956, amorce de sens : 5'- TCA AAC CTG GGG AAT GTC TC -3' et amorce antisens : 5'- AGG CCA CGC ACT TAA TCT TG -3') (Pfeffer et al. 2013), générant un amplicon de 366 paires de bases. Comme témoin, nous avons utilisé le gène de ménage codant pour la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (*GAPDH*; gène ID 2597, amorce de sens : 5'- CGA GAT CCC TCC AAA ATC AA -3' et amorce antisens : 5'- TTC TAG ACG GCA GGT CAG GT -3') (H.-J. Lee et al. 2021) générant un amplicon de 513 paires de bases. Les ADNc ont été amplifiés selon les conditions suivantes : 94°C pendant 3 minutes, suivie de 25 à 35 des cycles comprenant une dénaturation à 94°C pendant 40 secondes, une hybridation à 60°C pendant 40 secondes et une extension à 72°C pendant 40 secondes, suivis d'une étape finale d'extension à 72°C pendant 10 min. La réaction de PCR a été réalisée dans un thermocycleur (Eppendorf, Mississauga, ON, Canada). Les produits amplifiés ont été analysés par électrophorèse sur gels d'agarose à 1,5 % en utilisation colorés au SYBR Safe (Invitrogen™ S33102, Thermo Fischer Scientific) et visualisés sous une illumination UV (ChemiDoc XRS+, Bio-Rad).

Immunobuvardage de type Western:

L'extraction des protéines totales a été effectuée à partir d'un million de cellules en utilisant 200 uL de tampon RIPA (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), contenant un cocktail commercial d'inhibiteurs de protéases (Roche, Laval, Canada). Les échantillons ont ensuite été placés dans un bain de glace durant 30 minutes, avec vortexage à toutes les 10 minutes. La période d'incubation s'est terminée par une centrifugation de 15 min à 15 000 x *g*. Le surnageant contenant les protéines extraites a été ensuite récolté. Après l'extraction, 40 ug de protéines totales ont été séparées par SDS-PAGE (« *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* ») et transférées sur une membrane de nitrocellulose. Les membranes ont été incubées avec une solution de lait 5% (v/v) dans du PBS/0.05% (v/v) Tween 20 % (v/v) (Sigma Aldrich) pendant 1 heure, puis incubées 16 heures à 4°C avec les anticorps primaires de souris spécifiques à la Gal-1 (ProteinTech, IL, USA) ou un anticorps monoclonal de lapin contre la GAPDH (ProteinTech). Les anticorps ont été dilués dans la même solution que celle utilisée pour le blocage. Après lavages (4 x 5 minutes) une solution de PBS/0.05% (v/v) Tween 20 (Sigma Aldrich), les membranes ont été incubées avec des anticorps secondaires anti-souris (GE Health care Life Sciences, Mississauga, ON, Canada) ou anti-lapin (1:10000, GE Health care Life Sciences). Après une autre série de lavages, les membranes ont finalement été incubées pendant 1 minute à température ambiante avec un réactif de détection utilisant la chimioluminescence améliorée (GE Healthcare Life Science) pour la détection avec un détecteur de luminescence (Invitrogen™ iBright™ FL1500 Imaging System).

Inhibition de la traduction de Gal-1 par *KnockDown* :

Afin d'inhiber l'expression de la Gal-1, les cellules U-87 MG ont étéensemencées dans des plaques à 6 puits à une densité de 1 million de cellules par puits et incubées à 37°C, 5 % de CO₂ pendant une nuit. Lorsque les cellules ont atteint 80 % de confluence, elles ont été incubées avec un siRNA spécifique à *LGALS1* avec les séquences sens 5'- UUG CUG UUG CAC ACG AUG GUG UUG G -3' et

antisens 5'- CCA ACA CCA UCG UGU GCA ACA GCA A -3' (Zhang et al. 2014), ainsi qu'un siRNA témoin (« scrambles ») en utilisant la Lipofectamine 2000 (Invitrogen) comme réactif de transfection lipidique, conformément aux instructions du fabricant, à raison de 80 pg de siRNA par puits. Après 48 heures, les cellules ont été lavées avec du PBS (MultiCell, Wisent) et récupérées à l'aide d'une solution enzymatique de trypsine et d'EDTA (acide éthylènediaminetétraacétique) (MultiCell, Wisent).

Densitométrie :

Les images des membranes de cellulose après le Western Blot et les gels d'agarose provenant des tests de retardement et d'encapsulation ont été analysées par densitométrie avec le logiciel Image J.

Test de protection :

Afin de mesurer la protection des siRNA complexés avec les nanovaccins, nous avons réalisé un test de protection contre RNase, une méthode couramment employée pour évaluer l'encapsulation d'acides nucléiques par des nanoparticules (de la Torre et al. 2022). Des complexes de nanovaccins ont été assemblés dans une solution de siRNA avec un ratio de nanovaccin/siRNA de 1 μ M/100nM. Le mélange a ensuite été incubé avec et sans ajout de solutions de RNase (Invitrogen, AM2286) diluées 1/1000 dans de l'eau stérile pendant 15 minutes à 37°C. Une quantité équivalente de siRNA sans nanoparticules a été utilisée comme témoin pour vérifier l'activité RNase. La réaction a ensuite été arrêtée en ajoutant une solution d'héparine de façon à obtenir une concentration finale de 1,5 unité/ml, puis les tubes ont été déposés sur un bain de glace pendant 30 minutes. Les résultats ont été visualisés sur gel d'agarose 2% tel que décrit précédemment.

Test de retardation.

Les solutions de nanovaccins complexés avec des siRNA (100nM) ont été préparées à différentes concentrations (de 1 μ M à 10 μ M) dans de l'eau MilliQ stérile, permettant ainsi d'obtenir différents ratios R (Nano particules/siRNA), à

savoir R = 10, 20, 50 et 100. Les différentes solutions ont été incubées pendant 30 minutes à température ambiante. Dans des tubes PCR (0.2 mL en polypropylène), des aliquots de 36 uL de solution ont été mélangés avec 6 uL de tampon de chargement (Biorad 6X) pour une analyse sur un gel d'agarose 2% dans un tampon TBE (0.13 M Tris, 45 mM acide borique, 2.5 mM EDTA, pH 7.6). La visualisation des bandes a été effectuée avec l'aide du SYBR Safe (Invitrogen™ S33102, Thermo Fischer Scientific) sous une illumination UV. Dans ce type d'essais semi-quantitatif, les siRNA libres migrent dans le gel tandis que les siRNA encapsulés ne migrent pas. L'intensité de la bande observée par la suite reflète ainsi la quantité de siRNA libre (de la Torre et al. 2022).

Statistiques :

Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le test t de Student pour évaluer la significativité des résultats. Les différences ont été considérées comme statistiquement significatives lorsque la valeur de p était inférieure à 0,05.

CHAPITRE 4

Résultats

1. Étapes préliminaires pour l'étude des nanovaccins.

Les huit nanovaccins faisant l'objet de cette étude ont été fournis par l'entreprise Glycovax sous forme de poudre lyophilisée (**Tableau 1**). Ces nanovaccins diffèrent au niveau des sucres composant leur tête polaire. Nous avons dissous ces échantillons de nanovaccins pour obtenir des solutions stocks mères de 100 mM. Étant donné que les nanovaccins sont des particules lipidiques susceptibles de réagir aux changements de composition et de polarité de leur environnement et de leur solvant, nous avons choisi de les dissoudre dans le DMSO et dans l'éthanol dans le but de les comparer ultérieurement au cours de notre étude. En tout, nous avons préparé 16 solutions mères.

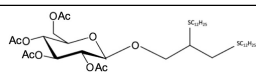
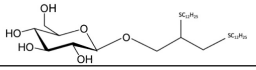
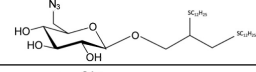
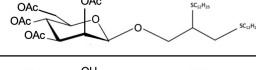
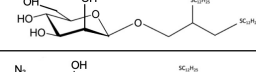
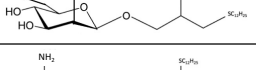
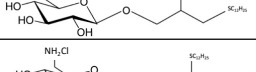
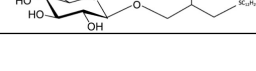
NUMBER	NAME	STRUCTURE
1	GVX-Nano-001	
2	GVX-Nano-002	
3	GVX-Nano-003	
4	GVX-Nano-011	
5	GVX-Nano-012	
6	GVX-Nano-013	
7	GVX-Nano-004	
8	GVX-Nano-005	

Tableau 1 : Nanovaccins de Glycovax avec leurs structures chimiques

La liste des nanovaccins ainsi que la représentation de leur structure chimique nous ont été fournies par l'entreprise Glycovax.

Une fois cette étape accomplie, dans le but d'étudier les nanovaccins tout au long de notre recherche, nous avons d'abord évalué la toxicité cellulaire des deux solvants des solutions stocks dans notre modèle cellulaire U-87 MG, une lignée cellulaire dérivée d'un glioblastome humain couramment employée comme modèle *in vitro* pour le développement de nouveaux traitements contre le gliome

(Allen et al. 2016). Nous avons incubé nos cellules pendant 16 heures avec des concentrations croissantes (0 - 12%, v/v) de DMSO et d'éthanol dilués dans un milieu de culture cellulaire sans sérum. Les résultats obtenus ont démontré qu'il n'y pas d'augmentation de la mort cellulaire comparativement au témoin jusqu'à une concentration de 3% de DMSO et 4% d'éthanol (**figures 15 et 16**). Suite à ces analyses, dans le but de minimiser les effets non-spécifiques des solvants, nous avons adopté comme seuil une concentration finale de 1% de solvant.

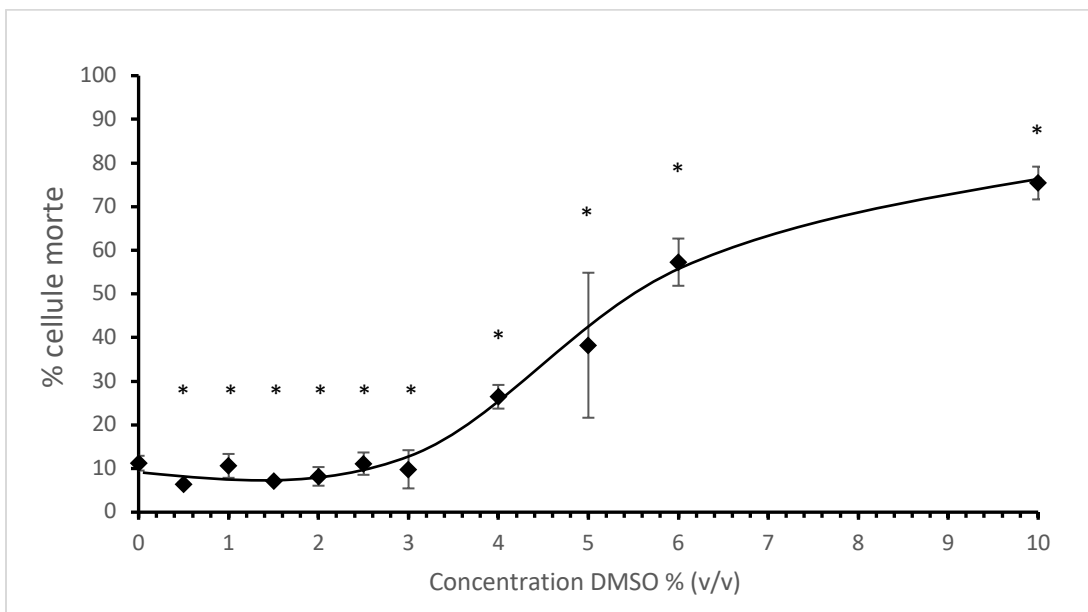


Figure 15 : Cytotoxicité du DMSO pour la lignée cellulaire U-87 MG.

La cytotoxicité a été mesurée par cytométrie en flux en utilisant une coloration à l'IP. Les mesures représentent les valeurs de triplicata. Les barres d'erreurs représentent la déviation standard. * $p < 0,05$ selon un test de Student comparant la moyenne des valeurs obtenues et celles observées dans le témoin à 0% de DMSO.

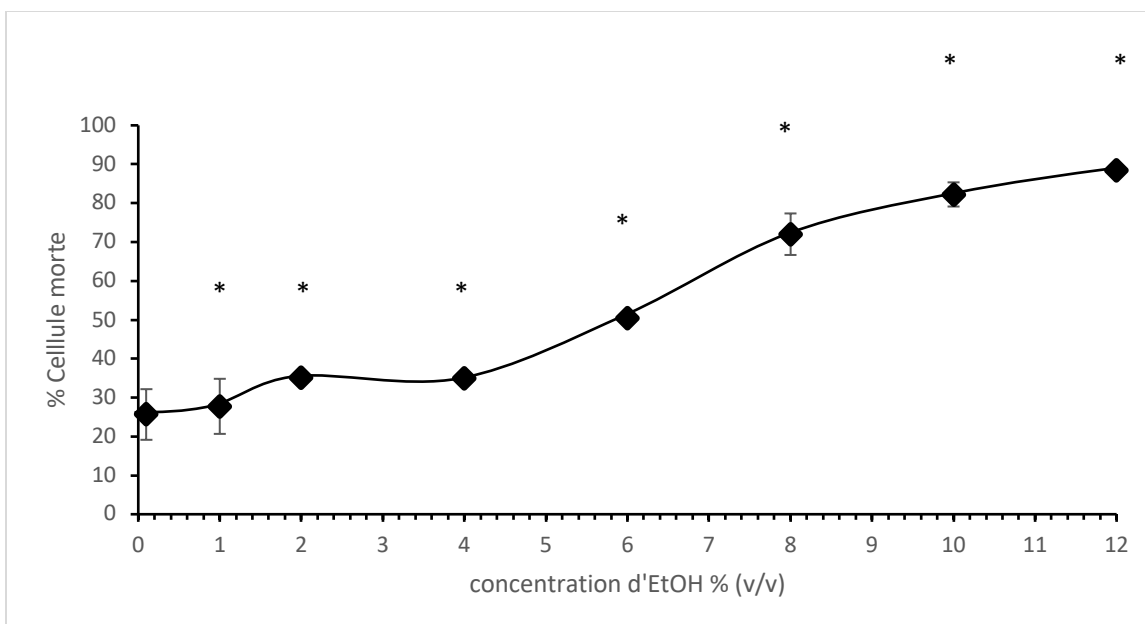


Figure 16 : Cytotoxicité de l'éthanol pour la lignée cellulaire U-87 MG

La cytotoxicité a été mesurée par cytométrie en flux en utilisant une coloration à l'IP. Les mesures représentent les valeurs de triplicata. Les barres d'erreurs représentent la déviation standard. * $p < 0,05$ selon un test de Student comparant les valeurs obtenues et celles observées dans le témoin à 0% d'EtOH.

Après cette étape, nous avons examiné la solubilité des nanovaccins en phase aqueuse et dans le milieu cellulaire, car ce sont les milieux que nous utiliserons tout au long de notre étude. Nous avons préparé des solutions avec une concentration croissante de chaque nanovaccin dans l'eau ainsi que dans le milieu EMEM, en utilisant les solutions stock d'éthanol et de DMSO, de manière à obtenir une concentration totale de solvant soit de 1% (v/v). Nos résultats ont démontré que le Nano 1 n'est pas soluble et précipite dans l'eau, quelle que soit sa concentration. Pour les Nano 2 et 4, la concentration maximale de solubilisation est de 50 μM en milieu aqueux. Enfin, pour les Nano 3, 5, 6, 7 et 8, la concentration maximale est de 200 μM (**Tableau 2**). Les résultats étaient identiques que ce soit dans l'eau ou dans le milieu EMEM, et indépendamment de l'utilisation des solutions stock d'éthanol ou de DMSO. En résumé, tous les nanovaccins, à l'exception du Nano 1, étaient solubles en milieux aqueux. Sur la base de ces résultats, le Nano 1 n'a pas été étudié dans la suite du projet.

Nano	C max (μM)
1	0
2	50
3	200
4	50
5	200
6	200
7	200
8	200

Tableau 2 : Résumé des résultats sur la solubilité des nanovaccins en milieu aqueux.

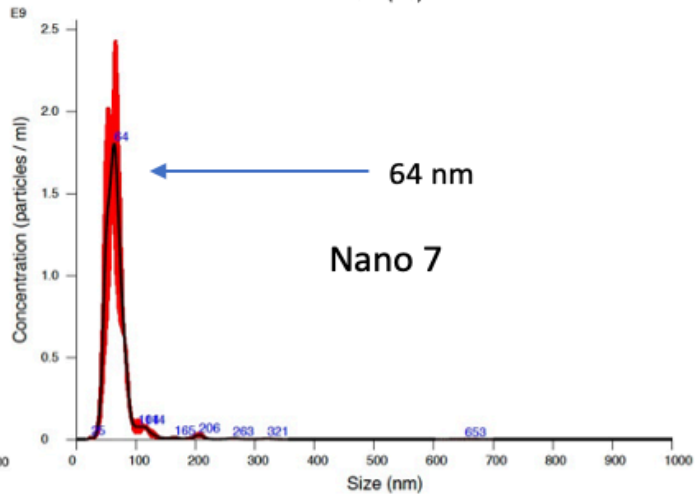
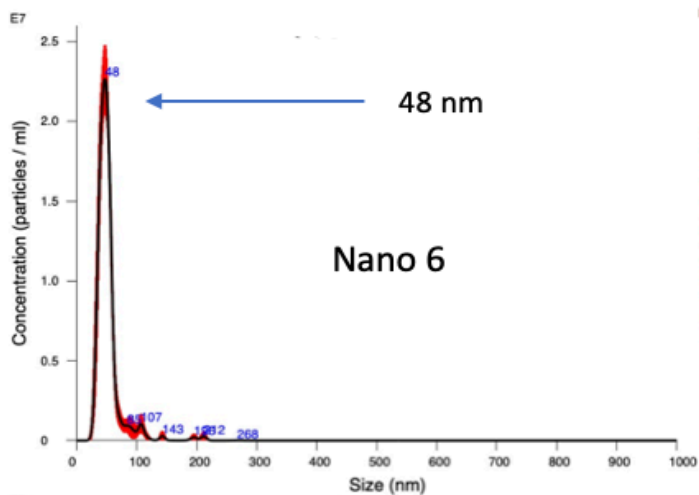
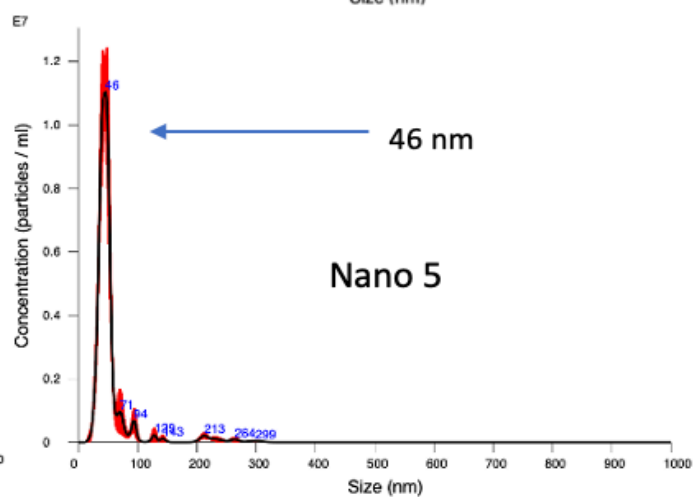
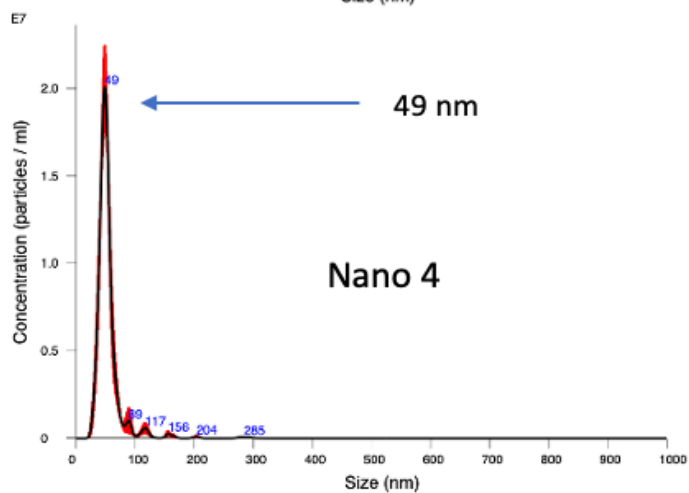
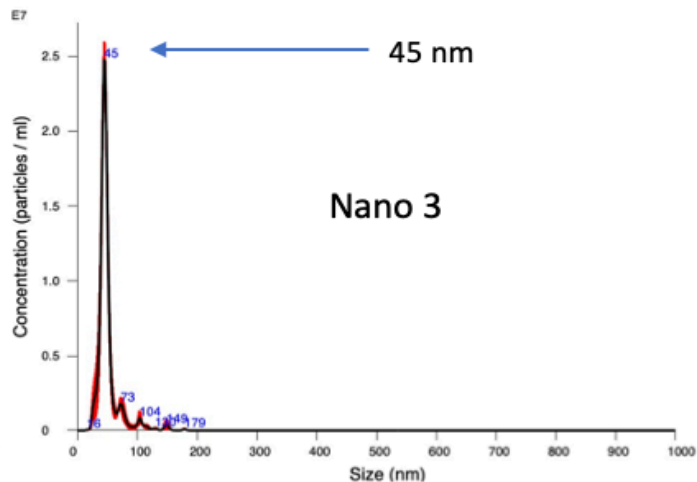
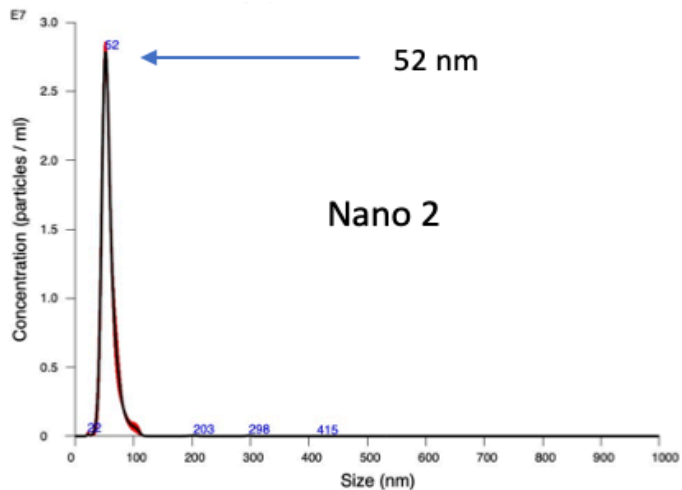
2. Caractérisation et assemblage des nanovaccins

Pour évaluer l'autoassemblage des nanovaccins dans un milieu aqueux, nous avons entrepris une caractérisation en examinant leur homogénéité en solution, leur taille, et leur conformation. Nous nous sommes particulièrement intéressés à leur stabilité, c'est-à-dire leur capacité à maintenir une taille et une conformation constantes, ainsi qu'à éviter l'agrégation entre eux.

Dans un premier temps, nous avons étudié la taille et l'homogénéité des nanovaccins formés en solution aqueuse à partir des solutions stock de DMSO. Nous avons utilisé une analyse par *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA) pour cette étape. Les Nano 2 à 8 ont été évalués à une concentration de 1 μM à l'aide du Nanosight 300. Cette concentration de 1 μM a été déterminée suite à des tests préliminaires et correspond à la concentration optimale permettant à l'appareil d'effectuer une analyse précise et de fournir des résultats qualitativement acceptables, selon l'évaluation du logiciel intégré.

Les résultats obtenus ont révélé que l'ensemble des nanovaccins observés montraient un pic principal bien défini correspondant à une population de nanoparticules homogènes. Pour chaque nanovaccin, le pic correspondait à une taille entre 48 et 64 nm (**Figure 17**).

Ces résultats confirment que les nanovaccins ont été capables de s'auto-assembler de manière homogène en solution aqueuse.



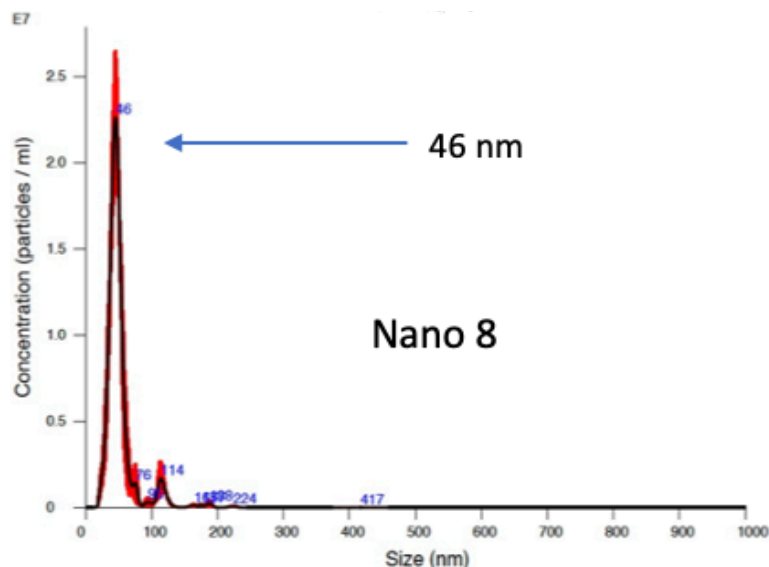


Figure 17 : Analyse NTA des nanovaccins 2 à 8 à partir des solutions stocks de DMSO.

L'évaluation de la répartition en taille des nanovaccins a été réalisée à l'aide du Nanosight300. Les nanovaccins ont été assemblés à une concentration de 1 μM dans l'eau Milli-Q à partir des solutions stocks de DMSO, puis analysés au Nanosight300 avec le réglage automatique des paramètres d'exposition. Trois lectures ont été effectuées pour chaque échantillon (N=3).

Dans le but d'étudier l'impact potentiel du solvant utilisé pour préparer les solutions stock de nanovaccin sur leur auto-assemblage en milieu aqueux, nous avons reproduit l'expérience précédente en utilisant les Nano 2, 4, 5 et 6 à partir des solutions stock d'éthanol. Les mêmes conditions ont été appliquées, avec une concentration de 1 μM de nanovaccin dans de l'eau Milli-Q. Afin de simplifier la comparaison, ces nanovaccins ont été choisis de manière aléatoire en raison de contraintes de temps et de quantité limitée de nanovaccins disponibles.

Les résultats de l'étude par NTA ont révélé que pour les quatre nanovaccins étudiés, nous avons observé un pic bien défini, indiquant une population homogène de nanoparticules dont la taille variait entre 55 et 60 nm, très semblables aux tailles obtenues précédemment avec les stocks de DMSO. Ces résultats suggèrent l'auto-assemblage des nanovaccins conduit à des populations

homogènes et de taille similaire en milieu aqueux, quel que soit le solvant de la solution mère utilisé.

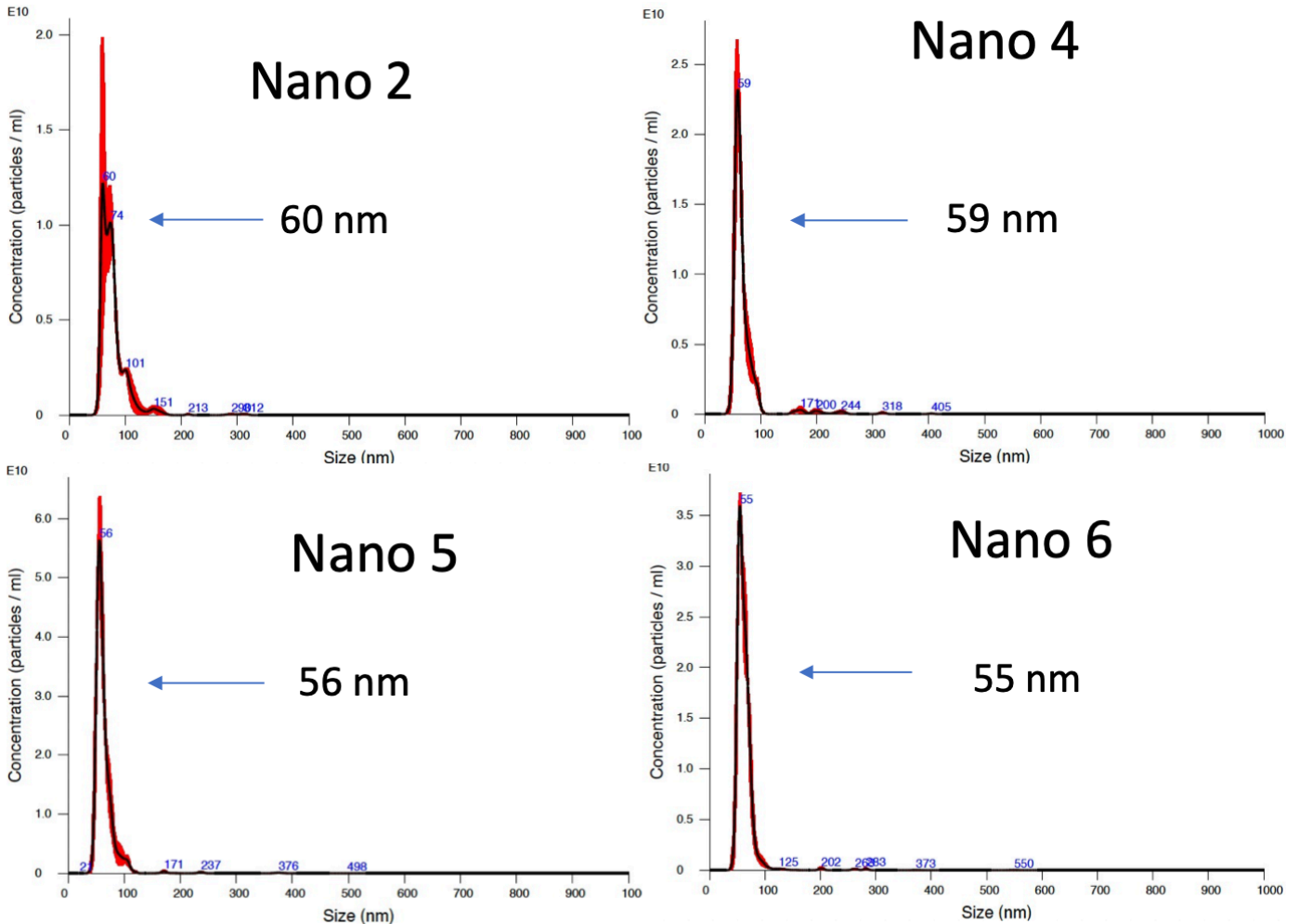


Figure 18: Analyse NTA des nanovaccins 2, 4, 5 et 6 à partir des solutions stocks d'éthanol.

L'évaluation de la répartition en taille des nanovaccins a été réalisée à l'aide du Nanosight300. Les nanovaccins ont été assemblés à une concentration de 1 μ M dans l'eau Milli-Q à partir des solutions stocks de DMSO, puis analysés au Nanosight300 avec le réglage automatique des paramètres d'exposition. Trois lectures ont été effectuées pour chaque échantillon (N=3).

Dans un souci de précision, nous avons cherché à confirmer les résultats obtenus avec le NTA concernant la taille et l'homogénéité de chaque échantillon de nanovaccin avec une analyse de diffusion dynamique de la lumière (DLS). Cette technique présente des avantages par rapport au NTA, notamment la possibilité

d'utiliser des concentrations plus élevées de nanovaccin et de fournir des informations à la fois sur leur homogénéité et leur stabilité grâce à l'indice de polydispersité (PDI). Un PDI élevé indique une hétérogénéité et une instabilité de l'échantillon, tandis que PDI bas indique une stabilité et homogénéité accrue. De manière générale, un PDI supérieur à 0.7 est considéré comme indiquant un échantillon instable et hétérogène, rendant la valeur obtenue, qui correspond à la taille moyenne des nanoparticules de l'échantillon, non significative (Bhattacharjee 2016; Stetefeld, McKenna, et Patel 2016; Danaei et al. 2018).

Dans une première analyse DLS, nous avons étudié les échantillons de nanovaccins 2 à 8 à une concentration de 1 μM dans l'eau Milli-Q. Les échantillons ont été analysés à deux moments, à T0 et 24 heures plus tard, afin d'étudier leur stabilité au fil du temps.

Les résultats obtenus indiquent que la taille moyenne des nanovaccins à T0, exprimée par le zeta moyen, était comprise entre environ 50 et 130 nm, avec un PDI compris entre 0,18 et 0,32. 24 heures plus tard, la taille moyenne des nanovaccins était toujours comprise entre 50 et 200 nm, avec un PDI variant entre 0,22 à 0,30 (**Tableau 3**). Nous avons également observé une variabilité des données entre T0 et T24 moins importante pour les nanovaccins 6, 7 et 8, ce qui indique une meilleure stabilité dans le temps pour ces nanovaccins, selon la diffusion dynamique de la lumière.

Ainsi, à partir de cette première analyse DLS, nous pouvons conclure que les nanovaccins en solution aqueuse se présentent sous forme de nanoparticules en population homogène, ce qui concorde avec les résultats obtenus par l'analyse NTA. En effet, même si les résultats semblent différer entre les deux techniques, il faut noter que nous sommes dans le même ordre de grandeur, et que nous nous trouvons proche des limites de détections de ces appareils. De plus, dans le DLS les échantillons sont dans une eau stagnante ce qui pourrait donc favoriser une certaine agrégation ou fusion des particules en suspension et ainsi expliquer qu'ils apparaissent plus grand. Dans le cas de l'analyse NTA, les particules sont analysées dans un flux continu, et ce mouvement pourrait limiter cette tendance à

fusionner. Enfin, nous pouvons également affirmer que les nanovaccins semblent être stables dans l'eau, au moins pendant une période de 24 heures.

	T0h		T24h	
	Z-Average (d.nm)	Pdi	Z-Average (d.nm)	Pdi
Nano 2	71.36 ± 2.23	0.32 ± 0.01	122.47 ± 85.01	0.23 ± 0.10
Nano 3	76.25 ± 18.44	0.21 ± 0.09	71.91 ± 25.87	0.22 ± 0.10
Nano 4	70.27 ± 20.84	0.21 ± 0.09	80.67 ± 41.08	0.27 ± 0.06
Nano 5	126.67 ± 75.17	0.19 ± 0.12	87.39 ± 68.00	0.23 ± 0.10
Nano 6	74.23 ± 4.29	0.18 ± 0.05	74.92 ± 5.79	0.22 ± 0.03
Nano 7	53.18 ± 2.89	0.19 ± 0.02	54.13 ± 3.28	0.23 ± 0.06
Nano 8	97.04 ± 21.88	0.18 ± 0.03	95.63 ± 27.83	0.30 ± 0.02

Tableau 3 : Diamètre et indice de polydispersité (PDI) des nanovaccins à T0 et T24.

Les nanovaccins 2 à 8 ont été préparés à une concentration de 1 µM dans de l'eau, à partir d'une dilution de la solution stock dans le DMSO, de manière à ce que la concentration finale soit de 1% de DMSO (v/v). Chaque préparation de nanovaccin a été mesurée par DLS à l'aide du programme d'analyse de la taille avec le réglage des paramètres automatique à T=0h, puis à T=24h pour 3 lectures (N=3). Le "Zeta average" correspond au diamètre moyen des nanovaccins en nanomètres, et le PDI à l'indice de polydispersité.

Étant donné les contraintes du matériel disponible et basé sur les résultats obtenus à partir des analyses de DLS, nous avons décidé de nous concentrer sur les Nano 6, 7 et 8, car ils possèdent un atome d'azote (N) susceptible de s'ioniser une fois en solution, acquérant ainsi une charge positive (**Tableau 1**). À ce stade de l'étude, nous avons émis l'hypothèse que cette charge positive au niveau de la tête polaire pourrait favoriser les liaisons ioniques avec le squelette phosphodiester chargé négativement des siARN. Nous avons donc supposé que ces nanovaccins, en particulier, pourraient offrir une meilleure encapsulation. Cette décision s'inscrit dans l'objectif global du projet qui implique ultérieurement la complexation des nanovaccins avec des siARN.

Ainsi, dans le but d'étudier la variation de différents facteurs tels que la composition du milieu et la concentration des nanovaccins, nous avons effectué une deuxième analyse par DLS. Les Nano 6, 7 et 8 ont été dilués à partir des concentrations stock de DMSO dans de l'eau, une solution tampon phosphate (PBS) et du tampon

tris/EDTA (TE) à différentes concentrations. Nous avons jugé pertinent d'explorer le comportement des nanovaccins dans le PBS, reproduisant ainsi l'osmolarité et les concentrations en sel présentes dans le corps humain. Quant au tampon TE, il s'agit d'un tampon moins osmolaire avec un agent chélateur, servant de compromis entre le PBS et l'eau.

Les résultats de cette expérience ont révélé que dans le PBS, le nanovaccin 7 n'était pas analysable en raison d'un PDI supérieur à 0,4 (**Tableau 4**). Cette observation s'applique également au Nano 8 à des concentrations de 10 et 50 μM . Une différence de taille des nanovaccins d'un milieu à l'autre a également été observée. Par exemple, le Nano 6 passe d'une moyenne de 134 nm dans l'eau à 1754 nm dans le tampon TE à une concentration de 50 μM . On remarque notamment qu'avec l'augmentation de la concentration, la taille augmente pour tous les nanovaccins analysés. À des concentrations élevées (50 μM), le PDI des Nano 6 et 7 diminue considérablement, démontrant une grande stabilité de ces échantillons dans ces conditions. Pour ce qui est du Nano 8, le PDI moyen reste compris entre 0,18 et 0,23 pour des concentrations de 1 à 50 μM .

Plusieurs conclusions peuvent être tirées de ces résultats. Premièrement, les nanovaccins ne se comportent pas de la même manière selon le milieu et leur concentration, ce qui est cohérent aux données mentionnées dans notre revue de littérature. De plus, de manière générale, leur taille a tendance à augmenter avec l'augmentation de leur concentration. Nous pouvons également affirmer que, de manière générale, les nanovaccins sont stables dans l'eau et dans le TE. Cependant, cette stabilité varie d'un nanovaccin à l'autre ; par exemple, le Nano 7 est instable dans le PBS alors que le Nano 6 ne l'est pas.

En résumé, ces résultats confirment ceux obtenus précédemment en NTA et DLS, ajoutant une nouvelle dimension de stabilité relative à l'environnement et à leur concentration. Nous pouvons conclure que les nanovaccins forment une population homogène et stable dans l'eau et dans le TE, mais tous ne sont pas stables dans le PBS.

NPS	BUFFER	CONCENTRATION					
		1 μ M		10 μ M		50 μ M	
		z average (d.nm)	PDI	z average (d.nm)	PDI	z average (d.nm)	PDI
NANO 6	WATER	65 \pm 28	0.30 \pm 0.06	130 \pm 3	0.24 \pm 0.01	134 \pm 5	0.02 \pm 0.01
	PBS	131 \pm 3	0.20 \pm 0.01	405 \pm 15	0.27 \pm 0.00	682 \pm 36	0.10 \pm 0.07
	TE	168 \pm 4	0.21 \pm 0.01	390 \pm 17	0.19 \pm 0.03	1754 \pm 525	0.13 \pm 0.09
NANO 7	WATER	54 \pm 8	0.17 \pm 0.01	89 \pm 3	0.10 \pm 0.01	124 \pm 4	0.08 \pm 0.00
	PBS	NA	PDI > 0.4	NA	PDI > 0.4	NA	PDI > 0.4
	TE	114 \pm 89	0.24 \pm 0.10	144 \pm 4	0.22 \pm 0.01	184 \pm 5	0.05 \pm 0.02
NANO 8	WATER	97 \pm 22	0.18 \pm 0.03	158 \pm 5	0.22 \pm 0.00	203 \pm 8	0.23 \pm 0.02
	PBS	195 \pm 5	0.25 \pm 0.01	NA	PDI > 0.4	NA	PDI > 0.4
	TE	106 \pm 2	0.23 \pm 0.01	177 \pm 11	0.29 \pm 0.05	196 \pm 20	0.27 \pm 0.04

Tableau 4 : Diamètre et indice de polydispersité (PDI) des nanovaccins selon la concentration et le milieu.

Les nanovaccins 6 à 8 ont été préparés en ajoutant respectivement 1, 10 et 50 μ M à de l'eau MilliQ, du tampon PBS et du tampon TE, à partir d'une dilution de la solution stock dans le DMSO, de manière à ce que la concentration finale soit de 1% de DMSO (v/v). Chaque préparation de nanovaccin a été mesurée par DLS à l'aide du programme d'analyse de la taille, avec des paramètres de réglage automatique, à T=0h pour trois lectures (N=3). Lorsque le PDI est supérieur à 0,4, les échantillons ont été arbitrairement considérés comme non-analysables (NA). Le "Zeta average" correspond au diamètre moyen des nanovaccins en nanomètres, et le PDI à l'indice de polydispersité.

Nous avons ensuite poursuivi notre étude DLS afin d'approfondir notre compréhension de la stabilité et l'état de charge, et ce afin de mieux évaluer la capacité d'encapsulation de siRNA des nanovaccins. L'analyse DLS nous permet notamment de révéler la charge moyenne globale des nanoparticules présentes dans un échantillon, exprimée en millivolt (mV). La charge moyenne des nanoparticules nous donne, tout comme le PDI, un indice sur leur stabilité. En effet, plus une particule est chargée électriquement, que ce soit positivement ou négativement, plus elle sera stable, car les particules d'un même échantillon se repoussent entre elles, les empêchant ainsi de fusionner ou de s'agréger (Clogston et Patri 2011; Gumustas et al. 2017). De plus, en ce qui concerne l'objectif de notre projet, qui est de coupler des siARN aux nanovaccins, une particule est chargée positivement aura plus de chances de lier les siARN chargés négativement grâce à leur squelette phosphoré. Nous avons donc procédé à cette étude en préparant des solutions de nanovaccin à une concentration de 10 μ M

dans de l'eau, que nous avons ensuite analysées par DLS à l'aide d'une cuve spécifique pour l'étude du potentiel zêta de charge (mV).

Les résultats obtenus ont montré que tous les nanovaccins présentaient des valeurs moyennes du potentiel zêta (mV) négatives, ce qui indique que les nanovaccins sont globalement chargés négativement à leur surface (**Tableau 5**). Les Nano 5 et 8 étaient les nanovaccins les plus fortement chargés négativement. Le Nano 2 était celui qui présentait la plus faible charge, et l'on note une erreur standard élevée, de 107,3, alors que pour les autres nanovaccins, elle était inférieure à 10.

Ainsi, nous pouvons ainsi conclure que les nanovaccins 5 et 8 semblent être les plus stables du point de vue de leur charge électronégative, et donc les moins aptes à former des agrégats. Nous pouvons également conclure que le Nano 2 est le moins stable car sa charge moyenne est proche d'être zéro en termes d'électronégativité, mais son erreur standard est élevée.

	Nano 2	Nano 3	Nano 4	Nano 5	Nano 6	Nano 7	Nano 8
Z (mV)	-6.9 ± 107.3	-20.5 ± 7.5	-22.8 ± 5.5	-26.5 ± 5.6	-13.6 ± 7.4	-19.4 ± 12.1	-23.3 ± 9.6

Zeta potential (mV)	Stabilité
• De 0 à ± 10	Agregation rapide
• De 10 à ± 30	Stabilité faible
• De 30 à ± 40	Stabilité moyenne
• De 40 à ± 60	Stabilité bonne
• Plus de ± 61	Stabilité excellente

Tableau 5 : Étude de la charge des nanovaccins.

L'analyse de la charge globale moyenne des nanovaccins a été réalisée par DLS. Les nanovaccins ont été assemblés dans de l'eau Milli-Q à une concentration de 10 µM à partir des solutions stock de DMSO. Chaque échantillon a été placé dans une cuve spécifique à l'analyse de la charge, et le programme d'analyse de la charge, avec des paramètres de réglage automatique, a ensuite été utilisé de manière à ce que trois lectures soient réalisées pour chaque échantillon (N=3). Z(mV) correspond au potentiel zêta.

Nous avons poursuivi notre caractérisation des nanovaccins une troisième approche, la microscopie électronique à l'état frais. En plus de nous permettre d'évaluer la taille des nanovaccins, cette approche à l'avantage de nous offrir une

visualisation des nanoparticules, nous permettant ainsi d'avoir une idée de leur conformation spatiale.

Pour cela, nous avons examiné les Nano 4, 7 et 8 à l'état frais, en les mettant en solution à une concentration de 10 μM . Chaque nanovaccin a été coloré avec la solution qui s'est avérée la plus efficace empiriquement pour les visualiser. Ainsi, le Nano 4 a été coloré négativement avec une solution d'acide phosphotungstique (PTA) 3% et les Nano 7 et 8 ont été coloré négativement avec une solution d'acide urique (UA) 2%. Seuls ces nanovaccins ont été étudiés dans cette expérience en raison de la disponibilité limitée du microscope électronique et des stocks disponibles de nanovaccins à ce moment.

En ce qui concerne le Nano 4, les résultats de la microscopie ont révélé des nanoparticules de forme sphérique avec une taille inférieure à 120 nm (**Figure 19**). Quant aux Nano 7 et 8, les résultats ont montré des particules sphériques avec un changement de couleur à leur périphérie, créant une légère démarcation semblable à une membrane (**Figures 20 et 21**). Pour ces deux nanovaccins, la taille semble homogène et inférieure à 140 nm.

Nous pouvons donc conclure que les Nano 4, 7 et 8 sont des nanoparticules sphériques, ce qui suggère une similitude avec des liposomes. Ces observations sont cohérentes avec les résultats de taille moyenne obtenue lors des tests précédents, ce qui confirme la classification des nanovaccins en solution en tant que nanoparticules.

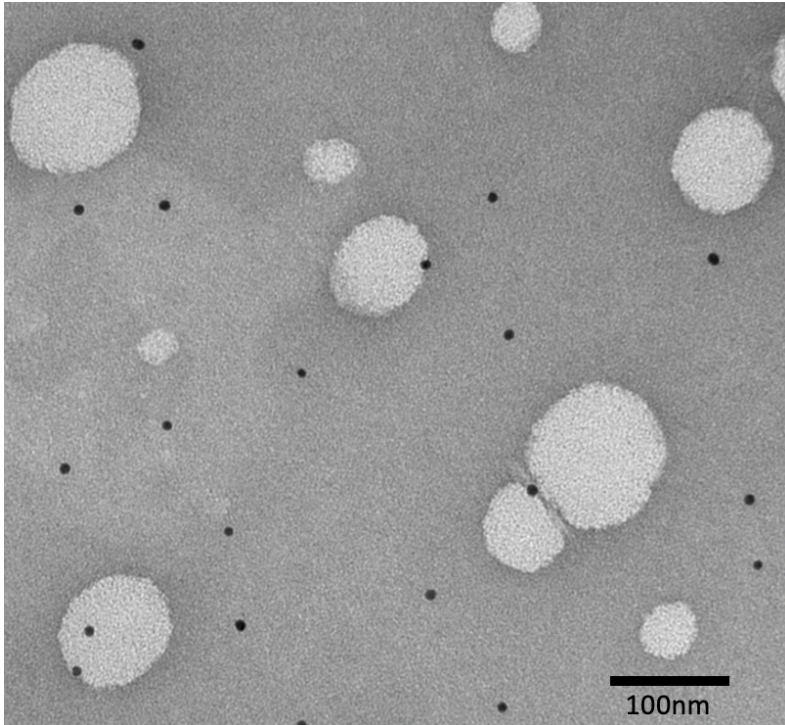


Figure 19 : Observation en microscopie électronique du nanovaccin 4.

L'analyse du nanovaccin 4 a été effectuée à l'état frais et coloré négativement à l'aide d'une solution UA 2% (pH = 7,0). Les sphères claires sur l'image correspondent au nanovaccin 4, et les points noirs sont des artefacts de la grille causés par sa réutilisation.

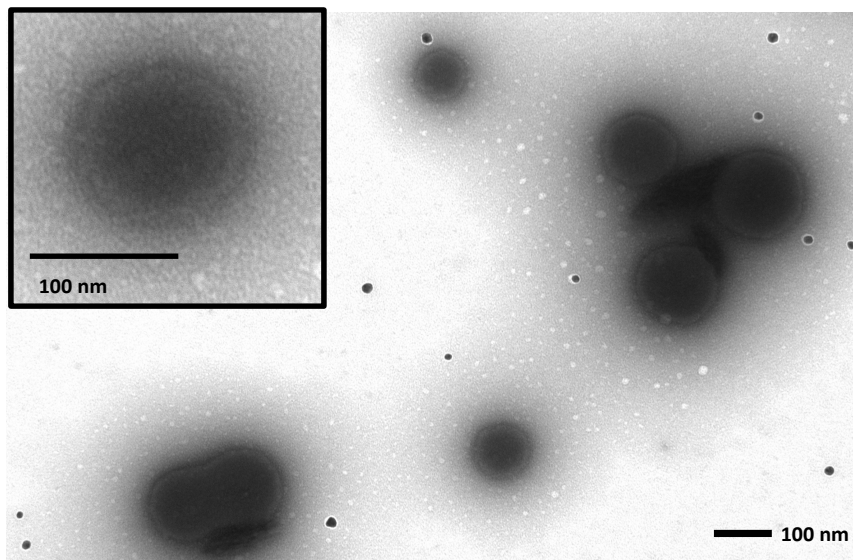


Figure 20 : Observation en microscopie électronique du nanovaccin 7.

L'analyse du nanovaccin 7 a été effectuée à l'état frais et coloré négativement à l'aide d'une solution UA 2% (pH = 7.0).

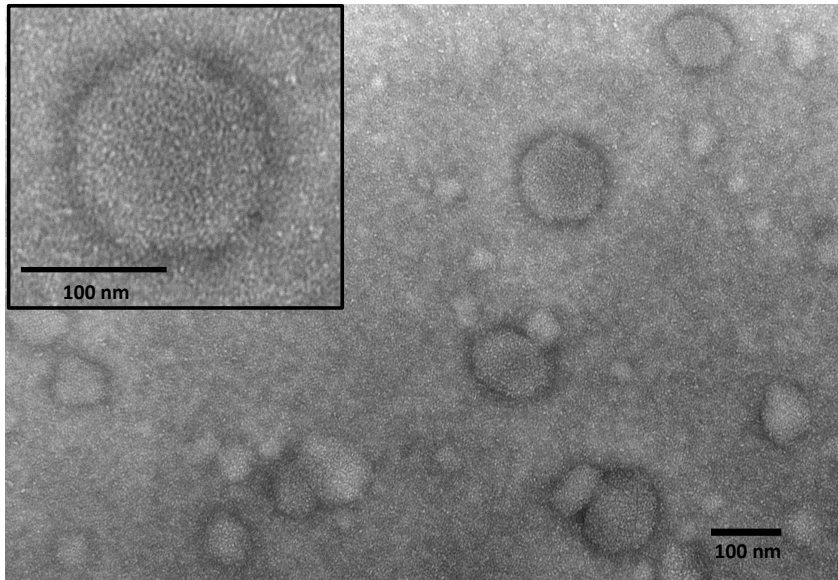


Figure 21 : Observation en microscopie électronique du nanovaccin 8.

L'analyse du nanovaccin 8 a été effectuée à l'état frais et coloré négativement à l'aide d'une solution PTA 3% (pH=7.0).

3. Étude de la cytotoxicité des nanovaccins

Dans le but de caractériser les nanovaccins en vue de leur utilisation potentielle comme vecteurs de transport dans le développement d'une thérapie contre le gliome en tant que vecteurs de transport, nous avons examiné leur toxicité cellulaire. Pour cela, nous avons réalisé une expérience de toxicité cellulaire en incubant les nanovaccins avec des cellules de la lignée humaine U-87 MG pendant une nuit (16 heures). Les nanovaccins ont été incubés à différentes concentrations (de 0.1 μM à 200 μM), en fonction de leur concentration maximale de solubilisation respective (voir **Tableau 2**), en présence de 1% (v/v) de DMSO final, et sans sérum bovin dans le milieu EMEM. Il est communément admis d'effectuer les tests de cytotoxicité sans sérum car ce dernier intervient directement dans la capacité des cellules à survivre et que ses composants pourraient interagir avec les réactifs utilisés. Nous avons également utilisé des cellules incubées dans les mêmes conditions, mais sans nanovaccin comme témoins, de même que des cellules sans nanovaccin mais avec 10% de sérum bovin et des cellules incubées avec

10% de DMSO comme témoins additionnels. Ensuite, nous avons récolté les cellules et les avons analysées par cytométrie en flux en utilisant une coloration à l'iodure de propidium (PI).

Les résultats obtenus ont révélé que, à leur concentration maximale, les Nano 4, 7 et 8 n'induisaient pas plus de 20% de mort cellulaire (**Figure 22**). Nous avons observé que le Nano 5 présentait une toxicité maximale de 30%, tandis que le Nano 2 montrait une mortalité de 20% à sa concentration maximale. Enfin, le Nano 3 affichait une toxicité maximale inférieure à 25% à une concentration de 200 μM . Par comparaison, les cellules incubées toute la nuit sans nanovaccins et sans sérum présentaient un taux de mort cellulaire d'environ 4%, ce qui est négligeable, un taux équivalent en présence de nanovaccins à des concentrations entre 0.1 μM et 5 μM . Ainsi, les Nano 2 et 5 ne présentent aucune toxicité jusqu'à 5 μM . En ce qui concerne les témoins, aucunes cellules n'a survécu avec le DMSO, et le taux de mort cellulaire observé pour les cellules incubées avec le sérum était comparable à celles sans sérum.

En conclusion, nos résultats indiquent que les nanovaccins ont, en général, un niveau de toxicité relativement peu élevé pour les cellules de notre modèle U-87 MG, l'exception étant les Nano 2 et 5. En combinant ces résultats avec ceux obtenus lors de l'étude de solubilisation (**Tableau 2**), on peut également en conclure que leur toxicité tend à augmenter lorsque leur concentration approche de leur concentration maximale de solubilisation.

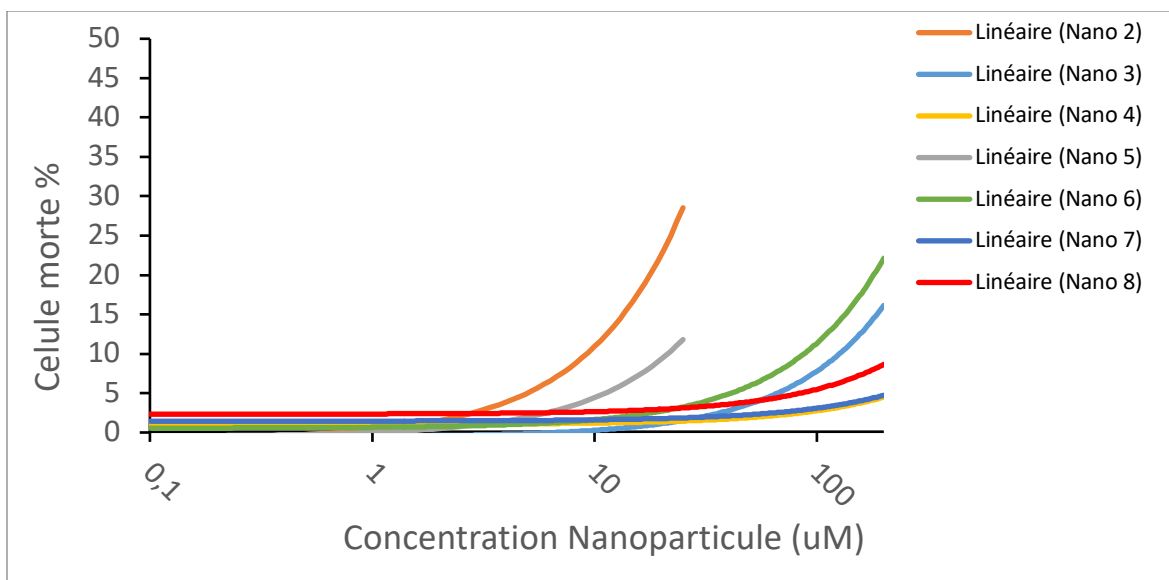


Figure 22 : Courbe de cytotoxicité des nanovaccins avec les cellules U-87 MG.

Les cellules U-87 MG ont été incubées pendant 48 heures dans du milieu EMEM à 37°C, en absence ou présence nanovaccins à des concentrations croissantes.

4. Expression de la galectine-1 dans le glioblastome

Dans l'objectif d'établir les bases d'une thérapie ciblée contre la Gal-1 dans le contexte du gliome, il est essentiel de valider notre modèle *in vitro*. Plusieurs équipes de recherche ont utilisé ce modèle pour étudier le rôle de la Gal-1 dans le gliome (Isabelle Camby et al. 2005; Jung et al. 2008; Le Mercier et al. 2010). Nous avons néanmoins voulu confirmer l'expression de la Gal-1 dans ce modèle et profiter de cette expérience pour valider nos méthodes d'analyses de l'expression de Gal-1 dans cette lignée.

Dans un premier temps, nous avons évalué l'expression de Gal-1 au niveau de l'ARNm par les méthodes standards de RT-PCR en utilisant des amorces spécifiques à *LGALS1* et des amorces spécifiques à la *GAPDH* comme témoin (voir Annexe 1). Dans un second temps, nous avons procédé à des analyses d'expression par immunobuvardage de type Western en utilisant des anticorps commerciaux spécifiques à la Gal-1 et des anticorps spécifiques à l'actine, notre protéine témoin (voir Annexe 2).

Les résultats obtenus ont confirmé l'expression de la Gal-1 tant au niveau de l'ARNm que de la protéine (**Figure 23**).

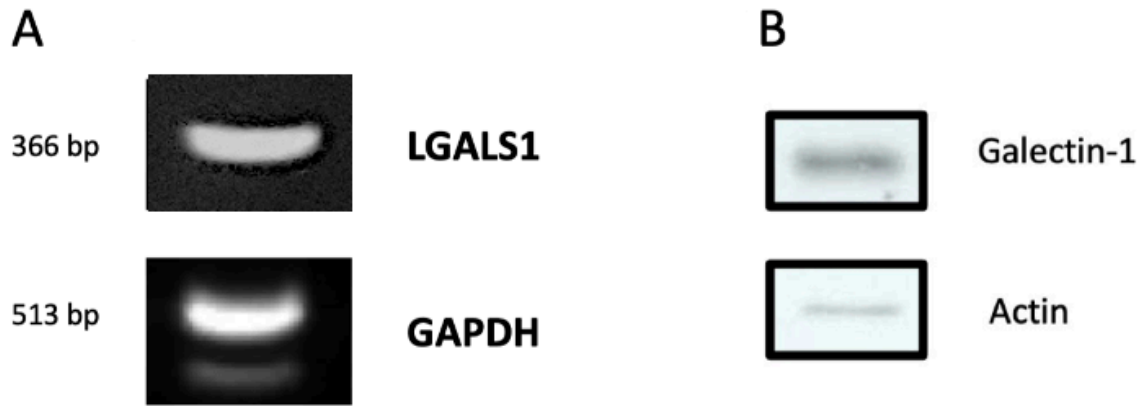


Figure 23 : Expression de galectine-1 dans la lignée cellulaire U-87 MG.

Expression de la Gal-1 au niveau de l'ARNm (A) et de la protéine (B).

5. Validation de l'inhibition de l'expression de Gal-1 par les siRNA.

Dans le cadre du développement d'une thérapie ciblée dirigée contre la Gal-1 au niveau de l'ARNm avec les nanovaccins complexé avec des siRNA, nous avons ensuite validé l'effet de siRNA. Pour ce faire, nous avons transfecté, en utilisant la Lipofectamine comme agent de transfection, des siRNA spécifiques à la Gal-1 dans des cellules U-87 MG. Ces cellules ont été incubées pendant 72 heures avec les siRNA. Les témoins incluaient des cellules sans siRNA et des cellules avec des siRNA possédant une séquence "scrambled" (Sc). Les résultats obtenus ont démontré une réduction significative de l'expression de Gal-1 d'environ 40%,

(Figures 15 et 16). Ces résultats nous ont permis de valider l'efficacité de nos siRNA et de notre modèle d'étude.

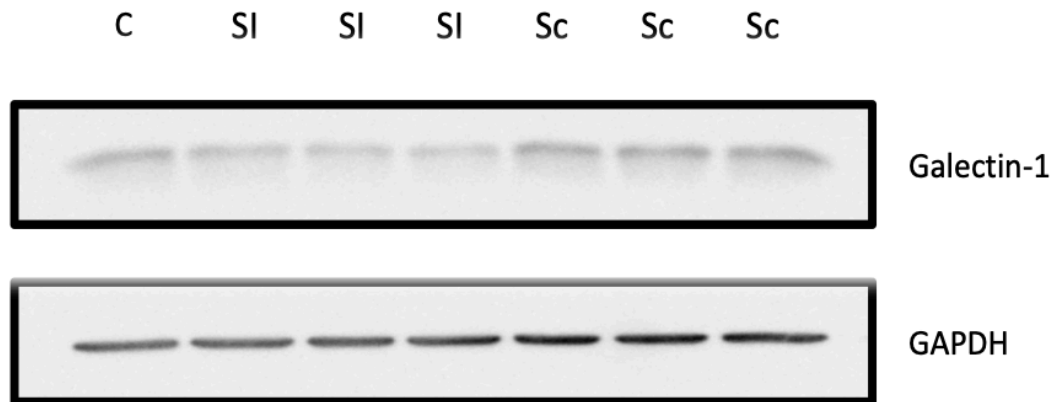


Figure 24 : Immunobuvardage de type Western de l'expression de Gal-1 en absence ou présence de siRNA.

C : cellules sans traitement ; SI : cellules incubées pendant 72h avec le siRNA contre la Gal-1; Sc : cellules incubées pendant 72h avec le siRNA témoin.

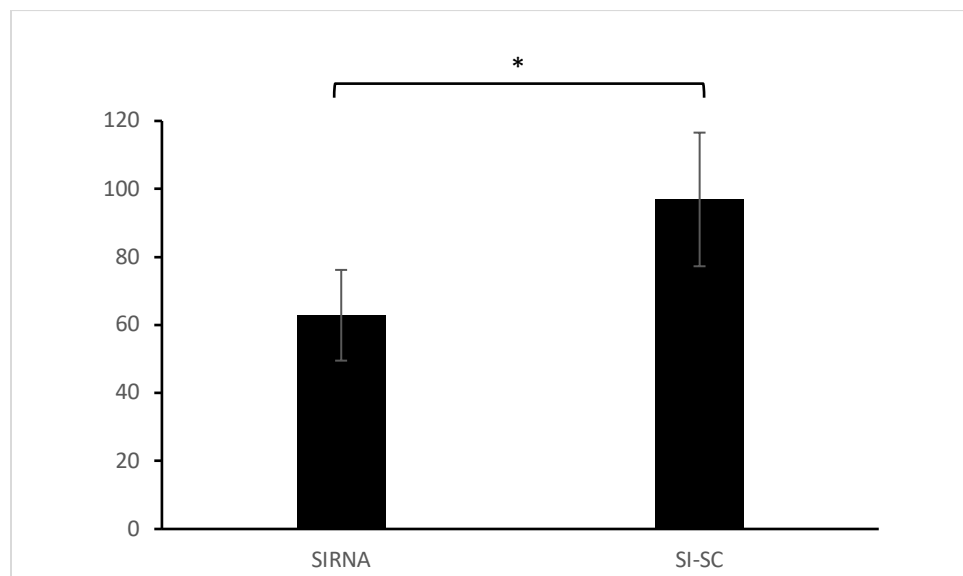


Figure 25 : Analyse densitométrique de l'immunobuvardage de type western de la figure 24.

La densitométrie a été réalisée avec le logiciel ImageJ à partir de la membrane illustrée à la figure 24. Les barres d'erreurs représentent la déviation standard. L'expérience a été réalisée en triplicata (N=3). * $p < 0,05$ selon un test de student.

6. Interaction des nanovaccins avec les siRNA

Afin de mettre en place une thérapie basée sur le transport des siRNA vers les cellules du gliome à l'aide des nanovaccins, il est essentiel de vérifier la capacité des nanovaccins à transporter les siRNA et à s'assembler avec eux. Pour étudier la complexation des siRNA avec les nanoparticules, nous avons réalisé un test de protection contre la RNase. Des nanovaccins ont été assemblés dans une solution de siRNA, puis le tout a été incubé pendant 15 minutes à 37°C avec un mélange de RNase. La dégradation des siRNA a ensuite été mesurée par visualisation sur un gel d'agarose (**Figure 26**). Les résultats obtenus ont mis en lumière l'absence de protection des siRNA par le Nano 3, contrairement aux autres nanovaccins qui ont démontré une protection (**Figure 27**). De plus, Les Nano 4, 7 et 8 ont affiché une protection statistiquement significative ($p < 0,05$), atteignant jusqu'à 14% pour le Nano 8.

Ces observations confirment la capacité des nanovaccins à interagir avec les siRNA et à les protéger de la dégradation des RNase.

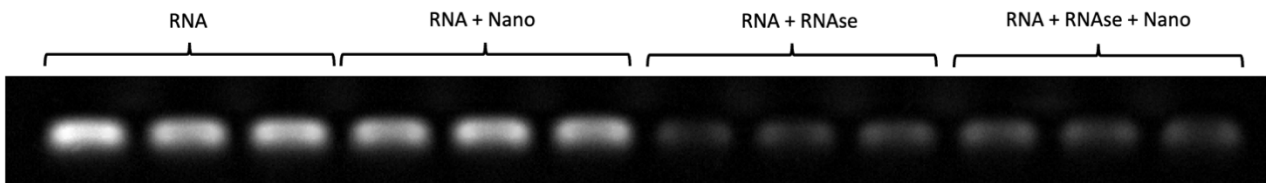


Figure 26 : Gel du test de protection a la RNase du nano 7.

Les nanovaccins ont été complexés avec les siRNA selon un ratio [1 μ M]nanovaccins/[100nM]siRNA, puis incubés à 37°C pendant 15 minutes avec et sans RNase cocktail dilué 1/1000. Un tube contenant 100nM de siRNA dans de l'eau stérile a été utilisé comme contrôle négatif (ARN non protégé). Ensuite, le mélange a été combiné avec un tampon de chargement et déposé sur un gel d'agarose à 2,5%. Une migration par électrophorèse dans du tampon TE a été réalisée à 60V pendant 20 minutes. L'ARN non protégé a été dégradé par la RNase, et l'ARN protégé est visible sur le gel. L'analyse du gel a été effectuée par densitométrie à l'aide du logiciel ImageJ.

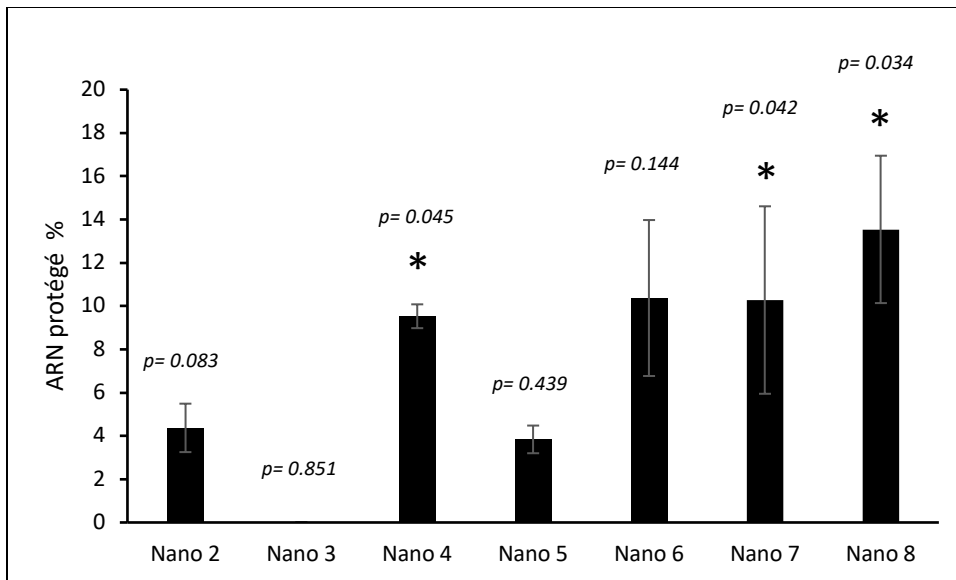


Figure 27 : Test de protection des siRNA complexés aux nanovaccins.

L'analyse du gel de chaque nanovaccin a été effectuée par densitométrie à l'aide du logiciel ImageJ. L'histogramme représente le pourcentage d'ARN protégé de la dégradation par les nanovaccins après un traitement à la RNase en fonction de l'ARN total. Chaque test a été réalisé en triplicata. Les barres d'erreurs correspondent à l'erreur standard de la différence entre de quantité d'ARN protégé et la moyenne des ARN non protégés (N=3). * $p < 0,05$ selon un test de Student comparant les différences obtenues avec et sans Nano.

Dans le but de confirmer l'interaction mise en évidence par l'expérience précédente, nous avons réalisé un test de retardation sur gel d'agarose. Ce test repose sur le principe selon lequel les ARN qui interagissent avec les nanoparticules ne migrent pas, car ils sont trop volumineux, laissant ainsi uniquement les ARN libres, plus petits, migrer dans le gel.

Pour ce test, nous avons assemblé des nanovaccins à différentes concentrations avec une concentration fixe de siRNA (100nM), formant ainsi des complexes nanovaccin-siRNA, à différents ratios tels que 0, 10, 50 et 100. La condition 0 représente un contrôle ne possédant pas de nanovaccins, tandis que 100 correspond à la concentration maximale de nanovaccins, soit 100 fois plus élevée que celle du siRNA. Ensuite, nous avons incubé le mélange pendant 30 minutes à température ambiante avant de migrer les échantillons sur un gel d'agarose à 2,5%. Nous avons utilisé un échantillon comparatif en incubant des siRNA avec 2,5% de Lipofectamine 2000.

Les résultats ont révélé que seuls les Nano 6 et 8 ont montré une interaction avec les ARN. Tous les autres n'ont présenté aucune rétention des siRNA à aucune des concentrations étudiées. Pour le Nano 6, un effet statistiquement significatif a été observé à partir d'un ratio nanovaccin/siRNA de 100, montrant une rétention moyenne d'environ 21% des siRNA (**Figure 28**). En ce qui concerne le Nano 8, un effet de rétention a été observé dès un ratio de 10 jusqu'à 100, démontrant une séquestration d'environ 19% des siRNA (**Figure 29**).

En conclusion, nous avons pu mettre en évidence une interaction entre les Nano 6 et 8 et les siRNA, avec une séquestration séquestrer d'environ 20% des siRNA présents dans le milieu en utilisant un ratio de 100 (nanovaccin/siRNA).

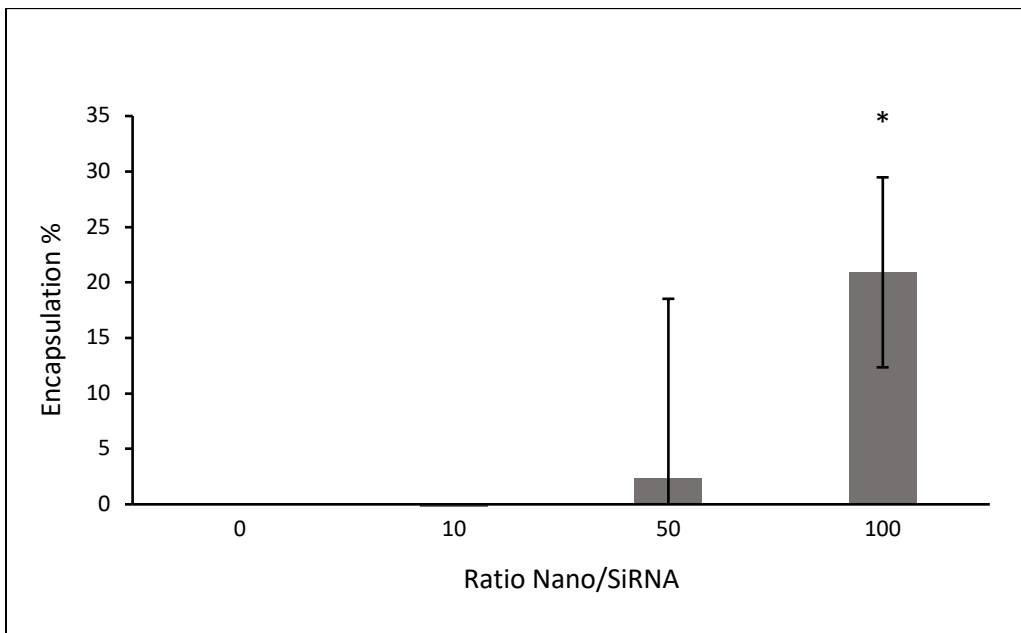


Figure 28 : Test de retardation avec le nanovaccin 6.

Le nanovaccin 6 a été assemblé à différentes concentrations avec une concentration constante de siARN (100nM) pour obtenir des ratios de 10, 50 et 100 (nanoparticules/siARN). Le complexe a été chargé sur un gel d'agarose à 2,5% avec un tampon de chargement. Un contrôle négatif contenant 100 μ M de siARN dans de l'eau a été utilisé pour représenter l'absence d'encapsulation. Un contrôle positif, constitué de 100 μ M de siARN et de lipofectamine 2000, a été utilisé pour témoigner d'une encapsulation totale. Cet histogramme représente le taux d'encapsulation moyen de l'ARN en fonction du ratio Nano/siARN en triplicata (N=3). * $p < 0,05$ selon un test de student comparant la moyenne d'encapsulation obtenue à un ratio donné et un ratio nul.

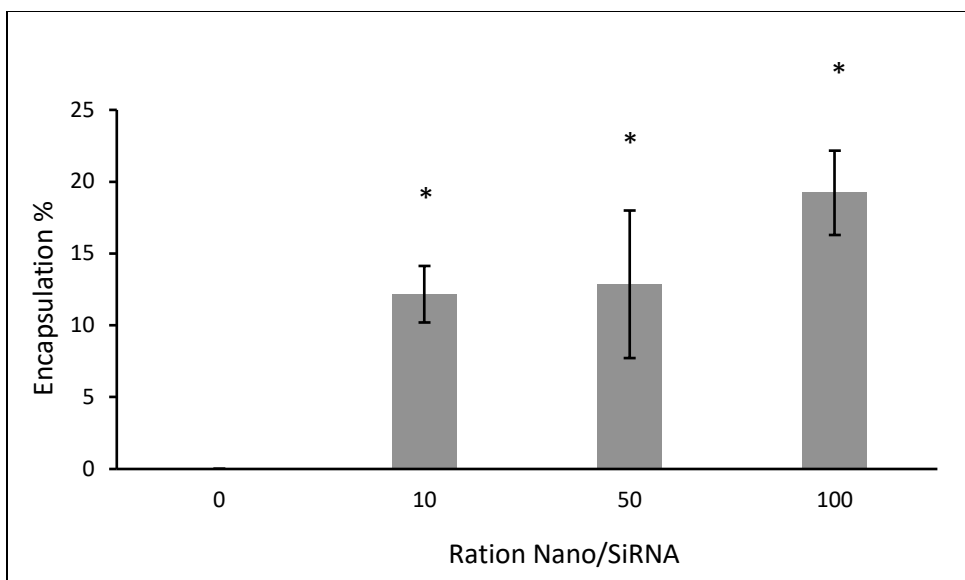


Figure 29 : Test de retardation du nanovaccin 8.

Le nanovaccin 8 a été assemblé à différentes concentrations avec une concentration constante de siARN (100nM) pour obtenir des ratios de 10, 50 et 100 (nanoparticules/siARN). Le complexe a été chargé sur un gel d'agarose à 2,5% avec un tampon de chargement. Un contrôle négatif contenant 100 μ M de siARN dans de l'eau a été utilisé pour représenter l'absence d'encapsulation. Un contrôle positif, constitué de 100 μ M de siARN et de lipofectamine, a été utilisé pour témoigner d'une encapsulation totale. Cet histogramme représente le taux d'encapsulation moyen de l'ARN en fonction du ratio Nano/siARN en triplicata (N=3). * $p < 0,05$ selon un test de student comparant la moyenne d'encapsulation obtenue à un ratio donné et un ratio nul.

Pour confirmer une fois de plus la complexation entre les nanovaccins et les siRNA, nous avons utilisé la microscopie électronique à l'état frais, couplée à un marquage des siRNA biotinylées suivi par un marquage indirect avec des anticorps anti-biotine marqués avec des particules d'or. Cette approche nous permet à la fois de visualiser et de vérifier l'arrangement spatial des siRNA, rendu visible grâce au marquage, ainsi que des nanovaccins. Le Nano 8, qui a montré à la fois une rétention des siRNA lors du test de retardation et lors du test de protection à la RNase, a été sélectionné pour cette expérience.

Nos résultats ont clairement démontré une agglomération de points autour du Nano 8, correspondant à un regroupement de siRNA à sa surface (**Figure 30**). Ces résultats confirment la complexation des nanovaccins avec les siRNA et sont

consistant avec le concept de phytosome que nous avons abordé dans notre revue de littérature.

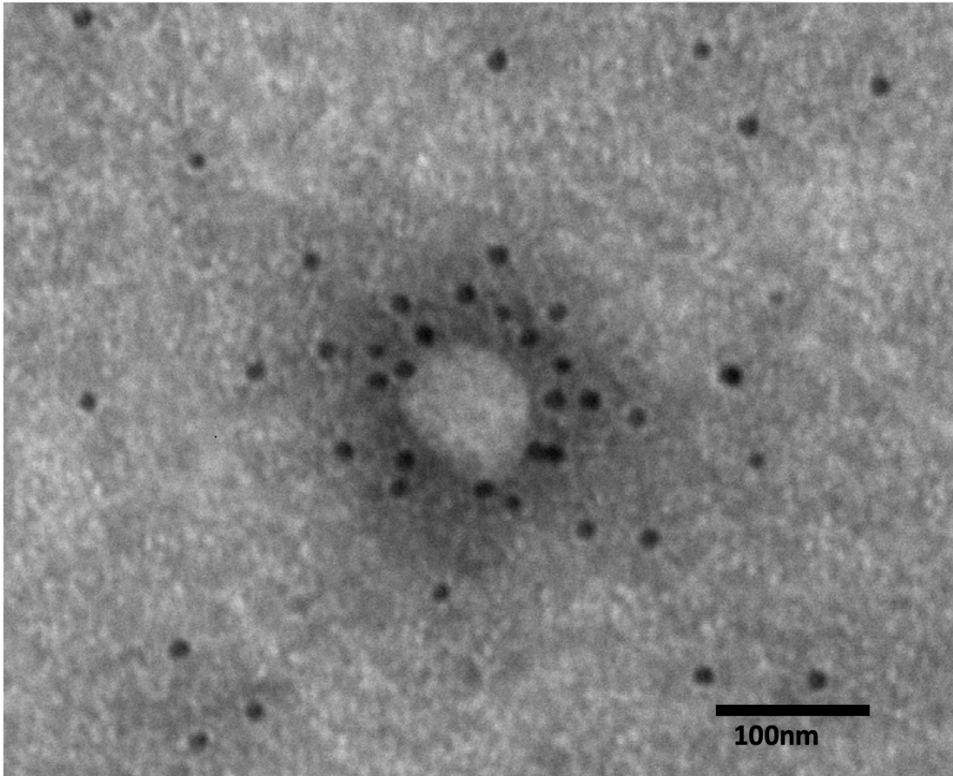


Figure 30 : Visualisation des siRNA avec le nanovaccin 8.

Le nanovaccin 8 a été assemblé à une concentration de 10 μM dans une solution de siARN biotinylé en 3' (100nM). Le complexe formé a ensuite subi un premier traitement avec des anticorps primaires antibiotine, suivi d'un second traitement avec des anticorps secondaires couplés à des particules d'or. L'analyse du complexe par TEM a été réalisée à l'état frais et coloré négativement à l'aide d'une solution UA 2% (pH=7.0).

CHAPITRE 4

Discussion

L'objectif général de ce projet visait à évaluer le potentiel de nanovaccins pour le développement d'une thérapie ciblant la Gal-1 dans le gliome. Plus spécifiquement, nous avons caractérisé huit nanoparticules lipidiques, développées par l'entreprise Glycovax, en vue de sélectionner la meilleure candidate pour une thérapie basée sur le transport de siRNA spécifique à Gal-1. Les différentes phases de sélection des candidats étaient basées sur plusieurs critères, dont la solubilité, la taille, l'homogénéité, la capacité à s'agréger, la toxicité, la conformation et la capacité à encapsuler des siRNA. En résumé, nous avons démontré que : 1) tous les nanovaccins étaient solubles dans un milieu composé à 99% d'eau, à l'exception du Nanovaccin 1; 2) selon nos résultats obtenus en utilisant le *nanoparticles tracking analysis* (NTA), la diffusion dynamique de la lumière (DLS) et la microscopie électronique (TEM), nous avons observé que les nanovaccins ont une morphologie sphérique, suggérant qu'il s'agit de nanoliposomes avec une taille moyenne de 50 à 100 nm; 3) La taille des nanovaccins varie en fonction de la concentration et du milieu; 4) que les nanovaccins sont relativement stables, sans tendance à former des agrégats; 5) les nanovaccins étaient peu toxiques; 6) le nanovaccin 8 s'est démarqué des autres candidats dans sa capacité à se complexer aux siRNA et de les protéger de la dégradation par les RNases. L'ensemble de ces résultats suggère que ce nanovaccin est un bon candidat pour la livraison de siRNA pour cibler des gènes protumorigéniques comme la Gal-1.

La suite logique de ce travail sera de procéder à des études pré-cliniques *in vitro* et *in vivo* visant à trouver les meilleures conditions pour une inhibition optimale de son utilisation. Ces études pourront notamment se baser sur l'utilisation du modèle U-87 MG que nous avons validé durant ce projet, un modèle couramment utilisé pour le développement de thérapies contre le gliome (Camby et al. 2001). Il est toutefois évident que nous devons d'optimiser les séquences de siRNA, présentement basées sur les résultats de Zhang et collaborateurs (Zhang et al., 2014), et les protocoles d'inhibition afin d'augmenter l'efficacité, la quantification et la reproductibilité de cette approche. Des expériences plus quantitatives, faisant appel, par exemple, à digital droplet polymerase chain

reaction (ddPCR) pourrait être envisagé. Cette approche offre plusieurs avantages pour mesurer l'inhibition à l'aide d'un siRNA, particulièrement au niveau de sa sensibilité élevée, sa précision quantitative, sa simplicité (pas besoin d'étalons de référence), et sa reproductibilité. Comme l'ont démontré nos résultats utilisant la DLS, le NTA et la microscopie électronique, il sera également important de prendre en considération les conditions expérimentales lors de l'évaluation de la taille des nanovaccins, dont nous avons évalué la taille entre 50 et 150 nm.

Nos résultats ont démontré également l'importance d'étudier la solubilité des nanovaccins. Dans ce cas-ci, le choix de comparer la solubilité dans le milieu EMEM a été motivé par son utilisation comme milieu de croissance recommandé par l'American Type Culture Collection (ATCC) pour les cellules U-87 MG. Tous les nanovaccins, à l'exception du nanovaccin 1, ont présenté une solubilité similaire, que ce soit dans l'eau ou dans le milieu EMEM, soulignant une bonne compatibilité avec le milieu cellulaire. L'analyse de la structure du nanovaccin 1 suggère que les groupements acetyles de faible polarité liés aux carbones du sucre de sa tête polaire pourraient être responsables de sa moindre solubilité. À noter que la solubilité du nanovaccin 4, malgré la présence de groupements acetyles, pourrait être due à la stéréochimie différente de ces groupements sur la conformation chaise par rapport au nanovaccin 1. Cette observation souligne l'importance de la configuration moléculaire dans les propriétés de solubilité des nanovaccins, mettant en lumière des considérations structurales cruciales pour leur application potentielle en thérapie.

L'analyse utilisant la DLS s'est avérée un outil important pour caractériser les nanovaccins, fournissant des données essentielles sur leur taille, leur distribution et leur charge. La première évaluation DLS a fourni deux paramètres clés : le potentiel zêta, reflétant la taille moyenne des particules, et l'indice de polydispersité (PDI), indicateur de l'homogénéité de l'échantillon. Selon les normes de l'Organisation Internationale de Standardisation (ISO) et les recommandations de Malvern, qui font référence aux lignes directrices et aux bonnes pratiques proposées par la société Malvern Panalytical, l'indice PDI renseigne sur la distribution en taille des particules (e.g. ISO 22412:2008). Un PDI inférieur à 0,1

est communément associé à un échantillon très homogène avec une seule population, tandis qu'un PDI supérieur à 0,7 indique un échantillon trop diversifié pour être analysé. Ces normes, corroborées par des études antérieures (Bhattacharjee 2016; Stetefeld, McKenna, et Patel 2016; Danaei et al. 2018), fournissent des informations cruciales sur la stabilité des particules étudiées. Bien que la FDA ne spécifie actuellement aucun critère d'acceptation pour le PDI dans son guide de production industrielle de liposomes, soulignant simplement l'importance d'une formulation homogène en taille (U.S. Food and Drug Administration, 2021), notre choix de considérer comme homogènes et analysables uniquement les échantillons présentant un PDI inférieur à 0,4 est motivé par une quête de précision, alignée sur des pratiques établies dans la littérature scientifique (Bhattacharjee, 2016). De manière générale, les indices PDI moyens des nanovaccins se situent entre 0.1 et 0.3, suggérant ainsi des particules homogènes en taille et relativement stables. Cette homogénéité a été corroborée par le NanoSight 300, où chaque nanovaccin présente un pic net et défini correspondant à une seule population. Ces observations sont également confirmées par les images du microscope électronique à transmission (TEM), qui renseignent sur l'uniformité des particules. Quant à la DLS, elle offre l'avantage d'étudier les nanovaccins dans diverses conditions, ce qui nous a permis d'observer comment la taille moyenne (ζ) des nanovaccins augmentait avec la concentration tandis que le PDI restait stable. Cette variation de comportement des nanovaccins en fonction du milieu dans lequel ils évoluent s'explique par leur composition de molécules lipidiques apolaires avec une tête polaire en milieu aqueux. La conformation des nanovaccins peut être envisagée comme un équilibre dynamique interagissant constamment avec son environnement, similaire aux phospholipides constituant les membranes cellulaires (Sun et al., 2022). Il est plausible que, avec une concentration accrue, les molécules s'agencent en structures plus importantes sans former d'agrégat puisque le PDI n'augmentait pas avec la concentration. Il serait intéressant alors d'étudier les conformations que peuvent prendre les nanovaccins à de plus grande concentration ce qui nous permettrait de prédire leur comportement lors d'une

accumulation dans les différents compartiments physiologiques comme au niveau de la BHE. Une autre information fournie par la DLS est le potentiel zêta en millivolts (mV), qui reflète la charge globale des particules. Le potentiel zêta renseigne sur la charge électromagnétique moyenne à la surface des particules dans l'échantillon, dépendant ainsi de la structure moléculaire de la tête polaire composée d'un sucre et des groupements qui y sont liés. Ce potentiel zêta est également influencé par la polarité du milieu et le pH. La charge électromagnétique indique la stabilité des nanovaccins, car des particules fortement chargées ont une propension à se repousser, évitant ainsi l'agrégation ou la fusion. On considère généralement que des valeurs de potentiel zêta dépassant +30 mV ou -30 mV indiquent une bonne stabilité des particules (Clogston et Patri, 2011; Gumustas et al., 2017). Dans notre étude, les nanovaccins ont présenté un potentiel zêta compris entre environ -10 et -30, indiquant ainsi une tendance générale à être électronégatifs avec une stabilité moyenne. Une stabilité moyenne peut influencer la dynamique des nanoparticules lipidiques, les rendant plus susceptibles de s'agréger, fusionner ou se déformer, et les rendant ainsi sensibles à leur environnement. Il est donc difficile de prédire exactement comment les nanovaccins réagiront dans les différents compartiments du corps humain, notamment au niveau de la BHE. Néanmoins certaines études suggèrent qu'une charge globalement négative pour des nanoparticules lipidiques serait favorable à une entrée de ces dernières par macropinocytose dans les cellules tumorales du gliome, en plus d'améliorer la stabilité dans le sang et réduire la clairance hépatique pour une meilleure biodisponibilité (Xiao et al., 2011; Kang et al., 2017). Cette observation concorde avec la stabilité déduite des résultats de l'étude du PDI mentionnée précédemment. À noter que le nanovaccin 2 avait un potentiel zêta se rapprochant de 0, ce qui reflète une particule neutre et instable. L'erreur élevée (+107) suggère probablement une instabilité de surface avec des charges variables en fonction des molécules environnantes. En ce qui concerne le Nanovaccin 8, son potentiel zêta est sans doute plus électropositif en raison de la présence du groupement NH_2C sur le sucre de sa tête polaire. En milieu aqueux neutre, cela devrait libérer une amine, exposant ainsi une charge positive. On

pourrait espérer que son potentiel zêta soit plus électropositif, avantageux dans le contexte de l'utilisation de l'ARN, car la charge positive de l'amine peut se lier au squelette phosphorylé des brins d'ARN chargés négativement, les reliant par interaction ionique. Cependant, la présence des groupements OH sur les autres carbones du sucre pourraient hypothétiquement expliquer le potentiel zêta moyen de -23,3, classant ainsi le nanovaccin 8 comme une nanoparticule lipidique anionique en surface de stabilité moyenne. En effet même si les groupements OH des sucres ne sont généralement pas déprotonés à pH neutre, nous émettons l'hypothèse qu'ils peuvent arborer une charge électronégative. En effet, l'atome d'oxygène est plus électronégatif que celui de carbone et d'hydrogène. Il crée alors un moment dipolaire au niveau du groupement OH qui peut présenter une charge potentielle électrostatique de surface négative selon la conformation de la molécule au niveau de l'oxygène (Murray et Politzer, 2011; Lorite et al., 2012; Sironi et al., 2022). Néanmoins, une charge globalement négative en surface n'entrave pas nécessairement le transport de matériel génétique, comme le montre l'étude de Raval et al., qui a réussi à coupler et à livrer des siARN à l'aide de particules anioniques (Raval et al., 2019). Pour optimiser la stabilité du nanovaccin 8, des approches telles que l'ajout de cholestérol peuvent être envisagées, ce dernier étant depuis longtemps décrit comme un lipide favorisant la stabilité des liposomes (Demel et al., 1968; Willis et Forssen, 1998).

Après avoir minutieusement exploré les propriétés physiques des nanovaccins, telles que leur taille, charge et stabilité, notre attention s'est portée vers leur conformation et leur capacité d'encapsulation. La plateforme technologique proposée par Glycovax repose sur des liposomes capables de s'autoassembler, pouvant être couplés à d'autres molécules de type dendrimère pour former des dendrimèresomes (Goyard et al. 2016; Moffett et al. 2021). En se basant sur d'autres études similaires et sur la structure chimique des molécules, il est logique d'entrevoir une structure de liposomes. Leurs tailles réduites les classeraient parmi les nanoliposomes, bien que leur observation soit délicate. Les images obtenues par microscopie électronique ont d'ailleurs révélé une forme sphérique, confirmant cette hypothèse. Cependant, sur certaines images,

notamment celles des nanovaccins 7 et 8, une démarcation avec un changement de couleur à la surface des particules, évoquant les caractéristiques des liposomes décrites dans la littérature scientifique, est observable. Malgré ces indices, il reste difficile d'affirmer catégoriquement qu'il s'agit de liposomes. Une preuve de la présence d'une lumière interne et d'une membrane composée d'une bicouche lipidique serait nécessaire pour exclure la possibilité qu'il s'agisse, par exemple, de micelles. Malheureusement, l'observation au TEM à l'état frais ne permet pas de vérifier ces éléments, puisque seule la surface des particules dans leur état hydraté normal est visible. De plus, la taille nanométrique, de par leur relative instabilité, entrave leur soumission au stress mécanique de l'ultracentrifugation selon le protocole classique d'inclusion dans une résine pour la réalisation de coupes permettant d'observer la présence d'une lumière interne. La cryoTEM serait la technique idéale (Tang Li et al. 2019; Yao, Fan, et Yan 2020). Cette approche mériterait d'être explorée pour l'avenir du projet, permettant la vérification de la présence ou de l'absence d'une lumière interne dans les nanovaccins et l'examen de la structure de la bicouche lipidique externe. On pourrait notamment la combiner avec le marquage à l'*immunogold*, nous permettant ainsi de confirmer l'encapsulation véritable des siRNA à l'intérieur de leur lumière, en plus de la complexation des siRNA à leur surface que nous avons démontrée. Pour l'instant, nous pouvons seulement affirmer que la complexation des siRNA avec les nanovaccins prend la forme d'un phytosome. Toutefois, nos résultats de résistance à la RNase sont consistants avec une encapsulation, car si les siRNA étaient exclusivement à l'extérieur des nanovaccins, ils ne bénéficieraient probablement pas de la protection offerte par ces derniers. De plus, le test de retardation a révélé une rétention des siRNA lors de la migration. Tous ces éléments convergent vers la possibilité que les nanovaccins soient effectivement capables d'une véritable encapsulation à l'intérieur d'une lumière. Reste à savoir si la protection et l'encapsulation, que nous avons estimé aux environs de 20%, sont adéquats pour la mise en place d'une thérapie, surtout lorsque certains groupes de recherche atteignent des taux d'encapsulation nettement supérieurs (Huang et al., 2022; Huang et al., 2017; Van Woensel et al.,

2016; Leung et al., 2012). Il est néanmoins possible d'optimiser la formulation des nanovaccins pour améliorer leurs taux d'encapsulation. Par exemple, l'utilisation d'un mélange à différents ratios, de différentes molécules, ou d'autres nanovaccins, comme cela se fait avec le cholestérol dans certains groupes, pourrait être explorée. Cependant, il est essentiel de garder à l'esprit que la technologie des nanovaccins repose sur l'auto-assemblage et leur simplicité de production. Une autre piste d'investigation pourrait consister à introduire des charges cationiques au niveau des carbones du sucre de la tête des nanovaccins, afin de les transformer en particules cationiques, favorisant ainsi les interactions ioniques avec les siRNA chargés négativement.

Après avoir examiné en détail la caractérisation des nanovaccins, il est essentiel de souligner les aspects critiques des techniques employées dans ce projet. Chacune de ces méthodes présente des avantages distincts, mais également des limitations inhérentes. Par exemple, bien que le DLS offre la possibilité d'étudier les nanoparticules dans divers tampons et à différentes concentrations, il peut être sensible à la présence d'agrégats, provoquant des résultats potentiellement erronés, surtout lors de la sédimentation de l'échantillon dans la cuve (Says, 2013).

Quant au Nanosight 300, basé sur l'observation vidéo du flux d'échantillon, il permet une mesure précise de la taille des particules grâce à la diffusion de la lumière et au mouvement brownien. Néanmoins, il montre ses limites face à des échantillons à forte concentration (Filipe et al., 2010; Maguire et al., 2018). Dans le cas de la TEM, qui permet une visualisation directe des particules, elle se distingue par sa précision dans la mesure de leur taille. Cependant, cette méthode exige une préparation délicate des échantillons, les contraignant à un milieu défini et à une concentration précise (Verleysen et al., 2019), limitant ainsi sa polyvalence. C'est pourquoi l'utilisation simultanée des trois méthodes visait à confirmer la caractérisation des nanovaccins en tenant compte des variations de concentration, de composition du milieu, et de la précision de chaque technique. Ces considérations révèlent une cohérence entre les résultats obtenus, consolidant ainsi les observations antérieures.

Cette étude a recouru à deux techniques pour évaluer la capacité des nanovaccins à transporter les siRNA : le test de protection à la RNase et le test de retardation. Une critique majeure de ces méthodes réside dans leur dépendance à une analyse de densitométrie basée sur une image, entraînant une faible reproductibilité et précision, ainsi qu'une variabilité notable dans les mêmes conditions expérimentales. Cette variabilité peut découler de problèmes de détection ou de qualité du gel d'agarose. Malgré ces limitations, ces techniques demeurent largement utilisées dans l'étude des nanoparticules lipidiques, car peu d'autres options permettent de quantifier l'encapsulation.

La caractérisation quantitative des nanovaccins s'est également avérée être un défi substantiel. Leur taille trop réduite les rend insaisissables au cytomètre en flux conventionnels, et les lipides et sucres qu'ils renferment ne sont pas détectables en spectrométrie de fluorescence, excluant ainsi une quantification spectrométrique. De plus, leur instabilité face à l'environnement chimique et à la concentration, comme discuté précédemment, rend impossible l'application de certains protocoles basés sur la quantification des siRNA libres par rapport aux siRNA encapsulés. Des méthodes basées sur des étapes de centrifugation ont été envisagées, mais l'augmentation de la concentration des nanovaccins altère leur conformation et leurs propriétés, rendant cette approche peu pertinente. Bien que le protocole de Cao et al. ait également été envisagé, l'utilisation d'un tampon spécifique et d'un colorant modifie le milieu, induisant des changements dans la conformation et les propriétés physico-chimiques des nanovaccins, comme indiqué par nos résultats de DLS montrant des différences significatives dans leur comportement, que ce soit dans de l'eau, du tampon TE ou du PBS. L'application de ce protocole à nos particules autoassemblées entraînerait ainsi la perte de toute indication de l'encapsulation intrinsèque probable des nanovaccins (Cao et al., 2022). Malgré tout, l'utilisation combinée du test de protection à la RNase et du test de retardation nous a permis d'obtenir une estimation semi-quantitative de la capacité potentielle des nanovaccins à transporter les siRNA, atteignant environ 20%. Cette évaluation a été qualitativement confirmée par l'étude immunogold réalisée en TEM, qui nous a permis de visualiser directement l'interaction des

siRNA à la surface des nanovaccins. Pour une compréhension plus précise de l'encapsulation des siRNA par les nanovaccins et dans l'optique d'une éventuelle optimisation, il serait intéressant de mettre en place une expérience permettant une quantification plus précise. L'utilisation de la chromatographie par exclusion de taille pour séparer les nanovaccins des siRNA libres dans le milieu pourrait être une solution attrayante (Robertson et al., 2016). Cependant, il convient de noter que cette approche peut s'avérer coûteuse en cas d'interaction entre les nanovaccins et la matrice de la colonne, ce qui pourrait rendre celle-ci inutilisable. Bien que le complexe avec le nanovaccin 8 ait généré des résultats prometteurs dans notre étude, plusieurs obstacles potentiels nécessitent une attention particulière pour le développement futur du projet. Des expériences supplémentaires sont essentielles pour en évaluer son plein potentiel. Comme nous l'avons souligné, les nanovaccins peuvent subir des changements de conformation et de propriétés physiques en fonction de leur environnement et de leur concentration. Par conséquent, il est légitime de se questionner sur leur comportement dans le sang, où les composantes biologiques et les forces dynamiques peuvent varier. Sur le plan cellulaire, bien que la toxicité des liposomes ait été étudiée sur les cellules cancéreuses U-87 MG, il est important de noter que ces cellules présentent des mécanismes de survie anormalement actifs, les rendant résistantes à la toxicité. Afin d'obtenir une représentation plus précise de la toxicité des nanovaccins, il serait judicieux de reproduire l'expérience sur différentes lignées cellulaires humaines non cancéreuses, telles que les fibroblastes, les cellules endothéliales et les cellules de l'immunité. En effet, des études antérieures ont démontré que les liposomes peuvent présenter une toxicité variable selon le type cellulaire, affectant la mitose et certaines voies de signalisation cruciales pour ces cellules (Tenchov et al., 2021). De surcroît, il convient de noter que les lipides ne sont pas des molécules inertes, surtout dans le contexte de notre projet où ils sont conjugués à des sucres, interagissant ainsi avec de nombreux mécanismes cellulaires. Les lipides qui composent les liposomes peuvent pour moduler la réponse immunitaire par divers mécanismes, selon leur taille, leur charge, et leurs interactions avec des protéines spécifiques

(Inglut et al., 2020; Barenholz, 2021). Il a même été constaté que les liposomes peuvent influencer la différenciation phénotypique M1/M2 des macrophages (Cruz-Leal et al., 2014). Cette modulation du système immunitaire peut représenter un obstacle à la réussite d'une thérapie, en particulier dans le contexte du cancer.

Enfin, des interrogations légitimes se posent quant à la biodisponibilité et à l'élimination des nanovaccins dans l'organisme. La littérature scientifique a rapporté que certaines formulations de liposomes peuvent entraîner des problèmes d'élimination post-injection, conduisant à une accumulation dans les organes avec des risques potentiels de toxicité, notamment l'hépatotoxicité (Baldrick, 2010; Sercombe et al., 2015; Patnaik et al., 2021). Des réactions allergiques ont également été observées en réponse à l'activation du système immunitaire par les liposomes (Szebeni et al., 2009; Sercombe et al., 2015). De plus, les liposomes sont confrontés au défi de la "clairance sanguine accélérée". Après plusieurs injections, ils ont tendance à être éliminés plus rapidement, ce qui peut affecter leur biodisponibilité à long terme en vue d'une utilisation thérapeutique (Dams et al., 2000; Sercombe et al., 2015). Il sera aussi important d'étudier sur la réelle délivrance des siRNA aux cellules. Quantifier la quantité de siRNA effectivement délivrée aux cellules serait essentiel pour assurer une livraison complète et maximiser l'effet thérapeutique. Une exploration pertinente consisterait à investiguer des approches de livraison spatiotemporellement contrôlées. Par exemple, l'utilisation d'ultrasons ou de photons pour induire la libération du chargement par le liposome pourrait améliorer le taux de délivrance d'un côté, tout en offrant un meilleur contrôle de la biodisponibilité du médicament et potentiellement réduire les effets secondaires associés. Cette combinaison entre le nanovaccin 8 avec des technologies de délivrance contrôlée aurait le potentiel d'améliorer à la fois l'efficacité de la délivrance thérapeutique et la sécurité du traitement (Shi et al., 2017; Ogawa et al., 2022). Il n'en demeure pas moins que les propriétés de ce nanovaccin 8, notamment au niveau de son autoassemblage, associées à une faible toxicité et une facilité de production, en font un candidat intéressant. En outre, la présence de sucres à la surface de ces

nanovaccins pourrait conférer des avantages biomédicaux, en mimant les interactions cellulaires normales et en modulant la réponse immunitaire. Des travaux antérieurs indiquent en effet que ce nanovaccin pourrait exploiter les mécanismes de délivrance spécifiques aux liposomes glycosylés pour franchir la BHE (Lewicky et al., 2020; 2021; Irache et al., 2008; Anraku et al., 2017). Ces caractéristiques combinées positionnent le nanovaccin 8 comme un candidat de choix pour une thérapie efficace du gliome.

En résumé, il est clair que la progression de notre projet se déploiera à améliorer le ratio d'encapsulation du nanovaccin 8, que ce soit en combinant différents nanovaccins ou en renforçant sa stabilité par l'ajout éventuel de cholestérol. Dans un premier temps, notre attention devra se tourner vers l'étude de l'internalisation dans les cellules en recourant par exemple, à la microscopie confocale. Puis dans un second, l'internalisation à travers la BHE. Dans ce dernier cas, des modèles in vitro sont disponibles, notamment ceux faisant appel à des lignées de cellules endothéliales du cerveau, comme Bend3 (Rabanel et al., 2020). Une autre alternative serait l'utilisation de modèle du poisson-zèbre, un choix pertinent pour étudier le transport vers le cerveau, compte tenu de ses nombreux avantages (Ali et al., 2011; Rabanel et al., 2021).

CHAPITRE 5

Conclusion

Conclusion :

En conclusion, notre étude nous a permis de sélectionner le nanovaccin 8 comme le meilleur candidat pour être un transporteur de siRNA dans le développement d'une thérapie pour le gliome. Ce nanovaccin présente des caractéristiques essentielles telles que la solubilité, la taille, la stabilité, une faible toxicité et la capacité d'encapsulation des siRNA. Néanmoins, il sera essentiel d'optimiser davantage sa stabilité et son taux d'encapsulation afin de le rendre encore plus compétitif sur le marché des liposomes. Il sera également essentiel de vérifier la capacité de ce nanovaccin à traverser la barrière hémato-encéphalique et à délivrer les siRNA aux cellules du gliome.

CHAPITRE 6

Références

Références

- 14:00-17:00. s. d. « ISO/TS 80004-2:2015 ». ISO. Consulté le 23 août 2022.
<https://www.iso.org/cms/render/live/fr/sites/isoorg/contents/data/standard/05/44/54440.html>.
- Adams, David, Ivailo L. Tournev, Mark S. Taylor, Teresa Coelho, Violaine Planté-Bordeneuve, John L. Berk, Alejandra González-Duarte, et al. 2022. « Efficacy and Safety of Vutrisiran for Patients with Hereditary Transthyretin-Mediated Amyloidosis with Polyneuropathy: A Randomized Clinical Trial ». *Amyloid: The International Journal of Experimental and Clinical Investigation: The Official Journal of the International Society of Amyloidosis*, juillet, 1-9. <https://doi.org/10.1080/13506129.2022.2091985>.
- Advedissian, Tamara, Véronique Proux-Gillardeaux, Rachel Nkosi, Grégoire Peyret, Thao Nguyen, Françoise Poirier, Mireille Viguier, et Frédérique Deshayes. 2017. « E-Cadherin Dynamics Is Regulated by Galectin-7 at Epithelial Cell Surface ». *Scientific Reports* 7 (1): 17086. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17332-y>.
- Agarwala, S. S., et J. M. Kirkwood. 2000. « Temozolomide, a Novel Alkylating Agent with Activity in the Central Nervous System, May Improve the Treatment of Advanced Metastatic Melanoma ». *The Oncologist* 5 (2): 144-51.
<https://doi.org/10.1634/theoncologist.5-2-144>.
- Ahmad, Nisar, Hans-J. Gabius, Sabine André, Herbert Kaltner, Subramanian Sabesan, René Roy, Bingcan Liu, Frank Macaluso, et C. Fred Brewer. 2004. « Galectin-3 Precipitates as a Pentamer with Synthetic Multivalent Carbohydrates and Forms Heterogeneous Cross-Linked Complexes ». *The Journal of Biological Chemistry* 279 (12): 10841-47.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M312834200>.
- Ahmed, Niyaz. 2005. « 23 years of the discovery of Helicobacter pylori: Is the debate over? » *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 4 (octobre):17.
<https://doi.org/10.1186/1476-0711-4-17>.
- Ahn, Insook, Chanhee S. Kang, et Jinju Han. 2023. « Where Should siRNAs Go: Applicable Organs for siRNA Drugs ». *Experimental & Molecular Medicine* 55 (7): 1283-92.
<https://doi.org/10.1038/s12276-023-00998-y>.
- Ajarrag, Samy, et Yves St-Pierre. 2021. « Galectins in Glioma: Current Roles in Cancer Progression and Future Directions for Improving Treatment ». *Cancers* 13 (21): 5533.
<https://doi.org/10.3390/cancers13215533>.
- Akahani, S., P. Nangia-Makker, H. Inohara, H. R. Kim, et A. Raz. 1997. « Galectin-3: A Novel Antiapoptotic Molecule with a Functional BH1 (NWGR) Domain of Bcl-2 Family ». *Cancer Research* 57 (23): 5272-76.
- Akbarzadeh, Abolfazl, Rogaie Rezaei-Sadabady, Soodabeh Davaran, Sang Woo Joo, Nosratollah Zarghami, Younes Hanifehpour, Mohammad Samiei, Mohammad Kouhi, et

- Kazem Nejati-Koshki. 2013. « Liposome: classification, preparation, and applications ». *Nanoscale Research Letters* 8 (1): 102. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-102>.
- Alard, Emilie, Aura-Bianca Butnariu, Marta Grillo, Charlotte Kirkham, Dmitry Aleksandrovich Zinovkin, Louise Newnham, Jenna Macciocchi, et Md Zahidul Islam Pranjol. 2020. « Advances in Anti-Cancer Immunotherapy: Car-T Cell, Checkpoint Inhibitors, Dendritic Cell Vaccines, and Oncolytic Viruses, and Emerging Cellular and Molecular Targets ». *Cancers* 12 (7): 1826. <https://doi.org/10.3390/cancers12071826>.
- Ali, Shaukat, Danielle L. Champagne, Herman P. Spaink, et Michael K. Richardson. 2011. « Zebrafish Embryos and Larvae: A New Generation of Disease Models and Drug Screens ». *Birth Defects Research. Part C, Embryo Today: Reviews* 93 (2): 115-33. <https://doi.org/10.1002/bdrc.20206>.
- Allen, Marie, Mia Bjerke, Hanna Edlund, Sven Nelander, et Bengt Westermark. 2016. « Origin of the U87MG Glioma Cell Line: Good News and Bad News ». *Science Translational Medicine* 8 (354): 354re3. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf6853>.
- Alshehri, Abdullah, Anna Grabowska, et Snow Stolnik. 2018. « Pathways of cellular internalisation of liposomes delivered siRNA and effects on siRNA engagement with target mRNA and silencing in cancer cells ». *Scientific Reports* 8 (février):3748. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22166-3>.
- Anguela, Xavier M., et Katherine A. High. 2019. « Entering the Modern Era of Gene Therapy ». *Annual Review of Medicine* 70 (janvier):273-88. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-012017-043332>.
- Anraku, Y., H. Kuwahara, Y. Fukusato, A. Mizoguchi, T. Ishii, K. Nitta, Y. Matsumoto, et al. 2017. « Glycaemic control boosts glucosylated nanocarrier crossing the BBB into the brain ». *Nature Communications* 8 (octobre):1001. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00952-3>.
- Baenziger, J. U., et D. Fiete. 1980. « Galactose and N-Acetylgalactosamine-Specific Endocytosis of Glycopeptides by Isolated Rat Hepatocytes ». *Cell* 22 (2 Pt 2): 611-20. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(80\)90371-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(80)90371-2).
- Balazs, Daniel A., et W. T. Godbey. 2010. « Liposomes for Use in Gene Delivery ». *Journal of Drug Delivery* 2011 (décembre):e326497. <https://doi.org/10.1155/2011/326497>.
- Baldrick, Paul. 2010. « The Safety of Chitosan as a Pharmaceutical Excipient ». *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 56 (3): 290-99. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2009.09.015>.
- Balin, B. J., R. D. Broadwell, M. Salcman, et M. el-Kalliny. 1986. « Avenues for Entry of Peripherally Administered Protein to the Central Nervous System in Mouse, Rat, and Squirrel Monkey ». *The Journal of Comparative Neurology* 251 (2): 260-80. <https://doi.org/10.1002/cne.902510209>.

- Banerjee, Kaushik, Felipe J. Núñez, Santiago Haase, Brandon L. McClellan, Syed M. Faisal, Stephen V. Carney, Jin Yu, et al. 2021. « Current Approaches for Glioma Gene Therapy and Virotherapy ». *Frontiers in Molecular Neuroscience* 14:621831. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.621831>.
- Barenholz, Janos Szebeni, Yechezkel (Chezy). 2021. « Complement Activation, Immunogenicity, and Immune Suppression as Potential Side Effects of Liposomes ». In *Advances in Clinical Immunology, Medical Microbiology, COVID-19, and Big Data*. Jenny Stanford Publishing.
- Barenholz, Yechezkel. 2012. « Doxil®--the First FDA-Approved Nano-Drug: Lessons Learned ». *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 160 (2): 117-34. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.03.020>.
- Barriga, Hanna M. G., Margaret N. Holme, et Molly M. Stevens. 2019. « Cubosomes: The Next Generation of Smart Lipid Nanoparticles? » *Angewandte Chemie International Edition* 58 (10): 2958-78. <https://doi.org/10.1002/anie.201804067>.
- Bayda, Samer, Muhammad Adeel, Tiziano Tuccinardi, Marco Cordani, et Flavio Rizzolio. 2019. « The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine ». *Molecules* 25 (1): 112. <https://doi.org/10.3390/molecules25010112>.
- Beatty, Gregory L., et Whitney L. Gladney. 2015. « Immune escape mechanisms as a guide for cancer immunotherapy ». *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 21 (4): 687-92. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-1860>.
- Berdasco, María, et Manel Esteller. 2010. « Aberrant Epigenetic Landscape in Cancer: How Cellular Identity Goes Awry ». *Developmental Cell* 19 (5): 698-711. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.10.005>.
- Berois, Nora, et Eduardo Osinaga. 2014. « Glycobiology of Neuroblastoma: Impact on Tumor Behavior, Prognosis, and Therapeutic Strategies ». *Frontiers in Oncology* 4:114. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00114>.
- Bertozi, C. R., et L. L. Kiessling. 2001. « Chemical Glycobiology ». *Science (New York, N.Y.)* 291 (5512): 2357-64. <https://doi.org/10.1126/science.1059820>.
- Bhattacharjee, Sourav. 2016. « DLS and Zeta Potential - What They Are and What They Are Not? » *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 235 (août):337-51. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>.
- Binh, Nguyen Huy, Kunio Satoh, Kazuhiro Kobayashi, Manabu Takamatsu, Yuichiro Hatano, Akihiro Hirata, Hiroyuki Tomita, Toshiya Kuno, et Akira Hara. 2013. « Galectin-3 in Preneoplastic Lesions of Glioma ». *Journal of Neuro-Oncology* 111 (2): 123-32. <https://doi.org/10.1007/s11060-012-1005-2>.

- Binnewies, Mikhail, Edward W. Roberts, Kelly Kersten, Vincent Chan, Douglas F. Fearon, Miriam Merad, Lisa M. Coussens, et al. 2018. « Understanding the Tumor Immune Microenvironment (TIME) for Effective Therapy ». *Nature Medicine* 24 (5): 541-50. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0014-x>.
- Blakney, Anna K., Paul F. McKay, Bárbara Ibarzo Yus, Yoann Aldon, et Robin J. Shattock. 2019. « Inside out: Optimization of Lipid Nanoparticle Formulations for Exterior Complexation and in Vivo Delivery of saRNA ». *Gene Therapy* 26 (9): 363-72. <https://doi.org/10.1038/s41434-019-0095-2>.
- Blasco, Maria A. 2005. « Telomeres and Human Disease: Ageing, Cancer and Beyond ». *Nature Reviews. Genetics* 6 (8): 611-22. <https://doi.org/10.1038/nrg1656>.
- Brenner, Andrew J., Ande Bao, William Phillips, Gregory Stein, Vibhudutta Awasthi, Toral R. Patel, Jeffrey Weinberg, et John Floyd. 2021. « Safety and feasibility of rhenium-186 nanoliposome (186RNL) in recurrent glioma: The ReSPECT phase 1 trial. » *Journal of Clinical Oncology* 39 (15_suppl): 2061-2061. https://doi.org/10.1200/JCO.2021.39.15_suppl.2061.
- Bros, Matthias, Katharina Haas, Lorna Moll, et Stephan Grabbe. 2019. « RhoA as a Key Regulator of Innate and Adaptive Immunity ». *Cells* 8 (7): E733. <https://doi.org/10.3390/cells8070733>.
- Burg, Sjoerd H. van der, Ramon Arens, Ferry Ossendorp, Thorbald van Hall, et Cornelis J. M. Melief. 2016. « Vaccines for Established Cancer: Overcoming the Challenges Posed by Immune Evasion ». *Nature Reviews. Cancer* 16 (4): 219-33. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.16>.
- Burkhart, Deborah L., et Julien Sage. 2008. « Cellular Mechanisms of Tumour Suppression by the Retinoblastoma Gene ». *Nature Reviews. Cancer* 8 (9): 671-82. <https://doi.org/10.1038/nrc2399>.
- Byrd, Allyson L., Menghan Liu, Kei E. Fujimura, Svetlana Lyalina, Deepti R. Nagarkar, Bruno Charbit, Jacob Bergstedt, et al. 2021. « Gut Microbiome Stability and Dynamics in Healthy Donors and Patients with Non-Gastrointestinal Cancers ». *The Journal of Experimental Medicine* 218 (1): e20200606. <https://doi.org/10.1084/jem.20200606>.
- Cachia, David, Ramin Eskandari, Daniel G. McDonald, Libby Kosnik Infinger, William A. Vandergrift, Abhay K. Varma, Sunil J. Patel, Alicia M. Zukas, Scott M. Lindhorst, et Arabinda Das. 2023. « Low-Dose Radiation Followed by on-Target Inhibition of Galectin-3 in Combination with Anti-4-1BB Monoclonal Antibody Regulates Immune Responses in Group 3 and Group 4 Medulloblastoma Mouse Model (P11-13.001) ». *Neurology* 100 (17 Supplement 2). <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000203573>.
- Cagnoni, Alejandro J., María Laura Giribaldi, Ada G. Blidner, Anabela M. Cutine, Sabrina G. Gatto, Rosa M. Morales, Mariana Salatino, et al. 2021. « Galectin-1 Fosters an Immunosuppressive Microenvironment in Colorectal Cancer by Reprogramming CD8+ Regulatory T Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*

States of America 118 (21): e2102950118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2102950118>.

- Cai, Xiaoxia, Qingxia Zhu, Yun Zeng, Qi Zeng, Xueli Chen, et Yonghua Zhan. 2019. « Manganese Oxide Nanoparticles As MRI Contrast Agents In Tumor Multimodal Imaging And Therapy ». *International Journal of Nanomedicine* 14:8321-44. <https://doi.org/10.2147/IJN.S218085>.
- Camby, I., N. Belot, S. Rorive, F. Lefranc, C. A. Maurage, H. Lahm, H. Kaltner, et al. 2001. « Galectins Are Differentially Expressed in Supratentorial Pilocytic Astrocytomas, Astrocytomas, Anaplastic Astrocytomas and Glioblastomas, and Significantly Modulate Tumor Astrocyte Migration ». *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)* 11 (1): 12-26. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2001.tb00377.x>.
- Camby, Isabelle, Nathalie Belot, Florence Lefranc, Niloufar Sadeghi, Yvan de Launoit, Herbert Kaltner, Sophie Musette, et al. 2002. « Galectin-1 Modulates Human Glioblastoma Cell Migration into the Brain Through Modifications to the Actin Cytoskeleton and Levels of Expression of Small GTPases ». *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 61 (7): 585-96. <https://doi.org/10.1093/jnen/61.7.585>.
- Camby, Isabelle, Christine Decaestecker, Florence Lefranc, Herbert Kaltner, Hans-Joachim Gabius, et Robert Kiss. 2005. « Galectin-1 Knocking down in Human U87 Glioblastoma Cells Alters Their Gene Expression Pattern ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 335 (1): 27-35. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.07.037>.
- Cao, Ye, Yang Fei Tan, Yee Shan Wong, Muhammad Aminuddin, Bhuthalingam Ramya, Melvin Wen Jie Liew, Jiaxin Liu, et Subbu S. Venkatraman. 2022. « Designing siRNA/Chitosan-Methacrylate Complex Nanolipogel for Prolonged Gene Silencing Effects ». *Scientific Reports* 12 (1): 3527. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07554-0>.
- Capalbo, Carlo, Marco Filetti, Giorgia Scafetta, Paolo Marchetti, et Armando Bartolazzi. 2019. « Galectins role as predictive markers for anti-PD-1-based immunotherapy in non-small cell lung cancer. » *Journal of Clinical Oncology* 37 (8_suppl): 111-111. https://doi.org/10.1200/JCO.2019.37.8_suppl.111.
- Cappell, Kathryn M., et James N. Kochenderfer. 2023. « Long-Term Outcomes Following CAR T Cell Therapy: What We Know so Far ». *Nature Reviews Clinical Oncology* 20 (6): 359-71. <https://doi.org/10.1038/s41571-023-00754-1>.
- Cárcamo, Claudia, Evelyn Pardo, Claudia Oyanadel, Marcela Bravo-Zehnder, Paulina Bull, Mónica Cáceres, Jorge Martínez, et al. 2006. « Galectin-8 Binds Specific Beta1 Integrins and Induces Polarized Spreading Highlighted by Asymmetric Lamellipodia in Jurkat T Cells ». *Experimental Cell Research* 312 (4): 374-86. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.10.025>.
- Carmeliet, Peter. 2005. « VEGF as a Key Mediator of Angiogenesis in Cancer ». *Oncology* 69 Suppl 3:4-10. <https://doi.org/10.1159/000088478>.
- Cavallaro, Ugo, et Gerhard Christofori. 2004. « Cell Adhesion and Signalling by Cadherins and

- Ig-CAMs in Cancer ». *Nature Reviews. Cancer* 4 (2): 118-32.
<https://doi.org/10.1038/nrc1276>.
- Chan, Yi-Chen, Hsien-Ya Lin, Zhijay Tu, Yen-Hsi Kuo, Shang-Te Danny Hsu, et Chun-Hung Lin. 2018. « Dissecting the Structure–Activity Relationship of Galectin–Ligand Interactions ». *International Journal of Molecular Sciences* 19 (2): 392.
<https://doi.org/10.3390/ijms19020392>.
- Chen, Apeng, Yinan Jiang, Zhengwei Li, Lingxiang Wu, Ulises Santiago, Han Zou, Chunhui Cai, et al. 2021. « Chitinase-3-like 1 Protein Complexes Modulate Macrophage-Mediated Immune Suppression in Glioblastoma ». *The Journal of Clinical Investigation* 131 (16).
<https://doi.org/10.1172/JCI147552>.
- Chen, Ivy X., Vikash P. Chauhan, Jessica Posada, Mei R. Ng, Michelle W. Wu, Pichet Adstamongkonkul, Peigen Huang, Neal Lindeman, Robert Langer, et Rakesh K. Jain. 2019. « Blocking CXCR4 Alleviates Desmoplasia, Increases T-Lymphocyte Infiltration, and Improves Immunotherapy in Metastatic Breast Cancer ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116 (10): 4558-66.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1815515116>.
- Chen, P. L., Y. M. Chen, R. Bookstein, et W. H. Lee. 1990. « Genetic Mechanisms of Tumor Suppression by the Human P53 Gene ». *Science (New York, N.Y.)* 250 (4987): 1576-80.
<https://doi.org/10.1126/science.2274789>.
- Chen, Qun, Bo Han, Xiangqi Meng, Chunbin Duan, Changxiao Yang, Zhenyu Wu, Dinislam Magafurov, et al. 2019. « Immunogenomic Analysis Reveals LGALS1 Contributes to the Immune Heterogeneity and Immunosuppression in Glioma ». *International Journal of Cancer* 145 (2): 517-30. <https://doi.org/10.1002/ijc.32102>.
- Chen, Ricky, Matthew Smith-Cohn, Adam L. Cohen, et Howard Colman. 2017. « Glioma Subclassifications and Their Clinical Significance ». *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 14 (2): 284-97.
<https://doi.org/10.1007/s13311-017-0519-x>.
- Cheng, Zhe, Maoyu Li, Raja Dey, et Yongheng Chen. 2021. « Nanomaterials for cancer therapy: current progress and perspectives ». *Journal of Hematology & Oncology* 14 (mai):85. <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01096-0>.
- Choi, Gyeyoung, Gyeongseon Shin, et SeungJin Bae. 2022. « Price and Prejudice? The Value of Chimeric Antigen Receptor (CAR) T-Cell Therapy ». *International Journal of Environmental Research and Public Health* 19 (19): 12366.
<https://doi.org/10.3390/ijerph191912366>.
- Chou, Shang-Yu, Shao-Lun Yen, Chao-Cheng Huang, et Eng-Yen Huang. 2018. « Galectin-1 Is a Poor Prognostic Factor in Patients with Glioblastoma Multiforme after Radiotherapy ». *BMC Cancer* 18 (1): 105. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4025-2>.
- Chung, Ling-Yen, Shye-Jye Tang, Guang-Huan Sun, Teh-Ying Chou, Tien-Shun Yeh, Sung-

- Liang Yu, et Kuang-Hui Sun. 2012. « Galectin-1 Promotes Lung Cancer Progression and Chemoresistance by Upregulating P38 MAPK, ERK, and Cyclooxygenase-2 ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 18 (15): 4037-47. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-3348>.
- Clogston, Jeffrey D., et Anil K. Patri. 2011. « Zeta Potential Measurement ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 697:63-70. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-198-1_6.
- Coley, William B. 1936. « The Diagnosis and Treatment of Bone Sarcoma *Delivered before the University of Glasgow, 15th October, 1935. ». *Glasgow Medical Journal* 126 (2): 49-86.
- Correia, Ana Luísa, Joao C. Guimaraes, Priska Auf der Maur, Duvini De Silva, Marcel P. Trefny, Ryoko Okamoto, Sandro Bruno, et al. 2021. « Hepatic Stellate Cells Suppress NK Cell-Sustained Breast Cancer Dormancy ». *Nature* 594 (7864): 566-71. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03614-z>.
- Crowe, Tyler P., M. Heather West Greenlee, Anumantha G. Kanthasamy, et Walter H. Hsu. 2018. « Mechanism of Intranasal Drug Delivery Directly to the Brain ». *Life Sciences* 195 (février):44-52. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.12.025>.
- Cruz-Leal, Yoelys, María Fernanda Lucatelli Laurindo, Lika Osugui, María Del Carmen Luzardo, Alejandro López-Requena, María Eugenia Alonso, Carlos Álvarez, et al. 2014. « Liposomes of Phosphatidylcholine and Cholesterol Induce an M2-like Macrophage Phenotype Reprogrammable to M1 Pattern with the Involvement of B-1 Cells ». *Immunobiology* 219 (6): 403-15. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2014.01.006>.
- Curti, Brendan D., Yoshinobu Koguchi, Rom S. Leidner, Annah S. Rolig, Elizabeth R. Sturgill, Zhaoyu Sun, Yaping Wu, et al. 2021. « Enhancing Clinical and Immunological Effects of Anti-PD-1 with Belapectin, a Galectin-3 Inhibitor ». *Journal for Immunotherapy of Cancer* 9 (4): e002371. <https://doi.org/10.1136/jitc-2021-002371>.
- D'Abaco, Giovanna M., et Andrew H. Kaye. 2007. « Integrins: Molecular Determinants of Glioma Invasion ». *Journal of Clinical Neuroscience: Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia* 14 (11): 1041-48. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2007.06.019>.
- Dams, E. T., P. Laverman, W. J. Oyen, G. Storm, G. L. Scherphof, J. W. van Der Meer, F. H. Corstens, et O. C. Boerman. 2000. « Accelerated Blood Clearance and Altered Biodistribution of Repeated Injections of Sterically Stabilized Liposomes ». *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 292 (3): 1071-79.
- Danaei, M., M. Dehghankhold, S. Ataei, F. Hasanzadeh Davarani, R. Javanmard, A. Dokhani, S. Khorasani, et M. R. Mozafari. 2018. « Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems ». *Pharmaceutics* 10 (2): 57. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>.

- Danhier, Fabienne, Khaled Messaoudi, Laurent Lemaire, Jean-Pierre Benoit, et Frédéric Lagarce. 2015. « Combined Anti-Galectin-1 and Anti-EGFR siRNA-Loaded Chitosan-Lipid Nanocapsules Decrease Temozolomide Resistance in Glioblastoma: In Vivo Evaluation ». *International Journal of Pharmaceutics* 481 (1-2): 154-61. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.01.051>.
- Dautry, François, Carole Ribet, et Maria-Antonietta Buccheri. 2007. « [RNA interference in mammalian cells] ». *Journal De La Societe De Biologie* 201 (4): 339-48. <https://doi.org/10.1051/jbio:2007904>.
- Davar, Diwakar, Amiran K. Dzutsev, John A. McCulloch, Richard R. Rodrigues, Joe-Marc Chauvin, Robert M. Morrison, Richelle N. Deblasio, et al. 2021. « Fecal Microbiota Transplant Overcomes Resistance to Anti-PD-1 Therapy in Melanoma Patients ». *Science (New York, N.Y.)* 371 (6529): 595-602. <https://doi.org/10.1126/science.abf3363>.
- Demel, R. A., S. C. Kinsky, C. B. Kinsky, et L. L. van Deenen. 1968. « Effects of Temperature and Cholesterol on the Glucose Permeability of Liposomes Prepared with Natural and Synthetic Lecithins ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 150 (4): 655-65. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(68\)90055-2](https://doi.org/10.1016/0005-2736(68)90055-2).
- Demotte, Nathalie, Grégoire Wieërs, Patrick Van Der Smissen, Muriel Moser, Christopher Schmidt, Kris Thielemans, Jean-Luc Squifflet, et al. 2010. « A Galectin-3 Ligand Corrects the Impaired Function of Human CD4 and CD8 Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Favors Tumor Rejection in Mice ». *Cancer Research* 70 (19): 7476-88. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0761>.
- Derosiers, Nohelly, William Aguilar, David A. DeGaramo, et Avery D. Posey Jr. 2022. « Sweet Immune Checkpoint Targets to Enhance T Cell Therapy ». *The Journal of Immunology* 208 (2): 278-85. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2100706>.
- Ding, Haiying, Wenxiu Xin, Yinghui Tong, Jiao Sun, Gaoqi Xu, Ziqi Ye, et Yuefeng Rao. 2020. « Cost Effectiveness of Immune Checkpoint Inhibitors for Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer: A Systematic Review ». *PLoS ONE* 15 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238536>.
- Dong, Cheng-Yuan, Sheng Hong, Di-Wei Zheng, Qian-Xiao Huang, Fu-Sheng Liu, Zhen-Lin Zhong, et Xian-Zheng Zhang. 2021. « Multifunctionalized Gold Sub-Nanometer Particles for Sensitizing Radiotherapy against Glioblastoma ». *Small (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)* 17 (5): e2006582. <https://doi.org/10.1002/sml.202006582>.
- Dunbar, Cynthia E., Katherine A. High, J. Keith Joung, Donald B. Kohn, Keiya Ozawa, et Michel Sadelain. 2018. « Gene therapy comes of age ». *Science* 359 (6372): eaan4672. <https://doi.org/10.1126/science.aan4672>.
- Dzutsev, Amiran, Jonathan H. Badger, Ernesto Perez-Chanona, Soumen Roy, Rosalba Salcedo, Carolyne K. Smith, et Giorgio Trinchieri. 2017. « Microbes and Cancer ». *Annual Review of Immunology* 35 (avril): 199-228. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052133>.

- Elbashir, Sayda M., Jens Harborth, Winfried Lendeckel, Abdullah Yalcin, Klaus Weber, et Thomas Tuschl. 2001. « Duplexes of 21-Nucleotide RNAs Mediate RNA Interference in Cultured Mammalian Cells ». *Nature* 411 (6836): 494-98. <https://doi.org/10.1038/35078107>.
- Enninga, Elizabeth Ann L., Wendy K. Nevala, Shernan G. Holtan, Alexey A. Leontovich, et Svetomir N. Markovic. 2016. « Galectin-9 modulates immunity by promoting Th2/M2 differentiation and impacts survival in patients with metastatic melanoma ». *Melanoma research* 26 (5): 429-41. <https://doi.org/10.1097/CMR.0000000000000281>.
- Eto, K., W. Puzon-McLaughlin, D. Sheppard, A. Sehara-Fujisawa, X. P. Zhang, et Y. Takada. 2000. « RGD-Independent Binding of Integrin Alpha9beta1 to the ADAM-12 and -15 Disintegrin Domains Mediates Cell-Cell Interaction ». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (45): 34922-30. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001953200>.
- « Explainer: What's behind FDA's Concern That a Cancer-Fighting Cell Therapy Can Also Cause the Disease? » s. d. Consulté le 27 décembre 2023. <https://www.science.org/content/article/explainer-what-s-behind-fda-s-concern-cancer-fighting-cell-therapy-can-also-cause>.
- Faget, Douglas V., Qihao Ren, et Sheila A. Stewart. 2019. « Unmasking Senescence: Context-Dependent Effects of SASP in Cancer ». *Nature Reviews. Cancer* 19 (8): 439-53. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0156-2>.
- Fang, Chen, Kui Wang, Zachary R. Stephen, Qingxin Mu, Forrest M. Kievit, Daniel T. Chiu, Oliver W. Press, et Miqin Zhang. 2015. « Temozolomide Nanoparticles for Targeted Glioblastoma Therapy ». *ACS Applied Materials & Interfaces* 7 (12): 6674-82. <https://doi.org/10.1021/am5092165>.
- Fecci, Peter E., et John H. Sampson. 2019. « The Current State of Immunotherapy for Gliomas: An Eye toward the Future ». *Journal of Neurosurgery* 131 (3): 657-66. <https://doi.org/10.3171/2019.5.JNS181762>.
- Feig, Christine, James O. Jones, Matthew Kraman, Richard J. B. Wells, Andrew Deonarine, Derek S. Chan, Claire M. Connell, et al. 2013. « Targeting CXCL12 from FAP-Expressing Carcinoma-Associated Fibroblasts Synergizes with Anti-PD-L1 Immunotherapy in Pancreatic Cancer ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (50): 20212-17. <https://doi.org/10.1073/pnas.1320318110>.
- Feng, Qishuai, Yajing Shen, Yingjie Fu, Megan E. Muroski, Peng Zhang, Qiaoyue Wang, Chang Xu, Maciej S. Lesniak, Gang Li, et Yu Cheng. 2017. « Self-Assembly of Gold Nanoparticles Shows Microenvironment-Mediated Dynamic Switching and Enhanced Brain Tumor Targeting ». *Theranostics* 7 (7): 1875-89. <https://doi.org/10.7150/thno.18985>.
- Ferragut, F., A. J. Cagnoni, L. L. Colombo, C. Sánchez Terrero, C. Wolfenstein-Todel, M. F. Troncoso, S. I. Vanzulli, G. A. Rabinovich, K. V. Mariño, et M. T. Elola. 2019. « Dual knockdown of Galectin-8 and its glycosylated ligand, the activated leukocyte cell

adhesion molecule (ALCAM/CD166), synergistically delays in vivo breast cancer growth ». *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2019.03.010>.

Ferrara, Napoleone. 2009. « Vascular Endothelial Growth Factor ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 29 (6): 789-91.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.179663>.

Ferrari, Mauro. 2005. « Cancer Nanotechnology: Opportunities and Challenges ». *Nature Reviews Cancer* 5 (3): 161-71. <https://doi.org/10.1038/nrc1566>.

Feynman, Richard. 2002. « There's Plenty of Room at the Bottom ». In *Feynman And Computation*. CRC Press.

Filipe, Vasco, Andrea Hawe, et Wim Jiskoot. 2010. « Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates ». *Pharmaceutical Research* 27 (5): 796.
<https://doi.org/10.1007/s11095-010-0073-2>.

Fisher, R., L. Pusztai, et C. Swanton. 2013. « Cancer Heterogeneity: Implications for Targeted Therapeutics ». *British Journal of Cancer* 108 (3): 479-85.
<https://doi.org/10.1038/bjc.2012.581>.

Fortin, Shannon, Marie Le Mercier, Isabelle Camby, Sabine Spiegl-Kreinecker, Walter Berger, Florence Lefranc, et Robert Kiss. 2010. « Galectin-1 Is Implicated in the Protein Kinase C ϵ /Vimentin-Controlled Trafficking of Integrin- β 1 in Glioblastoma Cells ». *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)* 20 (1): 39-49. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2008.00227.x>.

Fortuna-Costa, Anneliese, Angélica M. Gomes, Eliene O. Kozlowski, Mariana P. Stelling, et Mauro S. G. Pavão. 2014. « Extracellular Galectin-3 in Tumor Progression and Metastasis ». *Frontiers in Oncology* 4:138. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00138>.

Fourcade, Julien, Zhaojun Sun, Mourad Benallaoua, Philippe Guillaume, Immanuel F. Luescher, Cindy Sander, John M. Kirkwood, Vijay Kuchroo, et Hassane M. Zarour. 2010. « Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen-specific CD8⁺ T cell dysfunction in melanoma patients ». *The Journal of Experimental Medicine* 207 (10): 2175-86. <https://doi.org/10.1084/jem.20100637>.

Friedman, Claire F., Tracy A. Proverbs-Singh, et Michael A. Postow. 2016. « Treatment of the Immune-Related Adverse Effects of Immune Checkpoint Inhibitors: A Review ». *JAMA Oncology* 2 (10): 1346-53. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.1051>.

Fukumori, Tomoharu, Yukinori Takenaka, Natsuo Oka, Tadashi Yoshii, Victor Hogan, Hidenori Inohara, Hiro-Omi Kanayama, Hyeong-Reh Choi Kim, et Avraham Raz. 2004. « Endogenous Galectin-3 Determines the Routing of CD95 Apoptotic Signaling Pathways ». *Cancer Research* 64 (10): 3376-79. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0336>.

- Fynan, T. M., et M. Reiss. 1993. « Resistance to Inhibition of Cell Growth by Transforming Growth Factor-Beta and Its Role in Oncogenesis ». *Critical Reviews in Oncogenesis* 4 (5): 493-540.
- Gameiro, Paulo A., et Kevin Struhl. 2018. « Nutrient Deprivation Elicits a Transcriptional and Translational Inflammatory Response Coupled to Decreased Protein Synthesis ». *Cell Reports* 24 (6): 1415-24. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.07.021>.
- Gao, Jie, et Wenying Wang. 2019. « Knockdown of Galectin-1 Facilitated Cisplatin Sensitivity by Inhibiting Autophagy in Neuroblastoma Cells ». *Chemico-Biological Interactions* 297 (janvier):50-56. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.10.014>.
- Gauthier, Laurent, Benjamin Rossi, Florence Roux, Elise Termine, et Claudine Schiff. 2002. « Galectin-1 Is a Stromal Cell Ligand of the Pre-B Cell Receptor (BCR) Implicated in Synapse Formation between Pre-B and Stromal Cells and in Pre-BCR Triggering ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (20): 13014-19. <https://doi.org/10.1073/pnas.202323999>.
- Golden-Mason, Lucy, Rachel H. McMahan, Michael Strong, Richard Reisdorph, Spencer Mahaffey, Brent E. Palmer, Linling Cheng, et al. 2013. « Galectin-9 Functionally Impairs Natural Killer Cells in Humans and Mice ». *Journal of Virology* 87 (9): 4835-45. <https://doi.org/10.1128/JVI.01085-12>.
- Gordon-Alonso, Monica, Annika M. Bruger, et Pierre van der Bruggen. 2018. « Extracellular galectins as controllers of cytokines in hematological cancer ». *Blood* 132 (5): 484-91. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-04-846014>.
- Gordon-Alonso, Monica, Thibault Hirsch, Claude Wildmann, et Pierre van der Bruggen. 2017. « Galectin-3 Captures Interferon-Gamma in the Tumor Matrix Reducing Chemokine Gradient Production and T-Cell Tumor Infiltration ». *Nature Communications* 8 (1): 793. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00925-6>.
- Goyard, D., T. C. Shiao, N. L. Fraleigh, H.-Y. Vu, H. Lee, F. Diaz-Mitoma, H.-T. Le, et R. Roy. 2016. « Expedient Synthesis of Functional Single-Component Glycoliposomes Using Thiol–Yne Chemistry ». *Journal of Materials Chemistry B* 4 (23): 4227-33. <https://doi.org/10.1039/C6TB00344C>.
- Griffin, Matthew E., Juliell Espinosa, Jessica L. Becker, Ji-Dung Luo, Thomas S. Carroll, Jyoti K. Jha, Gary R. Fanger, et Howard C. Hang. 2021. « Enterococcus Peptidoglycan Remodeling Promotes Checkpoint Inhibitor Cancer Immunotherapy ». *Science (New York, N.Y.)* 373 (6558): 1040-46. <https://doi.org/10.1126/science.abc9113>.
- Grochans, Szymon, Anna Maria Cybulska, Donata Simińska, Jan Korbecki, Klaudyna Kojder, Dariusz Chlubek, et Irena Baranowska-Bosiacka. 2022. « Epidemiology of Glioblastoma Multiforme—Literature Review ». *Cancers* 14 (10): 2412. <https://doi.org/10.3390/cancers14102412>.
- Grozdanovic, Milica M., Christine B. Doyle, Li Liu, Brian Maybruck, Mark A. Kwatia, Nethaji

- Thiyagarajan, K. Ravi Acharya, et Steven J. Ackerman. 2020. « Charcot-Leyden Crystal Protein/Galectin-10 Interacts with Cationic Ribonucleases and is Required for Eosinophil Granulogenesis ». *The Journal of allergy and clinical immunology* 146 (2): 377-389.e10. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.01.013>.
- Guda, Maheedhara R., Andrew J. Tsung, Swapna Asuthkar, et Kiran K. Velpula. 2022. « Galectin-1 Activates Carbonic Anhydrase IX and Modulates Glioma Metabolism ». *Cell Death & Disease* 13 (6): 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-05024-z>.
- Gumustas, Mehmet, Ceyda T. Sengel-Turk, Aysen Gumustas, Sibel A. Ozkan, et Bengi Uslu. 2017. « Chapter 5 - Effect of Polymer-Based Nanoparticles on the Assay of Antimicrobial Drug Delivery Systems ». In *Multifunctional Systems for Combined Delivery, Biosensing and Diagnostics*, édité par Alexandru Mihai Grumezescu, 67-108. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-52725-5.00005-8>.
- Guo, Xing Rong, Mu Yu Wu, Long Jun Dai, Yu Huang, Meng Ye Shan, Shi Nan Ma, Jue Wang, et al. 2019. « Nuclear FAM289-Galectin-1 interaction controls FAM289-mediated tumor promotion in malignant glioma ». *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 38 (1): 394. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1393-7>.
- Hald Albertsen, Camilla, Jayesh A. Kulkarni, Dominik Witzigmann, Marianne Lind, Karsten Petersson, et Jens B. Simonsen. 2022. « The role of lipid components in lipid nanoparticles for vaccines and gene therapy ». *Advanced Drug Delivery Reviews* 188 (septembre):114416. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2022.114416>.
- Han, Liang. 2021. « Modulation of the Blood–Brain Barrier for Drug Delivery to Brain ». *Pharmaceutics* 13 (12): 2024. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13122024>.
- Hanahan, D., et J. Folkman. 1996. « Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis ». *Cell* 86 (3): 353-64. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80108-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80108-7).
- Hanahan, D., et R. A. Weinberg. 2000. « The Hallmarks of Cancer ». *Cell* 100 (1): 57-70. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9).
- Hanahan, Douglas. 2022. « Hallmarks of Cancer: New Dimensions ». *Cancer Discovery* 12 (1): 31-46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>.
- Hanahan, Douglas, et Robert A. Weinberg. 2011. « Hallmarks of Cancer: The Next Generation ». *Cell* 144 (5): 646-74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- Hata, Nobuhiro, Masahiro Mizoguchi, Daisuke Kuga, Ryusuke Hatae, Yojiro Akagi, Yuhei Sangatsuda, Takeo Amemiya, et al. 2020. « First-line bevacizumab contributes to survival improvement in glioblastoma patients complementary to temozolomide ». *Journal of Neuro-Oncology* 146 (3): 451-58. <https://doi.org/10.1007/s11060-019-03339-0>.
- He, Xia, Sunfu Zhang, Junchen Chen, et Dekang Li. 2019. « Increased LGALS3 Expression

- Independently Predicts Shorter Overall Survival in Patients with the Proneural Subtype of Glioblastoma ». *Cancer Medicine* 8 (5): 2031-40. <https://doi.org/10.1002/cam4.2075>.
- He, Xing, et Chenqi Xu. 2020. « Immune checkpoint signaling and cancer immunotherapy ». *Cell Research* 30 (8): 660-69. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0343-4>.
- Helmink, Beth A., M. A. Wadud Khan, Amanda Hermann, Vancheswaran Gopalakrishnan, et Jennifer A. Wargo. 2019. « The Microbiome, Cancer, and Cancer Therapy ». *Nature Medicine* 25 (3): 377-88. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0377-7>.
- Hu, Wan-Ming, Yuan-Zhong Yang, Tian-Zhi Zhang, Chang-Fei Qin, et Xue-Nong Li. 2020. « LGALS3 Is a Poor Prognostic Factor in Diffusely Infiltrating Gliomas and Is Closely Correlated With CD163+ Tumor-Associated Macrophages ». *Frontiers in Medicine* 7 (mai):182. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.00182>.
- Huang, Jia-Lin, Gan Jiang, Qing-Xiang Song, Xiao Gu, Meng Hu, Xiao-Lin Wang, Hua-Hua Song, et al. 2017. « Lipoprotein-Biomimetic Nanostructure Enables Efficient Targeting Delivery of siRNA to Ras-Activated Glioblastoma Cells via Macropinocytosis ». *Nature Communications* 8 (1): 15144. <https://doi.org/10.1038/ncomms15144>.
- Huang, Yuanyu, Shuquan Zheng, Zhaoxu Guo, Xavier de Mollerat du Jeu, Xing-Jie Liang, Zhiwei Yang, Hong-Yan Zhang, Shan Gao, et Zicai Liang. 2022. « Ionizable Liposomal siRNA Therapeutics Enables Potent and Persistent Treatment of Hepatitis B ». *Signal Transduction and Targeted Therapy* 7 (1): 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00859-y>.
- Ikemori, Rafael Yamashita, Camila Maria Longo Machado, Karina Mie Furuzawa, Suely Nonogaki, Eduardo Osinaga, Kazuo Umezawa, Marcelo Alex de Carvalho, Liana Verinaud, et Roger Chammas. 2014. « Galectin-3 up-Regulation in Hypoxic and Nutrient Deprived Microenvironments Promotes Cell Survival ». *PloS One* 9 (11): e111592. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111592>.
- Ikushima, Hiroaki, et Kohei Miyazono. 2010. « TGFbeta Signalling: A Complex Web in Cancer Progression ». *Nature Reviews. Cancer* 10 (6): 415-24. <https://doi.org/10.1038/nrc2853>.
- Inglut, Collin T., Aaron J. Sorrin, Thilinie Kuruppu, Shruti Vig, Julia Cicalo, Haroon Ahmad, et Huang-Chiao Huang. 2020. « Immunological and Toxicological Considerations for the Design of Liposomes ». *Nanomaterials* 10 (2): 190. <https://doi.org/10.3390/nano10020190>.
- Irache, Juan M, Hesham H Salman, Carlos Gamazo, et Socorro Espuelas. 2008. « Mannose-targeted systems for the delivery of therapeutics ». *Expert Opinion on Drug Delivery* 5 (6): 703-24. <https://doi.org/10.1517/17425247.5.6.703>.
- « ISO 13321:1996(en), Particle size analysis — Photon correlation spectroscopy ». s. d. Consulté le 14 janvier 2023. <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:13321:ed-1:v1:en:sec:2.2>.

- « ISO 22412:2008(en), Particle size analysis — Dynamic light scattering (DLS) ». s. d.
Consulté le 14 janvier 2023. <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:22412:ed-1:v1:en>.
- Jandrey, Elisa Helena Farias, Marcelle Bezerra, Lilian Tiemi Inoue, Frank B. Furnari, Anamaria Aranha Camargo, et Érico Tosoni Costa. 2021. « A Key Pathway to Cancer Resilience: The Role of Autophagy in Glioblastomas ». *Frontiers in Oncology* 11:652133.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2021.652133>.
- Janku, Filip. 2014. « Tumor heterogeneity in the clinic: is it a real problem? » *Therapeutic Advances in Medical Oncology* 6 (2): 43-51. <https://doi.org/10.1177/1758834013517414>.
- Jiang, Xianjie, Jie Wang, Xiangying Deng, Fang Xiong, Junshang Ge, Bo Xiang, Xu Wu, et al. 2019. « Role of the tumor microenvironment in PD-L1/PD-1-mediated tumor immune escape ». *Molecular Cancer* 18 (1): 10. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0928-4>.
- Jones, Joshua H., et Richard D. Minshall. 2022. « Endothelial Transcytosis in Acute Lung Injury: Emerging Mechanisms and Therapeutic Approaches ». *Frontiers in Physiology* 13 (mars):828093. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.828093>.
- Jung, Tae-Young, Shin Jung, Hyang-Hwa Ryu, Young-Il Jeong, Yong-Hao Jin, Shu-Guang Jin, In-Young Kim, Sam-Suk Kang, et Hyung-Seok Kim. 2008. « Role of Galectin-1 in Migration and Invasion of Human Glioblastoma Multiforme Cell Lines ». *Journal of Neurosurgery* 109 (2): 273-84. <https://doi.org/10.3171/JNS/2008/109/8/0273>.
- Kadry, Hossam, Behnam Noorani, et Luca Cucullo. 2020. « A blood–brain barrier overview on structure, function, impairment, and biomarkers of integrity ». *Fluids and Barriers of the CNS* 17 (1): 69. <https://doi.org/10.1186/s12987-020-00230-3>.
- Kanasty, Rosemary, Joseph Robert Dorkin, Arturo Vegas, et Daniel Anderson. 2013. « Delivery Materials for siRNA Therapeutics ». *Nature Materials* 12 (11): 967-77.
<https://doi.org/10.1038/nmat3765>.
- Kang, Ji Hee, Woo Young Jang, et Young Tag Ko. 2017. « The Effect of Surface Charges on the Cellular Uptake of Liposomes Investigated by Live Cell Imaging ». *Pharmaceutical Research* 34 (4): 704-17. <https://doi.org/10.1007/s11095-017-2097-3>.
- Karsy, Michael, Nam Yoon, Lillian Boettcher, Randy Jensen, Lubdha Shah, Joel MacDonald, et Sarah T. Menacho. 2018. « Surgical Treatment of Glioblastoma in the Elderly: The Impact of Complications ». *Journal of Neuro-Oncology* 138 (1): 123-32.
<https://doi.org/10.1007/s11060-018-2777-9>.
- Kasai, K., et J. Hirabayashi. 1996. « Galectins: A Family of Animal Lectins That Decipher Glycocodes ». *Journal of Biochemistry* 119 (1): 1-8.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021192>.
- Kessenbrock, Kai, Vicki Plaks, et Zena Werb. 2010. « Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment ». *Cell* 141 (1): 52-67.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.015>.

- Khalil, Danny N., Eric L. Smith, Renier J. Brentjens, et Jedd D. Wolchok. 2016. « The Future of Cancer Treatment: Immunomodulation, CARs and Combination Immunotherapy ». *Nature Reviews Clinical Oncology* 13 (5): 273-90. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.25>.
- Khan, Meshaal, Ajay V. Maker, et Shikha Jain. 2021. « The Evolution of Cancer Immunotherapy ». *Vaccines* 9 (6): 614. <https://doi.org/10.3390/vaccines9060614>.
- Kiessling, L. L., J. E. Gestwicki, et L. E. Strong. 2000. « Synthetic Multivalent Ligands in the Exploration of Cell-Surface Interactions ». *Current Opinion in Chemical Biology* 4 (6): 696-703. [https://doi.org/10.1016/s1367-5931\(00\)00153-8](https://doi.org/10.1016/s1367-5931(00)00153-8).
- Kinnear, Calum, Thomas L. Moore, Laura Rodriguez-Lorenzo, Barbara Rothen-Rutishauser, et Alke Petri-Fink. 2017. « Form Follows Function: Nanoparticle Shape and Its Implications for Nanomedicine ». *Chemical Reviews* 117 (17): 11476-521. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00194>.
- Knudsen, Arnon Møldrup, Sisse Josephine Rudkjøbing, Mia Dahl Sørensen, Rikke Hedegaard Dahlrot, et Bjarne Winther Kristensen. 2021. « Expression and Prognostic Value of the Immune Checkpoints Galectin-9 and PD-L1 in Glioblastomas ». *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 80 (6): 541-51. <https://doi.org/10.1093/jnen/nlab041>.
- Kondo, Yasuko, Takao Kanzawa, Raymond Sawaya, et Seiji Kondo. 2005. « The Role of Autophagy in Cancer Development and Response to Therapy ». *Nature Reviews. Cancer* 5 (9): 726-34. <https://doi.org/10.1038/nrc1692>.
- Kuhn, Nicholas F., Terence J. Purdon, Dayenne G. van Leeuwen, Andrea V. Lopez, Kevin J. Curran, Anthony F. Daniyan, et Renier J. Brentjens. 2019. « CD40 Ligand-Modified Chimeric Antigen Receptor T Cells Enhance Antitumor Function by Eliciting an Endogenous Antitumor Response ». *Cancer Cell* 35 (3): 473-488.e6. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.02.006>.
- Kumar, Vivek, Neha Chaudhary, Mohit Garg, Charalampos S. Floudas, Parita Soni, et Abhinav B. Chandra. 2017. « Current Diagnosis and Management of Immune Related Adverse Events (irAEs) Induced by Immune Checkpoint Inhibitor Therapy ». *Frontiers in Pharmacology* 8:49. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00049>.
- Kumthekar, Priya, Caroline H. Ko, Tatjana Paunesku, Karan Dixit, Adam M. Sonabend, Orin Bloch, Matthew Tate, et al. 2021. « A first-in-human phase 0 clinical study of RNA interference-based Spherical Nucleic Acids in patients with recurrent Glioblastoma ». *Science translational medicine* 13 (584): eabb3945. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abb3945>.
- Le Mercier, Marie, Shannon Fortin, Véronique Mathieu, Robert Kiss, et Florence Lefranc. 2010. « Galectins and Gliomas ». *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)* 20 (1): 17-27. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2009.00270.x>.

- Lee, Cameron C., John A. MacKay, Jean M. J. Fréchet, et Francis C. Szoka. 2005. « Designing Dendrimers for Biological Applications ». *Nature Biotechnology* 23 (12): 1517-26. <https://doi.org/10.1038/nbt1171>.
- Lee, Hyun-Jung, Seung Mook Lim, Hee Yeon Jang, Young Ran Kim, Joon-Seok Hong, et Gi Jin Kim. 2021. « miR-373-3p Regulates Invasion and Migration Abilities of Trophoblast Cells via Targeted CD44 and Radixin ». *International Journal of Molecular Sciences* 22 (12): 6260. <https://doi.org/10.3390/ijms22126260>.
- Lepur, Adriana, Emma Salomonsson, Ulf J. Nilsson, et Hakon Leffler. 2012. « Ligand Induced Galectin-3 Protein Self-Association ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (26): 21751-56. <https://doi.org/10.1074/jbc.C112.358002>.
- Leung, Alex K. K., Ismail M. Hafez, Svetlana Baoukina, Nathan M. Belliveau, Igor V. Zhigaltsev, Elham Afshinmanesh, D. Peter Tieleman, Carl L. Hansen, Michael J. Hope, et Pieter R. Cullis. 2012. « Lipid Nanoparticles Containing siRNA Synthesized by Microfluidic Mixing Exhibit an Electron-Dense Nanostructured Core ». *The Journal of Physical Chemistry. C, Nanomaterials and Interfaces* 116 (34): 18440-50. <https://doi.org/10.1021/jp303267y>.
- Levine, Bruce L., James Miskin, Keith Wonnacott, et Christopher Keir. 2016. « Global Manufacturing of CAR T Cell Therapy ». *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development* 4 (décembre):92-101. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2016.12.006>.
- Levy, Y., R. Arbel-Goren, Y. R. Hadari, S. Eshhar, D. Ronen, E. Elhanany, B. Geiger, et Y. Zick. 2001. « Galectin-8 Functions as a Matricellular Modulator of Cell Adhesion ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (33): 31285-95. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100340200>.
- Lewicky, Jordan D., Nya L. Fraleigh, Amanda Boraman, Alexandrine L. Martel, Thi M.-D. Nguyen, Peter W. Schiller, Tze Chieh Shiao, René Roy, Sabine Montaut, et Hoang-Thanh Le. 2020. « Mannosylated Glycoliposomes for the Delivery of a Peptide Kappa Opioid Receptor Antagonist to the Brain ». *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* 154 (septembre):290-96. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2020.07.021>.
- Lewicky, Jordan D., Nya L. Fraleigh, Alexandrine L. Martel, Thi M.-D. Nguyen, Peter W. Schiller, Leila Mousavifar, René Roy, Anh Dzung Le, Douglas Funk, et Hoang-Thanh Le. 2021. « Improving the Utility of a Dynorphin Peptide Analogue Using Mannosylated Glycoliposomes ». *International Journal of Molecular Sciences* 22 (15): 7996. <https://doi.org/10.3390/ijms22157996>.
- Li, Jing, Xuling Wang, Ting Zhang, Chunling Wang, Zhenjun Huang, Xiang Luo, et Yihui Deng. 2015. « A Review on Phospholipids and Their Main Applications in Drug Delivery Systems ». *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 10 (2): 81-98. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2014.09.004>.

- Li, Tang, Cameron J. Nowell, David Cipolla, Thomas Rades, et Ben J. Boyd. 2019. « Direct Comparison of Standard Transmission Electron Microscopy and Cryogenic-TEM in Imaging Nanocrystals Inside Liposomes ». *Molecular Pharmaceutics* 16 (4): 1775-81. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b01308>.
- Li, Tianxiang, Yanyan Yang, Hongzhao Qi, Weigang Cui, Lin Zhang, Xiuxiu Fu, Xiangqin He, Meixin Liu, Pei-feng Li, et Tao Yu. 2023. « CRISPR/Cas9 Therapeutics: Progress and Prospects ». *Signal Transduction and Targeted Therapy* 8 (1): 1-23. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01309-7>.
- Liang, Tingyu, Xiaoxuan Wang, Fang Wang, Enshan Feng, et Gan You. 2019. « Galectin-9: A Predictive Biomarker Negatively Regulating Immune Response in Glioma Patients ». *World Neurosurgery* 132 (décembre):e455-62. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2019.08.117>.
- Lin, Adam Y., Joseph K. Young, Ariel V. Nixon, et Rebekah A. Drezek. 2014. « Encapsulated Fe₃O₄ /Ag Complexed Cores in Hollow Gold Nanoshells for Enhanced Theranostic Magnetic Resonance Imaging and Photothermal Therapy ». *Small (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)* 10 (16): 3246-51. <https://doi.org/10.1002/sml.201303593>.
- Lin, Xiao Peng, Justine D. Mintern, et Paul A. Gleeson. 2020. « Macropinocytosis in Different Cell Types: Similarities and Differences ». *Membranes* 10 (8): 177. <https://doi.org/10.3390/membranes10080177>.
- Liu, Dan, Hongtao Zhu, Lidong Cheng, Ran Li, Xiaoyu Ma, Jing Wang, Junwen Wang, et al. 2023. « Hypoxia Induced Galectin-8 Maintains Stemness in Glioma Stem Cells via Autophagy Regulation ». *Neuro-Oncology*, décembre, noad264. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noad264>.
- Liu, Fu-Tong, et Gabriel A. Rabinovich. 2005. « Galectins as Modulators of Tumour Progression ». *Nature Reviews. Cancer* 5 (1): 29-41. <https://doi.org/10.1038/nrc1527>.
- Liu, Zengjin, Huamin Han, Xin He, Shouwei Li, Chenxing Wu, Chunjiang Yu, et Shengdian Wang. 2016. « Expression of the Galectin-9-Tim-3 Pathway in Glioma Tissues Is Associated with the Clinical Manifestations of Glioma ». *Oncology Letters* 11 (3): 1829-34. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4142>.
- Lombardo, Domenico, et Mikhail A. Kiselev. 2022. « Methods of Liposomes Preparation: Formation and Control Factors of Versatile Nanocarriers for Biomedical and Nanomedicine Application ». *Pharmaceutics* 14 (3): 543. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030543>.
- López-Lucendo, María F., Dolores Solís, Sabine André, Jun Hirabayashi, Ken-ichi Kasai, Herbert Kaltner, Hans-Joachim Gabius, et Antonio Romero. 2004. « Growth-Regulatory Human Galectin-1: Crystallographic Characterisation of the Structural Changes Induced by Single-Site Mutations and Their Impact on the Thermodynamics of Ligand Binding ». *Journal of Molecular Biology* 343 (4): 957-70. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.08.078>.

- Lorite, Israel, M. S. Martín-González, J. J. Romero, M. A. García, Jose. L. G. Fierro, et Jose. F. Fernández. 2012. « Electrostatic charge dependence on surface hydroxylation for different Al₂O₃ powders ». *Ceramics International* 38 (2): 1427-34. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2011.09.024>.
- Lotem, J., et L. Sachs. 1996. « Control of Apoptosis in Hematopoiesis and Leukemia by Cytokines, Tumor Suppressor and Oncogenes ». *Leukemia* 10 (6): 925-31.
- Louis, David N., Hiroko Ohgaki, Otmar D. Wiestler, Webster K. Cavenee, Peter C. Burger, Anne Jouvret, Bernd W. Scheithauer, et Paul Kleihues. 2007. « The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System ». *Acta Neuropathologica* 114 (2): 97-109. <https://doi.org/10.1007/s00401-007-0243-4>.
- Louis, David N., Arie Perry, Guido Reifenberger, Andreas von Deimling, Dominique Figarella-Branger, Webster K. Cavenee, Hiroko Ohgaki, Otmar D. Wiestler, Paul Kleihues, et David W. Ellison. 2016. « The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: A Summary ». *Acta Neuropathologica* 131 (6): 803-20. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>.
- Lowe, Scott W., Enrique Cepero, et Gerard Evan. 2004. « Intrinsic Tumour Suppression ». *Nature* 432 (7015): 307-15. <https://doi.org/10.1038/nature03098>.
- Lowenstein, Pedro R, Gregory J Baker, et Maria G Castro. 2014. « Cracking the glioma-NK inhibitory code: toward successful innate immunotherapy ». *Oncoimmunology* 3 (11): e965573. <https://doi.org/10.4161/21624011.2014.965573>.
- Lu, Zhihao, Jianling Zou, Shuang Li, Michael J. Topper, Yong Tao, Hao Zhang, Xi Jiao, et al. 2020. « Epigenetic Therapy Inhibits Metastases by Disrupting Premetastatic Niches ». *Nature* 579 (7798): 284-90. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2054-x>.
- Lundquist, Joseph J., et Eric J. Toone. 2002. « The Cluster Glycoside Effect ». *Chemical Reviews* 102 (2): 555-78. <https://doi.org/10.1021/cr000418f>.
- Lv, Ran, Qi Bao, et Yan Li. 2017. « Regulation of M1-type and M2-type Macrophage Polarization in RAW264.7 Cells by Galectin-9 ». *Molecular Medicine Reports* 16 (6): 9111-19. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7719>.
- Maguire, Ciarán Manus, Matthias Rösslein, Peter Wick, et Adriele Prina-Mello. 2018. « Characterisation of Particles in Solution – a Perspective on Light Scattering and Comparative Technologies ». *Science and Technology of Advanced Materials* 19 (1): 732. <https://doi.org/10.1080/14686996.2018.1517587>.
- Manikandan, Ceera, Akshita Kaushik, et Dwaipayan Sen. 2020. « Viral Vector: Potential Therapeutic for Glioblastoma Multiforme ». *Cancer Gene Therapy* 27 (5): 270-79. <https://doi.org/10.1038/s41417-019-0124-8>.
- Mansoori, G. A., et TA Fauzi Soelaiman. 2005. « Nanotechnology — An Introduction for the Standards Community ». *Journal of ASTM International* 2 (6): 1-22.

<https://doi.org/10.1520/JAI13110>.

- Mantovani, Fiamma, Licio Collavin, et Giannino Del Sal. 2019. « Mutant P53 as a Guardian of the Cancer Cell ». *Cell Death & Differentiation* 26 (2): 199-212. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0246-9>.
- Mariño, Karina V., Alejandro J. Cagnoni, Diego O. Croci, et Gabriel A. Rabinovich. 2023a. « Targeting Galectin-Driven Regulatory Circuits in Cancer and Fibrosis ». *Nature Reviews Drug Discovery* 22 (4): 295-316. <https://doi.org/10.1038/s41573-023-00636-2>.
- . 2023b. « Targeting Galectin-Driven Regulatory Circuits in Cancer and Fibrosis ». *Nature Reviews Drug Discovery* 22 (4): 295-316. <https://doi.org/10.1038/s41573-023-00636-2>.
- Markowitz, S., J. Wang, L. Myeroff, R. Parsons, L. Sun, J. Lutterbaugh, R. S. Fan, E. Zborowska, K. W. Kinzler, et B. Vogelstein. 1995. « Inactivation of the Type II TGF-Beta Receptor in Colon Cancer Cells with Microsatellite Instability ». *Science (New York, N.Y.)* 268 (5215): 1336-38. <https://doi.org/10.1126/science.7761852>.
- Marshall, Barry J., et Helen M. Windsor. 2005. « The Relation of Helicobacter Pylori to Gastric Adenocarcinoma and Lymphoma: Pathophysiology, Epidemiology, Screening, Clinical Presentation, Treatment, and Prevention ». *The Medical Clinics of North America* 89 (2): 313-44, viii. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2004.09.001>.
- Martínez-Bosch, Neus, Alejo Rodriguez-Vida, Núria Juanpere, Josep Lloreta, Ana Rovira, Joan Albanell, Joaquim Bellmunt, et Pilar Navarro. 2019. « Galectins in Prostate and Bladder Cancer: Tumorigenic Roles and Clinical Opportunities ». *Nature Reviews Urology* 16 (7): 433-45. <https://doi.org/10.1038/s41585-019-0183-5>.
- Martínez-Bosch, Neus, Noelia Vilariño, Francesc Alameda, Sergi Mojal, Montserrat Arumí-Uria, Cristina Carrato, Iban Aldecoa, et al. 2023. « Gal-1 Expression Analysis in the GLIOCAT Multicenter Study: Role as a Prognostic Factor and an Immune-Suppressive Biomarker ». *Cells* 12 (6): 843. <https://doi.org/10.3390/cells12060843>.
- Matarrese, Paola, Antonella Tinari, Elisabetta Mormone, Germán A. Bianco, Marta A. Toscano, Barbara Ascione, Gabriel A. Rabinovich, et Walter Malorni. 2005. « Galectin-1 Sensitizes Resting Human T Lymphocytes to Fas (CD95)-Mediated Cell Death via Mitochondrial Hyperpolarization, Budding, and Fission ». *The Journal of Biological Chemistry* 280 (8): 6969-85. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409752200>.
- McCarthy, Edward F. 2006. « The Toxins of William B. Coley and the Treatment of Bone and Soft-Tissue Sarcomas ». *The Iowa Orthopaedic Journal* 26:154-58.
- Meng, Xiangbing, Pavla Brachova, Shujie Yang, Zhi Xiong, Yuping Zhang, Kristina W. Thiel, et Kimberly K. Leslie. 2011. « Knockdown of MTDH Sensitizes Endometrial Cancer Cells to Cell Death Induction by Death Receptor Ligand TRAIL and HDAC Inhibitor LBH589 Co-Treatment ». *PLOS ONE* 6 (6): e20920. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020920>.

- Mercier, Marie Le, Véronique Mathieu, Benjamin Haibe-Kains, Gianluca Bontempi, Tatjana Mijatovic, Christine Decaestecker, Robert Kiss, et Florence Lefranc. 2008. « Knocking Down Galectin 1 in Human Hs683 Glioblastoma Cells Impairs Both Angiogenesis and Endoplasmic Reticulum Stress Responses ». *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 67 (5): 456-69. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e318170f892>.
- Merrell, Allyson J., et Ben Z. Stanger. 2016. « Adult Cell Plasticity in Vivo: De-Differentiation and Transdifferentiation Are Back in Style ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 17 (7): 413-25. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.24>.
- Metz, Claudia, Remziye Döger, Elizabeth Riquelme, Priscilla Cortés, Christopher Holmes, Ronan Shaughnessy, Claudia Oyanadel, Catalina Grabowski, Alfonso González, et Andrea Soza. 2016. « Galectin-8 promotes migration and proliferation and prevents apoptosis in U87 glioblastoma cells ». *Biological Research* 49 (1): 33. <https://doi.org/10.1186/s40659-016-0091-6>.
- Mey, A., H. Leffler, Z. Hmama, G. Normier, et J. P. Revillard. 1996. « The Animal Lectin Galectin-3 Interacts with Bacterial Lipopolysaccharides via Two Independent Sites ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 156 (4): 1572-77.
- Miao, Zhi-Feng, Mark A. Lewis, Charles J. Cho, Mahliyah Adkins-Threats, Dongkook Park, Jeffrey W. Brown, Jing-Xu Sun, et al. 2020. « A Dedicated Evolutionarily Conserved Molecular Network Licenses Differentiated Cells to Return to the Cell Cycle ». *Developmental Cell* 55 (2): 178-194.e7. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.07.005>.
- Mignani, Serge, João Rodrigues, René Roy, Xiangyang Shi, Valentin Ceña, Saïd El Kazzouli, et Jean-Pierre Majoral. 2019. « Exploration of biomedical dendrimer space based on in-vitro physicochemical parameters: key factor analysis (Part 1) ». *Drug Discovery Today* 24 (5): 1176-83. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.02.014>.
- Mignani, Serge, Xiangyang Shi, Valentin Ceña, Dzmitry Shcharbin, Maria Bryszewska, et Jean-Pierre Majoral. 2021. « In Vivo Therapeutic Applications of Phosphorus Dendrimers: State of the Art ». *Drug Discovery Today* 26 (3): 677-89. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.11.034>.
- Min, Hyun Su, Hyun Jin Kim, Mitsuru Naito, Satomi Ogura, Kazuko Toh, Kotaro Hayashi, Beob Soo Kim, et al. 2020. « Systemic Brain Delivery of Antisense Oligonucleotides across the Blood–Brain Barrier with a Glucose-Coated Polymeric Nanocarrier ». *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 59 (21): 8173-80. <https://doi.org/10.1002/anie.201914751>.
- Mitchell, Michael J., Margaret M. Billingsley, Rebecca M. Haley, Marissa E. Wechsler, Nicholas A. Peppas, et Robert Langer. 2021. « Engineering Precision Nanoparticles for Drug Delivery ». *Nature Reviews Drug Discovery* 20 (2): 101-24. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0090-8>.
- Mkam Tsengam, Igor Kevin, Marzhana Omarova, Elizabeth G. Kelley, Alon McCormick, Geoffrey D. Bothun, Srinivasa R. Raghavan, et Vijay T. John. 2022. « Transformation of

Lipid Vesicles into Micelles by Adding Nonionic Surfactants: Elucidating the Structural Pathway and the Intermediate Structures ». *The Journal of Physical Chemistry B* 126 (11): 2208-16. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.1c09685>.

- Moffett, Serge, Tze Chieh Shiao, Leila Mousavifar, Serge Mignani, et René Roy. 2021. « Aberrant Glycosylation Patterns on Cancer Cells: Therapeutic Opportunities for Glycodendrimers/Metalloendrimers Oncology ». *Wiley Interdisciplinary Reviews. Nanomedicine and Nanobiotechnology* 13 (1): e1659. <https://doi.org/10.1002/wnan.1659>.
- Moiseeva, E. P., E. L. Spring, J. H. Baron, et D. P. de Bono. 1999. « Galectin 1 Modulates Attachment, Spreading and Migration of Cultured Vascular Smooth Muscle Cells via Interactions with Cellular Receptors and Components of Extracellular Matrix ». *Journal of Vascular Research* 36 (1): 47-58. <https://doi.org/10.1159/000025625>.
- Moiseeva, Elena P., Bryan Williams, Alison H. Goodall, et Nilesh J. Samani. 2003. « Galectin-1 Interacts with Beta-1 Subunit of Integrin ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 310 (3): 1010-16. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.09.112>.
- Moses, H. L., E. Y. Yang, et J. A. Pietenpol. 1990. « TGF-Beta Stimulation and Inhibition of Cell Proliferation: New Mechanistic Insights ». *Cell* 63 (2): 245-47. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90155-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90155-8).
- Mousavifar, Leila, Jordan D. Lewicky, Alexis Taponard, Rahul Bagul, Madleen Rivat, Shuay Abdullayev, Alexandrine L. Martel, et al. 2022. « Synthesis & Evaluation of Novel Mannosylated Neoglycolipids for Liposomal Delivery System Applications ». *Pharmaceutics* 14 (11): 2300. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14112300>.
- Mujtaba, Muhammad, Depeng Wang, Lucas Bragança Carvalho, Jhones Luiz Oliveira, Anderson do Espirito Santo Pereira, Rahat Sharif, Sudisha Jogaiah, et al. 2021. « Nanocarrier-Mediated Delivery of miRNA, RNAi, and CRISPR-Cas for Plant Protection: Current Trends and Future Directions ». *ACS Agricultural Science & Technology* 1 (5): 417-35. <https://doi.org/10.1021/acsagascitech.1c00146>.
- Murciano-Goroff, Yonina R., Allison Betof Warner, et Jedd D. Wolchok. 2020. « The Future of Cancer Immunotherapy: Microenvironment-Targeting Combinations ». *Cell Research* 30 (6): 507-19. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0337-2>.
- Murray, Jane S., et Peter Politzer. 2011. « The Electrostatic Potential: An Overview ». *WIREs Computational Molecular Science* 1 (2): 153-63. <https://doi.org/10.1002/wcms.19>.
- Nambiar, Dhanya K., Todd Aguilera, Hongbin Cao, Shirley Kwok, Christina Kong, Joshua Bloomstein, Zemin Wang, et al. 2019. « Galectin-1-Driven T Cell Exclusion in the Tumor Endothelium Promotes Immunotherapy Resistance ». *Journal of Clinical Investigation* 129 (12): 5553-67. <https://doi.org/10.1172/JCI129025>.
- Nangia-Makker, Pratima, Vitaly Balan, et Avraham Raz. 2008. « Regulation of Tumor Progression by Extracellular Galectin-3 ». *Cancer Microenvironment* 1 (1): 43-51. <https://doi.org/10.1007/s12307-008-0003-6>.

- Negrini, Simona, Vassilis G. Gorgoulis, et Thanos D. Halazonetis. 2010. « Genomic Instability—An Evolving Hallmark of Cancer ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 11 (3): 220-28. <https://doi.org/10.1038/nrm2858>.
- Nguyen, L., et P. Ohashi. 2014. « Clinical blockade of PD1 and LAG3 — potential mechanisms of action ». *Nature Reviews Immunology*. <https://doi.org/10.1038/nri3790>.
- Norambuena, Andrés, Claudia Metz, Lucas Vicuña, Antonia Silva, Evelyn Pardo, Claudia Oyanadel, Loreto Massardo, Alfonso González, et Andrea Soza. 2009. « Galectin-8 Induces Apoptosis in Jurkat T Cells by Phosphatidic Acid-Mediated ERK1/2 Activation Supported by Protein Kinase A down-Regulation ». *The Journal of Biological Chemistry* 284 (19): 12670-79. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808949200>.
- Obermeier, Birgit, Richard Daneman, et Richard M. Ransohoff. 2013. « Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier ». *Nature medicine* 19 (12): 1584-96. <https://doi.org/10.1038/nm.3407>.
- Ogawa, Koki, Naoya Kato, Michiharu Yoshida, Takeshi Hiu, Takayuki Matsuo, Shusaku Mizukami, Daiki Omata, et al. 2022. « Focused Ultrasound/Microbubbles-Assisted BBB Opening Enhances LNP-Mediated mRNA Delivery to Brain ». *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 348 (août):34-41. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.05.042>.
- Ostermann, Sandrine, Chantal Csajka, Thierry Buclin, Serge Leyvraz, Ferdy Lejeune, Laurent A. Decosterd, et Roger Stupp. 2004. « Plasma and Cerebrospinal Fluid Population Pharmacokinetics of Temozolomide in Malignant Glioma Patients ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 10 (11): 3728-36. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-03-0807>.
- Ostrom, Quinn T., Luc Bauchet, Faith G. Davis, Isabelle Deltour, James L. Fisher, Chelsea Eastman Langer, Melike Pekmezci, et al. 2014. « The epidemiology of glioma in adults: a “state of the science” review ». *Neuro-Oncology* 16 (7): 896-913. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nou087>.
- Ostrom, Quinn T., Haley Gittleman, Jordan Xu, Courtney Kromer, Yingli Wolinsky, Carol Kruchko, et Jill S. Barnholtz-Sloan. 2016. « CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2009–2013 ». *Neuro-Oncology* 18 (Suppl 5): v1-75. <https://doi.org/10.1093/neuonc/now207>.
- Ostroverkhova, Daria, Teresa M. Przytycka, et Anna R. Panchenko. 2023. « Cancer Driver Mutations: Predictions and Reality ». *Trends in Molecular Medicine* 29 (7): 554-66. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2023.03.007>.
- Ozeki, Y., T. Matsui, Y. Yamamoto, M. Funahashi, J. Hamako, et K. Titani. 1995. « Tissue Fibronectin Is an Endogenous Ligand for Galectin-1 ». *Glycobiology* 5 (2): 255-61. <https://doi.org/10.1093/glycob/5.2.255>.
- Pardoll, Drew M. 2012. « The Blockade of Immune Checkpoints in Cancer Immunotherapy ».

Nature Reviews Cancer 12 (4): 252-64. <https://doi.org/10.1038/nrc3239>.

- Patnaik, Soma, Bapi Gorain, Santwana Padhi, Hira Choudhury, Gamal A. Gabr, Shadab Md, Dinesh Kumar Mishra, et Prashant Kesharwani. 2021. « Recent Update of Toxicity Aspects of Nanoparticulate Systems for Drug Delivery ». *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 161 (avril):100-119. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2021.02.010>.
- Pattni, Bhushan S., Vladimir V. Chupin, et Vladimir P. Torchilin. 2015. « New Developments in Liposomal Drug Delivery ». *Chemical Reviews* 115 (19): 10938-66. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00046>.
- Paulus, W., I. Baur, A. S. Beutler, et S. A. Reeves. 1996. « Diffuse Brain Invasion of Glioma Cells Requires Beta 1 Integrins ». *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 75 (6): 819-26.
- Perillo, N. L., K. E. Pace, J. J. Seilhamer, et L. G. Baum. 1995. « Apoptosis of T Cells Mediated by Galectin-1 ». *Nature* 378 (6558): 736-39. <https://doi.org/10.1038/378736a0>.
- Persson, Emma K., Kenneth Verstraete, Ines Heyndrickx, Elien Gevaert, Helena Aegerter, Jean-Michel Percier, Kim Deswarte, et al. 2019. « Protein Crystallization Promotes Type 2 Immunity and Is Reversible by Antibody Treatment ». *Science (New York, N.Y.)* 364 (6442): eaaw4295. <https://doi.org/10.1126/science.aaw4295>.
- Pfeffer, Carsten K., Mingshan Xue, Miao He, Z. Josh Huang, et Massimo Scanziani. 2013. « Inhibition of Inhibition in Visual Cortex: The Logic of Connections between Molecularly Distinct Interneurons ». *Nature Neuroscience* 16 (8): 1068-76. <https://doi.org/10.1038/nn.3446>.
- Pfeffer, Claire M., et Amareshwar T. K. Singh. 2018. « Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy ». *International Journal of Molecular Sciences* 19 (2): 448. <https://doi.org/10.3390/ijms19020448>.
- Pichler, M., et J. Steyrer. 2021. « Cost-effectiveness analysis of the use of immunotherapy in metastatic solid tumours in Austria by applying the ESMO-Magnitude of Clinical Benefit Scale (ESMO-MCBS) version 1.1 ». *ESMO Open* 6 (4): 100198. <https://doi.org/10.1016/j.esmoop.2021.100198>.
- Plus Therapeutics. 2022. « A Dual Phase 1/2, Investigator Initiated Study to Determine the Maximum Tolerated Dose, Safety, and Efficacy of 186Rhenium Nanoliposomes (186RNL) in Recurrent Glioma (CTRC# 12-02) ». Clinical trial registration NCT01906385. [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01906385). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01906385>.
- Portella, Luigi, Anna Maria Bello, et Stefania Scala. 2021. « CXCL12 Signaling in the Tumor Microenvironment ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1302:51-70. https://doi.org/10.1007/978-3-030-62658-7_5.
- Prato, Cecilia Arahí, Julieta Carabelli, Oscar Campetella, et María Virginia Tribulatti. 2020.

- « Galectin-8 Enhances T cell Response by Promotion of Antigen Internalization and Processing ». *iScience* 23 (7): 101278. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101278>.
- Preston, Jane E., N. Joan Abbott, et David J. Begley. 2014. « Transcytosis of Macromolecules at the Blood-Brain Barrier ». *Advances in Pharmacology (San Diego, Calif.)* 71:147-63. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2014.06.001>.
- Qi, Timothy, Kyle McGrath, Raghuvier Ranganathan, Gianpietro Dotti, et Yanguang Cao. 2022. « Cellular kinetics: A clinical and computational review of CAR-T cell pharmacology ». *Advanced Drug Delivery Reviews* 188 (septembre):114421. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2022.114421>.
- Rabanel, Jean-Michel, Jimmy Faivre, Charlotte Zaouter, Shunmoogum A. Patten, Xavier Banquy, et Charles Ramassamy. 2021. « Nanoparticle Shell Structural Cues Drive in Vitro Transport Properties, Tissue Distribution and Brain Accessibility in Zebrafish ». *Biomaterials* 277 (octobre):121085. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2021.121085>.
- Rabanel, Jean-Michel, Pierre-Alexandre Piec, Sarra Landri, Shunmoogum A. Patten, et Charles Ramassamy. 2020. « Transport of PEGylated-PLA Nanoparticles across a Blood Brain Barrier Model, Entry into Neuronal Cells and in Vivo Brain Bioavailability ». *Journal of Controlled Release* 328 (décembre):679-95. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.09.042>.
- Raval, Nidhi, Hardi Jogi, Piyush Gondaliya, Kiran Kalia, et Rakesh K. Tekade. 2019. « Method and Its Composition for Encapsulation, Stabilization, and Delivery of siRNA in Anionic Polymeric Nanoplex: An In Vitro- In Vivo Assessment ». *Scientific Reports* 9 (1): 16047. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52390-4>.
- Régnier-Vigouroux, Anne. 2003. « The Mannose Receptor in the Brain ». *International Review of Cytology* 226:321-42. [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(03\)01006-4](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(03)01006-4).
- Research, Center for Drug Evaluation and. 2021. « Liposome Drug Products: Chemistry, Manufacturing, and Controls; Human Pharmacokinetics and Bioavailability; and Labeling Documentation ». U.S. Food and Drug Administration. FDA. 10 avril 2021. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/liposome-drug-products-chemistry-manufacturing-and-controls-human-pharmacokinetics-and>.
- Robertson, James D., Loris Rizzello, Milagros Avila-Olias, Jens Gaitzsch, Claudia Contini, Monika S. Magoń, Stephen A. Renshaw, et Giuseppe Battaglia. 2016. « Purification of Nanoparticles by Size and Shape ». *Scientific Reports* 6 (1): 27494. <https://doi.org/10.1038/srep27494>.
- Rodríguez, Ernesto, Sjoerd T. T. Schetters, et Yvette van Kooyk. 2018. « The Tumour Glyco-Code as a Novel Immune Checkpoint for Immunotherapy ». *Nature Reviews Immunology* 18 (3): 204-11. <https://doi.org/10.1038/nri.2018.3>.
- Rorive, S., N. Belot, C. Decaestecker, F. Lefranc, L. Gordower, S. Micik, C. A. Maurage, et al. 2001. « Galectin-1 Is Highly Expressed in Human Gliomas with Relevance for

- Modulation of Invasion of Tumor Astrocytes into the Brain Parenchyma ». *Glia* 33 (3): 241-55. [https://doi.org/10.1002/1098-1136\(200103\)33:3<241::aid-glia1023>3.0.co;2-1](https://doi.org/10.1002/1098-1136(200103)33:3<241::aid-glia1023>3.0.co;2-1).
- Ruiz-López, Eduardo, et Alberto J. Schuhmacher. 2021. « Transportation of Single-Domain Antibodies through the Blood–Brain Barrier ». *Biomolecules* 11 (8): 1131. <https://doi.org/10.3390/biom11081131>.
- Sadelain, Michel, Renier Brentjens, et Isabelle Rivière. 2013. « The Basic Principles of Chimeric Antigen Receptor Design ». *Cancer Discovery* 3 (4): 388-98. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0548>.
- Sadelain, Michel, Isabelle Rivière, et Renier Brentjens. 2003. « Targeting Tumours with Genetically Enhanced T Lymphocytes ». *Nature Reviews. Cancer* 3 (1): 35-45. <https://doi.org/10.1038/nrc971>.
- Sakuishi, Kaori, Lionel Apetoh, Jenna M. Sullivan, Bruce R. Blazar, Vijay K. Kuchroo, et Ana C. Anderson. 2010. « Targeting Tim-3 and PD-1 Pathways to Reverse T Cell Exhaustion and Restore Anti-Tumor Immunity ». *The Journal of Experimental Medicine* 207 (10): 2187-94. <https://doi.org/10.1084/jem.20100643>.
- Saleh, Ali, Emilie Marhuenda, Christine Fabre, Zahra Hassani, Jan de Weille, Hassan Boukhaddaoui, Sophie Guelfi, et al. 2019. « A Novel 3D Nanofibre Scaffold Conserves the Plasticity of Glioblastoma Stem Cell Invasion by Regulating Galectin-3 and Integrin-B1 Expression ». *Scientific Reports* 9 (1): 14612. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51108-w>.
- says, Sioe See Volaric. 2013. « Dynamic Light Scattering (DLS) - Understanding the Basics ». AZoNano.Com. 17 octobre 2013. <https://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=3662>.
- Schultheis, Beate, Dirk Strumberg, Jan Kuhlmann, Martin Wolf, Karin Link, Thomas Seufferlein, Joerg Kaufmann, et al. 2020. « Safety, Efficacy and Pharmacokinetics of Targeted Therapy with The Liposomal RNA Interference Therapeutic Atu027 Combined with Gemcitabine in Patients with Pancreatic Adenocarcinoma. A Randomized Phase Ib/IIa Study ». *Cancers* 12 (11): E3130. <https://doi.org/10.3390/cancers12113130>.
- Sears, Cynthia L., et Wendy S. Garrett. 2014. « Microbes, Microbiota, and Colon Cancer ». *Cell Host & Microbe* 15 (3): 317-28. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.02.007>.
- Seguin, Laetitia, Soline Odouard, Francesca Corlazzoli, Sarah Al Haddad, Laurine Moindrot, Marta Calvo Tardón, Mayra Yebra, et al. 2021. « Macropinocytosis Requires Gal-3 in a Subset of Patient-Derived Glioblastoma Stem Cells ». *Communications Biology* 4 (1): 1-17. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02258-z>.
- Seidel, Judith A., Atsushi Otsuka, et Kenji Kabashima. 2018. « Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 Therapies in Cancer: Mechanisms of Action, Efficacy, and Limitations ». *Frontiers in Oncology* 8 (mars):86. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00086>.

- Sercombe, Lisa, Tejaswi Veerati, Fatemeh Moheimani, Sherry Y. Wu, Anil K. Sood, et Susan Hua. 2015. « Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery ». *Frontiers in Pharmacology* 6 (décembre):286. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00286>.
- Shah, Diana, Andrea Comba, Syed M. Faisal, Padma Kadiyala, Gregory J. Baker, Mahmoud S. Alghamri, Robert Doherty, et al. 2021. « A Novel miR1983-TLR7-IFN β Circuit Licenses NK Cells to Kill Glioma Cells, and Is under the Control of Galectin-1 ». *Oncoimmunology* 10 (1): 1939601. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2021.1939601>.
- Shalom-Feuerstein, Ruby, Ran Levy, Victoria Makovski, Avraham Raz, et Yoel Kloog. 2008. « Galectin-3 Regulates RasGRP4-Mediated Activation of N-Ras and H-Ras ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1783 (6): 985-93. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.03.009>.
- Shatz-Azoulay, Hadas, Yaron Vinik, Roi Isaac, Ulrike Kohler, Sima Lev, et Yehiel Zick. 2020. « The Animal Lectin Galectin-8 Promotes Cytokine Expression and Metastatic Tumor Growth in Mice ». *Scientific Reports* 10 (1): 7375. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64371-z>.
- Shay, J. W., et W. E. Wright. 2000. « Hayflick, His Limit, and Cellular Ageing ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 1 (1): 72-76. <https://doi.org/10.1038/35036093>.
- Shergalis, Andrea, Armand Bankhead, Urarika Luesakul, Nongnuj Muangsin, et Nouri Neamati. 2018. « Current Challenges and Opportunities in Treating Glioblastoma ». Édité par Eric L. Barker. *Pharmacological Reviews* 70 (3): 412-45. <https://doi.org/10.1124/pr.117.014944>.
- Sherr, Charles J., et Ronald A. DePinho. 2000. « Cellular Senescence: Minireview Mitotic Clock or Culture Shock? ». *Cell* 102 (4): 407-10. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00046-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00046-5).
- Shi, Jinjin, Yu Su, Wei Liu, Junbiao Chang, et Zhenzhong Zhang. 2017. « A nanoliposome-based photoactivable drug delivery system for enhanced cancer therapy and overcoming treatment resistance ». *International Journal of Nanomedicine* 12 (novembre):8257-75. <https://doi.org/10.2147/IJN.S143776>.
- Shih, Wenting, et Soichiro Yamada. 2012. « N-cadherin as a key regulator of collective cell migration in a 3D environment ». *Cell Adhesion & Migration* 6 (6): 513-17. <https://doi.org/10.4161/cam.21766>.
- Sironi, Luca, Silvia Rizzato, et Leonardo Lo Presti. 2022. « Why Is α -d-Glucose Monomorphic? Insights from Accurate Experimental Charge Density at 90 K ». *Crystal Growth & Design* 22 (11): 6627-38. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.2c00846>.
- Soffer, Daniel, Robert Stoekenbroek, et Roda Plakogiannis. 2022. « Small Interfering Ribonucleic Acid for Cholesterol Lowering - Inclisiran: Inclisiran for Cholesterol Lowering ». *Journal of Clinical Lipidology*, juin, S1933-2874(22)00183-0. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2022.06.009>.

- Somia, Nikunj, et Inder M. Verma. 2000. « Gene Therapy: Trials and Tribulations ». *Nature Reviews Genetics* 1 (2): 91-99. <https://doi.org/10.1038/35038533>.
- Staring, Jacqueline, Eleonore von Castelmur, Vincent A. Blomen, Lisa G. van den Hengel, Markus Brockmann, Jim Baggen, Hendrik Jan Thibaut, et al. 2017. « PLA2G16 Represents a Switch between Entry and Clearance of Picornaviridae ». *Nature* 541 (7637): 412-16. <https://doi.org/10.1038/nature21032>.
- Stetefeld, Jörg, Sean A. McKenna, et Trushar R. Patel. 2016. « Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences ». *Biophysical Reviews* 8 (4): 409-27. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0218-6>.
- Sturgill, Elizabeth R., Annah S. Rolig, Stefanie N. Linch, Courtney Mick, Melissa J. Kasiewicz, Zhaoyu Sun, Peter G. Traber, Harold Shlevin, et William L. Redmond. 2021. « Galectin-3 Inhibition with Belapectin Combined with Anti-OX40 Therapy Reprograms the Tumor Microenvironment to Favor Anti-Tumor Immunity ». *Oncoimmunology* 10 (1): 1892265. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2021.1892265>.
- Su, Jiyong, Jin Gao, Yunlong Si, Linlin Cui, Chenyang Song, Yue Wang, Runjie Wu, Guihua Tai, et Yifa Zhou. 2018. « Galectin-10: A New Structural Type of Prototype Galectin Dimer and Effects on Saccharide Ligand Binding ». *Glycobiology* 28 (3): 159-68. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwx107>.
- Sun, Lingling, Fan Pan, et Shibei Li. 2022. « Self-Assembly of Lipid Mixtures in Solutions: Structures, Dynamics Processes and Mechanical Properties ». *Membranes* 12 (8): 730. <https://doi.org/10.3390/membranes12080730>.
- Sung, Hyuna, Jacques Ferlay, Rebecca L. Siegel, Mathieu Laversanne, Isabelle Soerjomataram, Ahmedin Jemal, et Freddie Bray. 2021. « Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries ». *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 71 (3): 209-49. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
- Szebeni, Janos, et Seyed Moein Moghimi. 2009. « Liposome Triggering of Innate Immune Responses: A Perspective on Benefits and Adverse Reactions ». *Journal of Liposome Research* 19 (2): 85-90. <https://doi.org/10.1080/08982100902792855>.
- Takashima, Yasuo, Atsushi Kawaguchi, Azusa Hayano, et Ryuya Yamanaka. 2019. « CD276 and the Gene Signature Composed of GATA3 and LGALS3 Enable Prognosis Prediction of Glioblastoma Multiforme ». *PloS One* 14 (5): e0216825. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216825>.
- Takenaka, Yukinori, Tomoharu Fukumori, Tadashi Yoshii, Natsuo Oka, Hidenori Inohara, Hyeon-Reh Choi Kim, Robert S. Bresalier, et Avraham Raz. 2004. « Nuclear Export of Phosphorylated Galectin-3 Regulates Its Antiapoptotic Activity in Response to Chemotherapeutic Drugs ». *Molecular and Cellular Biology* 24 (10): 4395-4406. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.10.4395-4406.2004>.
- Talmadge, James E, et Isaiah J Fidler. 2010. « AACR Centennial Series: The Biology of Cancer

- Metastasis: Historical Perspective ». *Cancer research* 70 (14): 5649-69.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1040>.
- Tang, Le, Fang Wei, Yingfen Wu, Yi He, Lei Shi, Fang Xiong, Zhaojian Gong, et al. 2018. « Role of metabolism in cancer cell radioresistance and radiosensitization methods ». *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR* 37 (avril):87.
<https://doi.org/10.1186/s13046-018-0758-7>.
- Teichberg, V. I., I. Silman, D. D. Beitsch, et G. Resheff. 1975. « A Beta-D-Galactoside Binding Protein from Electric Organ Tissue of *Electrophorus Electricus* ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 72 (4): 1383-87. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.4.1383>.
- Tenchov, Rumiana, Robert Bird, Allison E. Curtze, et Qiongqiong Zhou. 2021. « Lipid Nanoparticles—From Liposomes to mRNA Vaccine Delivery, a Landscape of Research Diversity and Advancement ». *ACS Nano* 15 (11): 16982-15.
<https://doi.org/10.1021/acsnano.1c04996>.
- Thienpont, Bernard, Laurien Van Dyck, et Diether Lambrechts. 2016. « Tumors Smother Their Epigenome ». *Molecular & Cellular Oncology* 3 (6): e1240549.
<https://doi.org/10.1080/23723556.2016.1240549>.
- Thorne, R. G., C. R. Emory, T. A. Ala, et W. H. Frey. 1995. « Quantitative Analysis of the Olfactory Pathway for Drug Delivery to the Brain ». *Brain Research* 692 (1-2): 278-82.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)00637-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)00637-6).
- Thurston, Teresa L. M., Michal P. Wandel, Natalia von Muhlinen, Ágnes Foeglein, et Felix Randow. 2012. « Galectin 8 Targets Damaged Vesicles for Autophagy to Defend Cells against Bacterial Invasion ». *Nature* 482 (7385): 414-18.
<https://doi.org/10.1038/nature10744>.
- Torre, Cristina de la, Pablo Játiva, Inmaculada Posadas, Darío Manzanares, José L. Jiménez Blanco, Carmen Ortiz Mellet, José Manuel García Fernández, et Valentín Ceña. 2022. « A β -Cyclodextrin-Based Nanoparticle with Very High Transfection Efficiency Unveils siRNA-Activated TLR3 Responses in Human Prostate Cancer Cells ». *Pharmaceutics* 14 (11): 2424. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14112424>.
- Torres, Cristina Morales, Alva Biran, Matthew J. Burney, Harshil Patel, Tristan Henser-Brownhill, Ayelet-Hashahar Shapira Cohen, Yilong Li, et al. 2016. « The Linker Histone H1.0 Generates Epigenetic and Functional Intratumor Heterogeneity ». *Science (New York, N.Y.)* 353 (6307): aaf1644. <https://doi.org/10.1126/science.aaf1644>.
- Toussaint, L Gerard, Allan E Nilson, Jennie M Goble, Karla V Ballman, C David James, Florence Lefranc, Robert Kiss, et Joon H Uhm. 2012. « Galectin-1, a gene preferentially expressed at the tumor margin, promotes glioblastoma cell invasion ». *Molecular Cancer* 11 (mai):32. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-11-32>.
- Traber, Gavin M., et Ai-Ming Yu. 2023. « RNAi-Based Therapeutics and Novel RNA Bioengineering Technologies ». *The Journal of Pharmacology and Experimental*

Therapeutics 384 (1): 133-54. <https://doi.org/10.1124/jpet.122.001234>.

- Trant, John F., Namrata Jain, Delfina M. Mazzuca, James T. McIntosh, Bo Fan, S. M. Mansour Haeryfar, Sebastien Lecommandoux, et Elizabeth R. Gillies. 2016. « Synthesis, Self-Assembly, and Immunological Activity of α -Galactose-Functionalized Dendron-Lipid Amphiphiles ». *Nanoscale* 8 (40): 17694-704. <https://doi.org/10.1039/C6NR05030A>.
- Tribulatti, María Virginia, Valentina Cattaneo, Ulf Hellman, Juan Mucci, et Oscar Campetella. 2009. « Galectin-8 Provides Costimulatory and Proliferative Signals to T Lymphocytes ». *Journal of Leukocyte Biology* 86 (2): 371-80. <https://doi.org/10.1189/jlb.0908529>.
- Tribulatti, María Virginia, María Gabriela Figini, Julieta Carabelli, Valentina Cattaneo, et Oscar Campetella. 2012. « Redundant and Antagonistic Functions of Galectin-1, -3, and -8 in the Elicitation of T Cell Responses ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 188 (7): 2991-99. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102182>.
- Tribulatti, María Virginia, Juan Mucci, Valentina Cattaneo, Fernán Agüero, Tim Gilmartin, Steven R. Head, et Oscar Campetella. 2007. « Galectin-8 Induces Apoptosis in the CD4(High)CD8(High) Thymocyte Subpopulation ». *Glycobiology* 17 (12): 1404-12. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwm104>.
- Van Woensel, Matthias, Thomas Mathivet, Nathalie Wauthoz, Rémi Rosière, Abhishek D. Garg, Patrizia Agostinis, Véronique Mathieu, et al. 2017. « Sensitization of Glioblastoma Tumor Micro-Environment to Chemo- and Immunotherapy by Galectin-1 Intranasal Knock-down Strategy ». *Scientific Reports* 7 (1): 1217. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01279-1>.
- Van Woensel, Matthias, Nathalie Wauthoz, Rémi Rosière, Véronique Mathieu, Robert Kiss, Florence Lefranc, Brecht Steelant, et al. 2016. « Development of siRNA-Loaded Chitosan Nanoparticles Targeting Galectin-1 for the Treatment of Glioblastoma Multiforme via Intranasal Administration ». *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 227 (avril):71-81. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.02.032>.
- Vasan, Neil, José Baselga, et David M. Hyman. 2019. « A View on Drug Resistance in Cancer ». *Nature* 575 (7782): 299-309. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1730-1>.
- Vasta, Gerardo R., Hafiz Ahmed, Mihai Nita-Lazar, Aditi Banerjee, Marta Pasek, Surekha Shridhar, Prasun Guha, et José A. Fernández-Robledo. 2012. « Galectins as self/non-self recognition receptors in innate and adaptive immunity: an unresolved paradox ». *Frontiers in Immunology* 3 (juillet):199. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00199>.
- Verma, Vivek, Tanja Sprave, Waqar Haque, Charles B. Simone, Joe Y. Chang, James W. Welsh, et Charles R. Thomas. 2018. « A Systematic Review of the Cost and Cost-Effectiveness Studies of Immune Checkpoint Inhibitors ». *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 6 (1): 128. <https://doi.org/10.1186/s40425-018-0442-7>.
- Verschuere, Tina, Jaan Toelen, Wim Maes, Françoise Poirier, Louis Boon, Thomas Tousseyn,

- Thomas Mathivet, et al. 2014. « Glioma-Derived Galectin-1 Regulates Innate and Adaptive Antitumor Immunity ». *International Journal of Cancer* 134 (4): 873-84. <https://doi.org/10.1002/ijc.28426>.
- Vives, K. P., et J. M. Piepmeier. 1999. « Complications and Expected Outcome of Glioma Surgery ». *Journal of Neuro-Oncology* 42 (3): 289-302. <https://doi.org/10.1023/a:1006163328765>.
- Vranic, Sandra, Nicole Boggetto, Vincent Contremoulins, Stéphane Mornet, Nora Reinhardt, Francelyne Marano, Armelle Baeza-Squiban, et Sonja Boland. 2013. « Deciphering the mechanisms of cellular uptake of engineered nanoparticles by accurate evaluation of internalization using imaging flow cytometry ». *Particle and Fibre Toxicology* 10 (février):2. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-10-2>.
- Waard, A. de, S. Hickman, et S. Kornfeld. 1976. « Isolation and Properties of Beta-Galactoside Binding Lectins of Calf Heart and Lung ». *The Journal of Biological Chemistry* 251 (23): 7581-87.
- Wahab, Rizwan, Neha Kaushik, Farheen Khan, Nagendra Kumar Kaushik, Su-Jae Lee, Eun Ha Choi, et Abdulaziz A Al-Khedhairy. 2019. « Gold quantum dots impair the tumorigenic potential of glioma stem-like cells via β -catenin downregulation in vitro ». *International Journal of Nanomedicine* 14 (février):1131-48. <https://doi.org/10.2147/IJN.S195333>.
- Waldman, Alex D., Jill M. Fritz, et Michael J. Lenardo. 2020. « A Guide to Cancer Immunotherapy: From T Cell Basic Science to Clinical Practice ». *Nature Reviews Immunology* 20 (11): 651-68. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0306-5>.
- Wang, Boshi, Jaskaren Kohli, et Marco Demaria. 2020. « Senescent Cells in Cancer Therapy: Friends or Foes? ». *Trends in Cancer* 6 (10): 838-57. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2020.05.004>.
- Wang, Hongxiang, Xiao Song, Qilin Huang, Tao Xu, Dapeng Yun, Yuqi Wang, Lingna Hu, et al. 2019. « LGALS3 Promotes Treatment Resistance in Glioblastoma and Is Associated with Tumor Risk and Prognosis ». *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* 28 (4): 760-69. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-18-0638>.
- Wang, Wei, Huaijian Guo, Jianlin Geng, Xiaodong Zheng, Haiming Wei, Rui Sun, et Zhigang Tian. 2014. « Tumor-Released Galectin-3, a Soluble Inhibitory Ligand of Human Nkp30, Plays an Important Role in Tumor Escape from NK Cell Attack ». *Journal of Biological Chemistry* 289 (48): 33311-19. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.603464>.
- Warren, J. R., et B. Marshall. 1983. « Unidentified Curved Bacilli on Gastric Epithelium in Active Chronic Gastritis ». *Lancet (London, England)* 1 (8336): 1273-75.
- Weller, Michael, Martin van den Bent, Matthias Preusser, Emilie Le Rhun, Jörg C. Tonn, Giuseppe Minniti, Martin Bendszus, et al. 2021. « EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood ». *Nature Reviews. Clinical Oncology* 18 (3): 170-86. <https://doi.org/10.1038/s41571-020-00447-z>.

- Willis, M., et E. Forssen. 1998. « Ligand-Targeted Liposomes ». *Advanced Drug Delivery Reviews* 29 (3): 249-71. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(97\)00083-5](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(97)00083-5).
- Witsch, Esther, Michael Sela, et Yosef Yarden. 2010. « Roles for Growth Factors in Cancer Progression ». *Physiology* 25 (2): 85-101. <https://doi.org/10.1152/physiol.00045.2009>.
- Wolf, Yochai, Ana C. Anderson, et Vijay K. Kuchroo. 2020. « TIM3 Comes of Age as an Inhibitory Receptor ». *Nature Reviews. Immunology* 20 (3): 173-85. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0224-6>.
- Wu, Di, Qi Chen, Xiaojie Chen, Feng Han, Zhong Chen, et Yi Wang. 2023. « The Blood–Brain Barrier: Structure, Regulation, and Drug Delivery ». *Signal Transduction and Targeted Therapy* 8 (1): 1-27. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01481-w>.
- Wu, Fanglong, Jin Yang, Junjiang Liu, Ye Wang, Jingtian Mu, Qingxiang Zeng, Shuzhi Deng, et Hongmei Zhou. 2021. « Signaling Pathways in Cancer-Associated Fibroblasts and Targeted Therapy for Cancer ». *Signal Transduction and Targeted Therapy* 6 (1): 1-35. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00641-0>.
- Xiao, Kai, Yuanpei Li, Juntao Luo, Joyce S. Lee, Wenwu Xiao, Abby M. Gonik, Rinki G. Agarwal, et Kit S. Lam. 2011. « The Effect of Surface Charge on in Vivo Biodistribution of PEG-Oligocholic Acid Based Micellar Nanoparticles ». *Biomaterials* 32 (13): 3435-46. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.021>.
- Xu, Shengchao, Lu Tang, Xizhe Li, Fan Fan, et Zhixiong Liu. 2020. « Immunotherapy for Glioma: Current Management and Future Application ». *Cancer Letters* 476 (avril):1-12. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.02.002>.
- Yamaguchi, Hirohito, Jung-Mao Hsu, Wen-Hao Yang, et Mien-Chie Hung. 2022. « Mechanisms Regulating PD-L1 Expression in Cancers and Associated Opportunities for Novel Small-Molecule Therapeutics ». *Nature Reviews Clinical Oncology* 19 (5): 287-305. <https://doi.org/10.1038/s41571-022-00601-9>.
- Yang, Jian, Azadeh Bahreman, Geert Daudey, Jeroen Bussmann, René C. L. Olsthoorn, et Alexander Kros. 2016. « Drug Delivery via Cell Membrane Fusion Using Lipopeptide Modified Liposomes ». *ACS Central Science* 2 (9): 621-30. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.6b00172>.
- Yang, Ri-Yao, Gabriel A. Rabinovich, et Fu-Tong Liu. 2008. « Galectins: Structure, Function and Therapeutic Potential ». *Expert Reviews in Molecular Medicine* 10 (juin):e17. <https://doi.org/10.1017/S1462399408000719>.
- Yang, Riyao, Linlin Sun, Ching-Fei Li, Yu-Han Wang, Jun Yao, Hui Li, Meisi Yan, et al. 2021. « Galectin-9 Interacts with PD-1 and TIM-3 to Regulate T Cell Death and Is a Target for Cancer Immunotherapy ». *Nature Communications* 12 (1): 832. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21099-2>.
- Yao, Xia, Xiao Fan, et Nieng Yan. 2020. « Cryo-EM analysis of a membrane protein embedded

in the liposome ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117 (31): 18497-503. <https://doi.org/10.1073/pnas.2009385117>.

Yingchoncharoen, Phatsapong, Danuta S. Kalinowski, et Des R. Richardson. 2016. « Lipid-Based Drug Delivery Systems in Cancer Therapy: What Is Available and What Is Yet to Come ». Édité par Eric L. Barker. *Pharmacological Reviews* 68 (3): 701-87. <https://doi.org/10.1124/pr.115.012070>.

Yıldırım, Cansu, Daphne Y. S. Vogel, Maurits R. Hollander, Josefien M. Baggen, Ruud D. Fontijn, Sylvia Nieuwenhuis, Anouk Haverkamp, et al. 2015. « Galectin-2 Induces a Proinflammatory, Anti-Arteriogenic Phenotype in Monocytes and Macrophages ». *PLOS ONE* 10 (4): e0124347. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124347>.

Yoo, Hong-Il, Eu-Gene Kim, Eun-Jin Lee, Sung-Young Hong, Chi-Sun Yoon, Min-Ju Hong, Sang-Jin Park, Ran-Sook Woo, Tai-Kyoung Baik, et Dae-Yong Song. 2017. « Neuroanatomical Distribution of Galectin-3 in the Adult Rat Brain ». *Journal of Molecular Histology* 48 (2): 133-46. <https://doi.org/10.1007/s10735-017-9712-9>.

Yuan, Feng, Haolang Ming, Yingshuai Wang, Yihan Yang, Li Yi, Tao Li, Haiwen Ma, et al. 2020. « Molecular and clinical characterization of Galectin-9 in glioma through 1,027 samples ». *Journal of Cellular Physiology* 235 (5): 4326-34. <https://doi.org/10.1002/jcp.29309>.

Yuan, Salina, Robert J. Norgard, et Ben Z. Stanger. 2019. « Cellular Plasticity in Cancer ». *Cancer Discovery* 9 (7): 837-51. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-0015>.

Zhang, Hao, Ziyu Dai, Wantao Wu, Zeyu Wang, Nan Zhang, Liyang Zhang, Wen-Jing Zeng, Zhixiong Liu, et Quan Cheng. 2021. « Regulatory mechanisms of immune checkpoints PD-L1 and CTLA-4 in cancer ». *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 40 (1): 184. <https://doi.org/10.1186/s13046-021-01987-7>.

Zhang, Hongxin, Pengfei Liu, Yan Zhang, Lujun Han, Zhihui Hu, Ziqi Cai, et Jianhui Cai. 2021. « Inhibition of Galectin-3 Augments the Antitumor Efficacy of PD-L1 Blockade in Non-Small-Cell Lung Cancer ». *FEBS Open Bio* 11 (3): 911-20. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13088>.

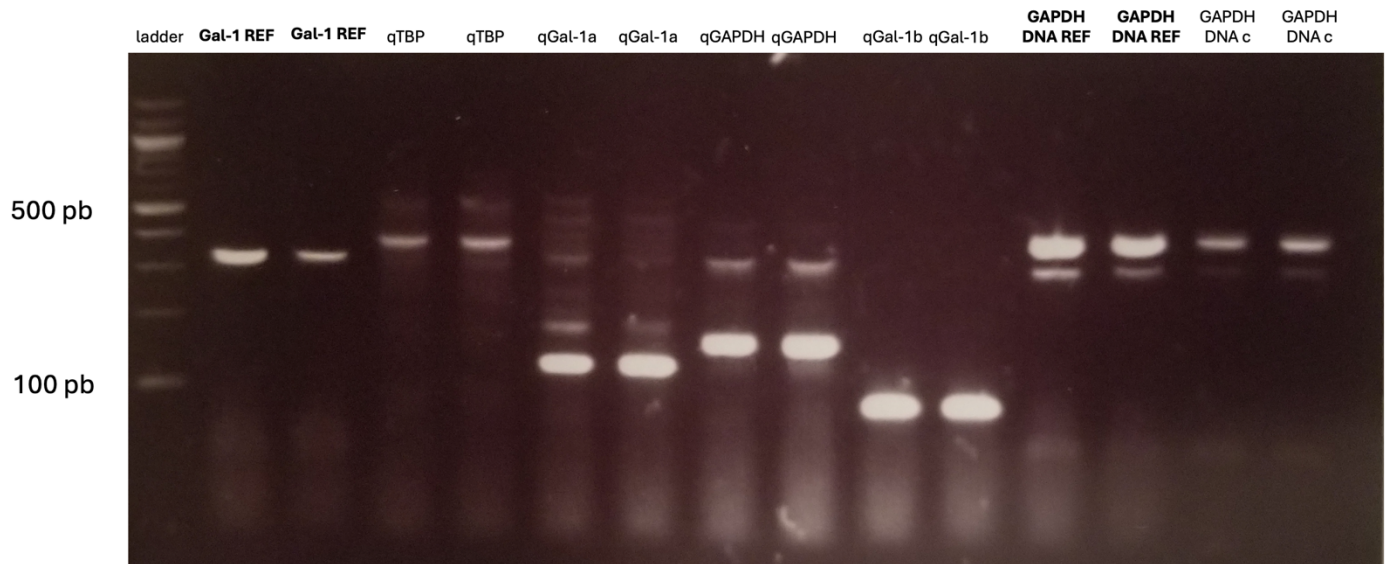
Zhang, P., P. Zhang, B. Shi, M. Zhou, H. Jiang, H. Zhang, X. Pan, H. Gao, H. Sun, et Z. Li. 2014. « Galectin-1 Overexpression Promotes Progression and Chemoresistance to Cisplatin in Epithelial Ovarian Cancer ». *Cell Death & Disease* 5 (1): e991-e991. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.526>.

Zhang, Peng-Fei, Jing Wu, Jin-Hong Luo, Ke-Sang Li, Fei Wang, Wei Huang, Yin Wu, Shui-Ping Gao, Xue-Mei Zhang, et Peng-Nan Zhang. 2019. « SNHG22 Overexpression Indicates Poor Prognosis and Induces Chemotherapy Resistance via the miR-2467/Gal-1 Signaling Pathway in Epithelial Ovarian Carcinoma ». *Aging* 11 (19): 8204-16. <https://doi.org/10.18632/aging.102313>.

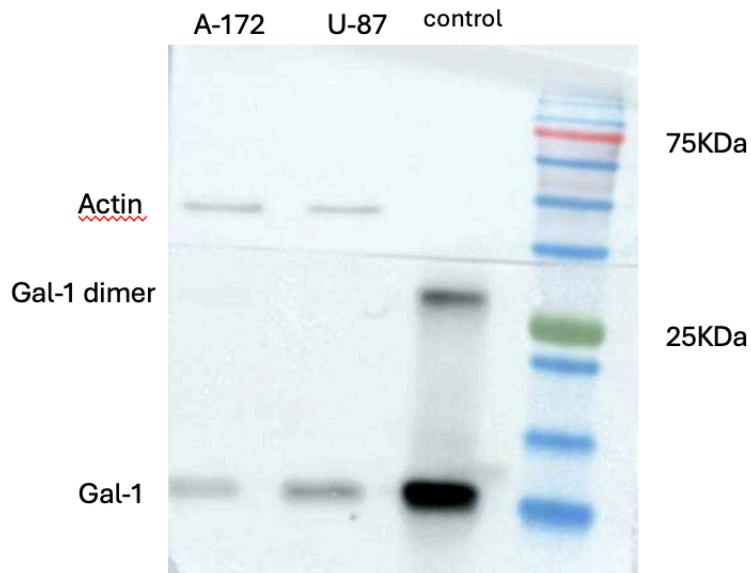
Zhang, Xuehua, Leilei Zhao, He Zhang, Yurui Zhang, Huanyu Ju, Xiaoyu Wang, Huan Ren,

- Xiao Zhu, et Yucui Dong. 2022. « The immunosuppressive microenvironment and immunotherapy in human glioblastoma ». *Frontiers in Immunology* 13 (novembre):1003651. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1003651>.
- Zhang, Ye, Maoyu Li, Xiaomei Gao, Yongheng Chen, et Ting Liu. 2019. « Nanotechnology in cancer diagnosis: progress, challenges and opportunities ». *Journal of Hematology & Oncology* 12 (décembre):137. <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0833-3>.
- Zheng, Fang, Yucheng Pang, Luyao Li, Yuxing Pang, Jiabin Zhang, Xinyi Wang, et Geert Raes. 2022. « Applications of Nanobodies in Brain Diseases ». *Frontiers in Immunology* 13:978513. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.978513>.
- Zhou, Xue, Quentin R. Smith, et Xinli Liu. 2021. « Brain Penetrating Peptides and Peptide-Drug Conjugates to Overcome the Blood-Brain Barrier and Target CNS Diseases ». *Wiley Interdisciplinary Reviews. Nanomedicine and Nanobiotechnology* 13 (4): e1695. <https://doi.org/10.1002/wnan.1695>.
- Zhou, Yutong, Feiyan Zhu, Yang Liu, Meng Zheng, Yibin Wang, Dongya Zhang, Yasutaka Anraku, et al. 2020. « Blood-brain barrier–penetrating siRNA nanomedicine for Alzheimer’s disease therapy ». *Science Advances* 6 (41): eabc7031. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abc7031>.
- Zhu, Chen, Ana C. Anderson, Anna Schubart, Huabao Xiong, Jaime Imitola, Samia J. Khoury, Xin Xiao Zheng, Terry B. Strom, et Vijay K. Kuchroo. 2005. « The Tim-3 Ligand Galectin-9 Negatively Regulates T Helper Type 1 Immunity ». *Nature Immunology* 6 (12): 1245-52. <https://doi.org/10.1038/ni1271>.
- Zhu, Haiyan, Aixue Chen, Saisai Li, Xuejiao Tao, Bo Sheng, Mandika Chetry, et Xueqiong Zhu. 2017. « Predictive role of galectin-1 and integrin $\alpha 5\beta 1$ in cisplatin-based neoadjuvant chemotherapy of bulky squamous cervical cancer ». *Bioscience Reports* 37 (5): BSR20170958. <https://doi.org/10.1042/BSR20170958>.
- Zhu, Hongtao, Dan Liu, Lidong Cheng, Jingdian Liu, Guanghui Wang, Huan Li, Yang Zhang, et al. 2022. « Prognostic Value and Biological Function of Galectins in Malignant Glioma ». *Frontiers in Oncology* 12 (juin):834307. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.834307>.

ANNEXE



Annexe 1: Présence de *LGALS1* et *GAPDH* dans les cellules U-87 MG (PCR)



Annexe 2: Présence de Gal-1 dans les cellules U-87 MG (Western Blot)