



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



**UNIVERSITÉ
DE LORRAINE**

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par **Tristan MANGEOLLE**

**Nanosondes multimodales pour guider la chirurgie des
carcinomatoses péritonéales d'origine ovarienne**

Le 3 décembre 2018

Membres du jury :

Rapporteurs :	Pr Cécile BRIGAND	PU-PH, Département de chirurgie digestive, Hopitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg
	Pr Anne-Sophie BATS	PU-PH, Service de gynécologie, Faculté Paris-Descartes, Hôpital Européen Georges-Pompidou, Paris
Examineurs :	Dr Thomas PONS	CR INSERM, Laboratoire de physique et d'étude des matériaux, Université Pierre et Marie Curie, Paris
	Pr. Frédéric MARCHAL	PU-PH, CRAN-UMR 7039, Université de Lorraine, CNRS, Institut de Cancérologie de Lorraine Directeur de thèse

**Centre de Recherche en Automatique de Nancy – CNRS UMR 7039 - Université de Lorraine, Institut de
Cancérologie de Lorraine, 6 avenue de Bourgogne, 54519 Vandœuvre-lès-Nancy cedex**

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier mon directeur de thèse, **Monsieur le Professeur Frédéric Marchal**, professeur des universités et praticien hospitalier. Sans vous ces travaux n'auraient pu voir le jour, et sans vous, ils n'auraient pu être menés à bien. Je resterai toujours admiratif de vos connaissances, de vos compétences, et votre détermination, unanimement reconnues, tant par vos pairs, vos étudiants, que par vos patients. Travailler sous votre direction a été un honneur, je vous souhaite tout le succès et le bonheur possible dans la poursuite de vos travaux.

Ma reconnaissance va aussi à Mesdames les Professeurs Cécile Brigand et Anne-Sophie Bats, qui nous ont fait l'honneur d'accepter l'évaluation de ces travaux, et le plaisir de les discuter lors de la soutenance. Ces échanges étaient extrêmement stimulants, et je souhaite qu'ils puissent orienter les futurs travaux menés par le laboratoire.

J'ai aussi eu la chance de travailler avec **Monsieur le Docteur Thomas Pons**, ainsi que Monsieur le **Professeur Nicolas Lequeux**, et Mademoiselle **Manon Debayle**, au sein de l'ESPCI de Paris. Cher Thomas, avoir travaillé avec toi et ton équipe a été un plaisir, riche d'enseignements et très motivant pour avancer ce projet. Vous avez toujours été réactifs, ouverts, et nos échanges lors de ces 3 ans m'auront beaucoup appris.

Je remercie Madame le Docteur Lina Bolotine, directrice de l'équipe de recherche translationnelle de l'ICL. Vos nombreux conseils et votre optimisme auront permis d'avancer ces travaux.

Ma reconnaissance va aussi à Madame le Docteur Sophie Marchal. Votre direction et votre expérience ont permis de réussir notre *review* dans de très bonnes conditions. Votre rigueur, votre ouverture, et vos -très nombreuses- corrections ont abouti à ce premier papier. Merci beaucoup Sophie.

Un grand merci aussi à Monsieur le Professeur Jean-Louis Merlin, directeur de la recherche à l'institut, qui m'a d'abord passionné par ses enseignements, puis encouragé pour mener à bien ce doctorat.

Ces travaux n'auraient pu être rédigés dans un anglais conventionnel et acceptable sans l'aide de Madame Dominique Marius Leprince. J'ai beaucoup apprécié ces années passées à vos côtés Dominique, votre soutien, votre humour, et votre aide ont beaucoup compté, mille fois merci.

Aucun résultat répétable n'aurait été obtenu sans l'aide de nos techniciennes, en premier lieu Madame Aurélie François. Ton appui et ton expérience, ainsi que ta gestion rigoureuse du laboratoire, auront été décisifs. Enfin, tu as sauvé le laboratoire du destin subi par mon bureau, ce qui n'est pas rien. Merci beaucoup pour ces trois années.

Je remercie également Mesdemoiselles Laureline Lamy et Elise Cerymele. Je suis heureux d'avoir pu vous côtoyer, de votre diplôme à vos carrières, et je vous souhaite à toutes les deux de pouvoir évoluer et vous épanouir au sein des métiers de la recherche.

A ma camarade de doctorat, Mademoiselle le Docteur Marie Millard. Ces trois années ensemble auront été l'occasion d'affronter maints défis. Je te souhaite le meilleur dans la suite de ton cursus, avec tout le bonheur possible.

A mon ami venu du froid, Ilya Yakavets. Cette thèse n'aurait pu aboutir sans toi, et si j'ai beaucoup apprécié ton aide et tes nombreux conseils, j'apprécie encore plus notre amitié. Je te souhaite d'avoir le post doctorat qui te plaît, et de pouvoir poursuivre les thématiques qui sauront te plaire.

Enfin, je souhaite remercier Mademoiselle le Docteur Estelle Bastien, rencontrée sur les bancs de la fac de pharmacie et retrouvée au laboratoire. J'ai apprécié ton enthousiasme, tes nombreux conseils, et ta façon, parfois peu conventionnelle, de travailler. Je suis heureux de pouvoir te compter parmi mes amis.

Dédicaces

A ma maman, Catherine Grosjean, sans qui ces études auraient été impossibles,

A mon frère, Valentin, ainsi que sa compagne Pauline, et mon futur neveu,

A mes grands-parents, Monique et Jean-Pierre Mangeolle, et mon père Francis,

A Z, ton appui et ton amour comptent énormément à mes yeux,

A Madame le Docteur Stéphanie Grandemange et Monsieur le Professeur Raphaël Duval, mes mentors

A Paul Grosjean et Frédéric Gense, colocataires exceptionnels,

A Marion, Jérémy et Maël Reuchet,

A la 5^e Compagnie du 35^e Régiment d'Infanterie,

A la 3^e Section de la 9^e Cie du 35^e Régiment d'Infanterie, Sentinelle Strasbourg
décembre 2018,

A à la 1^{ere} section de la 1^{ere} Compagnie du 1^{er} Bataillon de l'ENSOA, aout 2015, trois
fois première,

Au sergent Mathieu M,

A mon « père militaire », Monsieur le Lieutenant Philippe Revy, vous resterez mon
exemple.

Table des matières

1. État de l'art	
1.1 Cancers ovariens.....	1
1.1.1. Épidémiologie	1
1.1.2. Physiologie de l'ovaire et de la cavité péritonéale	2
1.1.3. Physiopathologie du cancer de l'ovaire	3
1.1.4. Diagnostic	5
1.1.4 Traitement de référence	6
1.1.5. Traitements en développement.....	11
1.1.6. Nécessité d'une chirurgie améliorée	12
1.2. Chirurgie de fluorescence	13
1.2.1. Bases théoriques de la fluorescence	14
1.2.2. Applications au guidage de la chirurgie.....	15
1.2.3. Fluorophores organiques	15
1.2.4. Systèmes d'imagerie	16
1.2.5. Utilisation de sondes ciblées.....	17
1.2.6. Le ciblage du récepteur de folate α	18
1.2.7. Fluorescence infrarouge	21
1.2.8. Fluorophores infrarouges.....	22
1.2.9. Approche multimodale	24
1.3. Quantum dots	46
1.3.1. Généralités.....	46
1.3.2. Avantages des QDs comparés aux fluorophores organiques.....	49

1.3.3. Utilisation des QD en milieux biologiques.....	51
1.3.4. Multimodalité	52
1.3.5. Ciblage	54
1.3.6. Ciblage folate	55
1.3.7. Toxicité.....	56
1.3.8. Avantage d'une injection IP.....	57
1.3.9. Une affaire de taille	58
1.3.10 Ou de chimie de surface	59
2. Objectifs	62
3. Résultats.....	63
3.1. QD rouges <i>in vitro</i>	67
3.1.1. Introduction.....	67
3.1.2. Matériels et méthodes.....	68
3.1.3. Résultats et discussion	71
3.1.4. Conclusions	76
3.2. QD Infrarouges sur modèle animal	77
3.2.1. Introduction.....	77
3.2.2 Matériels et méthodes.....	77
3.2.3. Résultats et discussion	81
3.2.4. Conclusions	86
3.3. Agrégats de <i>quantum dots</i> en nanoparticules de silice	88
3.3.1. Introduction.....	88
3.3.2. Matériels et méthodes.....	88
3.3.3. Résultats et discussion	90

3.3.4. Conclusions	91
4. Discussion.....	93
5. Conclusions et perspectives	101
6. Références.....	105
7. Production scientifique.....	121
Publications	123
Communications orales et par poster.....	123

1. État de l'art

1.1 Cancers ovariens

1.1.1. Épidémiologie

Les cancers ovariens constituent une exception parmi les cancers humains : s'ils sont relativement rares, avec, pour l'ensemble de la population mondiale environ 239 000 nouveaux cas estimés en 2012, ils demeurent particulièrement mortels, avec environ 152 000 décès estimés cette même année. En France, l'institut national du cancer prévoit environ 4 714 nouveaux cas de cancers ovariens pour l'année 2017, sur 185 000 femmes diagnostiquées avec un cancer la même année. (Doufekas and Olaitan, 2014) Cette faible incidence (17e) opposée à cette très forte mortalité (5e cause de mortalité par cancer avec 3 111 décès prévu en 2017) fait du cancer de l'ovaire le cancer gynécologique le plus mortel. (Siegel et al., 2018) Cette importante mortalité est la conséquence d'un diagnostic généralement tardif, majoritairement posé à un stade avancé (Figure 1), associé aux difficultés du traitement curatif.

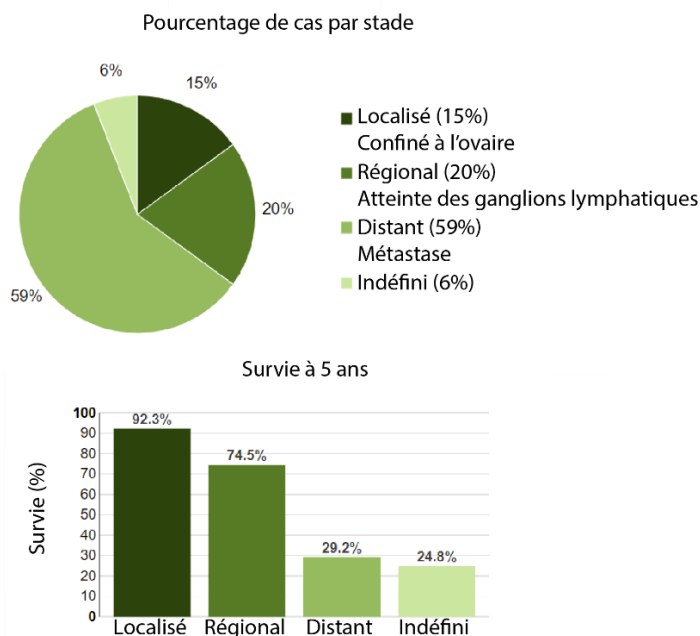


Figure 1 : Pourcentage de cas par stade et survie à 5 ans suivant le stade. (Surveillance, epidemiology and End Results program, mené par le National Cancer Institute américain)

1.1.2. Physiologie de l'ovaire et de la cavité péritonéale

Localisés au niveau du pelvis, les deux ovaires sont disposés de part et d'autre de l'utérus, auquel ils sont reliés par les trompes de Fallope. Leur rôle premier est la production d'ovocyte, sous l'action des hormones hypophysaires, en particulier l'hormone lutéinisante et l'hormone folliculostimulante. Leur première particularité anatomique, par comparaison avec les autres organes présents dans la cavité péritonéale, est de ne pas être recouverts d'une membrane séreuse, le péritoine, contrairement aux organes des systèmes digestifs. Les ovaires sont donc baignés directement dans le fluide péritonéal, qui circule dans toute la cavité péritonéale.

Chaque ovaire est revêtu d'un épithélium pavimenteux cubique ou simple, et comprends deux zones : une située en périphérie, appelée zone corticale, qui comporte les follicules ovariens contenant les ovocytes et le stroma ovarien ; et la zone médullaire située au centre de l'ovaire, constituée de tissus conjonctifs lâches et contenant les vaisseaux sanguins et lymphatiques, ainsi que les nerfs.

Les cancers ovariens ont longtemps été classés suivant leur type histologique, épithélial ou non, jusqu'à l'établissement d'une classification plus fine, basée sur leurs morphologies et leurs implications cliniques.(Matz et al., 2017)

Paradoxalement, il apparait que la majorité des cancers « ovariens » ne sont pas originaires de l'ovaire, mais des trompes de Fallope. Près de 75% des cancers ovariens sont des carcinomes ovariens séreux de haut grade, classés type II, souvent diagnostiqués à un stade avancé offrant de faibles chances de survie.

Ils sont majoritairement dérivés des cellules épithéliales des trompes de Fallope.(Kindelberger et al., 2007) Ces cellules sont très facilement exfoliées(Piek et al., 2001) et peuvent, lors de l'ovulation, migrer des trompes à la surface encore dénudée de l'ovaire, puis y former un kyste, avant de se transformer en cellules cancéreuses. Elles peuvent aussi se transformer sur les trompes puis migrer jusqu'à l'ovaire.(Kurman and Shih, 2010) Cette implication des cellules des trompes de Fallope

a été confirmée cliniquement, mais les mécanismes mis en jeu restent encore à élucider.(Labidi-Galy et al., 2017)

Les autres types histologiques de cancers ovariens sont classés type I, et regroupent les adénocarcinomes à cellules claires, et les carcinomes endométrioïdes, eux aussi suspectés d'être dérivés des trompes.(Wang et al., 2015) A ceux-ci s'ajoutent aussi les carcinomes mucineux ou de Brenner. Ces cancers « ovariens » de type I, minoritaires sont souvent diagnostiqués à des stades plus précoces, et offrent donc un meilleur pronostic

1.1.3. Physiopathologie du cancer de l'ovaire

Dans ce modèle, les cellules épithéliales des trompes régulièrement exposées aux cytokines pro-inflammatoires associées à l'ovulation et aux espèces réactives de l'oxygène peuvent subir une mutation du gène de la protéine P53, et se transformer. Les cellules cancéreuses ainsi formées vont se multiplier, le cancer est alors confiné à son site d'origine, défini par la Fédération Internationale des Gynécologues et Obstétriciens (FIGO) comme un stade FIGO I (table I). Le cancer va alors s'étendre à l'ovaire, à l'utérus ou aux autres tissus pelviens intrapéritonéaux (FIGO II). Ces stades sont généralement asymptomatiques, retardant d'autant le diagnostic.

À partir de cette tumeur primaire et de ses extensions, les cellules cancéreuses peuvent réaliser leur transition épithélio-mésenchymateuse, et être exfoliées et libérées dans le fluide péritonéal. En suspension dans ce fluide, les cellules vont s'agréger et former des sphéroïdes. Sous cette forme, les cellules présentent une résistance accrue face aux cellules immunitaires et aux chimiothérapies. En outre, ces sphéroïdes vont interagir avec de nombreux types cellulaires du microenvironnement péritonéal (adipocyte, cellules immunitaires, épithélium, plaquette), et ainsi stimuler le processus métastatique.

Table I : Classification FIGO des cancers ovariens, des tubes de Fallopes et du péritoine.

Stade FIGO	Description	Stade TNM
I	Tumeur confinée aux ovaires ou aux trompes de Fallope	T1
IA	Tumeur limitée à un ovaire (capsule intacte) ou à une trompe de Fallope, absence de tumeurs en surface des ovaires ou trompes de Fallope, pas de cellules malignes dans l'ascite ou les lavages péritonéaux	T1a
IB	Tumeur limitée aux ovaires (capsules intactes) ou aux trompes de Fallope, absence de tumeurs en surface des ovaires ou trompe de Fallope, pas de cellules malignes dans l'ascite ou les lavages péritonéaux	T1b
IC	Tumeur limitée à une ou aux deux ovaires ou trompes de Fallope, avec soit : *IC1 : libération de cellules cancéreuses due à la chirurgie *IC2 : capsule rompue avant la chirurgie ou tumeur en surface des ovaires ou des trompes de Fallope *IC3 : cellules malignes dans l'ascite ou les lavages péritonéaux	T1c
II	Tumeur impliquant un ou les deux ovaires, ou les trompes de Fallope, avec extension pelvienne ou cancer péritonéal primaire	T2
IIA	Extension ou implant tumoraux sur l'utérus et/ou les trompes de Fallope et/ou les ovaires	T2a
IIB	Extension tumorale aux autres tissus intrapéritonéaux pelviens	T2b
III	Tumeur impliquant un ou les deux ovaires, ou les trompes de Fallope, ou cancer péritonéal primaire avec confirmation histologique ou cytologique d'une invasion péritonéale au-delà du pelvis, ou métastase dans les ganglions lymphatiques rétro péritonéaux	T3
IIIA	IIIA1 : ganglions rétro péritonéaux positifs *IIIA1 (i) : métastase jusqu'à 10 mm dans sa plus grande dimension *IIIA1 (ii) : métastase de plus de 10 mm dans sa plus grande dimension IIIAA2 : implants tumoraux extra pelviens microscopiques avec ou sans atteinte des ganglions rétro péritonéaux	T1, T2, T3aN1 T3a/T3aN1
	Métastases péritonéales macroscopiques extra pelvienne de plus de 2 cm dans leur plus grande dimension, sans atteinte des ganglions rétro péritonéaux	T3a/T3aN1
IIIB	Métastases péritonéales macroscopiques extra pelvienne de plus de 2 cm dans leur plus grande dimension, avec ou sans atteinte des ganglions rétro péritonéaux (inclus l'atteinte de la capsule hépatique ou de la rate sans implication du parenchyme de ses organes)	T3b/T3bN1
IIIC	Métastases distantes, à l'exclusion de la carcinomatose péritonéale	T3c/T3cN1
IV	*IVA : effusion pleurale avec cytologie positive *IVB : métastases parenchymales et atteinte des organes extra-abdominaux (inclut les ganglions lymphatiques inguinaux et intra-abdominaux)	Tout T, tout N et M1

Ces sphéroïdes vont ensuite réaliser leur transition mésenchymo-épithéliale, adhérer au mésothélium du péritoine ou des organes péritonéaux, puis infiltrer les tissus sous-jacents avant de s'y multiplier. Les cellules cancéreuses ainsi implantées vont alors proliférer, stimuler l'angiogenèse et former un nodule.

Ce phénomène se répète et s'amplifie, la quantité de cellules cancéreuses en circulation dans le fluide péritonéal évolue de façon exponentielle. Elles vont alors envahir les réseaux lymphatiques, réduisant le drainage du fluide péritonéal, et augmenter la perméabilité du péritoine, en sécrétant du facteur de croissance endothéliale, entraînant ainsi une ascite.(Herr et al., 2012) C'est majoritairement à ce stade (FIGO III) que les premiers symptômes apparaissent, notamment des ballonnements et douleurs pelviennes et abdominales.

Cette apparition tardive des symptômes, ajoutée à l'absence de biomarqueur fiable aux stades précoces des cancers ovariens, explique le diagnostic tardif.(Ueland, 2017) Une fois la carcinomatose péritonéale établie, les cellules cancéreuses en suspension dans le fluide ascitique peuvent être drainées par le réseau lymphatique du diaphragme, le franchir et rejoindre la circulation pour établir des métastases extra-péritonéales (FIGO IV).(Abu-Hijleh et al., 1995)

1.1.4. Diagnostic

Face à ces symptômes, des examens pelviens et rectovaginaux, associés à l'imagerie médicale (échographie transvaginale et abdominale, tomographie assistée par ordinateur ou par émission de positron et imagerie de résonance magnétique) sont réalisés pour détecter d'éventuelles masses ovariennes, et estimer leur localisation et leur taille.(Sokalska et al., 2009) Le dosage sanguin du marqueur tumoral CA 125 (*carbohydrate antigen 125*) est aussi effectué dans le cadre du diagnostic.

Le diagnostic intervient majoritairement en fin de vie active, les patientes étant âgées en moyenne de 63 ans.

La majorité des patientes présente alors une ascite et des troubles digestifs (constipation, obstruction, diarrhée, vomissement et reflux gastro-intestinal), des ballonnements, douleurs abdominales et pelviennes, une sensation d'épuisement et difficultés respiratoires.(Goff et al., 2000) (Doufekas and Olaitan, 2014)

Une laparoscopie et l'excision d'éventuelles masses tumorales restent recommandées, pour confirmer le diagnostic, préciser le type histologique des tumeurs, et juger de l'extension du cancer. (Demir and Marchand, 2012)

1.1.4 Traitement de référence

Face à ces stades avancés, et notamment la carcinomatose péritonéale, un traitement curatif doit atteindre 3 objectifs complémentaires :

Premièrement, la résection chirurgicale de l'ensemble des tissus cancéreux, afin de minimiser la quantité de cellules cancéreuses résiduelles, ainsi appelée chirurgie de cytoréduction. Ensuite, l'éradication de ces cellules résiduelles puis la prévention de toute récurrence par chimiothérapie.

Les premiers efforts en termes de cytoréduction ont débuté en 1934. Pour soulager les patientes des symptômes induits par la carcinomatose péritonéale, les premières chirurgies, souvent associées à la radiothérapie et parfois à la chimiothérapie, ont été alors développées.(Neuwirth et al., 2016)(Neuwirth et al., 2016) Ces traitements alors étaient à visée palliative plus que curative, la réussite d'une cytoréduction totale (*i.e.* sans tumeurs résiduelles visibles) paraissant hors d'atteinte, voire inutile. Cette dernière assomption n'a été battue en brèche que 40 ans après, lorsque l'utilisation d'une chirurgie plus agressive a permis d'améliorer la survie (Munnell, 1968, 1969), et que cette amélioration était inversement proportionnelle à la taille des tumeurs résiduelles. (Griffiths, 1975; Griffiths et al., 1979)

Il était donc nécessaire de développer des outils pour prédire la possibilité ou non d'une cytoréduction complète. Dans le but d'évaluer l'étendue des carcinomatoses

péritonéales, et pour évaluer leur résécabilité, deux systèmes de score ont été développés.

Le premier score a été développé par Fagotti.(Fagotti et al., 2006) Etabli lors de la coelioscopie, il permet d'estimer la résécabilité de la carcinomatose péritonéale. Ce score repose sur six items : l'atteinte du grand épiploon, du diaphragme, une rétraction mésentérique, l'infiltration de l'estomac et des lésions hépatiques. Chacun des items reçoit un score en fonction des observations (Table II).

Tableau II. Système de score établi par Fagotti.(Fagotti et al., 2006)

Paramètres	Score
Gâteau épiploïque	0 localisation isolée ou 2 : infiltration diffuse allant à la grande courbure de l'estomac
Carcinose péritonéale	0 : carcinose atteignant des territoires limités (gouttière para colique ou péritoine pelvien résécables chirurgicalement par péritonectomie) ou 2 : infiltration péritonéale massive NON RÉSÉCABLE ou distribution miliaire
Carcinose diaphragmatique	0 : tous les autres cas ou 2 infiltration large ou nodules confluants infiltrant la majeure partie de la surface diaphragmatique
Rétraction mésentérique	0 : absence de rétraction mésentérique ou 2 : rétraction mésentérique
Infiltration du tube digestif	0 : tous les autres cas ou 2 : une résection digestive est envisagée
Infiltration de l'estomac	0 : tous les autres cas ou 2 : nodules infiltrant l'estomac et/ ou rate/et/ ou petit épiploon
Métastases hépatiques	0 : tous les autres cas ou 2 : toute lésion de surface >2cm

La somme des points de ces items permet d'établir un score , qui s'il est supérieur ou égal à 8, permet de prédire une cytoréduction incomplète.(Fagotti et al., 2008) Le traitement débute alors par une chimiothérapie néo adjuvante dans le but de rendre la cytoréduction complète accessible. Pour les patientes avec un score inférieur à 8, la cytoréduction est le traitement de référence.

L'index de carcinomatose péritonéale (ICP), développé par Sugarbaker,(Sugarbaker and Jablonski, 1995) basé sur l'observation de l'étendue de la carcinomatose par laparotomie associée ou non à la tomographie assistée par ordinateur, est le deuxième score (Figure 2). L'abdomen est virtuellement divisé en 9 régions, numérotées de 0 (pour la partie centrale) à 8, du cadran supérieur gauche (1)

au flanc droit (8) dans le sens horaire. L'intestin grêle est subdivisé en 4 zones, du jéjunum supérieur (9) à l'iléon distal. Pour chaque région, la présence et la taille maximale de tumeurs détectées définit un score de 0 (absence de tumeur) à 3 (tumeur d'au moins 5 cm). La somme des scores de chaque région constitue l'index de carcinomatose péritonéale (ICP) (Neuwirth et al., 2016). Cet index a été validé pour les carcinomatoses péritonéales d'origine ovariennes (Tentes et al., 2003) et est utilisé pour choisir et planifier le traitement, avec un objectif curatif jusqu'à un ICP égal à 30 pour les cancers ovariens. Au besoin, une chimiothérapie néo-adjuvante peut être utilisée en amont de l'opération pour réduire la masse tumorale (Sato and Itamochi, 2014; Schwartz, 2008) toutefois cette approche n'est pas systématique.

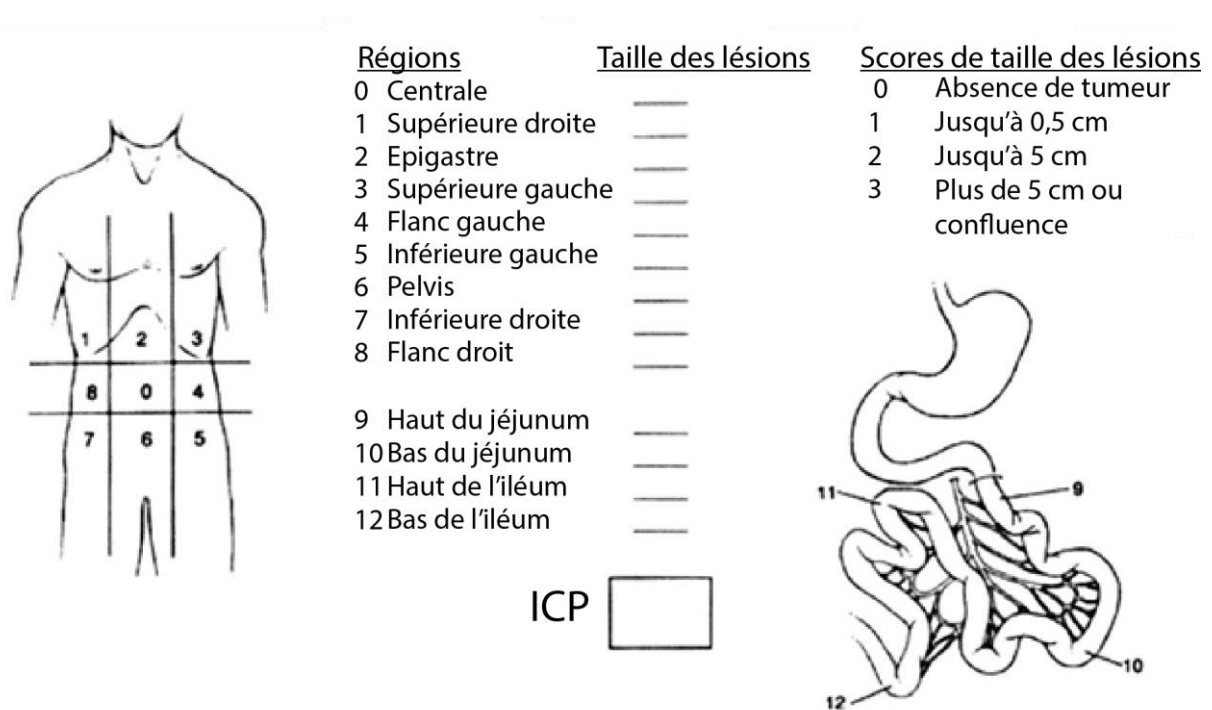


Figure 2 : Index de carcinomatose péritonéale, avec les 12 régions et le score attribués à chaque région suivant la taille des tumeurs. (Sugarbaker and Jablonski, 1995)

Une fois la carcinomatose quantifiée et cartographiée, le traitement chirurgical peut débuter. Celle-ci reste particulièrement difficile, le péritoine lui-même mesure à lui seul plus d'un mètre carré de surface (Albanese et al., 2009) avec de nombreux replis, sur laquelle se répartissent les implants tumoraux, parfois de taille submillimétrique. A cette importance surface s'ajoutait l'absence d'un protocole

chirurgical standardisé, qui rendait les résultats extrêmement aléatoires d'un chirurgien à l'autre. Cette standardisation a été réalisée, dans la continuité de l'ICP, par le Pr Sugarbaker. En associant plusieurs procédures chirurgicales et en précisant les points clés d'une chirurgie efficace, il a posé les jalons d'une méthode standardisée pour tenter d'atteindre une cytoréduction complète.

Usuellement, l'opération se fait ventre ouvert, et débute par une hystérectomie totale avec salpingoovariectomie bilatérale, suivie de la résection de l'omentum, puis au besoin de la rate. La chirurgie se poursuit en abordant le quadrant supérieur droit, en éliminant toute les métastases présentes sur le foie, la partie droite du diaphragme, et en éliminant le péritoine pour atteindre l'espace sous hépatique, afin d'examiner le rein droit et la glande surrénale. Le chirurgien explore ensuite la partie supérieure centrale de l'abdomen, et résèque les éventuelles métastases sur le sillon transverse du foie, la partie inférieure de l'omentum et l'estomac. Il aborde ensuite le cadrant supérieur gauche, notamment les surfaces du diaphragme et du pancréas. L'intestin grêle est exploré, les nodules réséqués ainsi qu'au niveau des flancs. Enfin, il termine par la cavité pelvienne, en réséquant les métastases présentes sur les ovaires, l'utérus et le rectum. Il procède aussi à une appendicectomie et à des curages ganglionnaires pelviens et lomboaortiques. La chirurgie est considérée comme complète lorsque la totalité des tissus cancéreux macroscopiques a été excisée.(Lim et al., 2012)

Elle est alors suivie d'une chimiothérapie, dont l'objectif est de finaliser l'élimination des tissus cancéreux microscopiques et des cellules circulantes. Cette chimiothérapie a aussi évolué au fil du temps, tant dans le choix des agents de chimiothérapie que leurs modalités d'administrations.(Cristea et al., 2010)

Les premières chimiothérapies des cancers ovariens ont été basées sur des agents alkylants, jusqu'au premier essai utilisant des sels de platine, plus actifs contre les cancers ovariens.(Rossof et al., 1979; Thigpen et al., 1979) Plusieurs essais cliniques associant ces sels avec d'autres types d'agents de chimiothérapie ont produit la première combinaison efficace, en associant cyclophosphamide et cis-platine.(Decker

et al., 1982) Le cis-platine a ensuite été remplacé par le carboplatine, mieux toléré par les patientes (Alberts et al., 1992) tandis que le cyclophosphamide était remplacé par le paclitaxel, nouvellement disponible, et plus efficace pour les cancers ovariens. (McGuire et al., 1996)

Depuis, la combinaison paclitaxel et carboplatine, administrée en plusieurs cycles par voie intraveineuse, est devenue la chimiothérapie de référence. (du Bois et al., 2003; Ozols et al., 2003)

Toutefois, dans le cas des carcinomatoses péritonéales, les lésions cancéreuses résiduelles sont faiblement vascularisées, et, par définition, confinées à la cavité péritonéale. Le péritoine qui délimite cette cavité agit comme une membrane, et limite la pénétration des agents de chimiothérapie dans la cavité péritonéale (Torres et al., 1978) réduisant leur action. Plus graves, les blessures et l'inflammation, occasionnées par la chirurgie, offrent un environnement immédiatement favorable et protecteur à la prolifération des cellules cancéreuses résiduelles. (Sugarbaker et al., 2003) En conséquence, seuls 50% des patientes répondent à la chimiothérapie intraveineuse, et 30% d'entre elles présentent encore des lésions microscopiques après traitement, tandis plus de 60% des patientes traitées vont, à terme, développer une récurrence. (Fagotti et al., 2010)

Pour augmenter l'efficacité de la chimiothérapie, plusieurs approches ont été proposées, notamment l'utilisation de fortes doses d'agents de chimiothérapie (Ngan et al., 1989) avec une augmentation significative des effets secondaires pour les patientes et sans résultats significatifs. (Vasey, 2003) Cependant, si les tumeurs sont confinées à la cavité péritonéale, et si le péritoine en limite l'accès aux agents de chimiothérapie injectés par voie intraveineuse, l'injection directe de ces agents dans la cavité péritonéale permet d'utiliser d'importantes doses tout en limitant l'exposition systémique. La chimiothérapie intrapéritonéale a donc été développée (Pretorius et al., 1981) et comparée avec succès à la chimiothérapie injectée par voie intraveineuse. Lors des études du groupe d'oncologie gynécologique (GOG) 114 et 172, la chimiothérapie

IP, comparée à une chimiothérapie IV, a augmenté la survie de plusieurs mois .(Armstrong et al., 2006; Trimble and Christian, 2006)

Toutefois, les résultats de ces études ont été longuement discutés, et l'ajout d'inhibiteur d'angiogenèse (bevacuzimab) à la chimiothérapie a remis en cause l'avantage des chimiothérapies IP comparées aux chimiothérapies IV, lors de l'étude GOG 252.

Avec une survie sans récurrence du cancer sans différence significative entre ces deux modalités(Wenzel et al., 2007) la chimiothérapie IV, associant paclitaxel et carboplatine, reste le consensus actuel.

Une approche complémentaire, reposant sur l'hyperthermie (42°C), a aussi été explorée après de premiers résultats cliniques.(Larkin et al., 1977) Toujours pour éviter une hyperthermie systémique, cette modalité de traitement a rapidement été employée par voie intrapéritonéale, associée à la chimiothérapie(Shingleton et al., 1961) menant au développement de la chimio hyperthermie intrapéritonéale (CHIP), appliquée immédiatement après la chirurgie. Si cette dernière modalité de traitement a longtemps fait débat(Markman, 2016) sa supériorité a été démontrée lors d'un essai clinique prospectif randomisé, faisant gagner plus d'un an de survie aux patientes, sans aggravation des effets secondaires.(van Driel et al., 2018) Cependant, des études randomisées sont encore attendues, avant d'implémenter la CHIP en routine pour le traitement des cancers ovariens.(Kireeva et al., 2018)

1.1.5. Traitements en développement

Enfin, le recours aux thérapies ciblées est exploré, en particulier les inhibiteurs de la poly ADP ribosyl polymérase (PARP), parmi lesquels l'olaparib, le rucaparib et le niraparib, qui ont fait l'objet de nombreuses études cliniques. Ces trois molécules sont approuvées par la FDA en monothérapie pour le traitement des cancers ovariens récurrents (olaparib ou rucaparib) ou comme traitement de maintenance des cancers ovariens répondant, au moins partiellement, à la chimiothérapie (olaparib ou

niraparib).(Walsh, 2018) Toutefois, comme pour de nombreux inhibiteurs, des résistances sont déjà observées en milieu clinique.(Ceccaldi et al., 2015)

1.1.6. Nécessité d'une chirurgie améliorée

De toutes les modalités de traitement, la chirurgie reste la clé de voute du traitement. En effet, la résection totale des lésions cancéreuses lors de la cytoréduction augmente significativement la survie moyenne(Figure 3) et la survie sans récidence du cancer.(Elattar et al., 2011) Malgré une cytoréduction considérée comme optimale, près d'une patiente sur deux présente encore des résidus tumoraux de plus d'un centimètre, avec un impact démontré sur la survie.(Covens, 2000; Lakhman et al., 2012) De fait, 70 % des patientes ayant bénéficié d'une cytoréduction « optimale » (sans résidus visibles) présente une rechute dans les deux ans suivant cette chirurgie(Dizon et al., 2002) la chirurgie restant indispensable pour améliorer la survie, comparée à la seule chimiothérapie.(Petrillo et al., 2014)

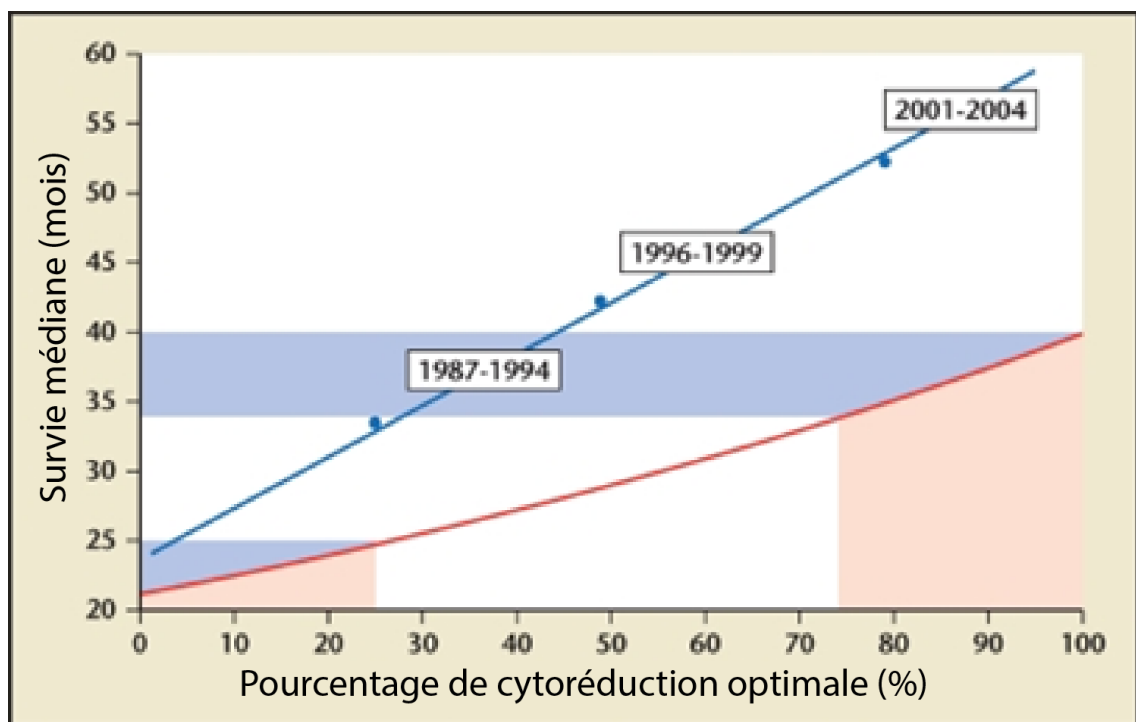


Figure 3 : Relation entre pourcentage de cyroréduction optimale et survie moyenne (en mois).(Schorge et al., 2010)

Cet échec relatif du traitement reste partiellement inexplicé. Les difficultés évidentes de la chirurgie influent probablement, tandis que plusieurs auteurs mettent

en avant l'implication potentielle de métastases microscopiques, donc non repérée par le chirurgien.(Azaïs et al., 2017)

Cette hypothèse ne repose que sur peu de données, et ces micrométastases sont surtout recherchées aux stades précoces (FIGO I et II). Une étude menée sur 122 patientes, diagnostiquées à des stades FIGO I, a permis de détecter des métastases microscopiques dans la cavité péritonéale de 5% de ces patientes.(Shroff et al., 2011)

Une seconde étude, menée sur un échantillon réduit de 30 femmes diagnostiquées à des stades précoces, a finalement diagnostiqué un stade III pour 20% des patientes, après détection de métastases microscopiques sur des biopsies péritonéales.(Soper et al., 1992) Enfin, de récentes études mettent en évidence la présence de tumeurs cachées sous la surface des tissus, elles aussi invisibles aux yeux du chirurgiens.(Hoogstins et al., 2016)

1.2. Chirurgie de fluorescence

Distinguer tissus sains et tissus cancéreux reste un des principaux défis de la chirurgie oncologique, et en particulier pour les lésions microscopiques. Si cette distinction est précise et efficace par imagerie de résonance magnétique ou tomographie assistée par ordinateur, ces modalités ne sont pas facilement utilisables en peropératoire. À cet effet, de nombreux efforts se sont focalisés sur des moyens utilisables pendant la chirurgie, parmi lesquels la chirurgie guidée par la fluorescence.

1.2.1. Bases théoriques de la fluorescence

La fluorescence est la lumière émise par une molécule, appelée fluorophore, après qu'elle ait absorbé un photon (Figure 4). Cette absorption fait passer un électron de la molécule d'un état fondamental, stable et de basse énergie (S_0), à un état excité, instable et de haute énergie (S_2). L'électron redescend alors vers un état excité de plus basse énergie (S_1) par conversion interne et relaxation vibrationnelle, puis à son état fondamental en produisant un photon. Ce photon possède une énergie égale à celle qui sépare les états S_0 et S_1 , inférieure à celle du photon exciteur, et donc de longueur d'onde supérieure (déplacement de Stokes).

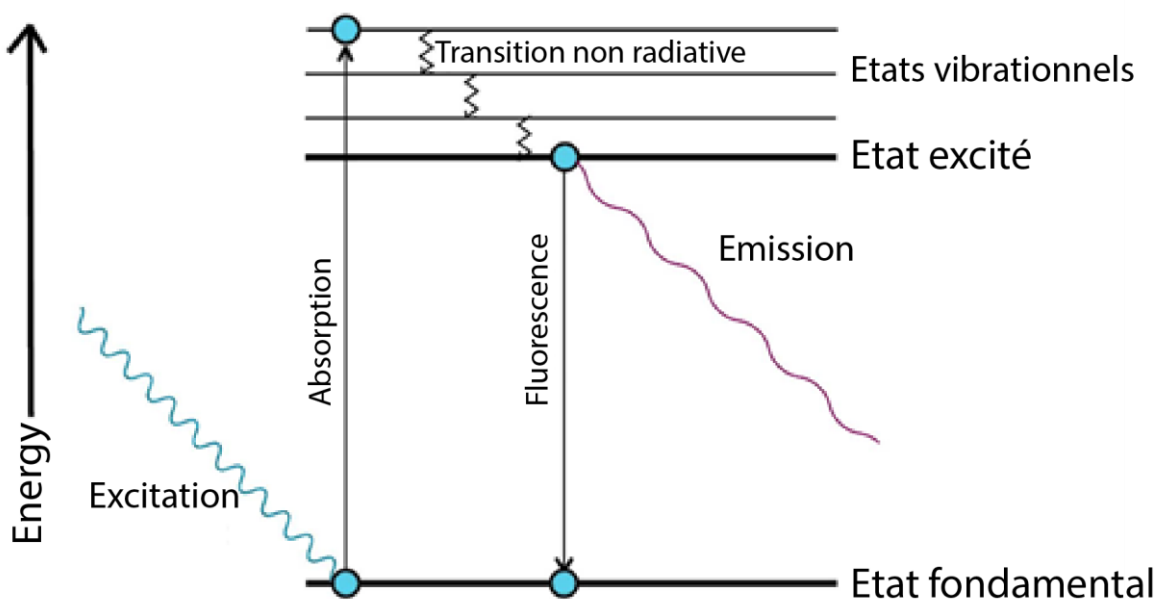


Figure 4 : Diagramme de Jablonski, qui représente le processus par lequel un photon est absorbé et produit l'émission de fluorescence.

Plusieurs paramètres permettent de caractériser l'émission de fluorescence pour chaque fluorophore. En particulier, le rendement quantique de fluorescence, qui correspond au nombre de photons émis par photon absorbé, et le coefficient d'extinction molaire, qui est la probabilité qu'un fluorophore absorbe un photon d'une longueur d'onde donnée, dans un solvant donné. La longueur d'onde d'émission va être conditionnée par la structure de la molécule. (Lichtman and Conchello, 2005)

Les premiers travaux menés sur la fluorescence s'intéressaient principalement aux minéraux et composés organiques, avant de se pencher sur les fluorophores biologiques observés dans de nombreuses plantes, puis les animaux, en débutant par les insectes puis les mammifères.

1.2.2. Applications au guidage de la chirurgie

Herly est le premier à tenter d'utiliser la fluorescence pour discriminer tissus sains et tissus cancéreux. En soumettant à une illumination ultraviolette (UV) plusieurs centaines de tumeurs mammaires, excisées lors de chirurgie, il a observé une fluorescence produite par les tissus cancéreux (Figure 5), permettant de les distinguer des tissus sains.(Herly, 1944)

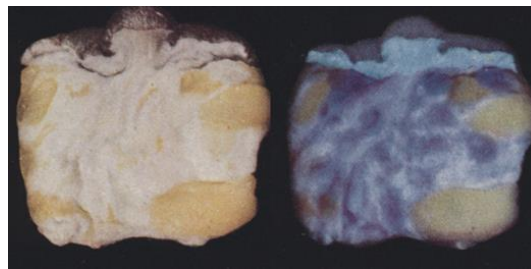


Figure 5 : Photographies réalisées par Herly sur des tumeurs mammaires, en lumière blanche (à gauche) et sous illumination ultraviolette (à droite).(Herly, 1944)

1.2.3. Fluorophores organiques

Cependant, ce phénomène ne se répète pas pour tous les cancers. Le recours à un fluorophore organique, injecté en IV, a donc été envisagé, avec l'espoir d'un marquage différent entre tissus sains et cancéreux.

Les premières tentatives, réalisées quasi immédiatement après injection, furent décevantes, faute d'arriver à discriminer les tissus tumoraux du tissu sain environnant. En allongeant l'intervalle entre l'injection et la visualisation de plusieurs heures, ce contraste apparaît clairement, en particulier pour les tumeurs cérébrales. Après injection de fluorescéine sodique par voie intraveineuse, l'exposition des biopsies ou du champ opératoire sous une lumière UV permet de nettement détecter les tissus cancéreux, rendus fluorescents, tandis que les tissus sains restent hypo

fluorescents.(Moore, 1947) Les tissus cancéreux peuvent alors être excisés avec précision (Figure 6).

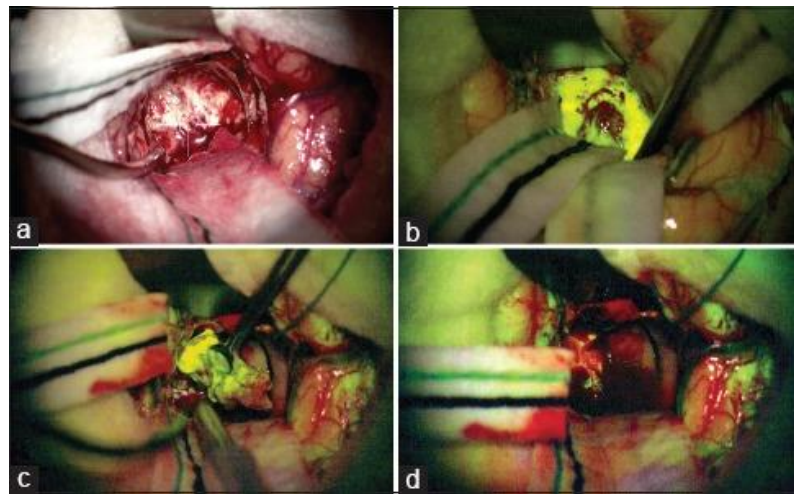


Figure 6 : Extraits d'une vidéo prise pendant la chirurgie d'un glioblastome guidée par la fluorescence de la fluorescéine. Photographies en lumière blanche (a), en fluorescence avant (b), pendant (c) et après l'excision de la tumeur.(Francaviglia et al., 2017)

L'emploi de la fluorescence pour guider la chirurgie a depuis connu un engouement majeur, tant pour la détection du ganglion sentinelle que pour la résection de tissus cancéreux. Cela a mené au développement de systèmes dédiés, associant une source d'excitation (diode laser ou électroluminescente), un système optique pour capter et filtrer la fluorescence, une ou plusieurs caméras, ainsi qu'un système informatique apte à traiter le signal, en remplacement des systèmes artisanaux employés auparavant.(Nagaya et al., 2017)

1.2.4. Systèmes d'imagerie

Ces systèmes regroupent généralement source d'excitation et caméra dans un même module, porté par un bras articulé et relié à un ordinateur qui en assure le contrôle (Figure 7). Un écran déporté affiche l'imagerie de fluorescence, tandis qu'un opérateur peut déplacer la caméra, et régler les paramètres d'acquisition.(DSouza et al., 2016)

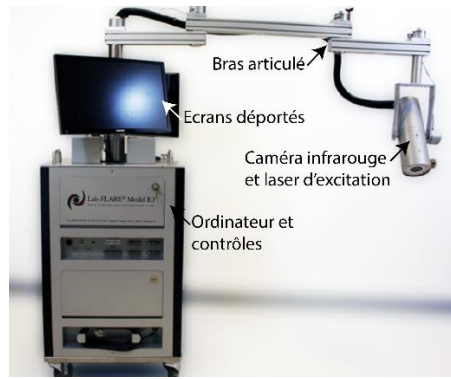


Figure 7 : Système Flare développé par Curadel. Le bras articulé et la caméra peuvent être recouverts d'un champ stérile, tandis que la caméra peut être commandée depuis l'ordinateur ou à l'aide de pédales sans fil.

Des systèmes plus expérimentaux, tels que des lunettes portées directement par le chirurgien, sont aussi en développement.(Liu et al., 2013b) D'un point de vue général, ces systèmes présentent l'avantage d'être relativement accessibles d'un point de vue financier (quelques centaines de milliers d'euros), sans requérir de salle dédiée comme pour les machines utilisées en IRM, ni de protection particulière contrairement aux radiotraceurs. Enfin, contrairement à l'IRM et à la tomographie, l'imagerie de fluorescence offre une image en temps réel du champ opératoire. (Nagaya et al., 2017)

1.2.5. Utilisation de sondes ciblées

L'application de la chirurgie de fluorescence pour guider la cytoréduction des carcinomatoses péritonéales d'origine ovarienne doit faire face à plusieurs autres défis. En premier lieu, la fluorescéine et les colorants organiques ne présentent pas de tumortropisme, mais s'accumulent préférentiellement dans les tumeurs.(Alander et al., 2012; Okuda et al., 2012)

Celles-ci présentent une vascularisation anarchique, sans drainage lymphatique, donc une perméabilité et une rétention accrues des fluorophores (*enhanced permeability and retention (EPR) effect*), rapidement éliminés de la circulation « saine ».(Matsumura and Maeda, 1986)

Si cet effet EPR semble suffisant pour détecter les tumeurs cérébrales, il produit de nombreux faux positifs lors de la chirurgie des cancers ovariens. Le développement

d'agents ciblés était donc indispensable pour guider la cytoréduction des carcinomatoses péritonéales d'origine ovarienne.(Tummers et al., 2015)

1.2.6. Le ciblage du récepteur de folate α

Parmi les cibles identifiées, le récepteur de folate α (RF α) présente de nombreux avantages. Cette protéine ancrée à la membrane par du glycosylphosphatidylinositol, présente une très forte affinité au folate (Kd de 10 pM), mais est faiblement exprimée par les cellules pulmonaires, rénales, placentaires et du plexus choroïde.(Wibowo et al., 2013) Localisés uniquement sur la surface apicale des cellules, les RF α ne sont pas exposés au folate en circulation, à l'exception de ceux exprimés par les tubules proximales des reins, qui assurent ainsi un faible captage du folate libre.(Birn et al., 1997; Parker et al., 2005) A l'inverse la majorité (90%) des tissus cancéreux d'origine ovarienne surexpriment le RF α , (Toffoli et al., 1997) et ce sur l'ensemble de leur surface membranaire, donc accessibles au folate en circulation, permettant leur ciblage.(Hoogstins et al., 2016) Dans le cas des cancers ovariens, c'est un marqueur d'agressivité et de récurrence(Kalli et al., 2008) dont l'expression n'est pas altérée par les chimiothérapies (Crane et al., 2012; Despierre et al., 2013).

Le ciblage de ce récepteur repose sur le couplage d'une drogue, d'un agent d'imagerie ou d'une nanoparticule à son ligand, le folate. Cette petite molécule (441 Da), aussi appelée vitamine B₉, est le précurseur du tétrahydrofolate, coenzyme indispensable à la synthèse d'acide nucléique, et intervient aussi dans la biosynthèse de la s-adénosylméthionine, essentielle pour la méthylation des biomolécules. Il intervient dans la réplication de l'ADN et la division cellulaire, notamment des cellules se divisant rapidement, et a un rôle crucial dans la carcinogenèse.(Choi and Mason, 2000) Disponible comme complément alimentaire, le folate présente l'avantage d'être non immunogène, stable en milieu biologique, et d'un prix accessible par comparaison avec les anticorps monoclonaux.(Yue et al., 2013) Son interaction avec le RF α repose majoritairement sur son extrémité ptérine (Figure 8), qui va se retrouver profondément enfoncée dans le site actif du récepteur, tandis que son extrémité glutamate va rester

exposée en surface, ce qui fait de l'extrémité carboxyle du glutamate le site de conjugaison idéal.(Chen et al., 2013a)

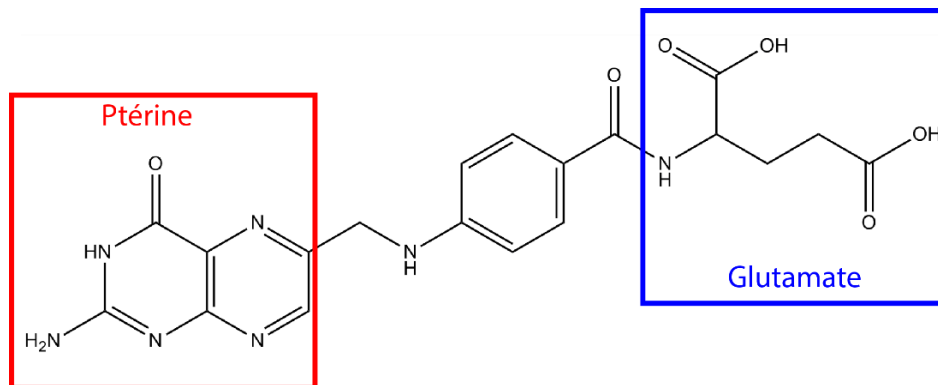


Figure 8 : Formule développée du folate, avec ses groupements ptérine (rouge) et glutamate.

Enfin, la fixation du folate au récepteur déclenche l'endocytose du complexe folate récepteur, permettant l'entrée d'une drogue ou d'une particule conjuguée au folate dans la cellule.(Lu and Low, 2002) L'acidification de l'endosome va réduire l'affinité du récepteur pour son ligand, entraînant leur séparation et le recyclage du récepteur.

Ces propriétés ont mené au développement de plusieurs médicaments et agents d'imagerie, conjugués avec le folate, ou couplés à un anticorps anti $RF\alpha$, aujourd'hui en essais clinique. (Cheung et al., 2016) Ainsi, une sonde fluorescente nommée EC17, associant la fluorescéine et le folate, produite par la compagnie américaine Endocyte est en cours de développement pour guider la chirurgie des tissus cancéreux (Figure 9).

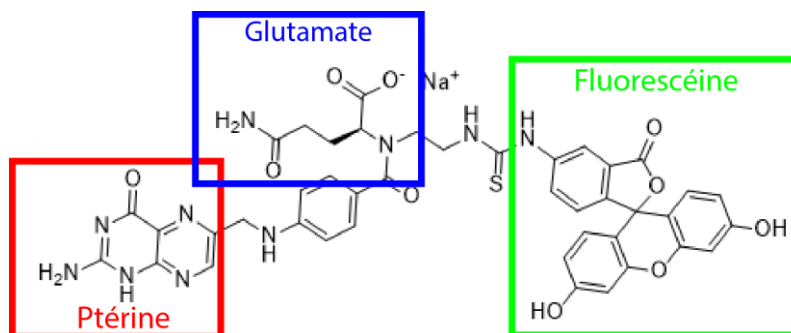


Figure 9 : Formule développée de l'EC17, avec le folate à gauche, avec groupement ptérine (rouge) indispensable au ciblage, et le groupement glutamate (bleu), sur lequel est lié la fluorescéine (verte).

Cette sonde, contrairement à la fluorescéine seule, permet la détection des tissus cancéreux sur modèle murin de carcinomatose péritonéale.(Kennedy et al., 2003) Le premier essai clinique avec cette sonde, injectée en IV à des patientes atteintes de cancers ovariens a démontré l'efficacité de la chirurgie guidée par fluorescence, en augmentant significativement le nombre de nodules tumoraux détectés par le chirurgien (Figure 10), tout en n'interférant pas avec le déroulement de la chirurgie et sans présenter de toxicité ni d'effet secondaire.(van Dam et al., 2011)

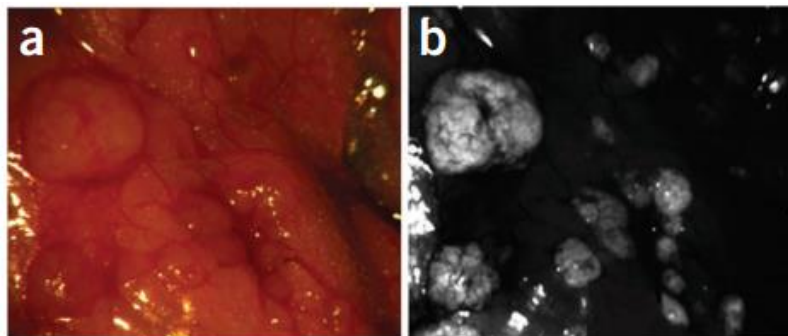


Figure 10 : Photographies en lumière blanche (a) et de fluorescence (b) sous une excitation de 495 nm d'un même champ, lors d'une opération de cytoréduction, 2 à 8h après injection d'EC 17 à raison de 0,3 mg/kg.(van Dam et al., 2011)

Une seconde étude, utilisant une autre molécule, l'acide aminolévulinique, a été menée. Contrairement à l'EC17, spécifiquement endocyté par les cellules, l'acide aminolévulinique est préférentiellement métabolisé par les tissus cancéreux, ce qui entraîne la formation de proto-porphyrine IX, absorbant à 400 nm et émettant à 635 nm.[61] Comme le FITC, ce fluorophore est autorisé dans la chirurgie des glioblastomes, mais aussi des cancers de la vessie.[62] Administré par voie orale lors d'un essai de phase I, menée sur des patientes atteinte d'un cancer ovarien avancé, ce pro-fluorophore a permis de détecter de très nombreuses tumeurs, même microscopiques (jusqu'à 0,5 mm de diamètre), lors de la cytoréduction (Figure 11), puis après réalisation d'une CHIP.(Liu et al., 2014)

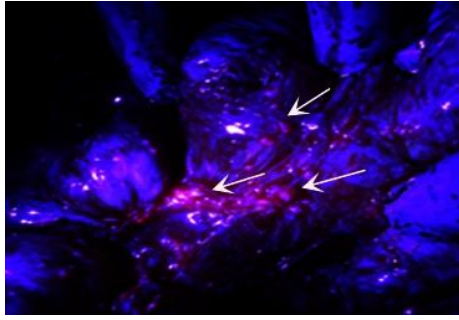


Figure 11 : Photographie d'une carcinomatose péritonéale, prise sous illumination bleue (440 nm), lors d'une opération de cytoréduction sur patiente atteinte d'un cancer ovarien. Les patientes ont ingéré 20 mg/kg d'acide aminolévolinique 2 heures avant l'opération. Les tumeurs, même de taille submillimétrique, émettent une fluorescence rouge. (Liu et al., 2014)

L'utilisation de ces agents permet donc de repérer des tumeurs submillimétriques par fluorescence. Cependant, une étude postérieure utilisant l'EC17 met en évidence le taux important de faux positifs, causés par l'auto fluorescence des tissus, en particulier les organes digestifs, aux longueurs d'onde utilisées. (Tummers et al., 2015)

De plus, ces longueurs d'onde d'excitation et d'émission, appartenant au spectre visible, sont fortement absorbées par les tissus biologique, ce qui limite leur pénétration, et donc la détection, à moins d'un millimètre. (Keating et al., 2016; Quek et al., 2012)

1.2.7. Fluorescence infrarouge

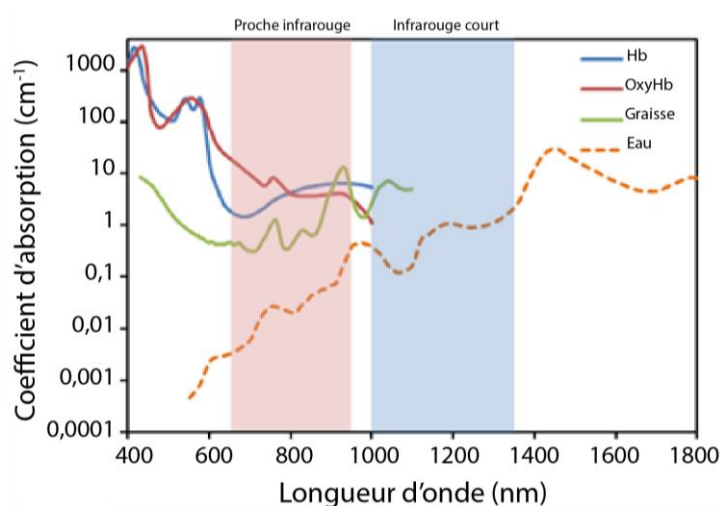


Figure 12 : Coefficient d'absorption (échelle logarithmique) de l'oxyhémoglobine (OxyHb, rouge), de l'hémoglobine (Hb), des graisses et de l'eau en fonction de la longueur d'onde.

Ces obstacles, bien connus dans le cadre de la chirurgie de fluorescence, ont mené à l'utilisation de fluorophores absorbant et émettant dans une des deux fenêtres infrarouges. Ces fenêtres sont délimitées par les absorbances des chromophores biologiques, majoritairement l'hémoglobine, la graisse, et l'eau (Figure 12). Ces longueurs d'onde présentent de nombreux avantages. En premier lieu, là où la lumière visible pénètre, au mieux jusqu'à 3 millimètres, l'excitation infrarouge peut pénétrer jusqu'à 1 centimètre. (Teraphongphom et al., 2017)

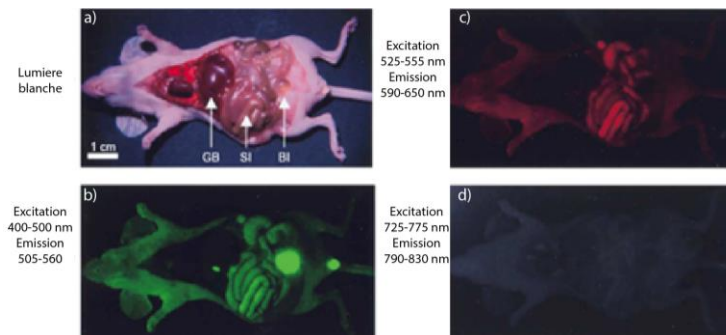


Figure 11 : Photographie en lumière blanche (a) et en fluorescence (b,c et d) d'une souris nude sacrifiée et dont les organes abdominaux sont exposés. Les différents filtres utilisés pour l'excitation et l'émission, bleu/vert (b), vert/rouge (c) et infrarouge/infrarouge (d), permettent d'observer l'auto fluorescence des tissus dans le spectre visible, et l'absence d'auto fluorescence dans le spectre infrarouge.

Autre avantage, les tissus biologiques, soumis à une excitation infrarouge, ne présentent qu'une très faible auto fluorescence, notamment les organes présents dans la cavité péritonéale (Figure 13d). (Frangioni, 2003) Enfin, dans le cadre de la chirurgie de fluorescence, excitation et fluorescence infrarouges sont indétectables par l'œil humain, et n'interfèrent donc pas avec la vision directe du chirurgien. (Frangioni, 2008)

1.2.8. Fluorophores infrarouges

Seuls deux fluorophores infrarouges bénéficient d'une autorisation de mise sur le marché, le bleu de méthylène (*methylene blue MB*) et le vert d'indocyanine (*indocyanine green ICG*). Ce dernier présente des propriétés photo physiques supérieures au MB, et permet d'obtenir une meilleure imagerie. (Matsui et al., 2010) A l'origine développé pour la photographie argentique infrarouge, l'ICG a rapidement trouvé des applications cliniques, d'abord pour mesurer la fonction hépatique puis le débit cardiaque. (Cherrick et al., 1960; Leevy et al., 1962) Rapidement éliminé par le

foie, l'ICG est considéré comme sans danger aux doses utilisées.(Reinhart et al., 2016) D'abord dosé par fluorescence dans le sang, son utilisation en imagerie a ensuite été développée, notamment pour les angiographies rétiniennes.(Raabe et al., 2003)

En oncologie, dans la détection du ganglion sentinelle l'ICG a été comparé à la technique de référence, le radio-isotope 99 du technétium associé au bleu patenté.(Hirche et al., 2012; Kitai et al., 2005)

Il a aussi été évalué pour guider la chirurgie des cancers hépatiques(Lieto et al., 2018) et des carcinomatoses péritonéales d'origine colorectale et ovarienne.(Liberale et al., 2017; Veys et al., 2018) Toutefois, seuls les cancers hépatiques semblent spécifiquement incorporer l'ICG, probablement à cause de leur origine hépatique même.(Shibasaki et al., 2016) Dans le cas des carcinomatoses péritonéales d'origine ovarienne, l'absence de spécificité a produit de nombreux faux positifs lors d'un essai préclinique. Tout comme pour la fluorescéine, l'effet EPR étant insuffisant, les auteurs concluent à la nécessité d'un agent ciblé.(Tummers et al., 2015)

En conséquence, et comme pour l'EC 17, un dérivé d'ICG ciblé avec du folate, a été développé par la firme On Target Laboratory : l'OTL 38. Expérimenté sur des lignées et des tumeurs murines sur-exprimant le $RF\alpha$, l'OTL-38 marque spécifiquement les cellules, et offre, comparativement à l'EC 17, un contraste bien plus marqué *in vitro* et *in vivo*.(De Jesus et al., 2015) Utilisé lors d'un essai clinique pour la chirurgie guidée par fluorescence des carcinomatoses péritonéales d'origine ovarienne, l'OTL-38 permet de détecter près de 40% de lésions supplémentaires ,comparé à la seule lumière blanche.(Hoogstins et al., 2016)

L'OTL-38 est aujourd'hui en essai clinique de phase III (NCT03180307) pour confirmer son efficacité dans le marquage fluorescent des carcinomatoses péritonéales d'origine ovarienne.

Ces évolutions, bien qu'encourageantes, restent limitées. La pénétration de la lumière, même infrarouge, ne peut physiquement pas atteindre une profondeur de

l'ordre du centimètre, insuffisante pour repérer l'intégralité des tumeurs avant, pendant, ou après la chirurgie.(Xi and Jiang, 2016)

1.2.9. Approche multimodale

Pour dépasser cette limitation, le recours à une sonde, associant au moins une seconde modalité d'imagerie, est envisagé.(Landau et al., 2016) De nombreuses possibilités paraissent disponibles, comme associer des ions paramagnétiques (gadolinium) pour l'imagerie de résonance magnétique, ou des radionucléides pour la tomographie par émission de positron à une sonde fluorescente ciblée.(Mishra et al., 2014; Rodriguez et al., 2016) Ainsi, ces sondes multimodales permettent de s'affranchir des limitations de profondeur de la fluorescence en pré et post opératoire, tout en bénéficiant d'une image en temps réels.

Cependant, si la synthèse de telle molécule paraît accessible, la conjonction entre ciblage, modalités d'imagerie, biocompatibilité et propriétés physicochimiques paraissent extrêmement aléatoire.

En outre, tous les fluorophores chimiques présentent une même faiblesse : tous sont sensibles au photo-blanchiment, ce qui limite l'intensité lumineuse utilisée et le temps pendant lequel la fluorescence est utilisable.(Gioux et al., 2010) En outre, ce phénomène de photo-blanchiment peut induire la production de photo-produits toxiques et d'espèce réactive de l'oxygène.(Gandorfer et al., 2008) Dans ce contexte, le recours aux nanoparticules, présentant une photo-stabilité très supérieure, est envisagée.(Zhao et al., 2018)

En plus leurs propriétés photo-physiques, la taille bien supérieure des nanoparticules offre des avantages bien distincts comparés aux fluorophores organiques : elle leur permet d'échapper en partie à la filtration rénale, ce qui augmente leur temps de circulation dans l'organisme, et donc la possibilité d'atteindre les tissus cancéreux.(Yoo et al., 2010) Cette même taille leur permet une rétention accrue dans les tumeurs grâce à l'effet EPR.(Nakamura et al., 2016) Enfin, cette taille

leur confère une surface importante, permettant de leurs associer des agents de ciblage ou d'autre modalité d'imagerie sans altérer leurs propriétés physico-chimiques.(Umut, 2013)

Ces avantages ont mené au développement de nanoparticules fluorescentes pour guider la chirurgie des carcinomatoses péritonéales d'origine ovarienne. Ces nanoparticules ont fait l'objet d'une revue, réalisée en collaboration avec le laboratoire de physique et d'étude des matériaux de l'École Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles (ESPCI).

Review

Fluorescent Nanoparticles for the Guided Surgery of Ovarian Peritoneal Carcinomatosis

Tristan Mangeolle ^{1,2}, Ilya Yakavets ^{1,2,3} , Sophie Marchal ^{1,2}, Manon Debayle ⁴, Thomas Pons ⁴, Lina Bezdetnaya ^{1,2} and Frédéric Marchal ^{1,5,*}

¹ Centre de Recherche en Automatique de Nancy, Centre National de la Recherche Scientifique UMR 7039, Université de Lorraine, Campus Sciences, Boulevard des Aiguillettes, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France; t.mangeolle@nancy.unicancer.fr (T.M.); i.yakavets@nancy.unicancer.fr (I.Y.); s.marchal@nancy.unicancer.fr (S.M.); l.bolotine@nancy.unicancer.fr (L.B.)

² Research Department, Institut de Cancérologie de Lorraine, 6 avenue de Bourgogne, 54519 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

³ Laboratory of Biophysics and Biotechnology, Belarusian State University, 4 Nezavisimosti Avenue, 220030 Minsk, Belarus

⁴ LPEM, ESPCI Paris, PSL Research University, CNRS, Sorbonne Université, 75005 Paris, France; manon.debayle@espci.fr (M.D.); thomas.pons@espci.fr (T.P.)

⁵ Surgical Department, Institut de Cancérologie de Lorraine, 6 avenue de Bourgogne, 54519 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

* Correspondence: f.marchal@nancy.unicancer.fr; Tel.: +33-(0)3-83-59-84-51

Received: 6 July 2018; Accepted: 22 July 2018; Published: 26 July 2018



Abstract: Complete surgical resection is the ideal cure for ovarian peritoneal carcinomatosis, but remains challenging. Fluorescent guided surgery can be a promising approach for precise cytoreduction when appropriate fluorophore is used. In the presence paper, we review already developed near- and short-wave infrared fluorescent nanoparticles, which are currently under investigation for peritoneal carcinomatosis fluorescence imaging. We also highlight the main ways to improve the safety of nanoparticles, for fulfilling prerequisites of clinical application.

Keywords: cancer imaging; cytoreduction surgery; fluorescent nanoparticle; near-infrared; short-wave infrared

1. Introduction

1.1. Epidemiology

Some peritoneal and gastrointestinal malignancies show preferential dissemination and invasion into peritoneal cavity, leading to a peritoneal carcinomatosis with substantial consequences on survival [1]. Among these malignancies, Epithelial Ovarian cancers (EOC) remain the fifth leading cause of death with a five-year survival rate of only 46%, albeit EOCs are only the 8th most common cancer in women [2]. The poor prognosis of these cancers is mainly due to the absence of specific early symptoms, leading to late diagnosis [3]. When confined to the ovary or the regional lymph nodes, EOC provides respectively 92.5 and 73% of survival at five years but they only represent 15 and 20% of newly diagnosed EOC respectively. 65% of EOC are diagnosed at distant stage with a survival rate of 28.9% [4].

Distant stages are characterized by the presence of cancer cells in the peritoneal cavity and/or in the retroperitoneal lymph nodes, where they can induce peritoneal carcinomatosis [5]. Peritoneal carcinomatosis suggests metastases, which in turn are localized on the peritoneum and the peritoneal organs, varying in size from microscopic lesions to cancerous masses of several centimeters [6].

Ultimately, peritoneal carcinomatosis progression leads to debilitating ascites and, above all, intestinal obstruction and subsequent lethal outcomes [7].

1.2. Conventional Treatment

The frontline treatment for peritoneal carcinomatosis of ovarian origin associates extensive surgery with peri-operative chemotherapy, mainly by paclitaxel and cisplatin, to remove the whole cancerous mass.

The main objective of extensive surgery is to excise macroscopic cancerous implants from the ovary and from the entire peritoneal cavity. Initially considered as palliative treatment to alleviate abdominal pain, extensive surgery was progressively developed for a curative intent with total removal of cancerous lesions [8], and was finally standardized by Sugarbaker [9]. However, despite many improvements, this procedure remains challenging.

First, surgeons can rely only on pre-operative imaging to distinguish all cancerous lesions, mainly by position emission tomography (PET), computed tomography (CT) or magnetic resonance imaging (MRI) [10], eventually combined with ultrasound, Doppler and laparoscopic observation [11].

During surgery, surgeons must explore the whole peritoneal cavity, delineated by a serous membrane (the peritoneum), with organs such as liver, spleen, pancreas, and the whole gastrointestinal tract. Altogether, peritoneum and peritoneal organs represent an area almost equivalent to that of the body [12]. Exploration of this huge surface requires many hours and can be achieved only by experienced surgeons. The goal of primary surgery is a complete resection, without any residual disease [13]. To eliminate residual cancerous cells, several cycles of intravenous platinum-based chemotherapy combined with paclitaxel is performed [14].

To treat residual microscopic metastases and thus to achieve a complete cytoreduction initiated with the surgical procedure, it is necessary to increase the local drug concentration by intraperitoneal injections [15]. It was quickly shown that the peritoneal membrane limits the plasmatic passage in case of local injection of ionized and lipid insoluble compounds [16,17]. Therefore, hydrophilic drugs injected by intraperitoneal are maintained at higher concentrations than after intravenous injection, with a lower risk of systemic toxicity.

Although this approach was clinically validated [18–20], one limiting factor consisting of a shallow drug penetration in the tumor (no more than few millimeters) considerably reduced its clinical efficacy on gross residual colon tumors [21]. Recent studies show improved survival rate for ovarian cancer patients treated by intraperitoneal chemotherapy, with better and longer survival rate [22,23]. Combination of hyperthermia and intraperitoneal chemotherapy was recently confirmed for ovarian cancer treatment [24], showing improved survival without higher rates of side effects [25].

Irrespective of chemotherapy modalities, the residual disease after surgery remains one of the primary prognosis factors [26–28]. Survival at five years is closely related to the absence (60% of totally debulked patients) or the presence of microscopic metastases (30% for patient with “optimal” (<1 cm) residual disease) [29]. Moreover, despite complete surgery, early post-operative computerized tomography detects sub-optimal (>1 cm) residual tumors in almost half of the patients [30].

2. Fluorescence Guided Surgery

While chemotherapy has undergone adjustments and its optimization by hyperthermia is still debated, surgical debulking still depends on the extensive experience of the surgeon and his/her own ability to detect tumor deposits in the peritoneal cavity [31]. Attempts have been made to search for complementary solutions to enhance surgeon guidance. Among other options, fluorescence guided surgery (FGS) is highly demanded, especially in oncological surgery [32].

Tissue offers various autofluorescence patterns under ultraviolet illumination. Therefore, ultraviolet illumination was tested to detect cancerous tissue in the middle of the 20th century with some success [33]. Moore improved the technique by using the difference of retention between cancerous and healthy tissue of intravenous injected fluorescent dye, the fluorescein [34]. This technique was further applied with

success to guide cerebral tumor resection [35]. Many improvements have been introduced since that time to FGS with fluorescein for glioblastoma surgical treatment and a similar approach to detect ovarian peritoneal carcinomatosis generated substantial improvements [36]. Van Dame and co-workers used as a target the predominant folate receptor sur-expression in ovarian cancer cells, combining fluorescein isothiocyanate (FITC) and folate. By means of filters and a fluorescence-specific camera, they increased the detection rate of residual disease four-fold [37]. The development of high-resolution cameras considerably contributed to real-time imaging of cancerous tissue with effective contrast and improved information accessible to the surgeon [32]. Another advantage provided by cameras was the possibility to use near-infrared (NIR) fluorescent dyes, invisible to human eye. Visible fluorescent dyes (fluorescein for example) are detectable mainly on the surface of tissue, no deeper than few millimeters, due to the absorption of biological chromophores (i.e., melanin, fat, hemoglobin, etc.).

By contrast, NIR fluorescence is weakly absorbed by the tissues, allowing a deeper detection (up to five millimeters) [38] and even a whole-body fluorescence imaging for small animals such as rodents [39]. From that point of view, FGS benefited from extensive development and application of NIR-fluorescent dyes [40–42]. Among other available NIR-fluorescent dyes, indocyanine green (ICG) is currently the spearhead of the probes applied for FGS purpose. This dye, developed in the middle of the 20th century, is one of the few Food and drug administration (FDA)-approved NIR dyes [43]. ICG was indicated in patients for the measurements of cardiac output, liver function, blood flow and retinal angiography, as well as tolerated and hepatic cleared dye. It has also been tested for sentinel lymph node mapping and cancer imaging [44]. Even though ICG has no specificity for cancer cells, its high affinity for plasma proteins results in a preferential accumulation of ICG-protein complex in the tumor vasculature. Tumor anarchic vasculature offers larger lumen and fenestration, facilitating both the permeability and retention of macromolecules, known as Enhanced Permeability and Retention (EPR) effect [45]. The only known exception is the hepato-cellular carcinoma, which displays specificity for ICG, probably because of their hepatic cell remnant characteristics [46].

In the case of ovarian cancer, encouraging results were obtained with intravenously injected ICG in mice, allowing the detection of few millimeters of peritoneal metastases from different origins [47]. However, the first clinical results were contradictory: high sensitivity was associated with low specificity, with a high rate (62%) of false positive non-malignant lesions being observed [48]. Another problem, raised by the hepatic clearance of ICG, was the fluorescent contamination of the gastrointestinal tract that hampers tumor implant detection [49].

From these observations, the authors identified the urgent need for targeting probes rather than passive probes. With this aim, OTL-38, the NIR folate-targeted counterpart of the FITC-folate probe, was clinically tested, showing encouraging results of a higher signal-to-background ratio (SBR) [50]. As expected, OTL-38 allows deeper tumor detection (almost one centimeter below tissue surface) than with FITC-folate. However, irrespective of the NIR-fluorescent dyes used, light excitation and emission scattering limit the detection depth to a few millimeters and the surgeon still needs a pre-operative CT/MRI scan or other intraoperative imagery modalities for precise and exhaustive tumor localization and surgery planning [38]. Thus, for ovarian peritoneal carcinomatosis and peritoneal malignancies, the ideal probe for FGS should be multimodal by associating NIR dye, targeting moiety and another imaging agent for either CT or MRI to overcome the lack of specificity and limitation of fluorescence depth of detection.

Until now, only one chemical multimodal probe has reached the phase I clinical trial for renal carcinoma. This probe consists in an antibody (girentuximab) directed against the carbonic anhydrase IX (CAIX), a common target of renal cancerous cells, bound to infrared (IR) fluorescent dye CW800 and the radioactive indium isotope ^{111}In . Early results showed better fluorescent detection of CAIX-positive tumors by using pre-operative SPECT/CT imaging and intraoperative gamma camera. However, the authors noted that the fluorescence intensity had been attenuated by the surrounding fibrous tissue and the tumor capsule [51]. Irrespective of such chemical construction of the probe and

the real benefit of multimodal imaging, the intrinsic low photostability and fluorescence shared by most chemical fluorescent dyes raise at least three challenging problems for FGS application.

First, the low photostability of the chemical dye implicates either limited time for surgery, which is not recommended for achieving total peritoneal cytoreduction, or higher amount of injected dye, which seems hazardous because of the dye toxicity. Second, relatively poor fluorescence emitted by the dye decreases the contrast between labeled and unlabeled tissue. To quantify the contrast, SBR is used. SBR measures the sensitivity of imaging device, and remains “the key determinant of sensitivity, detectability, and linearity in optical imaging” [52]. The lack of brightness and weak photostability of organic dyes reduce the SBR to a value above 2 [49], while the reference research in imaging establishes that SBR must be above 5 to reliably identify the object with absolute certainty [53]. Finally, this kind of “chemical fluorophore-based” construction is obviously difficult to adapt to another probe. Third, similar to ICG, CW800 is slowly excreted through the hepatobiliary way [49], resulting in contamination of the surgical field by the remnant unbounded fluorescent dye [54].

To summarize this part of the review on clinical advances in FGS, it is obvious that future probes will require bright and photo-resistant IR fluorescent dyes adaptable to multimodality and tumor targeting. In addition, the probe must be safe and rapidly excreted from the body to avoid fluorescence “contamination” and risk of toxicity in the long term. NIR nanoparticles (NPs) constitute alternative and seductive chemical constructs with the potential to fulfill all these requirements.

3. Overview of NIR Nanoparticles

NIR-fluorescent NPs (Figure 1) possess common advantages (Table 1). First, they have higher brightness, which is the product of a far superior molar attenuation coefficient (absorption of light per mol) and very satisfying quantum yields (the ratio between emitted and absorbed photons) than any organic fluorophores, providing higher SBR [55]. In the case of long operative time such as during cytoreduction, NIR NPs maintain photostability without the production of toxic photoproducts.

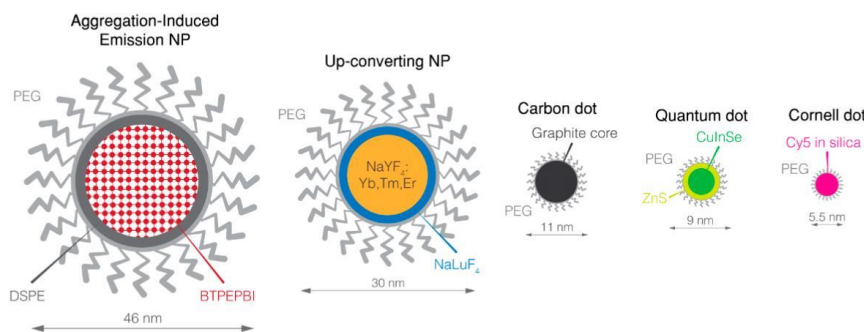


Figure 1. Overview of NIR nanoparticles. BTPEPBI: 1,7-tetraphenylethene modified 3,4,9,10-Tetracarboxylic perylene bisimide; Cy5: cyanine 5; DSPE: 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-[amino(polyethylene glycol)]; NP: nanoparticle; PEG: poly(ethyleneglycol).

Similar to protein/ICG complexes, NPs can accumulate in tumors by EPR effect. Finally, most of them offer a versatile surface which can be easily modified for targeting and combined with another imaging modality to achieve even more effective multimodal probe.

Table 1. Fluorescent near-Infrared Dye and their characteristics.

Spectra	Near-Infrared						
	ICG	OTL-38	Quantum Dots	UCNP	Carbon Dot	AIE NP	Cornell Dots
Name			CuInSe/ZnS(Mn) ZnSeHg	Yb, Tm, Er doped NaYF ₄ nanocrystal/NaLuF ₄ shell	Graphite core	Organic core	Cyanine 5 core and silica shell
Component	C ₄₃ H ₄₇ N ₂ NaO ₆ S ₂	C ₆₁ H ₆₃ N ₉ O ₁₇ S ₄ /4Na					
Size (nm)	—	—	9.0 (CuInSe/ZnS(Mn) 6.6 (ZnSeHg))	30	11	46	5.5
Coating	—	—	PEG	PEG	PEG	PEG	PEG
Targeting	—	Folate	iRGD	—	—	Folate	cRGD
Excretion	Hepatobiliary	Hepatobiliary	—	—	—	Hepatobiliary	Renal
Multimodality	—	—	MRI (Mn)	—	—	—	PET (124I)
Photostability	Low	Low	High	High	High	High	High
Excitation (nm)	805	774	690 (CuInSe) 785 (ZnSeHg)	980 (multiphotonic)	633	635	650
Emission peak (nm)	835	794	685 (CuInSe) >800 (ZnSeHg)	800	>710	810–815	670
SBR of <i>i.p.</i> tumor	2 ± 1	4.4	12	>5	—	7.2	—
Results in vivo	—	—	—	Passive accumulation in peritoneal tumors following <i>i.p.</i> injection	SBR ≈ 2 in subcutaneously injected matrigel	Allow the detection of sub-millimetric peritoneal tumors	—
Clinical	Low specificity	Improved cytoreduction	—	—	—	—	Preferential uptake of Cornell dots at the site of the disease, in vivo stability and safety
Reference	[47–49]	[50]	[56,57]	[58]	[59]	[60]	[61–65]

Abbreviations: AIE: aggregation-induced emission; ICG: indocyanine green; *i.p.*: intraperitoneal; MRI: molecular resonance imaging; NP: nanoparticle; OTL: on target laboratories incorporated (West Lafayette, USA); PEG: poly(ethylene glycol); PET: positron emission tomography; SBR: signal-to-background ratio; UCNP: up-converting nanoparticle.

3.1. Quantum Dots

Quantum dots (QD) are small fluorescent nanocrystals composed of semiconductor compounds. Unlike organic fluorophores, QD offer broad absorption and narrow emission spectra. Their emission wavelength depends on the composition and the size of nanocrystal (e.g., 3 nm PbS QD emits around 800 nm while the increasing diameter up to 6.5 nm leads to the emission wavelength more than 1500 nm) [66].

They are mainly synthesized through colloidal chemical syntheses, under inert atmosphere, where metallic precursors are suspended in organic solvent, such as octadecene, and heated at high temperature. The precursors decompose to form monomers that nucleate, thus creating very small nanocrystals. The second step is the growing stage of the nuclei and QD increase in size until they reach the desired one. Then, the solution is cooled very quickly to stop the growth. Subsequently, hydrophobic QD are transferred into water through ligand exchange (using mercaptopropionic acid for instance) or phospholipid micelle encapsulation. These syntheses allow very high quantum yield, even in the near-infrared range. The synthesis of hydrophilic QD has also been developed through the hydrothermal process, where organic solvent is replaced by water with either stabilizer or reverse micelles. However, these last hydrothermal syntheses have a higher polydispersity and a lower quantum yield in comparison with organic synthesis.

QD are currently among the brightest known NPs. In addition, they possess longer fluorescence lifetime, from tens to hundreds of nanoseconds or even microseconds, which may be used to selectively detect QD fluorescence while eliminating autofluorescence background [67]. Therefore, QDs with variable composition and size have been developed toward their clinical applications in FGS.

Beside these attractive optical properties, the weakness of most NIR QDs comes from their composition, which is commonly based on heavy metals, such as cadmium (Cd) or lead (Pb). Despite their *in vitro* stability, QDs can quickly degrade in the hepatocyte cells (Hep G2) model. Following intravenous injection, QDs typically accumulate mainly in the liver and the kidney with therefore hazardous long-term consequences [68,69]. Toxicity results from Cd accumulation in the liver while Te mainly accumulates in the kidney [69,70]. The ionic leach of Cd is presumed to be the main cause of QD toxicity since the production of induced oxidative stress was proven through the role of metallothionein in cadmium retention [71]. Therefore, to protect QD from degradation, a shell constituted by different compounds such as zinc sulfide (ZnS) was placed around the QD core [72]. In addition, NIR-emitting QDs based on less toxic components, such as silver (Ag) or Indium (In), have also been developed [73]. QDs can easily be combined with other imaging modality, such as paramagnetic ion to obtain multimodal probe [56], while functionalization of their surface chemistry enables grafting of targeting moieties [74].

3.2. Up-Converting Nanoparticles (UCNP)

Up-Converting Nanoparticles (UCNPs) represent another type of solvothermal or hydrothermal made fluorescent nanocrystals, based on lanthanide atoms. The mechanism of NIR fluorescence emitted by UCNP is particular. These NPs emit in the NIR after excitation at longer wavelengths (usually 980 nm), through a multiphoton conversion process [75,76]. In addition to providing excellent penetration depth, this modality eliminates the autofluorescence background [77]. NIR UCNPs have already been used for murine peritoneal carcinomatosis imaging, showing satisfying imaging properties. The authors highlighted the good biocompatibility of UCNPs and the fact that some lanthanides, such as chelate gadolinium, are already FDA-approved for MRI imaging [58], and seem to be less concerned by toxicity issues [78]. However, gadolinium is raising safety concerns, especially due to its potential leaching in the absence of chelates [79].

Therefore, the behavior of lanthanide metals in the body through their metabolism and cell interactions remains to be elucidated to fully ensure the safety of UCNPs [80], while less toxic rare-earth elements, such yttrium, should be preferred to gadolinium [81].

3.3. Carbon Dots

Carbon dots (CD) are a new kind of NP, gaining growing interest since 2004. They are made from carbonated molecules with wide approach either from fragmented bulk material or carbonized soluble substrate.

Their synthesis mainly implicates calcination and/or solvothermal process, either at high or low temperature in acidic or basic conditions. The production of a graphene core depends on the organic precursor and the synthesis process.

To significantly enhance the photophysical properties, the carbon particle core can be doped with an inorganic salt such as ZnS before surface functionalization [82]. Similar to QD, some CDs are characterized by high quantum yields and photostability with the advantage to be purely organic [83]. CD-labeled matrigel grafted in mice can be detected in the NIR range with a SBR above 2 [59].

Therefore, low-cost CDs have been rapidly investigated in bioimaging showing high biocompatibility and acceptable fluorescence properties [84,85].

3.4. Aggregation-Induced Emission Dyes

Self-quenching is a well-known phenomenon common to many organic dyes such as ICG or fluorescein, which lose their fluorescence efficiency at high concentrations or upon aggregation. By contrast, some organic luminophores emit fluorescence only in the aggregated state. This phenomenon, namely aggregation-induced emission (AIE), takes advantage of high brightness, strong photostability and, as with most classical organic fluorophores, good biocompatibility [86].

However, their high hydrophobicity requires an encapsulation step by adding amphiphilic polymers, such as pluronic F127 in organic solvent such as chloroform or tetrahydrofuran. Solvents are eliminated through evaporation. Then, mixes of AIE luminogen and polymer are resuspended and sonicated to obtain hydrophilic AIE NP.

Intravenously injected AIE NPs accumulate in tumors by the EPR effect, and detection of sub-millimetric peritoneal tumors were achieved with the satisfying SBR of 7.2 [87]. In addition, targeting of AIE NPs can be also proposed. NIR AIE NPs with folic acid as targeting agent display enhanced fluorescence in folate receptor positive MCF7 cells and in subcutaneous tumor-bearing mice [60].

3.5. Silica-Encapsulated Dyes

Finally, silica-encapsulated dyes differ from the NPs described above by the protective confinement offered by the silica shell [61,88]. Silica surface confers the advantage to be easily adapted to various imaging modalities and targeting agents. For example, NIR dyes such as cyanine 7 encapsulated in a silica nanoparticle were investigated for sentinel lymph node mapping [88]. They demonstrated enhanced brightness and photostability, which made them interesting probes for long operative times without the need for reinjection or high initial dose.

Cornell dots (C-dots) are ultrasmall (less than 10 nm) core/shell silica NPs, which can fulfill FGS requirements with their remarkable properties. Their synthesis relies on a modified sol-gel process, where cyanine derivative is crosslinked with silica precursor, and react to form a fluorescent core. A silica shell is then added to form a core shell structure.

To date, the C-dots are the only type of silica nanoparticles to have reached clinical trial phase I. First, after encapsulation of cyanine 5 NIR-fluorescent dye, the emission of the dye remains unchanged while both photostability and brightness were greatly increased, leading to the enhancement of SBR [62]. Second, C-dots were designed to avoid the major drawbacks of the QDs as with NPs: bio-accumulation and induced toxicity [89]. Ultrasmall, to target the renal excretion windows, C-dots can be renally excreted intact from animals [61] and humans [63]. Besides the reduction of the cytotoxic risk, this fast excretion offers better imagery by rapid reduction of the remnant probe background. Third, these NIR-fluorescent NPs possess all advantages of the versatile surface chemistry of silica NPs. Appropriate coating, for example with PEG, can be easily applied and associated with a targeting agent

such as cRGDY, which target $\alpha v \beta_3$ -integrins and with another imaging agent such as the smallest radioactive iodine covalently linked to the cRGDY moiety. It is acknowledged that integrins play a key role during the whole metastatic process of ovarian cancer [64]. Therefore, $\alpha v \beta_3$ -integrin appears to be an appropriate target for this type of cancer [90], although integrin expression may vary between patients [91]. For this purpose, Philipps et al. (2014) performed PET imaging using such a construction on patients with various types of cancer, allowing the detection of different integrin-positive lesions, from the liver to the pituitary gland, proving that intravenously injected C-dots can cross blood–brain barrier [63]. Therefore, an FGS probe should be available with different targeting to fulfill individual patient needs.

Currently, C-dots have entered early phase I clinical trials (NCT02106598) for Image-Guided Intraoperative Sentinel Lymph Node Mapping in Head and Neck Melanoma, Breast and Gynecologic Malignancies. Thus, C-dots are the first NPs to enter clinical trials for FGS. Completion of the study is expected in 2018.

Independent of fluorescence imaging, another property of C-dots was recently highlighted by showing the death of nutrient-deprived cancer cells exposed to C-dots by ferroptosis [65]. This property was confirmed in vivo in two different tumor models, thus conferring unexpected theranostic properties to C-dots.

Finally, C-dots seem able to fill all the criteria required in clinical bioimaging: high brightness, versatility, multimodality and targeting possibilities. In addition, C-dots are safe due to the fast clearance of the unbounded probe and theranostic properties. However, voluntarily made ultrasmall to target the renal clearance window, the few-nanometer size of the C-dot combined with a large-size antibody or a Super Paramagnetic Iron Oxide Nanoparticle (SPION) could hamper renal elimination, resulting in a decrease in safety.

4. Toward the Short-Wave Infrared

Another possibility to considerably improve the fluorescence imaging efficiency is to increase the infrared wavelength emission of the probe. Short-Wave InfraRed (SWIR) between 1000 and 2500 nm is gaining increasing attention in biological application, especially because of biological chromophore absorption and tissue scattering that are reduced in the 1000–1300 nm “transparent” window. Computational and in vitro simulation have long predicted that SWIR fluorescence could greatly outperform NIR fluorescence imaging, but SWIR imaging cameras have not been made widely available until recently [92]. Therefore, FGS devices were mainly focused on the NIR window and the development of FDA-approved NIR excitation sources [32].

SWIR cameras based on InGaAs sensor offer broad imaging facilities in the SWIR range [93]. Currently they are widely available in many fields of investigations including medical [94] and clinical predevelopment devices [95]. Moreover, the prediction of SWIR dye superiority as compared to NIR ones was confirmed by bioimaging [96,97]. While NIR provides a penetration depth of one or two millimeters, SWIR easily pushes the depth limit to five millimeters [98] making SWIR promising, especially for peritoneal cytoreduction.

However, SWIR dyes remain scarce and not efficient enough. The state-of-the-art dye is the IR-1050 from Nirmidas biotech (Palo Alto, CA, USA) which has several drawbacks [99]. Despite encouraging characteristics and safe renal excretion, IR-1050 displays very low SWIR fluorescence as compared to NIR dyes [100]. As with all organic dyes, IR-1050 is subjected to photobleaching and the attempt to associate it with a targeting agent and/or another imaging modality is similar to trying to square the circle. SWIR-emitting organic dyes are currently under development but their fluorescence quantum yield does not exceed a few percent [101]. Therefore, SWIR-emitting inorganic NPs (Figure 2) appear as interesting alternatives (Table 2).

Table 2. Short-Wave Infrared fluorescent nanoparticles and their characteristics.

Spectra		Short-Wave Infrared					
Name	IR-1050	ICG	Quantum Dot	Lanthanide NP	Gold NP	Phage Stabilized SWCNT	AIE NP
Component	C ₄₁ H ₄₀ BC ₁₃ F ₄ N ₂	C ₄₃ H ₄₇ N ₂ NaO ₆ S ₂	Ag ₂ S InAs	NaYF ₄ :Yb:Ln core doped with rare-earth NaYF ₄ shell	Gold	Pure carbon nanotube	Organic core
Size (nm)	—	—	3.0–4.0 (Ag ₂ S) 4.5 (InAs)	9.0–11	1.6	880 × 6.5 *	33
Coating	—	—	PEG	Polymeric coating by poly(ethylene oxide)	Lipoic acid-based sulfobetaine	Phage M13	Plutronic
Targeting	—	—	—	Folate	—	SPARC-Binding peptide	—
Excretion	Hepatobiliary	Hepatobiliary	Hepatobiliary (Ag ₂ S)	—	Renal	—	—
Multimodality	—	—	—	—	—	—	—
Photostability	Low	Low	High	High	High	High	High
Excitation (nm)	790	805	808	980	808	808	630
Emission peak (nm)	1050	835	1125 (Ag ₂ S) 1080–1330 (InAs)	1185 (Ho doped) 1310 (Pr doped) 1475 (Tm doped) 1525 (Er doped)	800–1400	1000 – 1300	808
SBR of <i>i.p.</i> tumor	—	—	14 (Ag ₂ Se)	>3	—	8	—
Results in vivo	—	—	<i>i.v.</i> injected Ag ₂ S QDs passively accumulate in subcutaneous murine tumor with a ratio of 10% ID/g tumors	<i>i.p.</i> injected lanthanide NPs accumulate, with or without targeting, in <i>i.p.</i> tumors from ovarian cancer OVCAR8 cell line	—	Effective imaging of peritoneal tumors after <i>i.p.</i> injection, with higher resection rate, especially for sub-millimetric nodules	SBR is 33 at the depth of 150 μm in mouse brain vasculature following <i>i.v.</i> injection
Clinical	—	—	—	—	—	—	—
Reference	[100]	[100]	[93,102,103]	[104]	[105]	[106]	[107]

*—the size of carbon nanotubes is presents as height × diameter. Abbreviations: AIE: aggregation-induced emission; ICG: indocyanine green; ID: injected dose; *i.p.*: intraperitoneal; *i.v.*: intravenously; NP: nanoparticle; PEG: Poly(ethylene glycol); QD: quantum dot; SBR: signal-to-background ratio; SPARC: secreted protein acidic rich in cysteine; SWCNT: single-walled carbon nanotube.

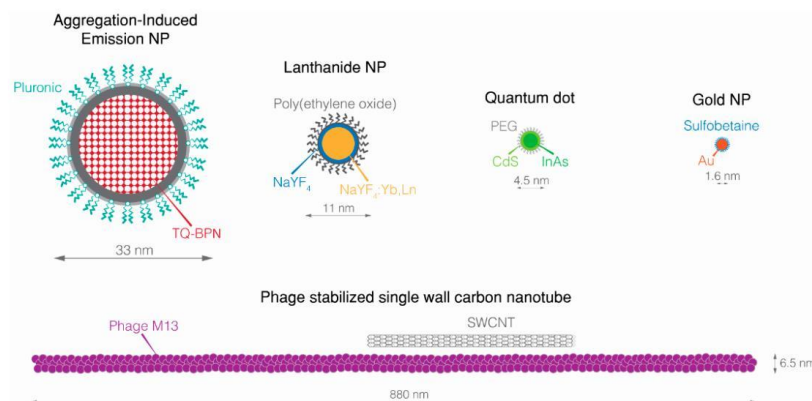


Figure 2. Overview of SWIR nanoparticles. NP, nanoparticle; PEG, poly(ethyleneglycol); SWCNT, Single-walled carbon nanotube; TQ-BNP, N,N' -((6,7-diphenyl-[1,2,5]thiadiazolo[3,4-g]quinoxaline-4,9-diy)bis(4,1-phenylene))bis(*N*-phenylnaphthalen-1-amine).

4.1. SWIR QD

Similarly to NIR QDs, the main interest of SWIR QD as compared to other NPs is their outstanding photophysical properties, especially for Ag_2Se QD and InAs QD, resulting in a better signal and higher SBR [96,102,103]. Similar to NIR-emitting QDs, it will be necessary to develop bright SWIR QDs devoid of heavy metals and carefully characterize their *in vivo* degradation and their potential toxicity.

4.2. Lanthanide Nanoparticles

Next, by their high QY, SWIR lanthanide NPs gained attention for bioimaging. Indeed, several lanthanide NPs have been developed to be absorbed in NIR and to emit in SWIR by the doping of sodium yttrium or gadolinium tetrafluoride nanocrystals, made using a solvo- or hydrothermal process, with different rare-earth elements. These NPs, encapsulated in a 100 nm hydrodynamic diameter albumin shell, were shown to be confined in the peritoneum at least 12 h after intraperitoneal injection [104], while another group reported more than 48 h confinement for similar NPs [108]. Other SWIR fluorescent lanthanide NPs, encapsulated in 100 nm polymeric shell, led to the detection of tumor deposits up to 72 h after intraperitoneal injection in a murine ovarian peritoneal carcinomatosis model. In this case, the process by which NPs remains for a long time in the cavity is still unknown [109]. The undeniable advantage of lanthanide NPs is their relative safety, mainly because of the absence of heavy metal in their composition. For example, microparticles of radioactive yttrium were approved as radiotherapeutic agents for liver malignancies [110]. On the other hand, leaching of Gd ions from NaGdF_4 may present severe long-term toxicity issues. If photophysical properties remain a concern for lanthanide nanoparticles, some coatings, such as silica or NaGdF_4 , have greatly improved it, at least *in vitro* for now [111].

4.3. Gold Nanoparticles

By reducing chloroauric acid in the presence of lipoic acid sulfobetaine, Chen et al. obtained SWIR fluorescent gold NPs with satisfying biocompatibility. Indeed, these NPs exhibited renal excretion and fast clearance in healthy mice, with fluorescent-observable excretion from circulation to kidney, despite a weak fluorescence. Further studies in animal tumor models could provide more interesting results [105].

4.4. Carbon Nanoparticle

Single-walled carbon nanotubes (SWCNT) are acknowledged for their SWIR emission under NIR excitation. Several synthesis methods exist to produce SWCNT, such as arc discharge, laser ablation and several chemical vapor deposition processes, which are far more productive. The nanoparticle reviewed below is a commercially available SWCNT made using a specific chemical vapor deposition process named high-pressure carbon monoxide method. In this process, carbon monoxide, which acts as carbon source, and iron carbon monoxide catalyst are continuously injected at high temperature, forming high-quality SWCNT.

Despite the low fluorescence of SWCNT, they have pure carbon composition which do not raise many concerns about QD heavy metal content [112]. Their potential toxicity can be adjusted by using appropriate length and coating. Additionally, depending on their design, they can be safely urinarily excreted or biodegraded [113].

Investigated in a murine model of ovarian peritoneal carcinomatosis, SWCNT displayed high imaging capacity upon 808 nm laser excitation. The SBR was superior to 5 *in vivo*, and up to 100 *ex vivo* [106]. Compared to unguided surgery, SWCNT guided surgery offered a significantly better detection, with ten times more sub-millimetric tumors excised through fluorescence guidance.

4.5. SWIR Fluorescent Organic Nanoparticles

Several AIE luminogens have a NIR absorption spectrum and display both NIR and weak SWIR fluorescence. Encapsulated in an organic shell such as the pluronic one, these NPs show extended photostability and allow clear visualization of tiny vessels in tissue below 0.8 mm in depth with an SBR higher than 30. They provide suitable properties to detect highly vascularized tumors when used to observe the EPR effect in the subcutaneous murine tumor model [107].

These NPs have the greatest advantage of nontoxic composition, and no adverse effects were observed after intravenous injection. However, their low photophysical properties in the SWIR region is a limiting factor for in-depth detection. Another disadvantage is related to the alteration of fluorescence and photostability upon the addition of a targeting moiety or/and another imaging agent to the NP [114].

5. NP Safety: A Major Concern

NPs are the main attractive newcomer in the field of pharmaceuticals and biomedicine over the last decade. However, their exceptional properties raise major concern about safety. NP design significantly affects toxicity as well as targeting ability and biodistribution behavior of NP *in vivo* [115]. NPs can rely on their nanosize to cross biological barriers and to reach the most sensitive organs [116], ultrasmall NP (few nanometers) are easily endocytosed, where then can disrupt cell biochemistry [117]. Therefore, these NPs are presumed more toxic than their larger counterparts [118]. It was proven that a retention for a long period in many organs such as lung and liver can be harmful, thus careful surface functionalization and passivation of NP is important for safe clinical application [119–121].

5.1. Urinary Excretion Is Mainly a Matter of Size

Safe application in clinics suggests total excretion of drugs from the organism. Therefore the main criteria to use these NPs clinically are an ultrasmall size (<5.5 nm) and/or an encapsulation in a biocompatible material likely to promote the excretion renally [122]. Additionally, NPs for FGS require appropriate photophysical properties. Considering that, inorganic NPs, especially QDs, are potent agents which could provide excellent imaging capacities if they can be excreted. Ultrasmall QDs were designed to avoid Kupfer cell endocytosis and to reach the bladder through renal filtration. Choi et al. tested cystein-coated Cd/Se QD of varying sizes and different emission wavelengths. Only the smallest QDs (less than 6 nm) were clearly removed by the renal pathway and were collected in the bladder, whereas the largest ones accumulated mainly in the liver, lungs and spleen [122].

The authors concluded that NPs should have a hydrodynamic diameter below 5.5 nm to achieve complete elimination from the body. However, the excretion rate of ultrasmall NPs is more complex than it seems. In fact, a recent study reported some differences between NPs made with varying amounts of gold atoms. Consistently, 1.7 nm NPs (201 gold atoms) are faster renally removed than 2.5 nm ones, while, surprisingly, lower excretion rate was measured with smallest NPs made of less than 20 atoms of gold. Authors also highlighted the role of the renal glycocalyx which acts like a chromatography filtration gel that allow larger NPs to pass rapidly through [123]. Therefore, it can be assumed that the ideal diameter for a NP is comprised between 1.7 nm and 6 nm to target renal excretion and to obtain an effective clearance. The clinical use of NIR Cd-based QD appears unlikely since many of them did not fit size condition.

Another approach to facilitate the renal excretion is using biocompatible coating such as silica-phosphonate for Cd-based QD. From 11.5 nm hydrodynamic diameter core, Ma et al. produced core/shell QD/silica-phosphonate NPs with a diameter of almost 30 nm. Despite its relatively large hydrodynamic diameter, the NP was mainly urinarly excreted after intravenous injection. In addition, the silica-phosphonate coating produced extended circulation time in blood to decrease liver accumulation [124].

Finally, the design of biodegradable NPs is still under investigation to reach excretion of NP after intravenous injection [125,126]. This approach can be easily applied to silica NP, AIE NP, carbon dot and SWCNT; however, its utilization for NP made of heavy metals or rare-earth elements is limited. In this context, biodegradable and heavy metal-free QDs constitute attractive alternatives. Among them, NIR silicon QDs [127] are small enough (<5 nm) [128], highly biocompatible and are able to be endocytosed by cancerous cells [129]. No toxicity was detected both in mice and monkey models even at high dose of QD (200 mg/kg). The size of silicon QDs varied from 4 to 11 nm, so they are rapidly accumulated both in the liver (the largest fraction) and in the bladder (the smallest fraction). Three months post-injection, high silica content was found in the liver and the spleen due to the retention of the largest QDs in these organs. Consistently, liver damage was histopathologically observed in mice but not in monkeys, suggesting the influence of the anatomical scale between these models exposed to identical amount of silicon QDs [130].

5.2. Rethinking of the Injection Route

Among the drawbacks in toxicity, fluorescent contamination by unbounded dye also must be considered for FGS with NPs. Evidently the biodistribution of fluorescent dye significantly depends on the injection route. For example, a large part of intravenously injected organic dye such as ICG is excreted through the liver and the intestine for a long time. The remaining part of the probe in these organs produces fluorescence contamination which can overshadow the fluorescence emitted by the cancerous tissue, decreasing SBR. Therefore, the renal excretion route is preferable for intravenously injected FGS drugs. As seen above, NPs require small size (less than 6 nm) [123] and probably a specific shape to be renally excreted [131]. This has already been shown clinically with the example of Cornell dots. However, the size of nanoparticle can be adjusted only for the limited numbers of nanomaterials. Thus, whenever possible, systemic exposition should be avoided as the simplest solution.

Additionally, intravenously injected probes demonstrated limited efficiency in the case of sub-millimetric-sized and/or small tumors which are not yet vascularized [132]. For these kind of tumors, the advantages of injection had been proved for organic NIR dyes. After intravenous injection, fluorescent contamination of many organs was observed. The appropriate SBR was displayed only for tumors larger than 5 mm. On the contrary, intraperitoneally injected dye allows detection of small tumors with reduced fluorescent contamination [133]. According to that, the use of the intraperitoneal injection route prevents systemic exposition and fluorescent contamination and provides an opportunity to safely use nanoparticle in clinics for peritoneal carcinomatosis FGS.

Biodistribution of NPs injected by the intraperitoneal route has been recently investigated in several studies reporting promising results. The intraperitoneal injection of QDs facilitated the dissection of peritoneal lymph nodes during the cytoreduction in rats due to rapid lymphatic drainage of the QDs [134]. Kato et al. (2010) monitored the biodistribution of intraperitoneally injected captopril QD by means of mass spectrometry [135]. The authors observed significant difference between QDs injected intraperitoneally and intravenously: only 2.5% of the initial dose of QDs in the liver, 1.5% in the spleen and almost 8% in the bloodstream, and almost 85% of the QDs were not detected in organs and seemed to remain confined to the peritoneal cavity six hours after intraperitoneal injection. Finally, injection of QD by intraperitoneal route showed appropriate toxicity. Adverse effects of mercaptopropionic acid coated QD were observed in mice only after 15 days of repeated intraperitoneal injection of 10 mg/kg [136]. QD induced mild toxicities in liver and lung, which they were detected by fluorescence microscopy.

Obviously intraperitoneally injected NPs can passively accumulate in ovarian peritoneal tumors e.g., lanthanide NPs [109]. However, the majority of FGS drugs possess low tumor selectivity which can be improved by using active targeting molecules. For example, SWCNTs functionalized with the secreted protein acidic and cysteine rich (SPARC)-binding peptide, actively targeting tumors with an SBR up to 5, remaining confined to peritoneal cavity at least for 24 h [106]. Indirect targeting can be also used with success in murine peritoneal carcinomatosis by injecting the peptide iRGD first, to permeate the tumor tissue before injecting NIR QDs. Then, unbounded QDs were bleached by using an etchant, and this step of the procedure allowed the detection of QD-labeled tumors [57]. To increase SBR, a peritoneal washing procedure could also be applied to any type of NPs. At the same time, the “washing” of a peritoneal cavity by etchant could enhance the safety of QDs by removing heavy metals from the organism, for example, in the case of ZnSeHg QDs [57].

6. Conclusions

Ovarian carcinomatosis FGS requires safe drugs, which selectively accumulate in the malignant tissue and provide high SBR for complete cytoreduction. NIR-fluorescent NPs possess all necessary characteristics to be potent FGS probes. To date, Cornell dots are the safest type of NIR NP, which is already in clinical trial phase I. The special design of Cornell dots results in rapid excretion renally following intravenous injection but were never applied for peritoneal carcinomatosis. By contrast, CD, UCNP and QDs were already studied using the intraperitoneal injection route, which is suggested to be the most potent for the detection of ovarian metastases. Obviously, the intraperitoneal route avoids systemic exposition, improving NP safety and providing the opportunity to use active targeting molecules to enhance selectivity and SBR of NPs. Another way to improve SBR is to use SWIR fluorescent NP, which demonstrated extended photostability and provided visualization of tiny vessels below 0.8 mm in tissue depth with an SBR higher than 30. Finally, NPs can be associated with other imaging agents in multimodal approaches to achieve pre-operative whole-body imaging, and precise tumor detection to complete cytoreduction.

Currently, NIR cameras and lasers are already FDA-approved for FGS. SWIR cameras have also become available on the market and are expected to be approved for medical use. In fact, the application of FGS in NIR and SWIR is limited by the number of FDA-approved dyes (ICG and methylene blue), therefore the investigation of NP-based FGS probes is of great interest.

Author Contributions: T.M. designed the review and drafted the manuscript, I.Y., S.M. and M.D. helped with the manuscript editing, I.Y. designed the figures, T.P., L.B. and F.M. reviewed the manuscript drafts. All authors read and approved the final manuscript.

Funding: This work was supported by the Ligue Nationale contre le Cancer, the Institut de Cancérologie de Lorraine and the Lorraine Region.

Acknowledgments: The authors thank Dominique Marius Le Prince (Nancy, France) for the proof-reading and corrections of manuscript.

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

References

- Coccolini, F.; Gheza, F.; Lotti, M.; Virzi, S.; Iusco, D.; Ghermandi, C.; Melotti, R.; Baiocchi, G.; Giulini, S.M.; Ansaloni, L.; et al. Peritoneal carcinomatosis. *World J. Gastroenterol.* **2013**, *19*, 6979–6994. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Jemal, A. Cancer statistics, 2017. *CA Cancer J. Clin.* **2017**, *67*, 7–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Cannistra, S.A. Cancer of the Ovary. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *351*, 2519–2529. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Baldwin, L.A.; Huang, B.; Miller, R.W.; Tucker, T.; Goodrich, S.T.; Podzielinski, I.; DeSimone, C.P.; Ueland, F.R.; van Nagell, J.R.; Seamon, L.G. Ten-year relative survival for epithelial ovarian cancer. *Obstet. Gynecol.* **2012**, *120*, 612–618. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Prat, J. FIGO's staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum: Abridged republication. *J. Gynecol. Oncol.* **2015**, *26*, 87–89. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Chandrasekhara, S.H.; Triveni, G.S.; Kumar, R. Imaging of peritoneal deposits in ovarian cancer: A pictorial review. *World J. Radiol.* **2016**, *8*, 513–517. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Fagotti, A.; Gallotta, V.; Romano, F.; Fanfani, F.; Rossitto, C.; Naldini, A.; Vigliotta, M.; Scambia, G. Peritoneal carcinosis of ovarian origin. *World J. Gastrointest. Oncol.* **2010**, *2*, 102–108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Griffiths, C.T.; Parker, L.M.; Fuller, A.F. Role of cytoreductive surgical treatment in the management of advanced ovarian cancer. *Cancer Treat. Rep.* **1979**, *63*, 235–240. [[PubMed](#)]
- Sugarbaker, P.H. *Peritoneal Carcinomatosis: Principles of Management*; Springer Science & Business Media: Berlin, Germany, 1996; ISBN 978-0-7923-3727-0.
- Nougaret, S.; Addley, H.C.; Colombo, P.E.; Fujii, S.; Al Sharif, S.S.; Tirumani, S.H.; Jardon, K.; Sala, E.; Reinhold, C. Ovarian Carcinomatosis: How the Radiologist Can Help Plan the Surgical Approach. *RadioGraphics* **2012**, *32*, 1775–1800. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Forstner, R.; Meissnitzer, M.; Cunha, T.M. Update on Imaging of Ovarian Cancer. *Curr. Radiol. Rep.* **2016**, *4*, 31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Albanese, A.M.; Albanese, E.F.; Miño, J.H.; Gómez, E.; Gómez, M.; Zandomeni, M.; Merlo, A.B. Peritoneal surface area: Measurements of 40 structures covered by peritoneum: Correlation between total peritoneal surface area and the surface calculated by formulas. *Surg. Radiol. Anat. SRA* **2009**, *31*, 369–377. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Du Bois, A.; Reuss, A.; Pujade-Lauraine, E.; Harter, P.; Ray-Coquard, I.; Pfisterer, J. Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: A combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials: By the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Studiengruppe Ovarialkarzin. *Cancer* **2009**, *115*, 1234–1244. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Du Bois, A.; Pfisterer, J. Future options for first-line therapy of advanced ovarian cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer Off. J. Int. Gynecol. Cancer Soc.* **2005**, *15* (Suppl. 1), 42–50. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Weisberger, A.S.; Levine, B.; Storaasli, J.P. Use of Nitrogen Mustard in Treatment of Serous Effusions of Neoplastic Origin. *J. Am. Med. Assoc.* **1955**, *159*, 1704–1707. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Dedrick, R.L.; Myers, C.E.; Bungay, P.M.; DeVita, V.T. Pharmacokinetic rationale for peritoneal drug administration in the treatment of ovarian cancer. *Cancer Treat. Rep.* **1978**, *62*, 1–11. [[PubMed](#)]
- Torres, I.J.; Litterst, C.L.; Guarino, A.M. Transport of model compounds across the peritoneal membrane in the rat. *Pharmacology* **1978**, *17*, 330–340. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Alberts, D.S.; Liu, P.Y.; Hannigan, E.V.; O'Toole, R.; Williams, S.D.; Young, J.A.; Franklin, E.W.; Clarke-Pearson, D.L.; Malviya, V.K.; DuBeshter, B. Intraperitoneal cisplatin plus intravenous cyclophosphamide versus intravenous cisplatin plus intravenous cyclophosphamide for stage III ovarian cancer. *N. Engl. J. Med.* **1996**, *335*, 1950–1955. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Howell, S.B.; Zimm, S.; Markman, M.; Abramson, I.S.; Cleary, S.; Lucas, W.E.; Weiss, R.J. Long-term survival of advanced refractory ovarian carcinoma patients with small-volume disease treated with intraperitoneal chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* **1987**, *5*, 1607–1612. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ozols, R.F.; Gore, M.; Tropé, C.; Grenman, S. Intraperitoneal treatment and dose-intense therapy in ovarian cancer. *Ann. Oncol.* **1999**, *10* (Suppl. 1), 59–64. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Los, G.; Verdegaal, E.M.; Mutsaers, P.H.; McVie, J.G. Penetration of carboplatin and cisplatin into rat peritoneal tumor nodules after intraperitoneal chemotherapy. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1991**, *28*, 159–165. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

22. Eoh, K.J.; Lee, J.Y.; Nam, E.J.; Kim, S.; Kim, Y.T.; Kim, S.W. Long-Term Survival Analysis of Intraperitoneal versus Intravenous Chemotherapy for Primary Ovarian Cancer and Comparison between Carboplatin- and Cisplatin-based Intraperitoneal Chemotherapy. *J. Korean Med. Sci.* **2017**, *32*, 2021–2028. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Tewari, D.; Java, J.J.; Salani, R.; Armstrong, D.K.; Markman, M.; Herzog, T.; Monk, B.J.; Chan, J.K. Long-Term Survival Advantage and Prognostic Factors Associated With Intraperitoneal Chemotherapy Treatment in Advanced Ovarian Cancer: A Gynecologic Oncology Group Study. *J. Clin. Oncol.* **2015**, *33*, 1460–1466. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Elias, D.; Antoun, S.; Goharin, A.; Otmany, A.E.; Puizillout, J.M.; Lasser, P. Research on the best chemohyperthermia technique of treatment of peritoneal carcinomatosis after complete resection. *Int. J. Surg. Investig.* **2000**, *1*, 431–439. [[PubMed](#)]
25. Van Driel, W.J.; Koole, S.N.; Sikorska, K.; Schagen van Leeuwen, J.H.; Schreuder, H.W.R.; Hermans, R.H.M.; de Hingh, I.H.J.T.; van der Velden, J.; Arts, H.J.; Massuger, L.F.A.G.; et al. Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy in Ovarian Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *378*, 230–240. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Elattar, A.; Bryant, A.; Winter-Roach, B.A.; Hatem, M.; Naik, R. Optimal primary surgical treatment for advanced epithelial ovarian cancer. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2011**, CD007565. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Hoskins, W.J.; Bundy, B.N.; Thigpen, J.T.; Omura, G.A. The influence of cytoreductive surgery on recurrence-free interval and survival in small-volume stage III epithelial ovarian cancer: A Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol. Oncol.* **1992**, *47*, 159–166. [[CrossRef](#)]
28. Vermeulen, C.K.M.; Tadesse, W.; Timmermans, M.; Kruitwagen, R.F.P.M.; Walsh, T. Only complete tumour resection after neoadjuvant chemotherapy offers benefit over suboptimal debulking in advanced ovarian cancer. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **2017**, *219*, 100–105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Du Bois, A.; Lück, H.-J.; Meier, W.; Adams, H.-P.; Möbus, V.; Costa, S.; Bauknecht, T.; Richter, B.; Warm, M.; Schröder, W.; et al. Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie Ovarian Cancer Study Group A randomized clinical trial of cisplatin/paclitaxel versus carboplatin/paclitaxel as first-line treatment of ovarian cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **2003**, *95*, 1320–1329. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Lakhman, Y.; Akin, O.; Sohn, M.J.; Zheng, J.; Moskowitz, C.S.; Iyer, R.B.; Barakat, R.R.; Sabbatini, P.J.; Chi, D.S.; Hricak, H. Early postoperative CT as a prognostic biomarker in patients with advanced ovarian, tubal, and primary peritoneal cancer deemed optimally debulked at primary cytoreductive surgery. *AJR Am. J. Roentgenol.* **2012**, *198*, 1453–1459. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Butler, J.; Gildea, C.; Poole, J.; Meechan, D.; Nordin, A. Specialist surgery for ovarian cancer in England. *Gynecol. Oncol.* **2015**, *138*, 700–706. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. DSouza, A.V.; Lin, H.; Henderson, E.R.; Samkoe, K.S.; Pogue, B.W. Review of fluorescence guided surgery systems: Identification of key performance capabilities beyond indocyanine green imaging. *J. Biomed. Opt.* **2016**, *21*, 080901. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Herly, L. Studies in Selective Differentiation of Tissues by Means of Filtered Ultraviolet Light. *Cancer Res.* **1944**, *4*, 227–231.
34. Moore, G.E. Fluorescein as an Agent in the Differentiation of Normal and Malignant Tissues. *Science* **1947**, *106*, 130–131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Moore, G.E.; Peyton, W.T.; French, L.A.; Walker, W.W. The clinical use of fluorescein in neurosurgery. *J. Neurosurg.* **1948**, *5*, 392–398. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Senders, J.T.; Muskens, I.S.; Schnoor, R.; Karhade, A.V.; Cote, D.J.; Smith, T.R.; Broekman, M.L.D. Agents for fluorescence-guided glioma surgery: A systematic review of preclinical and clinical results. *Acta Neurochir. (Wien)* **2017**, *159*, 151–167. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Van Dam, G.M.; Themelis, G.; Crane, L.M.A.; Harlaar, N.J.; Pleijhuis, R.G.; Kelder, W.; Sarantopoulos, A.; de Jong, J.S.; Arts, H.J.G.; van der Zee, A.G.J.; et al. Intraoperative tumor-specific fluorescence imaging in ovarian cancer by folate receptor- α targeting: First in-human results. *Nat. Med.* **2011**, *17*, 1315–1319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Vahrmeijer, A.L.; Hutteman, M.; van der Vorst, J.R.; van de Velde, C.J.H.; Frangioni, J.V. Image-guided cancer surgery using near-infrared fluorescence. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2013**, *10*, 507–518. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Leblond, F.; Davis, S.C.; Valdés, P.A.; Pogue, B.W. Pre-clinical whole-body fluorescence imaging: Review of instruments, methods and applications. *J. Photochem. Photobiol. B* **2010**, *98*, 77–94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Samanta, A.; Vendrell, M.; Das, R.; Chang, Y.-T. Development of photostable near-infrared cyanine dyes. *Chem. Commun. Camb. Engl.* **2010**, *46*, 7406–7408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

41. Umezawa, K.; Nakamura, Y.; Makino, H.; Citterio, D.; Suzuki, K. Bright, color-tunable fluorescent dyes in the visible-near-infrared region. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 1550–1551. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Yuan, L.; Lin, W.; Yang, Y.; Chen, H. A unique class of near-infrared functional fluorescent dyes with carboxylic-acid-modulated fluorescence ON/OFF switching: Rational design, synthesis, optical properties, theoretical calculations, and applications for fluorescence imaging in living animals. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 1200–1211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Reinhart, M.B.; Huntington, C.R.; Blair, L.J.; Heniford, B.T.; Augenstein, V.A. Indocyanine Green: Historical Context, Current Applications, and Future Considerations. *Surg. Innov.* **2016**, *23*, 166–175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Zhu, B.; Sevcik-Muraca, E.M. A review of performance of near-infrared fluorescence imaging devices used in clinical studies. *Br. J. Radiol.* **2014**, *88*, 20140547. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Maeda, H.; Wu, J.; Sawa, T.; Matsumura, Y.; Hori, K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: A review. *J. Control. Release* **2000**, *65*, 271–284. [[CrossRef](#)]
46. Shibasaki, Y.; Morita, Y.; Sakaguchi, T.; Konno, H. Indocyanine Green-Related Transporters in Hepatocellular Carcinoma. *SpringerLink* **2016**, 351–362. [[CrossRef](#)]
47. Kosaka, N.; Mitsunaga, M.; Longmire, M.R.; Choyke, P.L.; Kobayashi, H. Near infrared fluorescence-guided real-time endoscopic detection of peritoneal ovarian cancer nodules using intravenously injected indocyanine green. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **2011**, *129*, 1671–1677. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Tummers, Q.R.J.G.; Hoogstins, C.E.S.; Peters, A.A.W.; de Kroon, C.D.; Trimbos, J.B.M.Z.; van de Velde, C.J.H.; Frangioni, J.V.; Vahrmeijer, A.L.; Gaarenstroom, K.N. The Value of Intraoperative Near-Infrared Fluorescence Imaging Based on Enhanced Permeability and Retention of Indocyanine Green: Feasibility and False-Positives in Ovarian Cancer. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0129766. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Tanaka, E.; Choi, H.S.; Humblet, V.; Ohnishi, S.; Laurence, R.G.; Frangioni, J.V. Real-time intraoperative assessment of the extrahepatic bile ducts in rats and pigs using invisible near-infrared fluorescent light. *Surgery* **2008**, *144*, 39–48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Hoogstins, C.E.S.; Tummers, Q.R.J.G.; Gaarenstroom, K.N.; de Kroon, C.D.; Trimbos, J.B.M.Z.; Bosse, T.; Smit, V.T.H.B.M.; Vuyk, J.; van de Velde, C.J.H.; Cohen, A.F.; et al. A Novel Tumor-Specific Agent for Intraoperative Near-Infrared Fluorescence Imaging: A Translational Study in Healthy Volunteers and Patients with Ovarian Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2016**, *22*, 2929–2938. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Hekman, M.; Rijpkema, M.; Oosterwijk, E.; Langenhuijsen, H.; Boerman, O.; Oyen, W.; Mulders, P. Intraoperative dual-modality imaging in clear cell renal cell carcinoma using Indium-111-DOTA-girentuximab-IRDye800CW. *Eur. Urol. Suppl.* **2017**, *16*, e1831. [[CrossRef](#)]
52. Choi, H.S.; Gibbs, S.L.; Lee, J.H.; Kim, S.H.; Ashitate, Y.; Liu, F.; Hyun, H.; Park, G.; Xie, Y.; Bae, S.; et al. Targeted zwitterionic near-infrared fluorophores for improved optical imaging. *Nat. Biotechnol.* **2013**, *31*, 148–153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Rose, A. A Unified Approach to the Performance of Photographic Film, Television Pickup Tubes, and the Human Eye. *J. Soc. Motion Pict. Eng.* **1946**, *47*, 273–294. [[CrossRef](#)]
54. Kusano, M.; Kokudo, N.; Toi, M.; Kaibori, M. *ICG Fluorescence Imaging and Navigation Surgery*; Springer: Berlin, Germany, 2016; ISBN 978-4-431-55528-5.
55. Choi, H.S.; Frangioni, J.V. Nanoparticles for Biomedical Imaging: Fundamentals of Clinical Translation. *Mol. Imaging* **2010**, *9*, 291–310. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Sitbon, G.; Bouccara, S.; Tasso, M.; Francois, A.; Bezdetnaya, L.; Marchal, F.; Beaumont, M.; Pons, T. Multimodal Mn-doped I-III-VI quantum dots for near infrared fluorescence and magnetic resonance imaging: From synthesis to in vivo application. *Nanoscale* **2014**, *6*, 9264–9272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Liu, X.; Braun, G.B.; Qin, M.; Ruoslahti, E.; Sugahara, K.N. In vivo cation exchange in quantum dots for tumor-specific imaging. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 343. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Gao, Y.; Liu, L.; Shen, B.; Chen, X.; Wang, L.; Wang, L.; Feng, W.; Huang, C.; Li, F. Amphiphilic PEGylated Lanthanide-Doped Upconversion Nanoparticles for Significantly Passive Accumulation in the Peritoneal Metastatic Carcinomatosis Models Following Intraperitoneal Administration. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2017**, *3*, 2176–2184. [[CrossRef](#)]
59. Ko, H.Y.; Chang, Y.W.; Paramasivam, G.; Jeong, M.S.; Cho, S.; Kim, S. In vivo imaging of tumour bearing near-infrared fluorescence-emitting carbon nanodots derived from tire soot. *Chem. Commun. Camb. Engl.* **2013**, *49*, 10290–10292. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

60. Zhao, Q.; Li, K.; Chen, S.; Qin, A.; Ding, D.; Zhang, S.; Liu, Y.; Liu, B.; Sun, J.Z.; Tang, B.Z. Aggregation-induced red-NIR emission organic nanoparticles as effective and photostable fluorescent probes for bioimaging. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 15128–15135. [[CrossRef](#)]
61. Burns, A.A.; Vider, J.; Ow, H.; Herz, E.; Penate-Medina, O.; Baumgart, M.; Larson, S.M.; Wiesner, U.; Bradbury, M. Fluorescent silica nanoparticles with efficient urinary excretion for nanomedicine. *Nano Lett.* **2009**, *9*, 442–448. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Burns, A.; Ow, H.; Wiesner, U. Fluorescent core–shell silica nanoparticles: Towards “Lab on a Particle” architectures for nanobiotechnology. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 1028–1042. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Phillips, E.; Penate-Medina, O.; Zanzonico, P.B.; Carvajal, R.D.; Mohan, P.; Ye, Y.; Humm, J.; Gönen, M.; Kalaigian, H.; Schöder, H.; et al. Clinical translation of an ultrasmall inorganic optical-PET imaging nanoparticle probe. *Sci. Transl. Med.* **2014**, *6*, 260ra149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Landen, C.N.; Kim, T.-J.; Lin, Y.G.; Merritt, W.M.; Kamat, A.A.; Han, L.Y.; Spannuth, W.A.; Nick, A.M.; Jennings, N.B.; Kinch, M.S.; et al. Tumor-Selective Response to Antibody-Mediated Targeting of $\alpha v \beta 3$ Integrin in Ovarian Cancer. *Neoplasia* **2008**, *10*, 1259–1267. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Kim, S.E.; Zhang, L.; Ma, K.; Riegman, M.; Chen, F.; Ingold, I.; Conrad, M.; Turker, M.Z.; Gao, M.; Jiang, X.; et al. Ultrasmall nanoparticles induce ferroptosis in nutrient-deprived cancer cells and suppress tumour growth. *Nat. Nanotechnol.* **2016**, *11*, 977–985. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Lacroix, L.-M.; Delpech, F.; Nayral, C.; Lachaize, S.; Chaudret, B. New generation of magnetic and luminescent nanoparticles for in vivo real-time imaging. *Interface Focus* **2013**, *3*, 20120103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Damalakiene, L.; Karabanovas, V.; Bagdonas, S.; Rotomskis, R. Fluorescence-Lifetime Imaging Microscopy for Visualization of Quantum Dots’ Endocytic Pathway. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*. [[CrossRef](#)]
68. Helle, M.; Cassette, E.; Bezdetsnaya, L.; Pons, T.; Leroux, A.; Plénat, F.; Guillemin, F.; Dubertret, B.; Marchal, F. Visualisation of sentinel lymph node with indium-based near infrared emitting Quantum Dots in a murine metastatic breast cancer model. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e44433. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Liu, N.; Mu, Y.; Chen, Y.; Sun, H.; Han, S.; Wang, M.; Wang, H.; Li, Y.; Xu, Q.; Huang, P.; et al. Degradation of aqueous synthesized CdTe/ZnS quantum dots in mice: Differential blood kinetics and biodistribution of cadmium and tellurium. *Part. Fibre Toxicol.* **2013**, *10*, 37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Han, Y.; Xie, G.; Sun, Z.; Mu, Y.; Han, S.; Xiao, Y.; Liu, N.; Wang, H.; Guo, C.; Shi, Z.; et al. Plasma kinetics and biodistribution of water-soluble CdTe quantum dots in mice: A comparison between Cd and Te. *J. Nanopart. Res.* **2011**, *13*, 5373. [[CrossRef](#)]
71. Lin, C.-H.; Chang, L.W.; Chang, H.; Yang, M.-H.; Yang, C.-S.; Lai, W.-H.; Chang, W.-H.; Lin, P. The chemical fate of the Cd/Se/Te-based quantum dot 705 in the biological system: Toxicity implications. *Nanotechnology* **2009**, *20*, 215101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Derfus, A.M.; Chan, W.C.W.; Bhatia, S.N. Probing the Cytotoxicity of Semiconductor Quantum Dots. *Nano Lett.* **2004**, *4*, 11–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Cassette, E.; Helle, M.; Bezdetsnaya, L.; Marchal, F.; Dubertret, B.; Pons, T. Design of new quantum dot materials for deep tissue infrared imaging. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 719–731. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Duman, F.D.; Erkisa, M.; Khodadust, R.; Ari, F.; Ulukaya, E.; Acar, H.Y. Folic acid-conjugated cationic Ag₂S quantum dots for optical imaging and selective doxorubicin delivery to HeLa cells. *Nanomedicine* **2017**, *12*, 2319–2333. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Chen, G.; Qiu, H.; Prasad, P.N.; Chen, X. Upconversion Nanoparticles: Design, Nanochemistry, and Applications in Theranostics. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 5161–5214. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Zhu, X.; Su, Q.; Feng, W.; Li, F. Anti-Stokes shift luminescent materials for bio-applications. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 1025–1039. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. González-Béjar, M.; Francés-Soriano, L.; Pérez-Prieto, J. Upconversion Nanoparticles for Bioimaging and Regenerative Medicine. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2016**, *4*, 47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Hirano, S.; Suzuki, K.T. Exposure, metabolism, and toxicity of rare earths and related compounds. *Environ. Health Perspect.* **1996**, *104*, 85–95. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Rogosnitzky, M.; Branch, S. Gadolinium-based contrast agent toxicity: A review of known and proposed mechanisms. *Biometals* **2016**, *29*, 365–376. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

80. Chan, M.-H.; Liu, R.-S. Advanced sensing, imaging, and therapy nanoplatforms based on Nd³⁺-doped nanoparticle composites exhibiting upconversion induced by 808 nm near-infrared light. *Nanoscale* **2017**, *9*, 18153–18168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Rim, K.T.; Koo, K.H.; Park, J.S. Toxicological Evaluations of Rare Earths and Their Health Impacts to Workers: A Literature Review. *Saf. Health Work* **2013**, *4*, 12–26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Cao, L.; Yang, S.-T.; Wang, X.; Luo, P.G.; Liu, J.-H.; Sahu, S.; Liu, Y.; Sun, Y.-P. Competitive Performance of Carbon “Quantum” Dots in Optical Bioimaging. *Theranostics* **2012**, *2*, 295–301. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Zhu, S.; Meng, Q.; Wang, L.; Zhang, J.; Song, Y.; Jin, H.; Zhang, K.; Sun, H.; Wang, H.; Yang, B. Highly Photoluminescent Carbon Dots for Multicolor Patterning, Sensors, and Bioimaging. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 3953–3957. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Cao, L.; Wang, X.; Mezziani, M.J.; Lu, F.; Wang, H.; Luo, P.G.; Lin, Y.; Harruff, B.A.; Veca, L.M.; Murray, D.; et al. Carbon Dots for Multiphoton Bioimaging. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11318–11319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Jaleel, J.A.; Pramod, K. Artful and multifaceted applications of carbon dot in biomedicine. *J. Control. Release* **2018**, *269*, 302–321. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Hong, Y.; Lam, J.W.Y.; Tang, B.Z. Aggregation-induced emission: Phenomenon, mechanism and applications. *Chem. Commun.* **2009**, 4332–4353. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Liu, J.; Chen, C.; Ji, S.; Liu, Q.; Ding, D.; Zhao, D.; Liu, B. Long wavelength excitable near-infrared fluorescent nanoparticles with aggregation-induced emission characteristics for image-guided tumor resection. *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 2782–2789. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Helle, M.; Rampazzo, E.; Monchanin, M.; Marchal, F.; Guillemain, F.; Bonacchi, S.; Salis, F.; Prodi, L.; Bezdetrnaya, L. Surface Chemistry Architecture of Silica Nanoparticles Determine the Efficiency of in Vivo Fluorescence Lymph Node Mapping. *ACS Nano* **2013**, *7*, 8645–8657. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Elsaesser, A.; Howard, C.V. Toxicology of nanoparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 129–137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Kobayashi, M.; Sawada, K.; Kimura, T. Potential of Integrin Inhibitors for Treating Ovarian Cancer: A Literature Review. *Cancers* **2017**, *9*, 83. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Kaur, S.; Kenny, H.A.; Jagadeeswaran, S.; Zillhardt, M.R.; Montag, A.G.; Kistner, E.; Yamada, S.D.; Mitra, A.K.; Lengyel, E. β 3-Integrin Expression on Tumor Cells Inhibits Tumor Progression, Reduces Metastasis, and Is Associated with a Favorable Prognosis in Patients with Ovarian Cancer. *Am. J. Pathol.* **2009**, *175*, 2184–2196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Lim, Y.T.; Kim, S.; Nakayama, A.; Stott, N.E.; Bawendi, M.G.; Frangioni, J.V. Selection of quantum dot wavelengths for biomedical assays and imaging. *Mol. Imaging* **2003**, *2*, 50–64. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Smith, A.M.; Mancini, M.C.; Nie, S. Second window for in vivo imaging. *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 710–711. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Beaulieu, R.J.; Goldstein, S.D.; Singh, J.; Safar, B.; Banerjee, A.; Ahuja, N. Automated diagnosis of colon cancer using hyperspectral sensing. *Int. J. Med. Robot. Comput. Assist. Surg.* **2018**, *14*, e1897. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Hu, P.; Mingozzi, M.; Higgins, L.M.; Ganapathy, V.; Zevon, M.; Riman, R.E.; Roth, C.M.; Moghe, P.V.; Pierce, M.C. *Small Animal Imaging Platform for Quantitative Assessment of Short-Wave Infrared-Emitting Contrast Agents*; International Society for Optics and Photonics: Washington, DC, USA, 2015; Volume 9311, p. 93110T.
96. Hong, G.; Robinson, J.T.; Zhang, Y.; Diao, S.; Antaris, A.L.; Wang, Q.; Dai, H. In Vivo Fluorescence Imaging with Ag₂S Quantum Dots in the Second Near-Infrared Region. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 9818–9821. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Hong, G.; Diao, S.; Chang, J.; Antaris, A.L.; Chen, C.; Zhang, B.; Zhao, S.; Atochin, D.N.; Huang, P.L.; Andreasson, K.I.; et al. Through-skull fluorescence imaging of the brain in a new near-infrared window. *Nat. Photonics* **2014**, *8*, 723. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Zhang, H.; Salo, D.; Kim, D.M.; Komarov, S.; Tai, Y.-C.; Berezin, M.Y. Penetration depth of photons in biological tissues from hyperspectral imaging in shortwave infrared in transmission and reflection geometries. *J. Biomed. Opt.* **2016**, *21*, 126006. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Antaris, A.L.; Chen, H.; Cheng, K.; Sun, Y.; Hong, G.; Qu, C.; Diao, S.; Deng, Z.; Hu, X.; Zhang, B.; et al. A small-molecule dye for NIR-II imaging. *Nat. Mater.* **2016**, *15*, 235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

100. Starosolski, Z.; Bhavane, R.; Ghaghada, K.B.; Vasudevan, S.A.; Kaay, A.; Annapragada, A. Indocyanine green fluorescence in second near-infrared (NIR-II) window. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0187563. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Yang, Q.; Hu, Z.; Zhu, S.; Ma, R.; Ma, H.; Ma, Z.; Wan, H.; Zhu, T.; Jiang, Z.; Liu, W.; et al. Donor Engineering for NIR-II Molecular Fluorophores with Enhanced Fluorescent Performance. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 1715–1724. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Zhu, C.-N.; Jiang, P.; Zhang, Z.-L.; Zhu, D.-L.; Tian, Z.-Q.; Pang, D.-W. Ag₂Se Quantum Dots with Tunable Emission in the Second Near-Infrared Window. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, *5*, 1186–1189. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Bruns, O.T.; Bischof, T.S.; Harris, D.K.; Franke, D.; Shi, Y.; Riedemann, L.; Bartelt, A.; Jaworski, F.B.; Carr, J.A.; Rowlands, C.J.; et al. Next-generation in vivo optical imaging with short-wave infrared quantum dots. *Nat. Biomed. Eng.* **2017**, *1*, 0056. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Naczynski, D.J.; Tan, M.C.; Zevon, M.; Wall, B.; Kohl, J.; Kulesa, A.; Chen, S.; Roth, C.M.; Riman, R.E.; Moghe, P.V. Rare-earth-doped biological composites as in vivo shortwave infrared reporters. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2199. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Chen, Y.; Montana, D.M.; Wei, H.; Cordero, J.M.; Schneider, M.; Le Guével, X.; Chen, O.; Bruns, O.T.; Bawendi, M.G. Shortwave Infrared in Vivo Imaging with Gold Nanoclusters. *Nano Lett.* **2017**, *17*, 6330–6334. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Ghosh, D.; Bagley, A.F.; Na, Y.J.; Birrer, M.J.; Bhatia, S.N.; Belcher, A.M. Deep, noninvasive imaging and surgical guidance of submillimeter tumors using targeted M13-stabilized single-walled carbon nanotubes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 13948–13953. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Qi, J.; Sun, C.; Zebibula, A.; Zhang, H.; Kwok, R.T.K.; Zhao, X.; Xi, W.; Lam, J.W.Y.; Qian, J.; Tang, B.Z. Real-Time and High-Resolution Bioimaging with Bright Aggregation-Induced Emission Dots in Short-Wave Infrared Region. *Adv. Mater. Deerfield Beach Fla* **2018**, *30*, e1706856. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Zevon, M.; Ganapathy, V.; Kantamneni, H.; Mingozzi, M.; Kim, P.; Adler, D.; Sheng, Y.; Tan, M.C.; Pierce, M.; Riman, R.E.; et al. CXCR-4 Targeted, Short Wave Infrared (SWIR) Emitting Nanoprobes for Enhanced Deep Tissue Imaging and Micrometastatic Lesion Detection. *Small Weinheim Bergstr. Ger.* **2015**, *11*, 6347–6357. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Tao, Z.; Dang, X.; Huang, X.; Muzumdar, M.D.; Xu, E.S.; Bardhan, N.M.; Song, H.; Qi, R.; Yu, Y.; Li, T.; et al. Early tumor detection afforded by in vivo imaging of near-infrared II fluorescence. *Biomaterials* **2017**, *134*, 202–215. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
110. Murthy, R.; Nunez, R.; Szklaruk, J.; Erwin, W.; Madoff, D.C.; Gupta, S.; Ahrar, K.; Wallace, M.J.; Cohen, A.; Coldwell, D.M.; et al. Yttrium-90 microsphere therapy for hepatic malignancy: Devices, indications, technical considerations, and potential complications. *Radiogr. Rev. Publ. Radiol. Soc. N. Am. Inc* **2005**, *25* (Suppl. 1), S41–S55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
111. Yu, X.-F.; Chen, L.-D.; Li, M.; Xie, M.-Y.; Zhou, L.; Li, Y.; Wang, Q.-Q. Highly Efficient Fluorescence of NdF₃/SiO₂ Core/Shell Nanoparticles and the Applications for in vivo NIR Detection. *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 4118–4123. [[CrossRef](#)]
112. Saito, N.; Haniu, H.; Usui, Y.; Aoki, K.; Hara, K.; Takanashi, S.; Shimizu, M.; Narita, N.; Okamoto, M.; Kobayashi, S.; et al. Safe Clinical Use of Carbon Nanotubes as Innovative Biomaterials. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 6040–6079. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Sanginario, A.; Miccoli, B.; Demarchi, D. Carbon Nanotubes as an Effective Opportunity for Cancer Diagnosis and Treatment. *Biosensors* **2017**, *7*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Caltagirone, C.; Falchi, A.M.; Lampis, S.; Lippolis, V.; Meli, V.; Monduzzi, M.; Prodi, L.; Schmidt, J.; Sgarzi, M.; Talmon, Y.; et al. Cancer-cell-targeted theranostic cubosomes. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* **2014**, *30*, 6228–6236. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Saei, A.A.; Yazdani, M.; Lohse, S.E.; Bakhtiary, Z.; Serpooshan, V.; Ghavami, M.; Asadian, M.; Mashaghi, S.; Dreaden, E.C.; Mashaghi, A.; et al. Nanoparticle Surface Functionality Dictates Cellular and Systemic Toxicity. *Chem. Mater.* **2017**, *29*, 6578–6595. [[CrossRef](#)]
116. Pourmand, A.; Abdollahi, M. Current Opinion on Nanotoxicology. *DARU J. Pharm. Sci.* **2012**, *20*, 95. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Vishwakarma, V.; Sekhar, S.; Manoharan, N. Safety and Risk Associated with Nanoparticles—A Review. *J. Miner. Mater. Charact. Eng.* **2010**, *9*, 455–459. [[CrossRef](#)]

118. Yang, L.; Watts, D.J. Particle surface characteristics may play an important role in phytotoxicity of alumina nanoparticles. *Toxicol. Lett.* **2005**, *158*, 122–132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
119. Bahadar, H.; Maqbool, F.; Niaz, K.; Abdollahi, M. Toxicity of Nanoparticles and an Overview of Current Experimental Models. *Iran. Biomed. J.* **2016**, *20*, 1–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
120. Sykes, E.A.; Dai, Q.; Sarsons, C.D.; Chen, J.; Rocheleau, J.V.; Hwang, D.M.; Zheng, G.; Cramb, D.T.; Rinker, K.D.; Chan, W.C.W. Tailoring nanoparticle designs to target cancer based on tumor pathophysiology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, E1142–E1151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
121. Polo, E.; Collado, M.; Pelaz, B.; del Pino, P. Advances toward More Efficient Targeted Delivery of Nanoparticles in Vivo: Understanding Interactions between Nanoparticles and Cells. *ACS Nano* **2017**, *11*, 2397–2402. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Soo Choi, H.; Liu, W.; Misra, P.; Tanaka, E.; Zimmer, J.P.; Itty Ipe, B.; Bawendi, M.G.; Frangioni, J.V. Renal clearance of quantum dots. *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 1165–1170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Du, B.; Jiang, X.; Das, A.; Zhou, Q.; Yu, M.; Jin, R.; Zheng, J. Glomerular barrier behaves as an atomically precise bandpass filter in a sub-nanometre regime. *Nat. Nanotechnol.* **2017**, *12*, 1096–1102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Ma, N.; Marshall, A.F.; Gambhir, S.S.; Rao, J. Facile Synthesis, Silanization and Biodistribution of Biocompatible Quantum Dots. *Small Weinh. Bergstr. Ger.* **2010**, *6*, 1520–1528. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Yu, S.; Xu, D.; Wan, Q.; Liu, M.; Tian, J.; Huang, Q.; Deng, F.; Wen, Y.; Zhang, X.; Wei, Y. Construction of biodegradable and biocompatible AIE-active fluorescent polymeric nanoparticles by Ce(IV)/HNO₃ redox polymerization in aqueous solution. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *78*, 191–197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. Vlasova, I.I.; Kapralov, A.A.; Michael, Z.P.; Burkert, S.C.; Shurin, M.R.; Star, A.; Shvedova, A.A.; Kagan, V.E. Enzymatic Oxidative Biodegradation of Nanoparticles: Mechanisms, Significance and Applications. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2016**, *299*, 58–69. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
127. Warner, J.H.; Hoshino, A.; Yamamoto, K.; Tilley, R.D. Water-Soluble Photoluminescent Silicon Quantum Dots. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4550–4554. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
128. Kang, Z.; Tsang, C.H.A.; Zhang, Z.; Zhang, M.; Wong, N.; Zapfen, J.A.; Shan, Y.; Lee, S.-T. A polyoxometalate-assisted electrochemical method for silicon nanostructures preparation: From quantum dots to nanowires. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5326–5327. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
129. Erogbogbo, F.; Yong, K.-T.; Roy, I.; Xu, G.; Prasad, P.N.; Swihart, M.T. Biocompatible luminescent silicon quantum dots for imaging of cancer cells. *ACS Nano* **2008**, *2*, 873–878. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
130. Liu, J.; Erogbogbo, F.; Yong, K.-T.; Ye, L.; Liu, J.; Hu, R.; Chen, H.; Hu, Y.; Yang, Y.; Yang, J.; et al. Assessing Clinical Prospects of Silicon Quantum Dots: Studies in Mice and Monkeys. *ACS Nano* **2013**, *7*, 7303–7310. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
131. Lacerda, L.; Herrero, M.A.; Venner, K.; Bianco, A.; Prato, M.; Kostarelos, K. Carbon-Nanotube Shape and Individualization Critical for Renal Excretion. *Small* **2008**, *4*, 1130–1132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
132. Colby, A.H.; Berry, S.M.; Moran, A.M.; Pasion, K.A.; Liu, R.; Colson, Y.L.; Ruiz-Opazo, N.; Grinstaff, M.W.; Herrera, V.L.M. Highly Specific and Sensitive Fluorescent Nanoprobes for Image-Guided Resection of Sub-Millimeter Peritoneal Tumors. *ACS Nano* **2017**, *11*, 1466–1477. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
133. Han, M.S.; Tung, C.-H. Lessons learned from imaging mouse ovarian tumors: The route of probe injection makes a difference. *Quant. Imaging Med. Surg.* **2014**, *4*, 156–162. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Parungo, C.P.; Soybel, D.I.; Colson, Y.L.; Kim, S.-W.; Ohnishi, S.; De Grand, A.M.; Laurence, R.G.; Soltesz, E.G.; Chen, F.Y.; Cohn, L.H.; et al. Lymphatic Drainage of the Peritoneal Space: A Pattern Dependent on Bowel Lymphatics. *Ann. Surg. Oncol.* **2007**, *14*, 286–298. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
135. Kato, S.; Itoh, K.; Yaoi, T.; Tozawa, T.; Yoshikawa, Y.; Yasui, H.; Kanamura, N.; Hoshino, A.; Manabe, N.; Yamamoto, K.; et al. Organ distribution of quantum dots after intraperitoneal administration, with special reference to area-specific distribution in the brain. *Nanotechnology* **2010**, *21*, 335103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
136. Haque, M.M.; Im, H.-Y.; Seo, J.-E.; Hasan, M.; Woo, K.; Kwon, O.-S. Acute toxicity and tissue distribution of CdSe/CdS-MPA quantum dots after repeated intraperitoneal injection to mice. *J. Appl. Toxicol.* **2013**, *33*, 940–950. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1.3. Quantum dots

Parmi les nanoparticules présentées dans la revue, les *quantum dots* (QD) se distinguent par des propriétés photo physiques supérieures. Avec des coefficients d'extinction molaire et des rendements quantiques de fluorescence élevés, leurs brillances (produit des deux précédents) dépassent de loin les autres nanoparticules.

1.3.1. Généralités

Les QDs sont des nanocristaux métalliques et semi-conducteurs. Dans la théorie des bandes, les électrons d'un solide ne peuvent prendre que des valeurs d'énergie comprises dans certains intervalles, et séparées par une bande d'énergie « interdite ». À un état fondamental, la dernière bande d'énergie remplie par des électrons est appelée bande de valence, et la bande qui la suit bande de conduction, tandis que l'énergie qui sépare ces deux bandes et la bande dite « interdite ». Dans un matériau conducteur, les bandes de valence et de conduction se chevauchent, les électrons peuvent donc circuler librement dans le matériau (Figure 14a). Dans le cas des matériaux semi-conducteurs, les bandes de valence et de conduction ne se chevauchent pas, mais sont séparées par une bande « interdite » d'énergie faible, les électrons peuvent passer de la bande de valence à la bande de conduction en cas d'apport d'énergie externe, sous forme de chaleur ou de lumière par exemple (Figure 14b). (Brus, 1984) Enfin, dans un matériau isolant, la bande « interdite » présente un niveau d'énergie très important, empêchant le passage des électrons (Figure 14c). (Kittel, 1996)

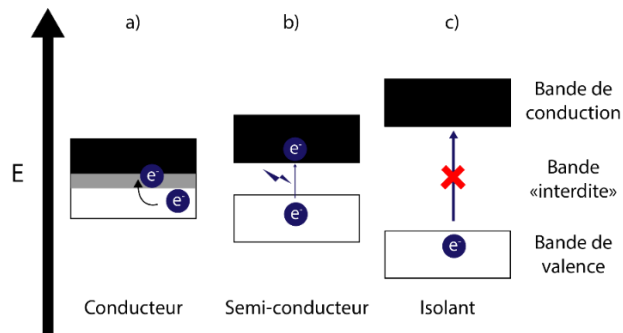


Figure 124 : Structures électroniques d'un conducteur (a), d'un semi-conducteur (b) et d'un isolant (c). Quand une énergie excédant celle de la bande interdite est absorbée par le semi-conducteur, les électrons de la bande de valence acquièrent suffisamment d'énergie pour rejoindre la bande conduction.

Cependant, la taille nanométrique des QDs est à l'origine d'une propriété supplémentaire, le confinement quantique. Dans une structure nanométrique sphérique, les électrons sont confinés dans les 3 dimensions, ce qui limite le nombre de niveaux d'énergie qu'ils peuvent occuper. La bande interdite séparant la bande de valence la plus haute et la bande de conduction la plus basse va alors être inversement proportionnelle à la taille de la nanoparticule (Figure 15).

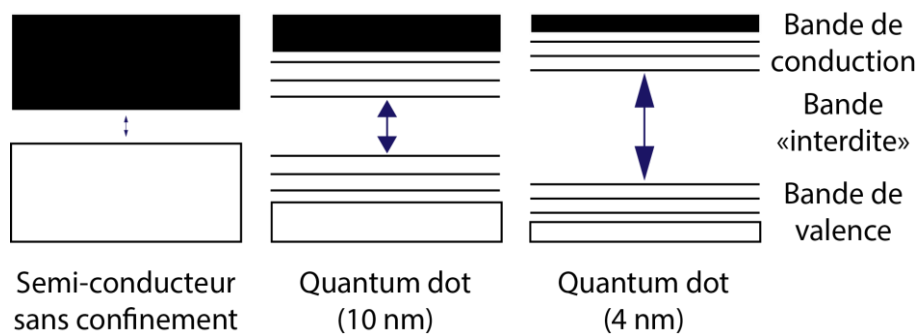


Figure 135 : Dans un quantum dot, les niveaux d'énergie des différentes bandes deviennent discrets, et plus le quantum dot est petit plus l'énergie de la bande interdite devient élevée.

De fait, lorsqu'un photon d'énergie au moins égale à la bande d'énergie interdite va être absorbé par un QD, un électron de la bande de valence va passer d'un état fondamental à un état excité, et ainsi occuper un niveau d'énergie de la bande de conduction, créant un « trou » dans la bande de valence. La paire électron-trou ainsi formée, et appelée exciton, reste confinée au QD du fait de sa taille nanométrique.

Lorsque l'électron excité se recombine avec son trou, il rejoint la bande de valence en émettant de l'énergie sous la forme d'un photon, d'énergie équivalente à celle de la bande interdite.

Pour protéger ce cœur fluorescent de l'environnement, une ou plusieurs coques métalliques peuvent être ajoutées. Ces coques, composées elles aussi d'alliage semi-conducteur, présentent des bandes interdites différentes. Elles vont avoir pour effet de passiver la surface du QD, le protégeant des interactions avec le milieu environnant, et augmente ainsi leur photo stabilité. Suivant leurs compositions et leurs épaisseurs, ces coques peuvent aussi modifier la longueur d'onde d'émission. (Reiss et al., 2009)

La bande d'énergie interdite étant proportionnelle à la taille des QDs, leur taille est proportionnelle à la longueur d'onde de la fluorescence émise. À composition identique, des QDs de tailles différentes auront donc une émission à une longueur d'onde différente (Figure 16).

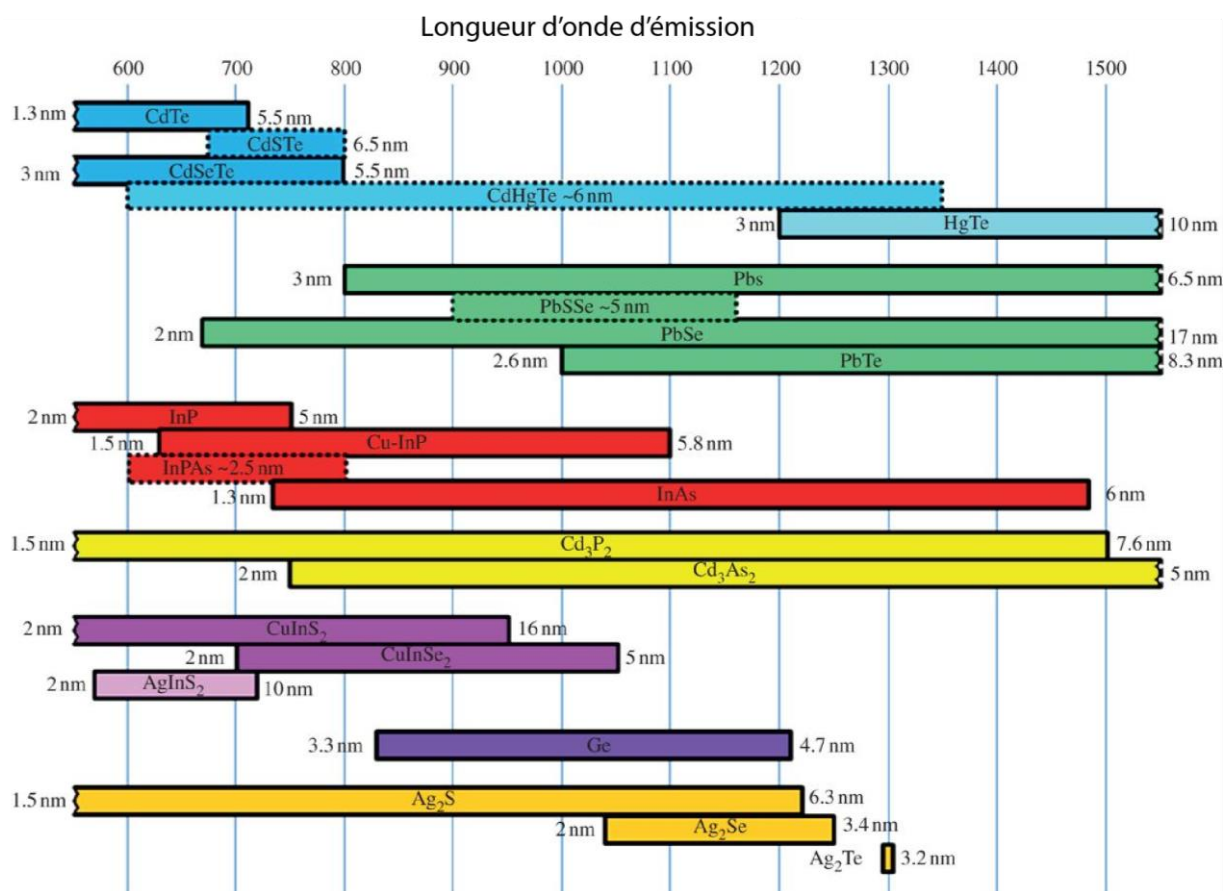


Figure 146 : Compositions, tailles et longueurs d'onde d'émission de différents quantum dots. (Lacroix et al., 2013)

Les QDs offrent donc une vaste gamme de taille et de longueur d'onde disponibles, en particulier dans le proche infrarouge et l'infrarouge court. Avec ces propriétés exceptionnelles, les QDs ont rapidement été mis à profit dans de nombreux domaines, dans les domaines photovoltaïques(Cheng et al., 2016) optoélectronique(Anikeeva et al., 2009) les télévisions(Bourzac, 2013) et même pour le développement d'ordinateurs quantiques.(Imamoglu et al., 1999)

1.3.2. Avantages des QDs comparés aux fluorophores organiques

Par comparaison avec les fluorophores classiques, les QDs présentent de nombreux avantages. En premier lieu, leurs propriétés photo-physiques leurs confèrent une brillance exceptionnelle. En effet, les QDs présentent des rendements quantiques de fluorescence jusqu'à 40%, contre 1% pour l'ICG, et des coefficients d'extinction molaire au moins égaux à l'ICG.(Benson and Kues, 1978; Bruns et al., 2017) Autre avantage, les QDs sont particulièrement résistants aux températures physiologiques au phénomène de photo dégradation(Wu et al., 2003) tandis que l'ICG se dégrade rapidement en solution aqueuse, sous l'action de la température et d'une excitation lumineuse.(Saxena et al., 2003)

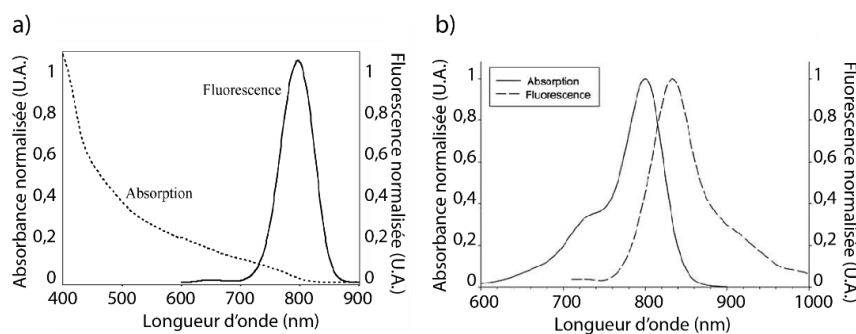


Figure 15 : Spectres d'absorbance et de fluorescence de QD à base de plomb et de soufre (a) et du vert d'indocyanine (b).(Jin et al., 2008; Topaloglu et al., 2013)

Second avantage, les QDs absorbent fortement les photons dans l'ultraviolet puis sur une large bande de longueurs d'onde (Figure 17a), et possèdent un déplacement de Stoke (écart entre le pic d'absorbance et le pic de fluorescence) de plusieurs centaines de nanomètres.(Gao et al., 2005) Cet écart facilite la séparation entre longueur d'onde d'excitation et d'émission, et améliore l'imagerie de

fluorescence.(Meng et al., 2017) En outre, les QDs de même composition, mais de tailles différentes partagent un spectre d'absorbance similaire, et produisent une fluorescence différente, ce qui permet d'utiliser une seule longueur d'onde d'excitation pour plusieurs fluorescences.(Walling et al., 2009) A l'inverse, les pics d'absorbance et de fluorescence de l'ICG sont distants d'une cinquantaine de nanomètres (Figure 17b), et se chevauchent.

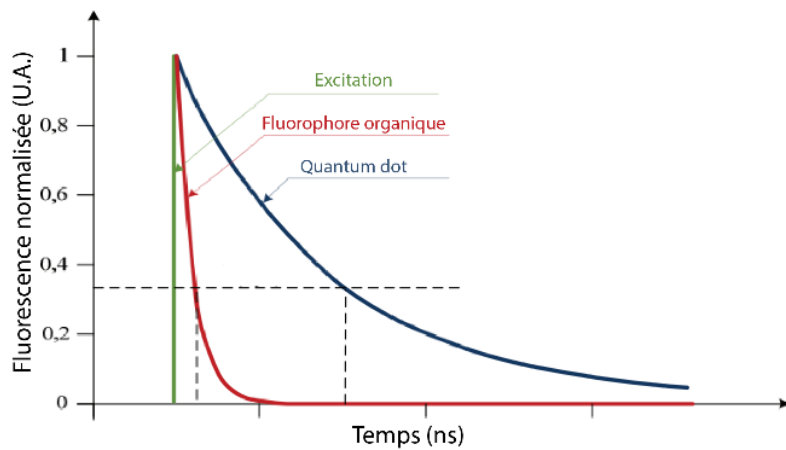
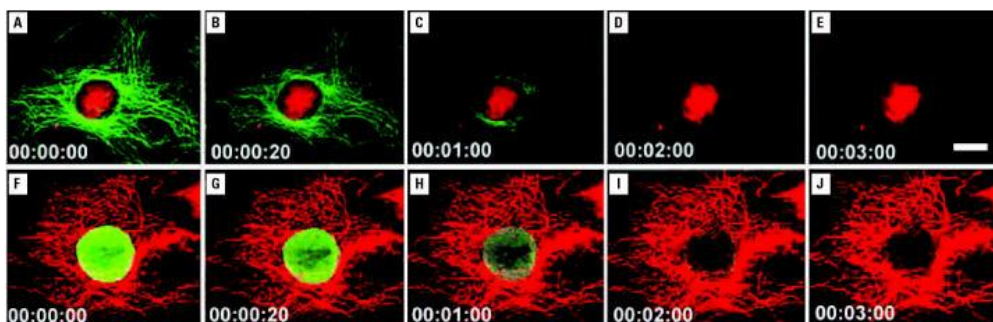


Figure 168 : Différence des temps de vie de fluorescence entre fluorophore organique (rouge) et quantum dot (bleu) après excitation par un laser femtoseconde (vert).(Brkić, 2018)

Dernières propriétés photo-physique en faveur des QDs, leurs demi-vies de fluorescence (Figure 18) atteint plusieurs dizaines voire centaines de nanosecondes,(Chen et al., 2015) contre 0,16 nanoseconde pour l'ICG.(Gerega et al., 2011) L'imagerie du temps de vie de fluorescence est envisagée pour guider la chirurgie des glioblastomes, mais s'appuie pour le moment sur les fluorophores biologiques tels que le NADP, qui présentent aussi des temps de vie très faible.(Sun et



al., 2010)

Figure 179 : Comparaison des QDs et d'un fluorophore organique en microscopie de fluorescence. Les QDs (rouge) sont ici comparés à l'Alexa 488 (vert), l'un et l'autre sont respectivement ciblés contre le noyau pour les QDs et la tubuline pour l'Alexa

488 (A-E), et inversement (F-J). Les images sont prises pendant 3 minutes sous une excitation constante de 485 nm. (Wu et al., 2003)

Enfin, les QDs présentent une photo-stabilité nettement supérieure aux fluorophores organiques. (Wegner and Hildebrandt, 2015) Cette dernière particularité avantage encore les QDs, notamment dans des applications en microscopie de fluorescence (Figure 19), (Wu et al., 2003), mais aussi pour la chirurgie de longue durée.

1.3.3. Utilisation des QD en milieux biologiques

Les QDs peuvent être synthétisés par de nombreux procédés, en milieux organiques ou aqueux, voire par biosynthèse. (Brichkin and Razumov, 2016; Green et al., 2016) Parmi ceux-ci, le procédé solvo-thermal, utilisant des précurseurs métalliques, en solution dans un solvant organique, et soumis à de haute température, permet d'obtenir des QDs considéré comme de « hautes qualités ». En effet, contrairement à d'autre procédé de synthèse, les QDs produits sont sans défaut de surface et de taille homogène. (Chen et al., 2013b) Cependant, en fin de synthèse, les QDs, hydrophobes sont recouverts d'un ligand lipidique, lui aussi hydrophobe.

Afin de rendre les QDs hydrophiles, plusieurs stratégies ont été développées (Figure 20), en particulier l'échange du ligand hydrophobe avec un ligand hydrophile, ou l'encapsulation des QDs et de leurs ligands hydrophobes dans une capsule hydrophile. (Tyrakowski and Snee, 2014) Par comparaison, cette dernière approche produit des QDs avec un diamètre hydrodynamique plus important (>25 nm), (Smith et al., 2006), et une chimie de surface plus difficile à modifier (Liu and Snee, 2011) ce qui réduit leur biocompatibilité.

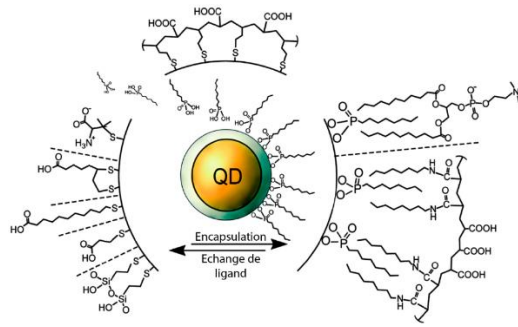


Figure 20 : Exemple d'échange de ligand et d'encapsulation des QDs, présentés ici avec une structure cœur/coque, et recouverts de trioctylphosphine hydrophobe. Les ligands se substituent au trioctylphosphine à la surface des QDs, via des mono ou bidentate thiol ou des groupements imidazole, et expose des groupements hydrophiles au milieu pour les rendre hydrosolubles. L'encapsulation utilise des surfactants hydrophobes qui permettent des interactions hydrophobes entre la trioctylphosphine et des polymères ou lipides amphiphiles.

Rendus hydrosolubles, les QDs présentent encore de nombreuses interactions non spécifiques avec les cellules, tissus et protéine, et subissent rapidement une opsonisation *in vivo*, menant à leur élimination de la circulation.(Gustafson et al., 2015) A cet effet, le polyéthylène glycol a été abondamment utilisé pour réduire les interactions non spécifiques, en augmentant cependant le diamètre hydrodynamique des nanoparticules.(Bentzen et al., 2005) Pour échapper à ce phénomène, des chimies de surface utilisant des polymères zwitterioniques, de taille réduite, sont développées.(Giovanelli et al., 2012) Expérimentés *in vitro* et *in vivo*, ces polymères réduisent eux aussi les interactions non spécifiques et prolongent le temps de circulation dans le sang.(Trapiella-Alfonso et al., 2018). Enfin, indépendamment de la chimie de surface employée pour réduire les interactions non spécifiques, les QDs présentent alors une chimie de surface offrant de nombreux sites de liaison. Ces sites peuvent être mis à profit pour greffer des agents de ciblage, d'imagerie, des fluorophores ou des agents de chimiothérapie.

1.3.4. Multimodalité

La tomographie assistée par ordinateur, la tomographie à émission de positron (TEP) l'imagerie de résonance magnétique (IRM) peuvent être utilisées pour le diagnostic et déterminer le stade des carcinomatoses péritonéales.(Patel et al., 2011) La fluorescence des QDs peut facilement être associée à ces modalités d'imagerie pour obtenir une sonde multimodale.

Des QDs synthétisés à partir de sulfure de molybdène ont été développés et injectés sur modèle murin porteur de tumeurs. Ces QDs sont détectables à la fois par fluorescence et tomographie assistée par ordinateur.(Wang et al., 2016) Cette modalité d'imagerie présente l'avantage d'être plus rapidement exécutée que les autres.

Le cœur et la coque des QD peuvent aussi être synthétisés à partir de radio-isotopes utilisés en TEP comme le cuivre 64,(Guo et al., 2015) ou l'indium 111(Sun et al., 2014). Le marquage radioactif de la surface des QDs est aussi possible, avec du fluor 18 par exemple.(Ducongé et al., 2008) Ces marquages radioactifs présentent l'avantage de ne pas augmenter le diamètre hydrodynamique des QDs.

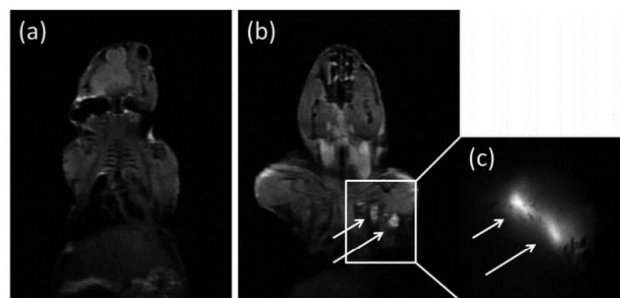


Figure 18 : Imagerie de résonance magnétique avant (a) et après (b) injection de QDs CuInSe/ZnS dopé au manganèse sur modèle murin porteur d'une tumeur subcutanée, comparée à l'imagerie de fluorescence infrarouge émise par les QDs.(Sitbon et al., 2014)

De même, le cœur des QDs peut aussi être dopé par le gadolinium.(Liu et al., 2011b) pour une utilisation en imagerie de résonance magnétique (Figure 21). La coque peut être aussi dopée par du manganèse(Sitbon et al., 2014; Wang et al., 2007) ou le gadolinium.(Yang et al., 2006) Enfin, des chélates de gadolinium peuvent être ajoutés en surface des QDs,(Oostendorp et al., 2010) toutefois avec le risque de libérer le gadolinium dans l'organisme.(Rogosnitzky and Branch, 2016) Par comparaison avec les techniques de tomographie, l'IRM, présente l'avantage de ne pas employer de rayonnement ionisant.

1.3.5. Ciblage

Contrairement aux fluorophores organiques, les nanoparticules en général, et les QDs en particulier, présentent un diamètre hydrodynamique supérieur, qui permet une meilleure accumulation dans les tumeurs grâce à l'effet EPR. Toutefois, l'effet EPR augmente l'accumulation de façon marginale. (Matsumura and Maeda, 1986) Aussi, pour améliorer cette accumulation, les QDs ont été associés à des molécules de ciblage, tel que des anticorps (Rizvi et al., 2014) aptamères (Zhang et al., 2013a) peptides (Przysiecka et al., 2016) et métabolites. (Chen et al., 2011)

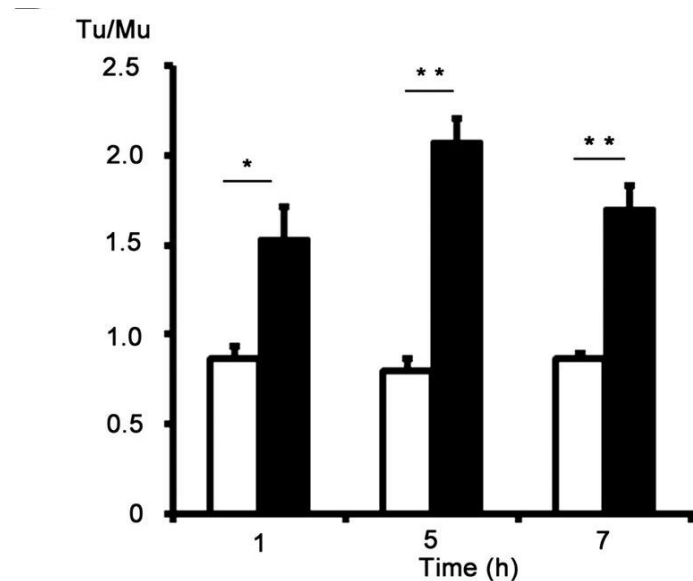


Figure 19 : Ratios de fluorescence entre tumeurs et muscles, sur modèle murin porteur d'une tumeur subcutanée, à différents temps après injection intraveineuse des QDs infrarouges sans (blanc) ou avec (noir) ciblage peptidique (RGD-BBN). (Hu et al.)

Ces ciblages ont à chaque fois augmentée significativement l'accumulation tumorale des QDs, (Figure 22) comparés aux QDs sans ciblage. (Hu et al.) Une approche originale a aussi été développée sur modèle animal. En injectant un peptide iRGD, (Yin et al., 2017a) les tumeurs sont rendues « poreuses » aux QDs sans ciblage, qui sont ensuite injectés et rapidement absorbés par les tumeurs, tandis que les QDs libres pouvaient être « éteints » par injection d'un mordant. Ces travaux ont été menés sur modèle murin de carcinomatose péritonéale et de tumeurs subcutanées. (Liu et al., 2017)

1.3.6. Ciblage folate

Dans le cadre du ciblage des carcinomatoses péritonéales d'origine ovarienne, et tout comme pour l'EC 17 et l'OTL 38, le folate a été étudié comme agent de ciblage des QDs. Plusieurs preuves de concept ont été réalisées sur modèle cellulaire (Bwatanglang et al., 2016; Ma et al., 2015; Suriamoorthy et al., 2010) et sur modèle murin porteur d'une tumeur sous-cutanée. (Chen et al., 2011) Ces essais ont toutefois mis en évidence un phénomène encore inexpliqué : l'association entre QD et folate altère l'intensité et le temps de vie de leur fluorescence, proportionnellement à la quantité de folate par QD (Figure 23a). Cette propriété a été mise à profit pour doser la concentration en folate dans des échantillons biologiques (Figure 23b) à l'aide des QDs. (Geszke-Moritz et al., 2012)

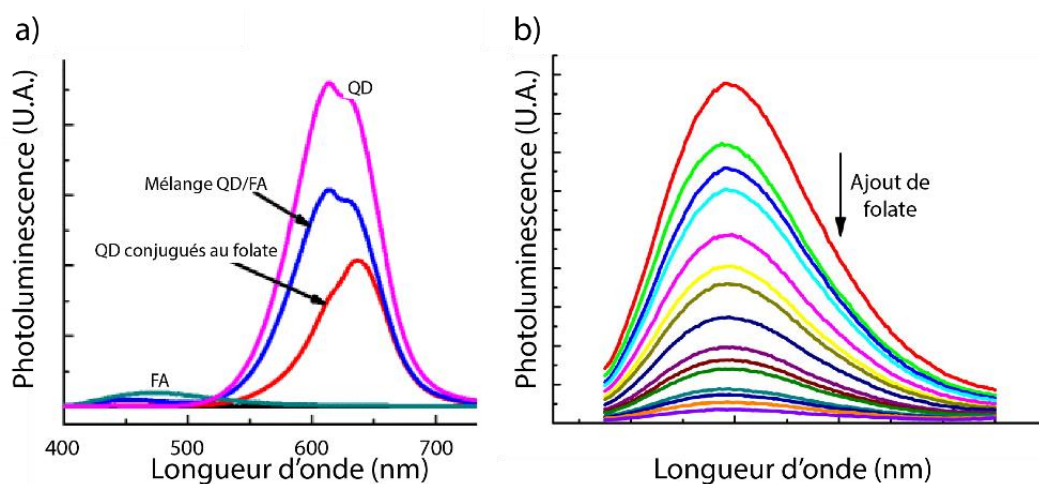


Figure 20 : Atténuation de la fluorescence des QDs par le folate. A. La fluorescence des QDs (rose) est réduite en présence de folate (bleu) et après conjugaison (rouge) avec le folate (vert). B. Dosage des folate en fonction de l'atténuation de la fluorescence, en l'absence de folate (rouge) la fluorescence est maximale, est décroît lorsque le ratio de folate augmente (du vert au brun). (Bwatanglang et al., 2016; Geszke-Moritz et al., 2012)

Bien qu'inexpliqué, ce phénomène a aussi été mis à profit pour produire un QDs « activables » (Figure 24). En ciblant les QDs par interaction faible entre leur chimie de surface et le folate, la fluorescence est totalement éliminée jusqu'à fixation du folate au récepteur, qui permet la réapparition de la fluorescence des QDs. (Zhang et al., 2013b)

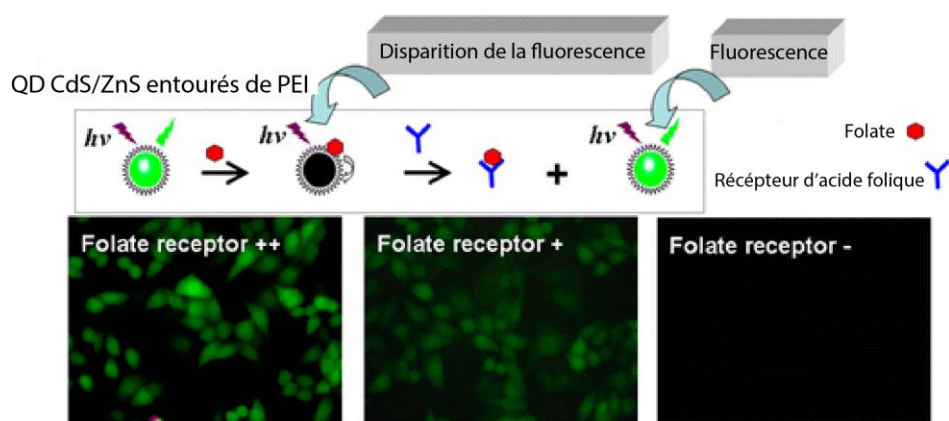


Figure 21 : QD/folate activable. Lors de la fixation du folate au QD, la fluorescence disparaît, et réapparaît une fois le folate lié au récepteur de folate. Essais sur lignées avec ou sans expression des récepteurs de folate. (Zhang et al., 2013b)

Cet effet reste toutefois inexpliqué. Les différents auteurs posent des hypothèses, tel qu'un transfert d'électron entre QD et folate, (Wu et al., 2010) l'absorption partielle de la lumière excitatrice par le folate, ou une acidification de l'environnement immédiat des QDs, qui réduirait leur fluorescence. (Stewart et al., 2010) Cependant, les compositions et chimie de surface des différents QDs sur lesquels ce phénomène a été observé ne permettent pas de comparaison.

1.3.7. Toxicité

Malgré leurs propriétés exceptionnelles, les QDs n'ont pas encore pu être intégré dans des essais cliniques du fait de leur toxicité. En effet, leurs compositions, souvent à base de métaux lourds (Cadmium, Plomb, Arsenic, Mercure...), posent des inquiétudes légitimes. Les QDs endocytés par les cellules sont exposés à un pH particulièrement acide dans les phagolysosomes, comme c'est le cas pour les nanoparticules marquées par le folate. Ces conditions extrêmes peuvent mener à la dégradation des QDs, et donc à la libération de métaux lourds sous forme ioniques, particulièrement toxiques. (Sabella et al., 2014) En conséquence, de nombreuses formulations à base de zinc, d'argent, de cuivre et d'indium ou de silice ont été développées pour se passer de métaux lourds. (Chinnathambi et al., 2014; Duman et al., 2017; Ma et al., 2015; Pons et al., 2010) Toutefois, la seule composition des nanoparticules n'explique pas totalement leur toxicité, leurs dégradations pouvant aussi être à l'origine d'un stress oxydatif. (Kim et al., 2015)

La mise en place d'une coque et d'une chimie de surface adaptées peut préserver, au moins temporairement, la stabilité des QDs.(Gravel et al., 2012) Cependant, les QDs injectés par voie intraveineuse sont rapidement bioaccumulés dans le foie et la rate, sans être éliminés.(Yin et al., 2017b) Leur éventuelle dégradation, qui mènerait à la libération de métaux sous forme libre et la production d'espèce réactive de l'oxygène sur le long terme, reste incompatible avec une application clinique.

1.3.8. Avantage d'une injection IP

Pour réduire l'exposition systémique et maximiser l'exposition de la carcinomatose péritonéale, la voie d'injection intrapéritonéale a déjà démontré son utilité pour les chimiothérapies. Pour les QDs, cette voie d'injection, comparée à la voie intraveineuse présente deux avantages :

Premièrement, les QDs injectés par voie intrapéritonéale reste confinée à la cavité péritonéale pendant plusieurs heures.(Kato et al., 2010) Ainsi injecté sur modèle murin de carcinomatose péritonéale, prétraité par le peptide iRGD, les QDs s'accumulent rapidement et profondément dans les tumeurs. Les QDs encore libres dans la cavité péritonéale peuvent alors être éliminés par lavage ou traitement chimique. Ainsi, seuls les tissus tumoraux restent fluorescents.(Liu et al., 2017)

La voie d'injection intrapéritonéale permet donc d'éviter une exposition systémique, mais pas seulement. En évitant la bioaccumulation dans les organes digestifs, cette voie d'injection améliore l'imagerie de fluorescence en offrant un meilleur contraste. En outre, les tumeurs péritonéales de très petites tailles, non vascularisées, sont ainsi exposées à la sonde.(Han and Tung, 2014) Concernant le ciblage folate, un excellent marquage peut être obtenu *in vivo* en 4 heures avec un fluorophore chimique.(Azaïs et al., 2017)

1.3.9. Une affaire de taille

Bien que la voie d'injection intrapéritonéale puisse réduire l'exposition systémique aux QDs, ceux-ci peuvent, au moins en partie, rejoindre la circulation au bout de plusieurs jours, avec des risques tant en termes de toxicité que de dégradation de l'imagerie. (Liu et al., 2011a) Leur excrétion rapide et totale reste donc un prérequis, et fait donc de l'excrétion rénale la priorité à atteindre.

Dans ce but, deux voies sont explorées. La première consiste à utiliser des nanoparticules de diamètre hydrodynamique très réduit. En effet, les QDs de faibles diamètres hydrodynamiques (< 5 nm) sont rapidement et massivement excrétés par voie rénale (Figure 25a). (Soo Choi et al., 2007) Cette excrétion est réduite de moitié pour des QDs de diamètre hydrodynamique à peine supérieur (5,5 nm), mais aussi pour des nanoparticules de tailles subnanométriques. (Du et al., 2017) Cette sensibilité a récemment été expliquée par la présence de glycocalix, en surface de l'épithélium glomérulaire, qui agit comme une chromatographie d'exclusion stérique.

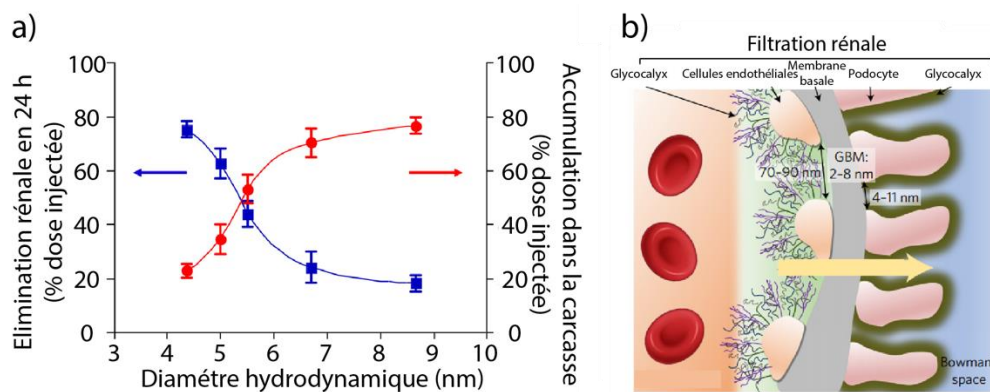


Figure 22 : Importance de la taille pour la filtration rénale. A. Excrétion rénale (bleu) et accumulation (rouge) en fonction du diamètre hydrodynamique des QDs. B. Schéma de la filtration rénale, les nanoparticules passent de la circulation à gauche, en passant par le glycocalix, la membrane basale glomérulaire et les podocytes, qui limitent le passage aux nanoparticules de 1 à 6 nm de diamètre.

Le glycocalix retient donc les particules de très petites tailles, mais est franchi par les particules de tailles supérieures, avant de rencontrer la membrane basale glomérulaire (avec des pores de 2 à 8 nm) et les podocytes (pores de 4 à 11 nm). Cet ensemble glycocalix, membrane basale glomérulaire et podocytes (Figure 25b) filtre

très précisément les nanoparticules, ne laissant passer que les nanoparticules d'un diamètre hydrodynamique de 1 à 6 nm.

Cette propriété est déjà mise à profit pour les Cornell-dots, des nanoparticules multimodales de silice, avec un diamètre hydrodynamique de 5,5 nm, contenant un cœur de fluorophore organique infrarouge (cyanine 5), et ciblées à l'aide de cRGD radiomarqué avec l'iode 124.(Phillips et al., 2014) Les Cornell-dots sont aujourd'hui en essais cliniques de phase I pour les cancers mammaires et colorectaux, et de phase II pour les tumeurs cérébrales (NCT02106598).

Concernant les QDs, certaines compositions permettent d'obtenir des nanoparticules d'un diamètre hydrodynamique compatible avec une excrétion rénale (< 6 nm), émettant dans l'infrarouge proche ou court. Cependant, cette taille critique limite l'association des QDs avec des agents de ciblage (*e.g.* anticorps) ou d'imagerie (*e.g.* nanoparticules de fer paramagnétiques) de tailles importantes.

1.3.10 Ou de chimie de surface

Pour s'affranchir de la limitation induite par la filtration rénale, une seconde alternative pourrait venir des nanoparticules de silice. Injectées par voie intraveineuse, des nanoparticules de silice, d'un diamètre de 30 nm, contenant des QDs et recouvertes de phosphonates, sont rapidement (Figure 26a et b) excrétées par voie rénale.(Ma et al., 2010) De même pour des nanoparticules de silice, avec différentes chimies et charges de surface, et un diamètre de 45 nm.(He et al., 2008) Ce phénomène a aussi été observé pour des microparticules de plus d'un micron, dopées au gadolinium et injectées par voie péritonéale.(Steinbacher, 2008) Les auteurs posent l'hypothèse d'un phénomène de transcytose, qui permettrait à ces particules de passer outre la filtration rénale pour rejoindre la vessie. Les mécanismes impliqués restent toutefois à élucider.

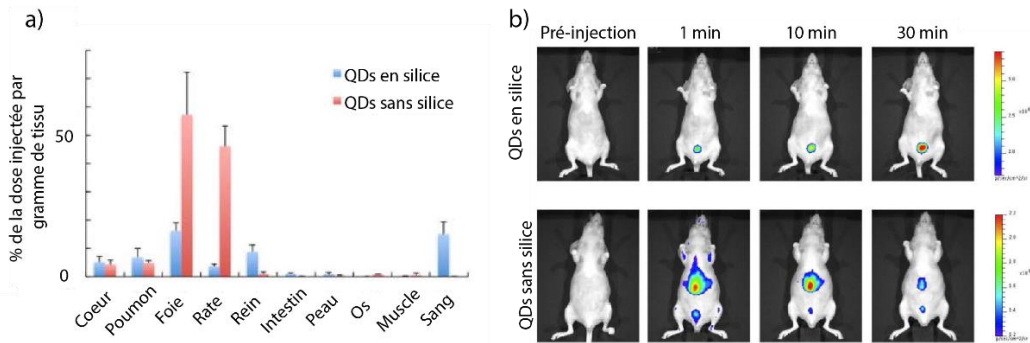


Figure 23 : Excrétion des nanoparticules de silice contenant un QD, 30 minutes après injection. A. Comparaison entre les QDs en nanoparticules de silice et les QDs nus. B. Imagerie de fluorescence de ces nanoparticules sur modèles murins.

Les nanoparticules de silice pourraient donc, théoriquement, permettre l'excrétion rapide des QDs, sans se limiter à une taille compatible avec la filtration rénale. En s'affranchissant de cette limitation de taille, ces nanoparticules de silice pourraient permettre d'associer QDs, modalité d'imagerie, ciblage voire même des agents de chimiothérapie. Enfin, cette solution permettrait d'utiliser plusieurs QDs dans une unique nanoparticule de silice, pour obtenir une fluorescence supérieure à un unique QDs.(Dembele et al., 2017)

2. Objectifs

L'objectif de ces travaux est d'obtenir une nanoparticule fluorescente dans le proche infrarouge, excrétée rapidement par l'organisme, dotée d'un ciblage dirigé contre les récepteurs de folate, et associée à une autre modalité d'imagerie, pour guider la chirurgie des carcinomatoses péritonéales d'origine ovarienne.

Parmi les nombreuses nanoparticules fluorescentes disponibles, les QDs se distinguent par une brillance exceptionnelle, et ont fait l'objet de nombreuses collaborations entre le CRAN et l'École Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles de Paris. Ces collaborations ont débuté par le développement de QDs infrarouges, à base de cadmium, pour visualiser les ganglions sentinelles sur modèle murin de cancer mammaire.(Pic et al., 2010) Ces travaux ont été poursuivis avec de nouveaux QDs infrarouges, conçus à base d'indium et dépourvus de cadmium, qui ont permis d'obtenir imagerie de fluorescence satisfaisante.(Helle et al., 2012) En outre, des travaux ultérieurs menés par l'ESPCI, ont permis d'associer un agent de contraste magnétique à ces QDs infrarouges, permettant la détection de tumeur sur modèle murin en fluorescence et en imagerie de résonance magnétique.(Sitbon et al., 2014)

Nos travaux ont d'abord constitué à développer le ciblage des QDs par le folate, en utilisant des QDs visibles, plus simples d'utilisation, sur modèles cellulaires et tumoraux *in vitro*. Ce ciblage a ensuite été transposé aux QDs infrarouges précédemment développés, et mis à l'épreuve sur modèle murin de carcinomatose péritonéale.

Enfin, si cette nouvelle composition réduit la toxicité des QD, ceux-ci restent bioaccumulés dans le foie, sans être excrétés, ce qui reste un obstacle majeur à leurs applications cliniques. En conséquence, nos partenaires de l'ESPCI ont développé une nanoparticule de silice, renfermant un cœur de QDs agrégés, avec différentes chimies de surface, pour tenter d'obtenir l'excrétion observée avec d'autres nanoparticules de silice. L'excrétion de ces nanoparticules a aussi été étudiée.

3. Résultats

3.1. QD rouges *in vitro*

3.1.1. Introduction

Comme exposé dans l'état de l'art, notre étude vise à développer une nanosonde fluorescente basée sur les QDs, ciblée par le folate, pour marquer spécifiquement les tissus tumoraux qui constituent les carcinomatoses péritonéales d'origine ovarienne. A cet effet, il convient de déterminer à quelle extrémité greffer le folate aux QDs ,(Chen et al., 2013a), mais aussi quel ratio de folate par QDs permettant d'obtenir un ciblage spécifique, sans altérer la solubilité des QDs. Enfin, le folate peut altérer la fluorescence des QDs, c'est pourquoi un compromis satisfaisant entre ciblage et fluorescence doit être obtenu.(Maity et al., 2013)

Dans un premier temps, plusieurs chimies de surface, avec des longueurs de PEG et des ratios folate par nanoparticule différents, ont été développées sur des QDs CdTeSe/ZnS émettant dans le rouge. Ces différentes formulations ont été ensuite expérimentées sur des lignées modèles capables de former des carcinomatoses, afin de sélectionner une chimie de surface satisfaisante. Ces capacités ont ensuite été testées sur modèle de tumeur *in vitro* surexprimant les récepteurs de folate.

Ces résultats font sont soumis à *Oncology reports*.

3.1.2. Matériels et méthodes

Synthèse des QDs et caractérisation : Les QDs cœur multicoques CdSe/CdS/ZnS (6-7 nm de diamètre) sont synthétisés en plusieurs étapes. Le cœur CdSe est synthétisé par un procédé solvothermal, à partir de myristate de cadmium et de poudre de sélénium, chauffé en suspension dans l'acide oléique. Les coques sont ajoutées par un processus d'adhésions et de réactions ioniques successives. (Renguo Xie et al., 2005; Yang et al., 2005)

Les QDs multicoques ainsi synthétisés sont purifiés et rendus hydrosolubles par échange de ligand, en présence d'acide mercaptopropionique. Cet acide est ensuite échangé avec un polymère zwitterionique biocompatible, et un polymère possédant des amines primaires. (Tasso et al., 2015a)

Cette amine primaire est utilisée pour greffer des chaînes poly(éthylène) glycol 2000, porteur d'une amine primaire, qui servira à la greffe du folate, sous forme de folate activé NHS, pour produire les QDs avec acide folique (QD-FA). Les QDs contrôle (QD-Ctrl) sont produits en remplaçant le folate activé NHS par du bis(sulfosuccinimidyl) subérate, puis les QDs sont purifiés par ultrafiltration.

Les mesures spectroscopiques ultraviolet-visible sont réalisées avec les QDs en suspension dans le PBS, en cuve à quartz et à température ambiante, sur l'appareil de mesure Lambda 35 (Perkin Elmer, Waltham, USA) entre 325 et 675 nm. Les spectres d'émission et d'excitation sont réalisés dans les mêmes conditions sur l'appareil LS55 (Perkin Elmer, Waltham, USA), les spectres d'émission sont obtenus en utilisant une longueur d'onde d'excitation de 340 nm, ceux d'excitation en mesurant l'émission à 608 nm.

Culture cellulaire : Les lignées Kb (ATCC n°CCL-17) et A549 (ATCC n°CCL-185) proviennent de l'*American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, USA) et sont cultivées en milieu DMEM 1 mM de pyruvate de sodium et 10% de sérum de veau fœtal (SVF), à 37°C, 100% d'hygrométrie et 5% de CO₂.

Les sphéroïdes de Kb sont obtenus en cultivant les cellules Kb à une concentration de $2,5 \times 10^4$ cellules par millilitre de milieu complet, à raison de 10 ml par flacon de culture traité à l'agarose 1% et cultivés dans les mêmes conditions que les cellules en culture.

Pendant trois jours, toutes les 24 h, 10 ml de milieu complet sont ajoutés à la suspension cellulaire, et celles-ci est divisée entre deux nouveaux flacons traités à l'agarose.

Au troisième jour, la suspension est mise en flacon d'agitation magnétique, complétée à 250 ml par du milieu complet, sous une agitation de 75 rpm, et incubée pendant 7 jours dans les mêmes conditions que les cellules en culture.

Expression du récepteur folate : Les cellules de chaque lignée sont lysées dans du tampon RIPA (25 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 0,1% Triton X-100, 0,5% deoxycholate de sodium, 0,1 mM PMSF). La concentration en protéine de chaque lysat est déterminée par le kit DC Protein Assay (Biorad, Hercules, EUA), et des lysats en quantité suffisante pour 20 µg de protéine sont dénaturés 30 min à 37°C en tampon de Laemmli, avant électrophorèse en gel de polyacrylamide avec un tampon SDS. Les protéines sont transférées sur membrane de PVDF par électrophorèse semi-sèche. La qualité du transfert et la quantité de protéine transférée sont déterminées par marquage au rouge ponceau, avant saturation de la membrane 1 h dans du lait écrémé 5%. La membrane est lavée plusieurs fois en tampon TBST, puis incubée 1h dans une solution de lait 5% contenant l'anticorps monoclonal anti récepteur de folate alpha humain (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). La membrane est ensuite lavée 3 fois par du TBST, puis incubée 45 min dans du lait 5% en présence de l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase de raifort. La membrane est lavée 3 fois avec du TBST, puis révélée avec le kit Clarity ECL (Biorad, Hercules, USA) en utilisant l'imageur Azure c600 (Azure biosystems, Dublin, USA).

Toxicité *in vitro* : Les lignées Kb et A549 sontensemencées en plaque 96 puits, en milieu DMEM SVF 10%, à raison de 200 µl concentré à 10⁵ cellules/ml par puits. La plaque est incubée 24h, puis le milieu est remplacé par des suspensions de QDs, concentrées entre 0 et 200 nM, en milieu DMEM SVF 10%. Après 24h d'incubation, les puits sont lavés trois fois par 200 µl de PBS, puis 100 µl de DMEM 10% SVF MTT 1 mg/ml sont ajoutés par puit, avant 2 h d'incubation. Les puits sont alors lavés trois fois par 200 µl de PBS, et les cristaux de formazan sont dissous dans 100 µl de DMSO, avant lecture d'absorbance à 540 nm sur spectrophotomètre pour plaque Multiskan Ascent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

Microscopie en épifluorescence : les lignées Kb ou A549 sont cultivées sur lame en chambre Labtek à la concentration de $2,5 \times 10^4$ cellules par ml, à raison de 0,25 ml par puits, en milieu complet pendant 24 h.

Le milieu est éliminé et les puits sont lavés 3 fois par 500 μ l de PBS, avant ajout de milieu DMEM 10% SVF sans folate. Les chambres Labtek sont ensuite incubées 24 h en condition de culture normale. Le milieu est éliminé, les puits sont lavés 3 fois par 500 μ l de PBS. Une part des cellules sont ensuite incubés en milieu DMEM 10% SVF saturé en folate, et l'autre part en milieu DMEM 10% SVF sans folate pendant 2h, en condition de culture normale. Les QDs-FA ou QDs ctrl sont ensuite ajoutés, à la concentration de 100 nM, et les chambres sont incubées pendant 4 h en condition de culture normale. Le milieu est ensuite éliminé, les puits sont lavés 3 fois par 250 μ l de PBS, puis les chambres sont éliminées et à les lames sont préparées pour la microscopie.

Les sphéroïdes sont traités de la même manière, mais sur plaque 12 puits traités à l'agarose 1%, avant d'être lavés et déposés sur lames, ou congelés en Optimal Cutting Temperature (Sakura Finetek, Staufen im Breisgau, Allemagne) pour découpe en cryostat, avant microscopie de fluorescence.

La microscopie de fluorescence est réalisée sur microscope AX-70 Provis (Olympus, Tokyo, Japan) équipé d'une lampe à vapeur de mercure 100 W et d'une caméra CCD refroidie par effet Peltier DP72 (Olympus, Tokyo, Japan). Le filtre d'excitation utilise un filtre 400-440 nm, associé à un miroir dichroïque passe-haut 570 nm et un filtre d'émission passe-haut 590 nm.

Les images sont converties en 8 bits et analysées à l'aide du logiciel ImageJ. (Bankhead, 2014)
La mesure du rapport signal-bruit est calculée suivant la formule :

$$\text{Ratio signal sur bruit} = \frac{(\text{aire d'une cellule} \times \text{fluorescence moyenne de la cellule})}{(\text{aire d'une cellule} \times \text{fluorescence moyenne du bruit de fond})}$$

Immunohistochimie : L'immunohistochimie est réalisée en appareil Ventana Benchmark XT (Ventana, Tucson, USA) sur des coupes de sphéroïde, fixées par du paraformaldéhyde tamponné 4%. L'expression de Ki67 est recherchée avec l'anticorps de lapin anti Ki67 (clone 3-09) et révélée avec le kit UltraVIEW DAB (Ventana, Tucson, USA).

3.1.3. Résultats et discussion

Les spectres d'absorption des deux QDs sont similaires, et typiques des QDs CuInSe, avec une forte absorbance dans l'ultraviolet, qui décroît au fil du spectre. Les spectres d'émission présentent le même unique pic à 608 nm, avec une différence d'intensité très importante entre les QDs Ctrl et les QDs FA, ces derniers n'ayant qu'une intensité de 55% comparée aux QDs Ctrl.

Cette différence d'intensité s'observe aussi sur les spectres d'excitation, qui présentent le même pic à 380 nm et le même épaulement à 450 nm, avec toujours cette différence d'intensité de l'ordre de 55% (Figure 24).

La greffe de folate sur ces QDs et leur chimie de surface atténue la fluorescence de ces QDs. Cette greffe ne modifie pas la longueur d'onde d'émission des QDs, ce qui indique que la surface des QDs n'est pas altérée. De plus, les spectres sont de forme identique, ce qui indique que le folate n'atténue pas la fluorescence des QDs en absorbant une partie de l'excitation.

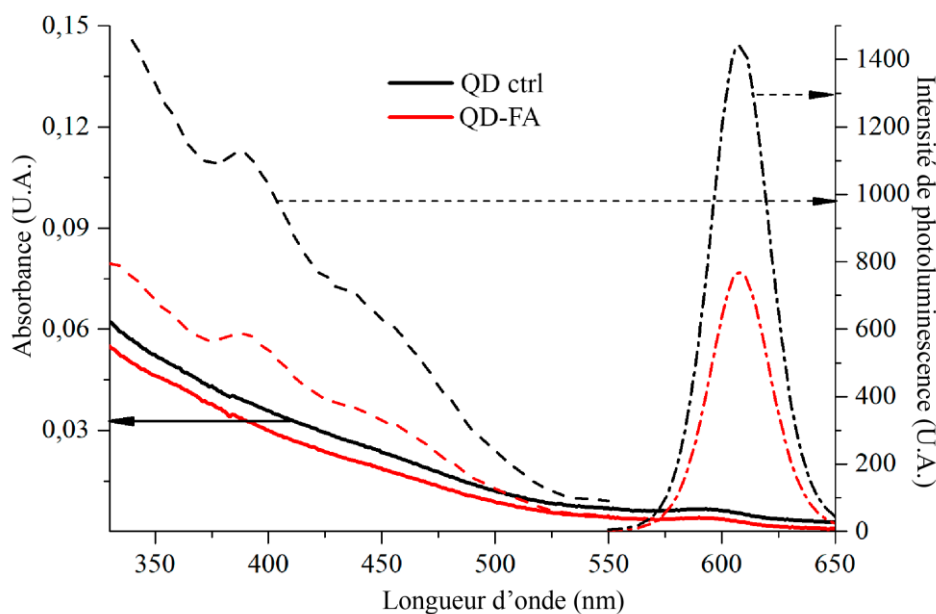


Figure 24 : Spectres d'absorption (traits continus), d'excitation (tirets) et d'émission (tirets et points) des QDs Ctrl (noir) et QD FA (rouge). L'émission est mesurée sous une excitation de 340 nm et l'excitation est mesurée à une émission de 608 nm.

Mis à l'épreuve *in vitro* sur les lignées, les deux QDs ne présentent pas de toxicité significative jusqu'à 200 mM après 24 h d'incubation (Figure 25a). L'expression des récepteurs de folate a aussi été comparée entre les lignées Kb et A549, avec une surexpression notable pour les premières, tandis que les A549 n'expriment pas le récepteur en quantité détectable (Figure 25b).

Les QDs ne sont donc pas toxiques pour les modèles cellulaires et les concentrations employées. Un marquage fluorescent sera donc bien lié à l'endocytose ou la fixation des QDs sur la membrane cellulaire, et non pas à une accumulation passive dans des cellules mortes. La lignée Kb surexprime très clairement le récepteur de folate, ce qui en fait un modèle positif, tandis que la lignée A549 constitue un modèle négatif.

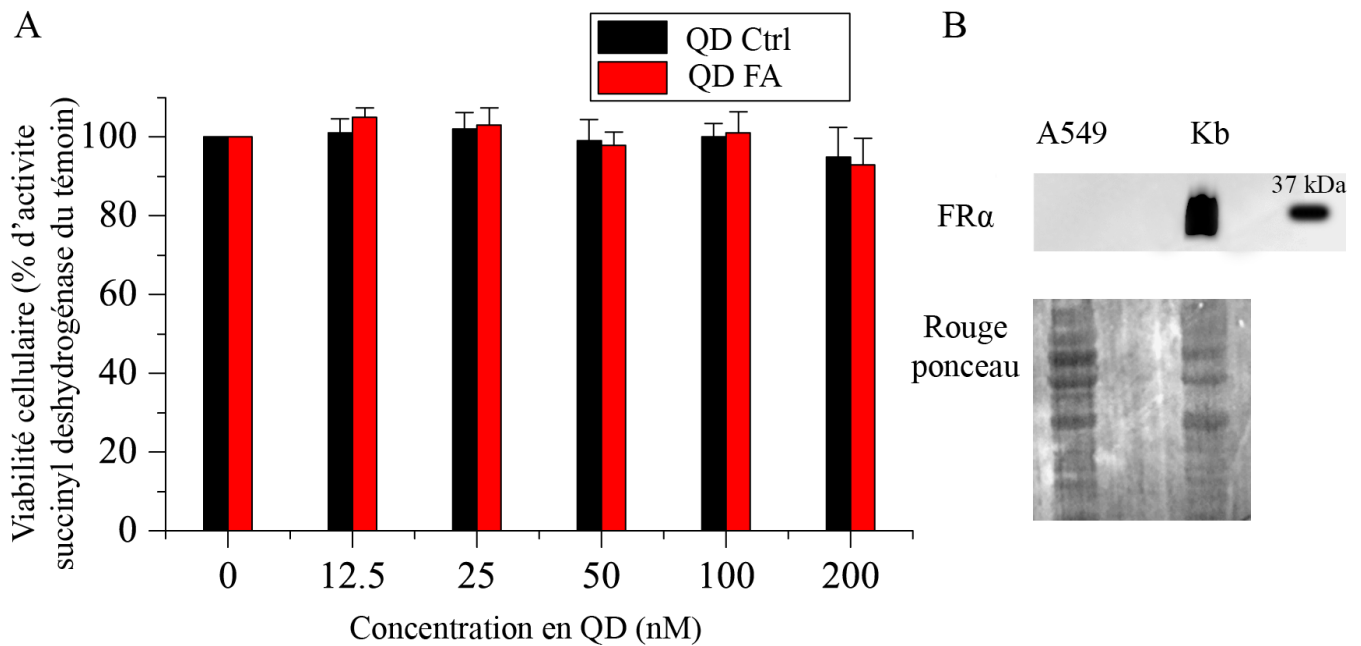


Figure 25 : Toxicité des QDs et expression des récepteurs folate. A. Toxicité des QDs Ctrl (noir) et QDs FA (rouge) sur les cellules Kb, à différentes concentrations, après 24 h d'incubation sur la lignée Kb. B. Expression des récepteurs de folate α (RF α) sur les lignées A549 et Kb.

Incubés en présence des cellules Kb ou A549 saturées ou privées de folate, les QDs Ctrl ne produisent qu'une très faible fluorescence, avec un rapport signal bruit non significatif. A l'inverse, les QDs FA produisent un marquage fluorescent très fort (rapport signal sur bruit proche de 5) sur les cellules Kb privées de folate, mais quasiment pas sur les cellules Kb saturées en folate ou sur la lignée A549.

Ces résultats confirment, *in vitro*, le rôle du folate sur les QDs et du RF α libre dans l'endocytose des QDs par les cellules Kb. Ces résultats ne sont toutefois pas représentatifs d'une tumeur, faute de structure tridimensionnelle, de gradients de concentration ou de matrice extracellulaire.

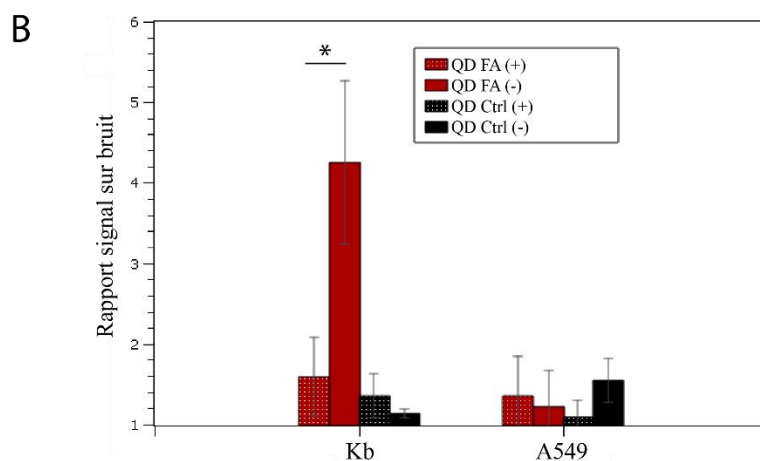
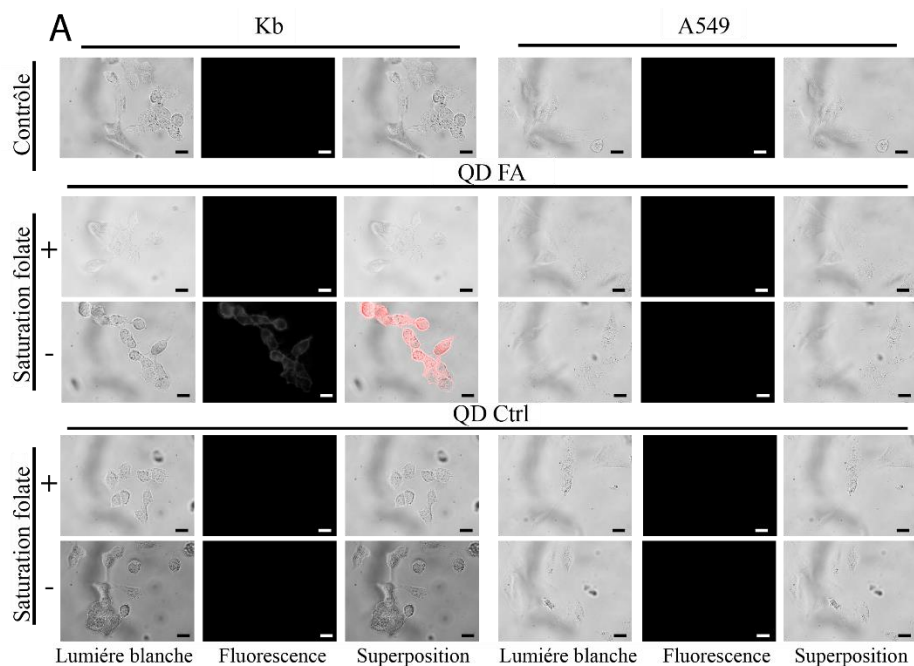


Figure 26 : Microscopie de fluorescence des cellules Kb et A549 incubées en présence des QDs FA ou QDs Ctrl, privées (-) ou saturées en folate. A. Images de microscopie de fluorescence. B. Ratio signal sur bruit des cellules. La longueur d'onde d'excitation est 405-445 nm et la fluorescence est collectée au-dessus de 590 nm. La concentration en QDs est de 100 nM.

Exposés aux mêmes QDs dans les mêmes conditions, les sphéroïdes Kb présentent une fluorescence différente des cellules Kb cultivées en monocouche (Figure 27a). Les QDs Ctrl produisent une fluorescence minimale, mais visible, avec un rapport signal sur bruit environ égal à 2 (Figure 27b), indépendamment de la privation ou de la saturation en folate. Pour les QDs FA, ceux-ci produisent une fluorescence significativement plus forte sur les sphéroïdes privés de folate, mais aussi un rapport signal sur bruit environ égal à deux sur les sphéroïdes saturés en folate. Enfin, dans toutes les conditions, le marquage apparaît plus fort en périphérie que dans le cœur des QDs.

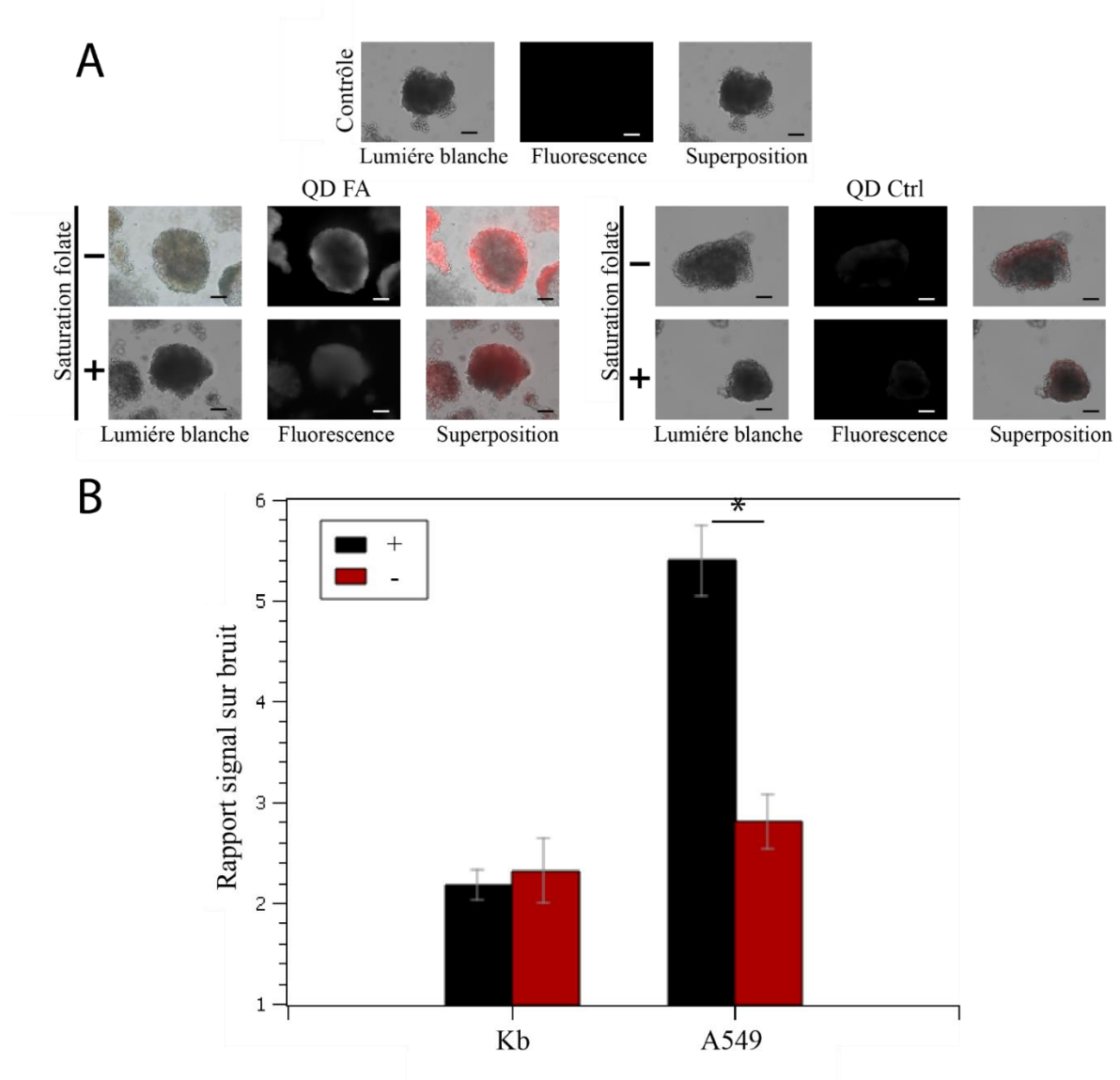


Figure 27 : Microscopie de fluorescence des sphéroïdes Kb incubés en présence des QDs FA ou QDs Ctrl, privés (-) ou saturés en folate. A. Images de microscopie de fluorescence. B. Ratio signal sur bruit des sphéroïdes. La longueur d'onde d'excitation est 405-445 nm et la fluorescence est collectée au-dessus de 590 nm. La concentration en QDs est de 100 nM.

Ces résultats confirment donc la spécificité des QDs *in vitro* sur modèle de tumeurs surexprimant les récepteurs de folate, mais mettent aussi en évidence une accumulation passive des QDs sur ce modèle. Toutefois, la notion de modèle reste importante, puisqu'il s'agit ici d'un sphéroïde contenant un unique type cellulaire, contrairement aux tumeurs qui associent fibroblastes, cellules immunitaires et cellules cancéreuses. Enfin, l'accumulation *a priori* périphérique des QDs ne peut être déduites de ces seuls résultats, et requiert une observation en microscopie confocale ou l'étude de coupe de sphéroïde. C'est cette dernière solution qui est retenue pour étudier la distribution des QDs dans le sphéroïde.

Les images sont ici représentées avec leur maximum d'intensité respective, la fluorescence de chacune n'est pas comparable à l'autre, mais rend compte de la distribution des QDs au sein du sphéroïde. Ce marquage se révèle essentiellement périphérique (Figure 28a), sans différence significative entre les deux QDs (Figure 28b). Cette distribution essentiellement périphérique est corrélée avec l'expression de Ki67, marqueur de prolifération détecté dans la périphérie des sphéroïdes cellulaires, autour d'un cœur de cellule non proliférative (Figure 28c).

Les QDs sont donc endocytés par les cellules prolifératives, et leur pénétration dans le sphéroïde n'est pas modifiée par l'ajout de folate en surface. Ils sont donc essentiellement localisés en périphérie, même s'ils peuvent marquer les cellules prolifératives de tout le sphéroïde, proportionnellement à leur profondeur.

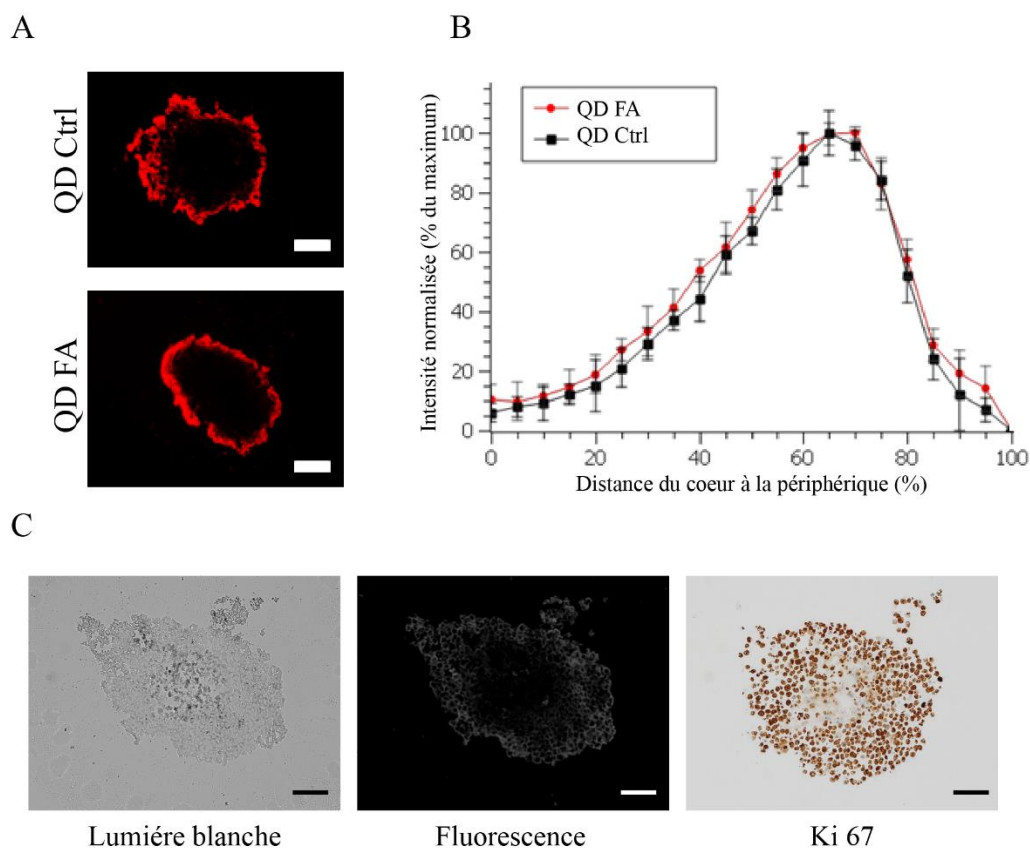


Figure 28 : Distribution des QDs dans le sphéroïde. A. Images de microscopie de fluorescence des coupes de sphéroïdes privés de folate et incubés en présence des QDs Ctrl ou QDs FA. B. Distribution des QDs au sein du sphéroïde, représenté du coeur à la périphérie. C. Microscopie optique et de fluorescence d'une coupe de sphéroïde privé de folate et incubé en présence de QDs FA, comparé à la même coupe traitée en immunohistochimie pour observer l'expression de Ki67.

3.1.4. Conclusions

La greffe de folate sur les QDs ne modifie pas leurs surfaces, et donc n'altère pas leur longueur d'onde d'émission. Elle atténue toutefois, presque de moitié, l'intensité de fluorescence, sans que le folate n'absorbe une part de l'excitation, ce qui laisse ce phénomène inexpliqué.

In vitro, cette greffe de folate augmente significativement l'endocytose des QDs dans les cellules surexprimant le RFA, tandis que les QDs non marqués sont faiblement endocytés. Cependant, sur sphéroïdes, une accumulation passive de ces QDs est observée, mais significativement inférieure à celles des QDs FA lorsque les sphéroïdes sont privés de folate. L'utilisation de ces QDs pour l'imagerie de fluorescence des tumeurs paraît donc indiquée.

Toutefois, si cette greffe augmente significativement l'endocytose, elle ne modifie pas la capacité des QDs à pénétrer dans le sphéroïde. Leur éventuelle utilisation comme vecteur pour une drogue, dans un objectif thérapeutique, paraît donc limitée en l'état.

3.2. QD Infrarouges sur modèle animal

3.2.1. Introduction

Après développement d'une chimie de surface permettant un ciblage des cellules surexprimant les récepteurs de folate, sans totalement éteindre la fluorescence des QDs à base de cadmium, cette même chimie a été appliquée à des QDs CuInSe/ZnS infrarouges. Ces QDs, dépourvus de cadmium, ont déjà été étudiés dans l'imagerie des ganglions sentinelles. (Helle et al., 2012)

La toxicité *in vitro* de ces QDs recouverts de la chimie de surface PEG₂₀₀₀-FA a été comparée à celles des QDs rouges utilisés jusqu'ici, avant d'étudier leurs propriétés photo-physiques. En parallèle, un modèle murin de carcinomatose péritonéale d'origine ovarienne a été développé et caractérisé. Les QDs CuInSe/ZnS PEG₂₀₀₀-FA ont été injectés par voie intrapéritonéale à ce modèle, afin d'évaluer leur capacité à imager la carcinomatose péritonéale. Enfin, l'excrétion de ces QDs a été évaluée après injection intraveineuse ou intrapéritonéale.

3.2.2 Matériels et méthodes

Synthèse des QDs CuInS₂/ZnS PEG-2000 : Les QDs sont synthétisés par la méthode mise au point par Pons *et al.* (Pons et al., 2010) Brièvement, le cœur CuInS₂ est formé à partir de chlorure d'indium et de cuivre, mis en solution dans l'octadecène, en présence de trioctylphosphine et d'acide oléique. Cette solution est chauffée à 190°C, le précurseur de soufre est alors injecté dans la solution sous forme de bis(N-hexyldithiocarbamate) de zinc. La température est maintenue pendant 10 minutes de façon à obtenir des cœurs CuInS₂ d'environ 3 nm de diamètre.

La coque de ZnS est formée en portant la solution à 230°C sous atmosphère inerte, du bis(N-hexyldithiocarbamate) de zinc et du stéarate de zinc, en solution dans un mélange oleylamine et octadecène, est injecté goutte par goutte au mélange, pendant 30 minutes. Les QDs CuInS₂/ZnS ainsi formés, recouverts d'acide oléique et d'oleylamine, sont purifiés et mis en solution dans l'hexane.

Pour permettre leur solubilisation dans l'eau, les QDs subissent deux étapes d'échanges de ligand, brièvement par remplacement de l'acide oléique avec de l'acide mercaptopropionique, puis avec un polymère zwitterionique. (Tasso et al., 2015b) La chimie de surface PEG et acide folique est finalement ajoutée, de la même manière que pour les QDs rouge précédemment présentées.

Toxicité *in vitro* : La lignée MRC5 estensemencée en plaque 96 puits, en milieu MEM SVF 10%, à raison de 200 µl concentré à 10⁵ cellules/ml par puits. La plaque est incubée 24h, puis le milieu est remplacé par des suspensions de QDs, concentrées entre 0 et 200 nM, en milieu MEM SVF 10%. Après 24h d'incubation, les puits sont lavés trois fois par 200 µl de PBS, puis 100 µl de MEM 10% SVF MTT 1 mg/ml sont ajoutés par puit, avant 2 h d'incubation. Les puits sont alors lavés trois fois par 200 µl de PBS, et les cristaux de formazan sont dissous dans 100 µl de DMSO, avant lecture d'absorbance à 540 nm sur spectrophotomètre pour plaque Multiskan Ascent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

Test de sensibilité membranaire : Du sang humain, prélevé sur EDTA et issu de donneurs volontaires est utilisé. Les hématies sont lavées et mises en suspension dans du PBS (contrôle négatif), de l'eau distillée (contrôle positif) ou des suspensions de QDs dans le PBS, à différentes concentrations (0-200 nM). Ces suspensions sont incubées 2 h à 37°C, puis centrifugées 10 min à 500 g. Les surnageants sont transférés en plaque 96 puits, pour une lecture d'absorbance à 540 nm sur spectrophotomètre pour plaque Multiskan Ascent.

Culture cellulaire : Les cellules SKOV-3 sont cultivées dans les mêmes conditions que les cellules Kb et A549 présentées précédemment.

Modèle animal : Les souris utilisées pour développer le modèle de carcinomatose péritonéale sont des souris *NMRI nude* femelles (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France), âgées de 8 semaines. Elles sont maintenues dans un cycle jour/nuit de 12h, et disposent d'un accès à l'eau et à la nourriture *ad libitum*, ainsi que d'un enrichissement constitué de chutes de carton et de coton. Les souris sont hébergées à raison de 4 à 6 individus par cage pour leur permettre d'exprimer leur comportement naturel.

Une suspension de SKOV-3 de concentration $2,5 \times 10^7$ cellules/ml est réalisée dans du PBS, pré incubé à 37°C. Chaque souris est maintenue en décubitus dorsal par contention manuelle, leur ventre est désinfecté avec une lingette imprégnée d'éthanol 70°, puis 200 µl de la suspension de SKOV-3 leur sont injectés par voie intrapéritonéale. Une aiguille 21G est utilisée par souris, et changée entre chaque injection.

L'évaluation de l'état de santé des animaux est réalisée tous les deux jours. L'observation du développement de la carcinomatose péritonéale n'est pas réalisable directement sans moyen d'imagerie. Dans cette situation, la seule mesure du poids, dépendant de l'âge et du poids initial de chaque individu, est insuffisante pour préserver le bien-être animal. C'est pourquoi un score de condition corporelle est utilisé (Table.). Ce score, couramment employé en médecine vétérinaire pour tout type d'animal, a été adapté aux rongeurs. Il repose sur plusieurs critères, parmi lesquels l'apparence, les comportements, naturel et provoqué (en réponse à une légère poussée manuelle de l'expérimentateur) et la condition physique, évaluée par palpation. Le score est obtenu en additionnant les sous-scores de chaque paramètre. (Paster et al., 2009)

Un score de 11 à 13 correspond à un animal en bonne santé, tandis qu'un score de 6 à 10 correspond à un animal de plus mauvaise condition. Lorsque le score chute entre 4 et 5, la surveillance devient quotidienne, et la carcinomatose considérée comme développée. Une absence d'amélioration en deux jours, ou un score de 3 ou moins, constituent des points limites, et mènent à l'euthanasie de l'animal.

Tableau III Score de condition corporelle murin

Paramètre	Description	Score
Apparence (rechercher aussi une distension abdominale)	Normal : œil brillant, pelage lisse et propre	2
	Anormal : pelage négligé ou ébouriffé	1
	Anormal : dos voûté, pilo-érection	0
Comportement naturel	Normal : actif, interagit avec son environnement	3
	Baisse légère d'activité et d'interaction	
	Anormal : baisse importante d'activité, isolement	2
	Anormal : automutilation, hyperactivité ou immobilité	1
		0
Comportement induit	Normal : éloignement rapide	3
	Éloignement ralenti ou réponse exagérée	2
	Anormal : Éloignement tardif	1
	Anormal : absence de réaction ou réponse très exagérées	0
Condition physique	Obésité	5
	Surpoids	4
	Normale	3
	Minceur	2
	Maigreur	1
Score total		1-13

Observation et caractérisation de la carcinomatose : Une fois le score égal à 5 ou moins, lorsqu'une ascite est observée ou lorsqu'une tumeur sous-cutanée apparaît au point d'injection, la souris est euthanasiée, par dislocation cervicale sous anesthésie gazeuse (isoflurane 4%). Une dissection est réalisée, permettant d'observer l'étendue de la carcinomatose péritonéale, et de prélever des tissus pour analyse histologique.

Les tissus prélevés sont fixés 24h en paraformaldéhyde 4% tamponné, avant d'être déshydratés en automate et inclus en bloc de paraffine. Les blocs sont débités en coupe de 5 μm , déposés sur lame avec de l'eau albuminée (pour coloration) ou de l'eau distillée (pour les marquages immunohistochimiques), avant d'être séchées à 40°C. Les colorations hématoxyline éosine safran (HES) et les marquages immuno-histochimiques sont réalisés en automate (Agilent, Santa Clara, USA).

Imagerie de fluorescence : Six semaines après injection, l'alimentation des souris modèle est remplacée par les croquettes Teklad TD.95247 (Envigo, Huntingdon, RU), dépourvue d'acide folique et de chlorophylle. Dix jours après la mise en place de cette alimentation, les souris sont anesthésiées sous masque par 4% d'isoflurane et placées en position dorsale sous caméra Fluobeam 700 (Fluoptics, Grenoble, France). L'excitation est activée (690 nm) et la caméra est alors réglée pour éliminer l'auto fluorescence infrarouges des tissus. Une injection intrapéritonéale de 20 pmol de QDs CuInSe/ZnS PEG₂₀₀₀-FA est effectuée, et la distribution des QDs est observée sur 24h. Ces expérimentations sont autorisées par le ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'innovation, après évaluation éthique favorable de l'autorisation de projet utilisant des animaux à des fins d'expérimentation animale numéro 11902.

Caractérisation des QDs : Les spectres d'absorbance sont réalisés à l'aide d'un spectromètre Lambda 35 (Perkin Elmer, Waltham, USA), tandis que les spectres d'émission et d'excitation des QDs sont réalisés à l'aide d'un spectrofluorimètre Xenius SAFAS (SAFAS, Monaco). Toutes les mesures sont effectuées dans le PBS à une concentration en QD de 10 nM, ce qui correspond à une densité optique de 0,1 à la longueur d'onde d'excitation ($\lambda_{\text{exc.}} = 300 \text{ nm}$).

Excrétion : Des souris Balb/c femelles de 8 semaines (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) sont anesthésiées par de l'isoflurane 4% et subissent une injection de 20 pmol de QDs en suspension dans 100 µl de PBS, par voie intraveineuse ou intrapéritonéale.

Elles sont ensuite placées individuellement en cage à métabolisme pendant 5 jours, avec un accès *a libitum* à l'eau et à une alimentation standard moulue. Les urines et fèces sont collectées quotidiennement. Cette expérimentation a été autorisée par le ministère de l'Enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation, après évaluation éthique favorable de l'autorisation de projet utilisant des animaux à des fins d'expérimentation animale numéro 9472.

Spectrométrie de masse : Urines et fèces sont pesées et mise en suspension séparément en solution d'acide nitrique 70%. Les échantillons sont minéralisés par chauffage à 90°C pendant 30 min, complétés à 25 ml par de l'eau milliQ (Millipore, Burlington, USA), et dosés par spectrométrie à plasma à couplage inductif sur appareil Varian 820 (Varian, les Ulis, France).

3.2.3. Résultats et discussion

Biocompatibilité *in vitro* :

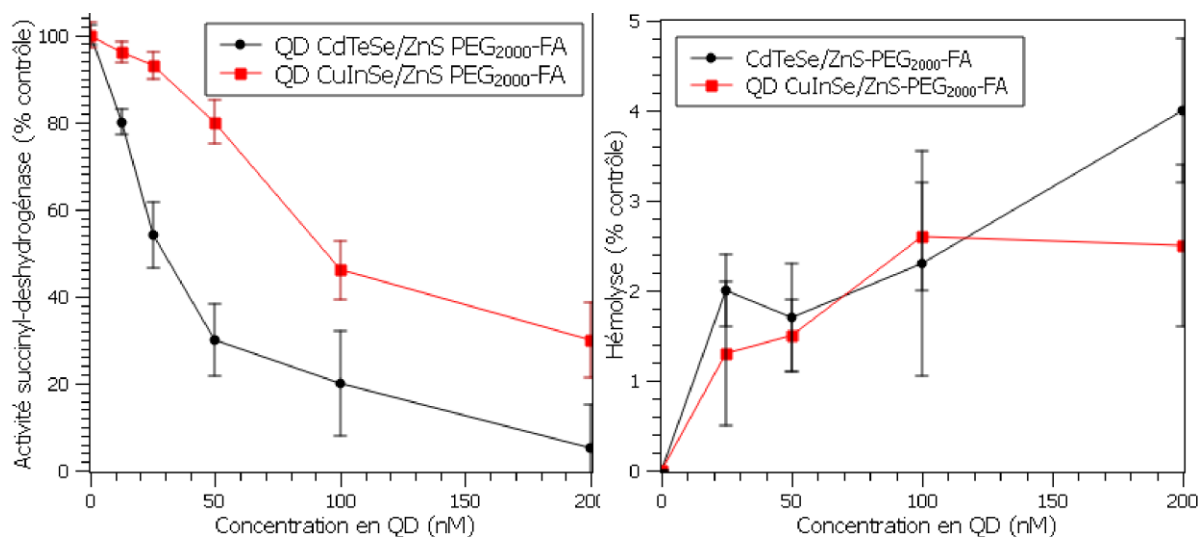


Figure 29 : À gauche, test de viabilité cellulaire sur fibroblastes pulmonaires sains (MRC-5) incubés en présence de différentes concentrations (0-200 nM) de QDs CdTeSe/ZnS ou CuInSe/ZnS avec la chimie de surface PEG2000-FA pendant 24h. À droite, test de sensibilité membranaire sur hématies humaines en suspension dans le PBS incubés en présence de différentes concentrations (0-200 nM) de QDs CdTeSe/ZnS ou CuInSe/ZnS avec la chimie de surface PEG2000-FA pendant 24h.

Les QDs CdTeSe/ZnS PEG₂₀₀₀-FA présentent une concentration inhibitrice médiane (*half maximal inhibitory concentration*, IC₅₀) de 29±5,5 nM, tandis que celle des QDs infrarouges

CuInSe/ZnS PEG₂₀₀₀-FA est de $92,3 \pm 7,5$ nM. Quant au test de sensibilité membranaire, les deux QDs présentent des profils similaires, avec des taux d'hémolyse toujours inférieur à 5%, même aux plus hautes concentrations testées (Figure 29).

Les résultats de toxicité rejoignent les résultats précédemment obtenus sur le même modèle cellulaire, avec des QDs similaires, mais dépourvus de PEG₂₀₀₀-FA. (Helle et al., 2012) Sur cette durée, à chimie de surface identique, les QDs infrarouges se révèlent donc trois fois moins toxiques que les QDs rouges utilisés jusqu'ici. De plus, l'ajout de PEG₂₀₀₀-FA diminue nettement la capacité hémolytique des QD CdTeSe/ZnS, observée auparavant sur ces QDs « nus ».

Les QDs infrarouges CuInSe/ZnS se révèlent donc moins toxiques sur modèle de cellule saine que les QDs à base de cadmium employé jusqu'ici. En outre, la chimie de surface développée ici permet de réduire les dommages induits aux membranes biologiques par les QDs.

Caractérisation des QDs :

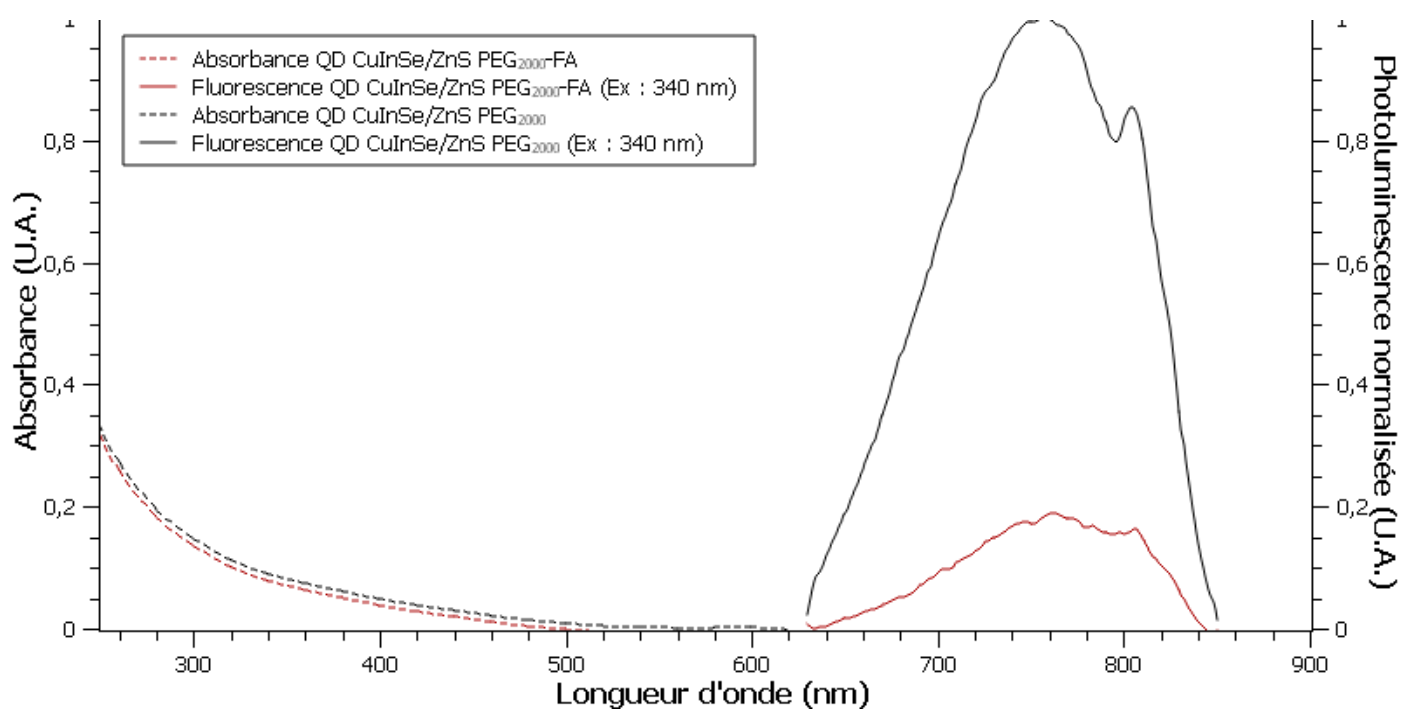


Figure 30 : Spectres d'absorbance (pointillés) et d'émission (excitation = 340 nm) des QDs infrarouges CuInSe/ZnS-PEG2000 (noir) et PEG2000-FA (rouge) en suspension dans le PBS à une concentration de 10 nM.

Les spectres d'absorbance des deux QDs sont semblables, avec une forte absorbance dans l'UV, qui chute sous 0,1 U.A. à partir de 300 nm et continue à décroître au fil du spectre.

Contrairement à l'absorbance, les spectres d'émission deux QDs présentent les mêmes pics d'émission, l'un à 745 nm et l'autre plus faible à 810 nm. Cependant, l'intensité de fluorescence est nettement réduite par la greffe de folate, avec une intensité de fluorescence réduite à 20 % de celle des QDs PEG₂₀₀₀. (Figure 30).

Comme pour les QDs visibles précédemment étudiés, la greffe de folate ne modifie pas la forme des spectres d'absorbance et d'émission, ce qui indique, en outre, que les QDs ne sont pas altérés en surface. De même, la greffe de folate diminue la fluorescence des QDs infrarouges, mais dans une proportion encore plus importante que pour les QDs visibles (80% de réduction sur les QDs infrarouges contre 50% pour les QDs visibles). Enfin la présence de deux pics sur les spectres d'émission indique la présence de deux populations de QDs, de taille différente, avec une population légèrement majoritaire émettant à 745 nm et une population émettant à 810 nm, donc de taille supérieure. Ces pics sont retrouvés pour les QDs PEG₂₀₀₀-FA, qui sont produits à partir du même lot de QDs.

Caractérisation du modèle murin de carcinomatose péritonéale d'origine ovarienne :

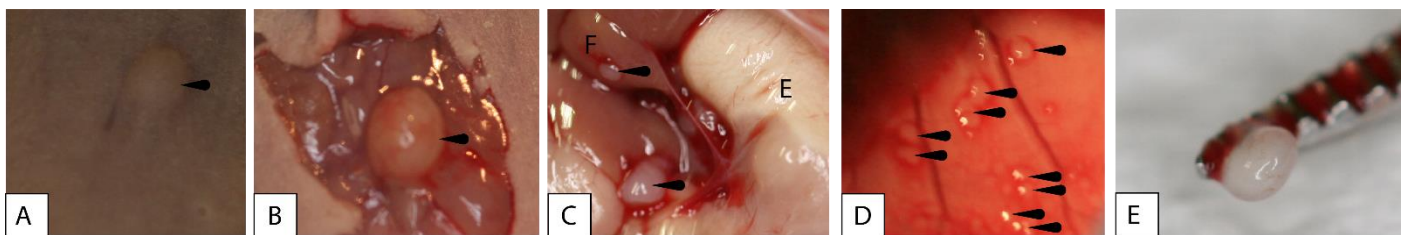


Figure 31 : Photographies de la face ventrale, prise avant (A), après incision de la peau (B), des organes (C) et du péritoine (D) après dissection d'une souris 8 semaines après injection intrapéritonéale de cellule SKOV-3. Implant tumoral prélevé sur une pince épaisse d'un millimètre (E). M : Mamelle ; F : Foie ; E : Estomac, les implants tumoraux sont indiqués par les flèches noires.

À environ 8 semaines, les souris présentant une tumeur au niveau du point d'injection (Figure 31a) sont euthanasiées et disséquées. La dissection révèle que la tumeur au point d'injection traverse le péritoine (Figure 31b), tandis que de nombreuses tumeurs, de taille millimétrique, sont présentes, en périphérie de l'estomac, du foie, des intestins (Figure 31c), et sur le péritoine (Figure 31 d et e).

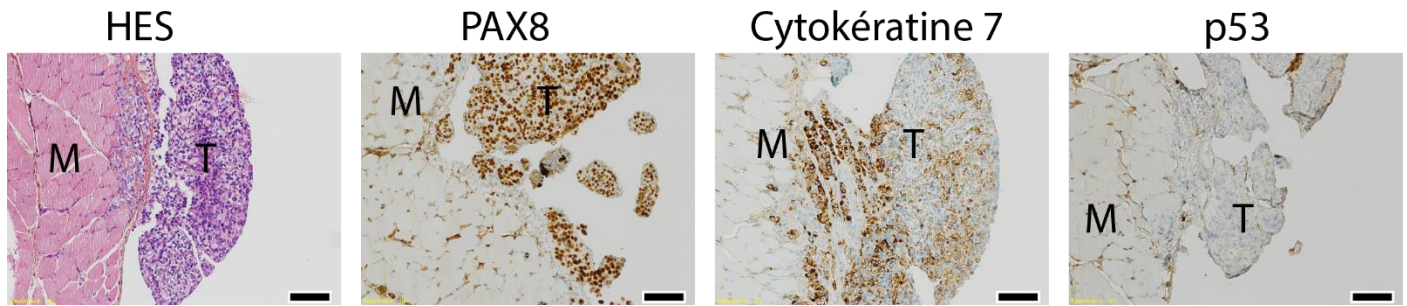


Figure 32 : Histologie d'une coupe de péritoine envahi par la carcinomatose péritonéale, coloration HES (a) et immunohistochimie des protéines p53 (b), cytokératine 7 (c) et PAX8 (d). M : muscle abdominaux ; T : tumeur. Barre d'échelle : 100 μ m

Les colorations HES des tissus prélevés révèlent des tumeurs de taille submillimétrique, et de types adénocarcinomes séreux et infiltrant, franchissant le péritoine et envahissant le muscle (Figure 32). Les analyses immuno-histochimiques montrent une absence de p53, une forte expression à l'interface entre tumeur et péritoine de la cytokératine 7 et une forte expression de PAX8 dans tous les tissus tumoraux.

L'obtention de tumeurs de faible taille était un prérequis à l'utilisation du modèle, et est ici obtenue sans atteindre un score de condition corporelle incompatible avec l'éthique. Les caractéristiques immuno-histochimiques confirment que les tissus cancéreux sont bien d'origine humaine (tous les anticorps utilisés sont conçus pour un usage clinique), et caractéristiques des cancers ovariens avec une très forte expression de PAX8. La lignée SKOV-3 est une des rares lignées de cancers ovariens humains n'exprimant pas la p53, ce qui confirme que ces tumeurs sont bien formées par cette lignée. (Yaginuma and Westphal, 1992) L'injection intrapéritonéale de SKOV-3 permet d'obtenir un modèle murin de carcinomatose péritonéale d'origine ovarienne humaine, présentant de nombreuses tumeurs macroscopiques et microscopiques.

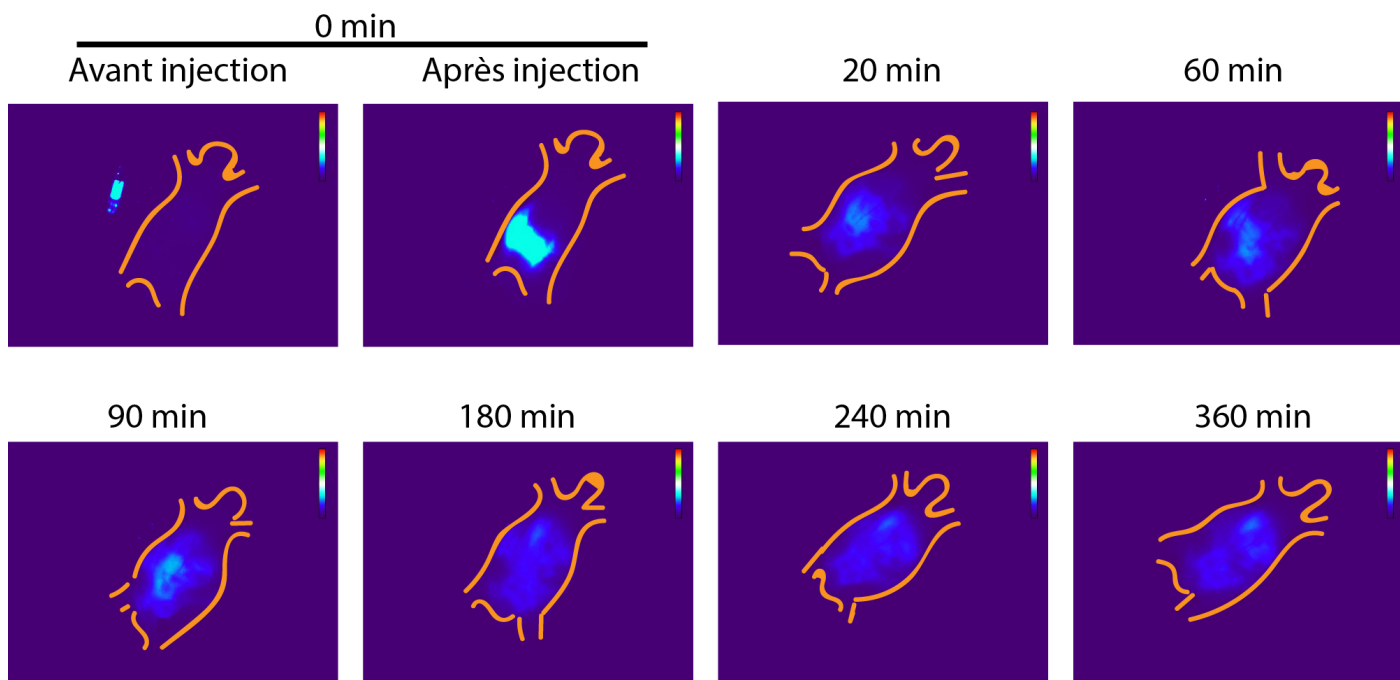


Figure 33 : Imagerie de fluorescence infrarouge de l'injection intrapéritonéale des QD CuInSe/ZnS PEG2000-FA sur modèle de carcinomatose péritonéale murin (Excitation : 690 nm ; Emission (>700 nm)). Images représentatives de trois essais. Les souris ont été anesthésiées sous isoflurane 4% et injectées par voie intrapéritonéale avec 20 pmol de QD CuInSe/ZnS PEG2000-FA en suspension dans 100 μ l de PBS.

Une fois le modèle animal caractérisé, il était important de tester *in vivo* la capacité des QDs CuInSe/ZnS PEG 2000-FA à cibler les implants tumoraux et à les marquer en fluorescence. La fluorescence des QDs PEG₂₀₀₀-FA est bien visible aux temps zéro, dans la seringue et une fois injectés, elle se dilue ensuite dans la cavité péritonéale.

La fluorescence reste détectable pendant plus de 6 heures, sans toutefois permettre de détecter les tumeurs par fluorescence. Au contraire, certains tissus, en particulier la tumeur transcutanée, apparaissent en négatif. Enfin, sur toute la durée de l'observation, la fluorescence apparaît confinée à la cavité péritonéale, sans point chaud ou augmentation de la fluorescence d'un ou plusieurs organes visible (Figure 33).

Le ciblage folate, démontré *in vitro* avec les QDs rouge, n'est pas reproduit *in vivo*. Ce phénomène a déjà été observé dans la littérature pour d'autres nanoparticules et semble corrélé à la densité de folate par nanoparticule, tout comme l'extinction de fluorescence des QDs. (Jang et al., 2015; Lee et al., 2015)

Cependant, le fait que la fluorescence reste confinée à la cavité péritonéale indique que les QDs CuInSe/ZnS PEG₂₀₀₀-FA restent en circulation dans cette cavité, sans accumulation visible dans les organes tels que le foie ou la rate, comme c'est couramment observé pour les QDs injectés par voie intraveineuse. À défaut d'obtenir un ciblage *in vivo*, la voie d'injection intrapéritonéale permet vraisemblablement de réduire l'accumulation des QDs dans les organes, au moins pendant 24h.

Mesure d'excrétion :

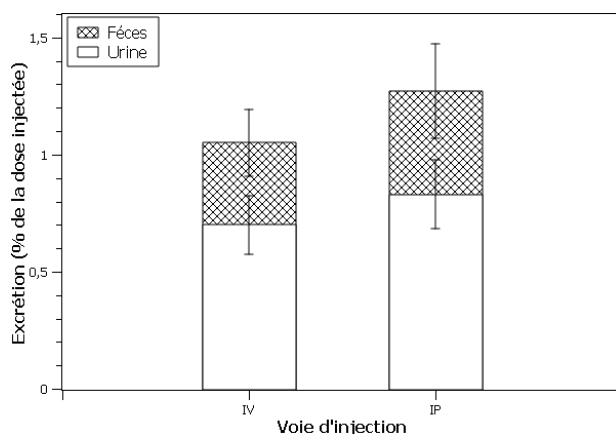


Figure 34 : Excrétion des QDs CuInSe/ZnS PEG₂₀₀₀-FA 24h après injection intraveineuse (IV) ou intrapéritonéale sur souris saines. La quantité d'indium des urines et fèces a été dosée par spectrométrie de masse, et comparée la quantité d'indium injectée.

Injectés par voie intraveineuse, les QDs ne sont que faiblement excrétés, à raison de 0,7±0,126% et 0,35±0,143% de la dose injectée, respectivement dans les urines et les fèces. Cette excrétion n'est pas significativement augmentée en utilisant la voie d'injection intrapéritonéale, avec 0,83±0,146% et 0,44±0,201% de la dose injectée, excrétée respectivement dans les urines et les fèces (Figure 34).

Les QDs ne sont donc pas excrétés, tout du moins pas en proportion satisfaisante, indépendamment de la voie d'injection. Cet obstacle majeur à leur utilisation clinique reste à surmonter.

3.2.4. Conclusions

Malgré une biocompatibilité supérieure aux QDs à base de cadmium, utilisés auparavant, et une émission dans le proche infrarouge, souhaitable dans le cadre d'une chirurgie guidée par fluorescence, la greffe de folate sur les QDs CuInSe/ZnS PEG₂₀₀₀-FA entraîne une extinction de fluorescence bien plus importante.

Leur fluorescence reste toutefois détectable *in vivo*, mais le ciblage n'apparaît pas efficace *in vivo*. Plus problématique encore, injectés par voie intraveineuse ou intrapéritonéale, ces QDs ne sont pas excrétés. Cependant, les images de fluorescence montrent qu'après injection intrapéritonéale, les QDs restent confinés à la cavité intrapéritonéale pendant au moins 24h, sans accumulation préférentielle dans les tumeurs ni les organes.

3.3. Agrégats de *quantum dots* en nanoparticules de silice

3.3.1. Introduction

L'absence de ciblage *in vivo* et d'excrétion des QDs CuInSe/ZnS_{PEG2000} conjugués au folate restent problématique pour guider la chirurgie des carcinomatoses péritonéales d'origine ovarienne. Dans cette configuration, obtenir le ciblage *in vivo* requiert vraisemblablement d'augmenter le ratio folate par nanoparticule (Lee et al., 2015) avec le risque de totalement éteindre la fluorescence. (2011) De plus, réduire leur taille pour obtenir l'excrétion par voie rénale n'est pas envisageable, la fluorescence infrarouge de ces QDs dépendant directement de leur taille.

Une des solutions pour protéger les QDs de l'extinction induite par certains fluorophores organiques, tels que le folate ou l'acridine, est de former une coque plus complexe autour des QDs pour réduire le transfert d'énergie au folate. (Linkov et al., 2018) Si cette solution peut préserver la fluorescence des QDs, elle ne résout pas le problème de l'excrétion. Hors, l'ajout d'une coque de silice avec une chimie de surface phosphonate, a produit des nanoparticules d'environ 30 nm de diamètre, rapidement excrétées après injection. (Ma et al., 2010)

Une nouvelle formulation a donc été développée, en associant un cœur de QDs agrégés dans une coque de silice mésoporeuse épaisse (SiNP), avec pour objectif d'obtenir une nanoparticule rapidement excrétée, et éventuellement insensible à l'ajout d'une forte densité de folate en surface.

3.3.2. Matériels et méthodes

Synthèse des QDs : Les QDs CuInS₂/ZnS sont synthétisés de la même manière que décrit précédemment.

Agrégation des QDs : Les agrégats sont formés à partir de QDs, en suspension dans du chloroforme. Du bromure de cétrimonium est ajouté à une concentration de 2,5 mM, et la suspension est incubée 10 min à température ambiante en bain à ultrason. Le chloroforme est éliminé par chauffage à 80°C et les agrégats ainsi formés sont remis en suspension dans une solution d'eau distillée avec 3 mM de bromure de cétrimonium.

Encapsulation dans une coque de silice : La coque de silice est formée par ajout d'orthosilicate de tétraéthyle et 20% et de soude à 0,1 M. La suspension est incubée pendant 2 jours, sous agitation et à température ambiante. Les SiNPs sont alors récupérées après plusieurs lavages en Vivaspin.

Microscopie électronique à transmission : Une goutte de suspension de nanoparticule est déposée sur grille de cuivre traitée au carbone Formvar 300 (Agar Scientific, Essex, RU), l'ensemble est dégazé sous vide pendant une nuit avant d'être imagé au microscope électronique à transmission JEOL 2010F (Jeol, Peabody, USA).

Caractérisation des SiNPs : Les spectres d'absorbance sont réalisés à l'aide d'un spectromètre Lambda 35 (Perkin Elmer, Waltham, USA), tandis que les spectres d'émission et d'excitation des SiNPs sont réalisés à l'aide d'un spectrofluorimètre Xenius SAFAS (SAFAS, Monaco). Toutes les mesures sont effectuées dans le PBS à une concentration en SiNPs de 10 nM, ce qui correspond à une densité optique de 0,1 à la longueur d'onde d'excitation ($\lambda_{exc.} = 300 \text{ nm}$).

Excrétion : Des souris Balb/c femelles de 8 semaines (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) sont anesthésiées par de l'isoflurane 4% et subissent une injection de 20 pmol de SiNP en suspension dans 100 μl de PBS, par voie intraveineuse ou intrapéritonéale. Elles sont ensuite placées individuellement en cage à métabolisme pendant 5 jours, avec un accès *a libitum* à l'eau et à une alimentation standard moulue. Les urines et fèces sont collectées quotidiennement. Cette expérimentation a été autorisée par le ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'innovation, après évaluation éthique favorable de l'autorisation de projet utilisant des animaux à des fins d'expérimentation animale numéro 9472.

Spectrométrie de masse : Urines et fèces sont pesées et mise en suspension séparément en solution d'acide nitrique 70%. Les échantillons sont minéralisés par chauffage à 90°C pendant 30 min, complétés à 25 ml par de l'eau milliQ (Millipore, Burlington, USA), et dosées par spectrométrie à plasma à couplage inductif sur appareil Varian 820 (Varian, les Ulis, France).

3.3.3. Résultats et discussion

Microscopie électronique en transmission :

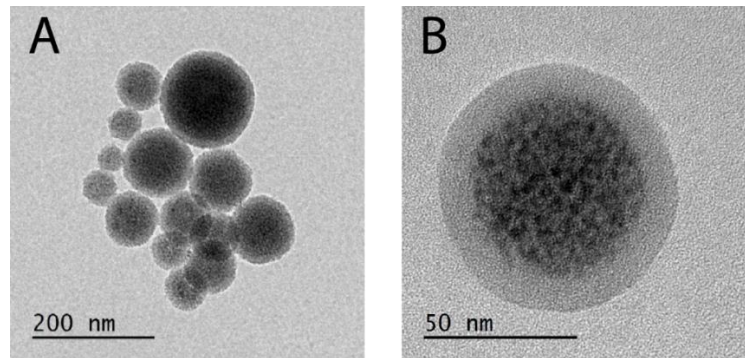


Figure 35 : Microscopie électronique des nanoparticules de silice méso poreuse, contenant des QDs agrégés (zone dense visible en noir).

Les SiNPs sont de forme sphérique, avec un cœur de QD qui apparaît dense en microscopie électronique, entouré d'une couche de silice mésoporeuse d'environ 10 nm d'épaisseur (Figure 35).

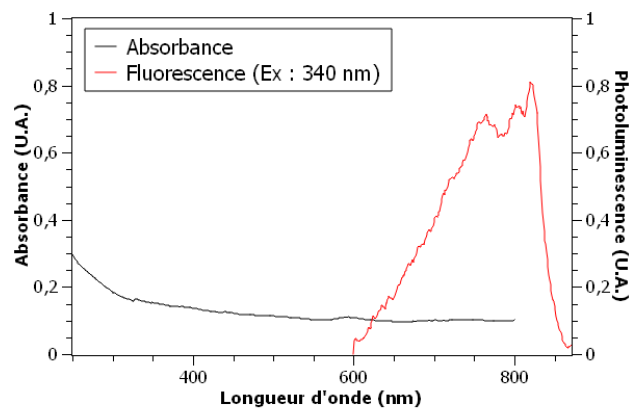


Figure 36 : Spectres d'absorbance (pointillés) et d'émission (excitation = 340 nm) des nanoparticules de silice à cœur de QDs CuInSe/ZnS infrarouges, en suspension dans le PBS à une concentration de 10 nM.

Les SiNPs présentent un spectre d'absorbance semblable aux QDs CuInSe/ZnS précédemment étudiés, avec une forte absorbance dans l'UV, qui décroît au fil du spectre. De même, le spectre d'émission des nanoparticules présente trois pics entre 600 et 850 nm, l'un à 760 nm, le second à 800 nm et le dernier, majoritaire, à 815 nm (Figure 36).

L'agrégation des QDs et l'ajout de silice n'ajoute pas de pic d'absorbance ni ne modifie la fluorescence des QDs, La présence de plusieurs pics de fluorescence infrarouge indique qu'au moins trois espèces de QDs, de tailles différentes, sont présentes dans les cœurs des QDs

Mesure d'excrétion :

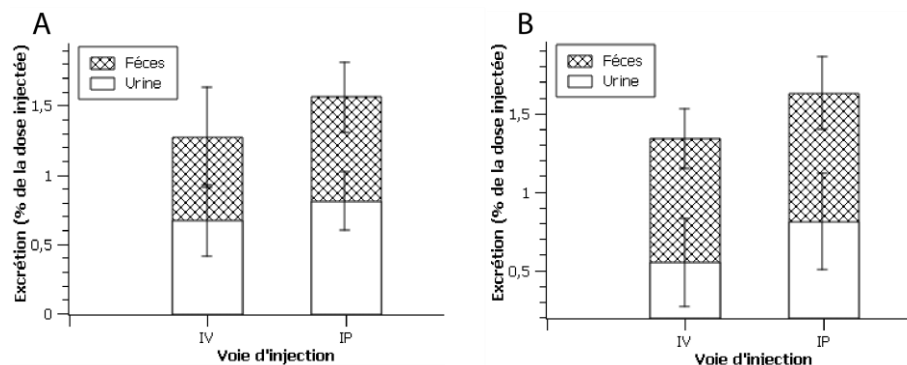


Figure 37 : Excrétion des nanoparticules de silice à cœur de QDs CuInSe/ZnS nues (A) et avec enveloppe de phosphonate (B), 24h après injection intraveineuse (IV) ou intrapéritonéale sur souris saines. La quantité d'indium des urines et fèces a été dosée par spectrométrie de masse, et comparée la quantité d'indium injectée.

Les SiNP nues sont faiblement excrétées en 24 h dans les urines ($0,67 \pm 0,25\%$ après injection intraveineuse et $0,81 \pm 0,21\%$ après injection intrapéritonéale) et les fèces ($0,6 \pm 0,36\%$ après injection intraveineuse et $0,75 \pm 0,25$ après injection intrapéritonéale), sans différences significatives entre les deux voie d'injection (Figure 37).

Les mêmes nanoparticules avec des phosphonates en surface ne sont pas plus excrétées, avec seulement $0,55 \pm 0,28\%$ et $0,79 \pm 0,19$ dans les urines et $0,79 \pm 0,19$ et $0,82 \pm 0,23$ dans les fèces, respectivement après injection intraveineuse ou intrapéritonéale.

Contrairement aux attentes, aucune des SiNP, avec ou sans phosphonates, que cela soit par injection intraveineuse ou intrapéritonéale, ne permet une excrétion satisfaisante des QDs. L'ajout de phosphonate semble seulement avoir tendance à réduire l'excrétion par voie urinaire et augmenter celle par voie hépatobiliaire, mais sans différence significative.

3.3.4. Conclusions

Malgré des caractéristiques photophysiques satisfaisantes, et des chimies de surface comparables à la littérature, ces nanoparticules de silice ne permettent pas une meilleure excrétion des QDs.

4. Discussion

L'utilisation du folate pour le ciblage des carcinomatoses péritonéales d'origine ovarienne fait actuellement consensus, du moins pour les fluorophores chimiques tels que le FITC ou les cyanines infrarouges.(van Dam et al., 2011)

Appliqué aux QDs, le folate présente toutefois une première limitation, puisqu'il atténue la fluorescence des QDs. Cette atténuation diffère entre les visibles QDs CdSe/CdS/ZnS et les QDs infrarouges CuInSe/ZnS, les premiers subissent une atténuation d'environ 50% contre une atténuation d'environ 80% pour les QDs infrarouges. Ce phénomène, connu, et proportionnel à la quantité de folate par QD, reste toutefois inexpliqué.(Bwatanglang et al., 2016; Geszke-Moritz et al., 2012) Les deux QDs étant de taille similaire (≈ 6 nm), et la chimie de surface étant identique, la quantité de folate par QDs paraît très similaire, et n'explique donc pas ces atténuations différentes entre QDs infrarouges et visibles.(Li et al., 2003; Pons et al., 2010)

Les autres hypothèses pour expliquer cette atténuation sont une absorption de la lumière excitatrice ou de la fluorescence par le folate, ou une fuite d'électrons du QD au folate. L'absence de différence dans la forme des spectres d'excitation, et le fait que le folate n'absorbe pas aux longueurs d'onde d'émission des QDs, semblent exclurent la première hypothèse.

Quant à une fuite d'électrons, celle-ci paraît improbable compte tenu de la présence de PEG à l'interface entre les QDs et le folate. Cependant, ce phénomène a déjà été observé avec d'autres chimies de surface, tel que le chitosan.(Bwatanglang et al., 2016) A taille et chimie de surface similaire entre les deux QDs, la différence pourrait provenir de la structure des QDs. En effet, les QDs visibles sont entourés d'une double coque CdS/ZnS, tandis que les QDs infrarouge n'ont qu'une simple coque ZnS. Or, l'utilisation de plusieurs coques peut limiter voire empêcher une fuite d'électrons, et donc l'atténuation de la fluorescence.(Linkov et al., 2018) Cette hypothèse reste à explorer, mais le phénomène d'atténuation de la fluorescence des QDs par le folate contraint, pour le moment, à utiliser de faibles ratios de folate par QD pour conserver une fluorescence détectable.

Malgré cette atténuation, le rôle du folate et de ses récepteurs dans l'endocytose des QDs par les cellules a pu être démontré *in vitro* : sur modèle cellulaire sur exprimant les récepteurs de folate, cette endocytose est significativement élevée, et totalement atténuée lorsque les récepteurs sont saturés au préalable par du folate libre. À l'opposé, les cellules modèles n'exprimant pas les récepteurs de folate ne sont pas significativement marquées.

Pour étudier l'interaction entre les QDs et les tumeurs sur exprimant les récepteurs de folate, un sphéroïde, qui mime les caractéristiques d'une tumeur de taille submillimétrique et avasculaire, a été développé. Sur ce modèle, les QDs folate permettent aussi d'obtenir une imagerie de fluorescence satisfaisante, avec un ratio signal bruit proche de 5,(Rose, 1946) et significativement supérieur en l'absence de folate dans le milieu.

Toutefois, les résultats obtenus sur coupe de sphéroïde démontrent que si les QDs ciblés par le folate marquent significativement plus ces sphéroïdes, ils ne pénètrent pas plus profondément que les QDs non ciblés, et restent essentiellement en surface des sphéroïdes. Pour l'imagerie de fluorescence, cette faible pénétration pourrait se révéler problématique, dans l'hypothèse où ces QDs restent accessibles à un mordant chimique, ce qui empêche d'éliminer spécifiquement les QDs libre à l'aide d'un mordant.(Liu et al., 2017) De même, dans l'hypothèse où les QDs pourraient être associés à des agents de chimiothérapie, en l'état, cette faible pénétration limite nettement leurs intérêts thérapeutique.(Lei et al., 2015)

Enfin, si ce ciblage est satisfaisant *in vitro*, il n'apparaît pas du tout effectif *in vivo*, ce qui est d'autant plus surprenant que la chimie de surface employée permet un ciblage efficace *in vitro*. Ce phénomène a déjà été observé pour d'autres nanoparticules, notamment des nanoparticules de graphène. Pour ces nanoparticules, le ratio folate par nanoparticule est proportionnel au marquage des tumeurs *in vivo* et *in vitro*, l'effet étant très nettement amplifié *in vivo*.(Lee et al., 2015) Hors, comme exposé précédemment, l'atténuation de la fluorescence des QDs par le folate empêche l'utilisation d'une forte densité. Une solution à ce problème peut être une liaison réversible du folate sur les QDs, en utilisant des liaisons dégradées en milieu acide, comme dans les lysosomes après l'endocytose des QDs. Les QDs natifs seraient ainsi « éteints » par la forte densité de folate, et « allumés » après endocytose.(Zhang et al., 2013b)

La faible pénétration des QDs ciblés par le folate *in vitro*, et l'absence de ciblage *in vivo*, incitent toutefois à envisager un autre ciblage. Parmi les plus prometteurs, le peptide iRGD, lié aux QDs ou libre, permet une pénétration en profondeur des QDs, sur modèles *in vitro* comme *in vivo*, sans impact négatif sur la fluorescence des QDs.(Liu et al., 2017; Przysiecka et al., 2016) Toutefois, si les fluorophores chimiques restent difficilement associés à une molécule de ciblage, les nanoparticules offrent de nombreux sites de liaisons, permettant la greffe de plusieurs molécules de ciblage, parfois différentes. Un ciblage multiple permet non seulement d'espérer atteindre plus de cibles, mais aussi d'obtenir un effet synergique, comme c'est le cas pour une nanoparticule associant folate et RGD.(Jang et al., 2015)

Malgré l'échec du ciblage, les observations *in vivo* mettent en évidence l'intérêt d'une injection intrapéritonéale des QDs. Ceux-ci restent visiblement confinés à la cavité péritonéale pendant toute la durée de l'observation, ce qui est en accord avec la littérature. Les données issues de la littérature indiquent en outre une très faible bioaccumulation des QDs dans les organes à 24 heures après injection intrapéritonéale.(Kato et al., 2010; Liu et al., 2017) Il est envisageable que les QDs restent en solution et ne s'agrègent pas ou peu dans la cavité péritonéale, puisqu'ils restent détectables pendant toute la durée de l'observation. Ils peuvent donc être éliminés par lavage de la cavité péritonéale, sous réserve qu'ils ne soient pas endocytés par les cellules saines, faute de récepteurs de folate. De même, lors de nos observations, le foie, le tube digestif ou les reins n'apparaissent pas hyper fluorescents, ce qui est préserve l'imagerie de fluorescence de la cavité péritonéale.

Cette voie d'injection ne permet toutefois pas d'obtenir l'excrétion des QDs, ce qui est cohérent avec la séquestration dans la cavité abdominale et un très faible passage dans la circulation. Les QDs injectés par voie intraveineuse sont rapidement séquestrés par les cellules de Kupfer, localisées au niveau du foie, ce qui mène à leur bioaccumulation et empêche leurs excrétion.(Helle et al., 2012) Il est probable que les QDs injectés par voie intrapéritonéale, qui à terme atteignent la circulation, rencontrent le même destin.

Sans résoudre la question de l'excrétion, la voie d'injection intrapéritonéale paraît donc privilégiée, pour d'une part éviter une exposition systémique lors de l'utilisation des QDs, et d'autre part optimiser l'imagerie de fluorescence des carcinomatoses péritonéales.

Reste le problème, crucial, posé par la bioaccumulation des QDs dans l'organisme. Cet obstacle n'a pas été balayé, ni en changeant de voie d'injection ni par un changement radical de nanoparticule, en utilisant une coque de silice méso poreuse autour d'un cœur de QDs agrégés. Le phénomène de transcytose, envisagé par différents auteurs pour expliquer l'excrétion de nanoparticules de silice, n'a pas pu être observé ici, malgré l'utilisation d'une composition (silice mésoporeuse), de forme (sphérique) et de chimie de surface (phosphonates) similaires aux succès référencés dans la littérature. (Ma et al., 2010; Steinbacher, 2008) Dans notre cas, l'excrétion des QDs agrégés et enfermés dans ces nanoparticules de silice est très semblable à celles des QDs seuls, et tout à fait insatisfaisante. Il est probable que la silice soit simplement dégradée *in vivo*, (Roggers et al., 2014) libérant les QDs, avec pour résultat leur bioaccumulation.

La disparité entre les nanoparticules étudiées, et le faible nombre d'études disponibles, ne permettent pas de poser un paradigme clair quant aux paramètres (taille, charge, chimie de surface, voie d'injection) qui régissent ce processus.

À l'opposé de la transcytose, la filtration rénale et le développement de nanoparticules compatibles (1-6 nm de diamètre) bénéficient de bien plus d'attention. (Du et al., 2017) L'entrée en essai clinique de phase II des Cornell dots suscite un intérêt grandissant pour le développement de sondes multimodales à partir d'une nanoparticule de silice « ultra petite » (5,5 nm de diamètre). (Phillips et al., 2014) Dans cette configuration, les QDs présentent toutefois encore des avantages, en conservant des propriétés photo-physiques de loin supérieures, en particulier pour l'imagerie de fluorescence utilisant des infrarouges courts. (Bruns et al., 2017) L'excrétion de QDs « ultra-petits » a été démontrée (Soo Choi et al., 2007) et expliquée, (Du et al., 2017) tandis que le dopage de la coque par des agents d'IRM ou un radio marquage en utilisant des radio-isotopes métalliques restent envisageables pour obtenir une sonde multimodale de taille acceptable. (Sitbon et al., 2014; Sun et al., 2014) Cette option est toutefois limitée à l'utilisation de QDs à base de métaux lourds tels que le plomb, l'arsenic ou le mercure.

Ces compositions posent question quant à leur toxicité, celle-ci reste cependant particulièrement discutée, et difficile à étudier au vu des différences entre les modèles animaux. Une étude, utilisant des QDs à base de silice et supposés non toxiques, et menée sur modèle murin et des primates, met en évidence des dommages hépatiques importants après injection intraveineuse de ces QDs sur modèle murin. À l’opposé, les primates tolèrent ces QDs, sans subir de toxicité. (Liu et al., 2013a) Une autre étude, plus récente, utilisant des QDs infrarouges à base de plomb, et menée sur modèle murin, met en évidence la bioaccumulation des QDs, et leurs éliminations par voie hépatobiliaire en deux semaines. Malgré leurs compositions et leur accumulation *in vivo*, ces QDs ne présentent pas de toxicité *in vitro*, et n’induisent pas de dommage histologique *in vivo*. (Kong et al., 2016)

En l’absence d’explication au phénomène de transcytose, le développement de QDs infrarouges « ultra petits » à base de métaux lourds, utilisant un ciblage multiple, et associés à d’autres modalités d’imagerie, paraît donc être l’option la plus efficace pour espérer produire une nano sonde multimodale, apte à guider la chirurgie des carcinomatoses péritonéales d’origine ovarienne.

En conclusion, nos travaux mettent en évidence l’effet atténuateur du folate, et son efficacité dans le ciblage *in vitro* des cellules et tumeurs sur exprimant ses récepteurs. Cette efficacité n’améliore toutefois pas la pénétration des QDs, et ne se reproduit pas *in vivo*. Enfin, l’excrétion des QDs n’a pu être obtenue, malgré plusieurs approches. Toutefois, l’utilisation de la voie d’injection intrapéritonéale semble être à privilégier, compte tenu du confinement des QDs dans la cavité abdominale.

5. Conclusions et perspectives

Si les QDs présentent des caractéristiques, photophysiques et chimiques, idéales pour servir de base au développement d'une nanosonde multimodale, destinée à guider la chirurgie des carcinomatoses péritonéales d'origine ovarienne, de nombreux défis restent à relever.

Le premier concerne le développement d'un ciblage effectif *in vivo*. Dans cette optique, le recours à un ciblage multiple paraît souhaitable. Cela permettrait, non seulement, une synergie entre agents de ciblage, mais aussi l'extension de ce ciblage à des cibles exprimant les récepteurs de folate à des degrés variables, donc une plus grande polyvalence pour guider la chirurgie des cancers. De même, une amélioration de la pénétration dans les tissus cancéreux, par un ou plusieurs agents de ciblage, tels que le peptide d'internalisation RGD, (Przysiecka et al., 2016) pourrait non seulement augmenter la quantité de sonde endocytée par ces tissus, mais aussi être mise à profit pour améliorer la pénétration de drogues cytotoxiques, couplées à la nanoparticule dans un but thérapeutique.

Le deuxième obstacle à relever reste l'absence d'excrétion des QDs. Dans ce contexte, trois possibilités restent envisageables. Premièrement, l'injection intrapéritonéale permet de les confiner, au moins temporairement, à la cavité péritonéale, les QDs n'ayant pas atteint leurs cibles pourraient être éliminés par lavage de la cavité, sous réserve d'obtenir un ciblage assez rapide et d'empêcher leur absorption sur les tissus sains ou leur pénétration dans la circulation, puis leur bioaccumulation.

Face à ces risques, le développement de QDs capables d'être rapidement excrétés par voie rénale reste indispensable, et pourrait étendre leur utilisation à d'autres applications. Les futurs travaux pourront s'intéresser au développement d'une sonde ultra petite, à base de QDs infrarouges de très faible diamètre, mais à base de métaux lourds, ou poursuivre le développement d'une nanoparticule de silice de taille plus conséquente, contenant des QDs infrarouges sans métaux lourds, excrétée par un autre processus. Si la première option paraît plus accessible au regard de la littérature, la transcytose des nanoparticules de silice reste prometteuse, en permettant une charge utile bien plus conséquente. Cependant, ce processus reste encore trop peu étudié.

Toutefois, si l'excrétion des QDs et l'utilisation de QDs sans métaux lourds paraissent hors d'atteinte, la brillance exceptionnelle des QDs permet leur utilisation à des doses très réduites, ce

limitant leur toxicité. À titre d'exemple, des QDs à base de soufre et de plomb, émettant dans le infrarouge court, ont été étudiés pour l'imagerie de fluorescence *in vivo*.

À la dose employée, ces QDs produisaient une imagerie de fluorescence *in vivo* très satisfaisante sur modèle murin, sans induire d'inflammation ni de dommage tissulaire, tandis que leurs composants, notamment le plomb, étaient éliminés au fil des semaines.(Kong et al., 2016)

L'utilisation de QDs à base de métaux lourds, sans espoir d'excrétion, mais à des doses infimes, reste donc envisageable dans un cadre clinique. Toutefois, dans le cadre de la cytoréduction des carcinomatose péritonéale guidée par fluorescence, cette bioaccumulation peut contaminer la fluorescence de la cavité abdominale, en rendant le foie hyper fluorescent.

Ce dernier obstacle pourrait être éliminé en utilisant des QDs « activables » comme présentée dans l'introduction, qui ne deviendraient fluorescents qu'en présence des tumeurs. L'association d'un atténuateur de la fluorescence, tels que le bleu de méthylène, lié aux QDs par une liaison sensible aux métalloprotéases, exprimées par les tissus tumoraux, permet d'obtenir ce type de QDs. Cette approche éliminerait la fluorescence non spécifique des QDs bioaccumulés dans le foie, préservant l'imagerie de fluorescence des tissus cancéreux.(Jeong et al., 2017)

En conclusion, la cytoréduction des carcinomatoses péritonéales guidée requiert une sonde fluorescente, excrétée par voie rénale et/ou hépatique, activable en présence des tissus cancéreux pour une meilleure imagerie. Cette sonde et ses produits de dégradation ne doivent pas induire d'inflammation ni d'effet toxique. Son ciblage doit reposer sur plusieurs agents, pour offrir une grande polyvalence, et pouvoir pénétrer en profondeur dans les tumeurs, et ainsi pouvoir servir de vecteur pour des drogues cytotoxiques. Enfin, cette sonde doit associer plusieurs modalités d'imagerie pour permettre d'imager le corps entier en pré et postopératoire, en complément de l'imagerie de fluorescence peropératoire, afin d'assurer le succès de la cytoréduction. C'est grâce à une chirurgie optimale que l'on augmentera la survie des patientes atteintes d'un cancer ovarien à un stade avancé, et le pourcentage de traitement curatif et sûr.

6. Références

- Abu-Hijleh, M.F., Habbal, O.A., and Moqattash, S.T. (1995). The role of the diaphragm in lymphatic absorption from the peritoneal cavity. *J. Anat.* 186, 453–467.
- Alander, J.T., Kaartinen, I., Laakso, A., Pättilä, T., Spillmann, T., Tuchin, V.V., Venermo, M., and Välisuo, P. (2012). A review of indocyanine green fluorescent imaging in surgery. *Int. J. Biomed. Imaging* 2012, 940585.
- Albanese, A.M., Albanese, E.F., Miño, J.H., Gómez, E., Gómez, M., Zandomeni, M., and Merlo, A.B. (2009). Peritoneal surface area: measurements of 40 structures covered by peritoneum: correlation between total peritoneal surface area and the surface calculated by formulas. *Surg. Radiol. Anat. SRA* 31, 369–377.
- Alberts, D.S., Green, S., Hannigan, E.V., O'Toole, R., Stock-Novack, D., Anderson, P., Surwit, E.A., Malvly, V.K., Nahhas, W.A., and Jolles, C.J. (1992). Improved therapeutic index of carboplatin plus cyclophosphamide versus cisplatin plus cyclophosphamide: final report by the Southwest Oncology Group of a phase III randomized trial in stages III and IV ovarian cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 10, 706–717.
- Anikeeva, P.O., Halpert, J.E., Bawendi, M.G., and Bulović, V. (2009). Quantum Dot Light-Emitting Devices with Electroluminescence Tunable over the Entire Visible Spectrum. *Nano Lett.* 9, 2532–2536.
- Armstrong, D.K., Bundy, B., Wenzel, L., Huang, H.Q., Baergen, R., Lele, S., Copeland, L.J., Walker, J.L., and Burger, R.A. (2006). Intraperitoneal Cisplatin and Paclitaxel in Ovarian Cancer. *N. Engl. J. Med.* 354, 34–43.
- Azaïs, H., Estevez, J.P., Foucher, P., Kerbage, Y., Mordon, S., and Collinet, P. (2017). Dealing with microscopic peritoneal metastases of epithelial ovarian cancer. A surgical challenge. *Surg. Oncol.* 26, 46–52.
- Bankhead, P. (2014). Analyzing fluorescence microscopy images with ImageJ. *ImageJ* 1–195.
- Benson, R.C., and Kues, H.A. (1978). Fluorescence properties of indocyanine green as related to angiography. *Phys. Med. Biol.* 23, 159–163.
- Bentzen, E.L., Tomlinson, I.D., Mason, J., Gresch, P., Warnement, M.R., Wright, D., Sanders-Bush, E., Blakely, R., and Rosenthal, S.J. (2005). Surface modification to reduce nonspecific binding of quantum dots in live cell assays. *Bioconjug. Chem.* 16, 1488–1494.
- Birn, H., Nielsen, S., and Christensen, E.I. (1997). Internalization and apical-to-basolateral transport of folate in rat kidney proximal tubule. *Am. J. Physiol.* 272, F70-78.
- du Bois, A., Lück, H.-J., Meier, W., Adams, H.-P., Möbus, V., Costa, S., Bauknecht, T., Richter, B., Warm, M., Schröder, W., et al. (2003). A randomized clinical trial of cisplatin/paclitaxel versus carboplatin/paclitaxel as first-line treatment of ovarian cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 95, 1320–1329.
- Bourzac, K. (2013). Quantum dots go on display. *Nat. News* 493, 283.
- Brichkin, S.B., and Razumov, V.F. (2016). Colloidal quantum dots: synthesis, properties and applications. *Russ. Chem. Rev.* 85, 1297.
- Brkić, S. (2018). Applicability of Quantum Dots in Biomedical Science. *Ioniz. Radiat. Eff. Appl.*
- Bruns, O.T., Bischof, T.S., Harris, D.K., Franke, D., Shi, Y., Riedemann, L., Bartelt, A., Jaworski, F.B., Carr, J.A., Rowlands, C.J., et al. (2017). Next-generation *in vivo* optical imaging with short-wave infrared quantum dots. *Nat. Biomed. Eng.* 1, 0056.

- Brus, L.E. (1984). Electron-electron and electron-hole interactions in small semiconductor crystallites: The size dependence of the lowest excited electronic state. *J. Chem. Phys.* *80*, 4403–4409.
- Bwatanglang, I.B., Mohammad, F., Yusof, N.A., Abdullah, J., Hussein, M.Z., Alitheen, N.B., and Abu, N. (2016). Folic acid targeted Mn:ZnS quantum dots for theranostic applications of cancer cell imaging and therapy. *Int. J. Nanomedicine* *11*, 413–428.
- Ceccaldi, R., O'Connor, K.W., Mouw, K.W., Li, A.Y., Matulonis, U.A., D'Andrea, A.D., and Konstantinopoulos, P.A. (2015). A Unique Subset of Epithelial Ovarian Cancers with Platinum Sensitivity and PARP Inhibitor Resistance. *Cancer Res.*
- Chen, C., Ke, J., Zhou, X.E., Yi, W., Brunzelle, J.S., Li, J., Yong, E.-L., Xu, H.E., and Melcher, K. (2013a). Structural basis for molecular recognition of folic acid by folate receptors. *Nature* *500*, 486–9.
- Chen, C., Zhang, P., Zhang, L., Gao, D., Gao, G., Yang, Y., Li, W., Gong, P., and Cai, L. (2015). Long-decay near-infrared-emitting doped quantum dots for lifetime-based in vivo pH imaging. *Chem. Commun.* *51*, 11162–11165.
- Chen, H., Li, L., Cui, S., Mahounga, D., Zhang, J., and Gu, Y. (2011). Folate Conjugated CdHgTe Quantum Dots with High Targeting Affinity and Sensitivity for In vivo Early Tumor Diagnosis. *J. Fluoresc.* *21*, 793–801.
- Chen, O., Zhao, J., Chauhan, V.P., Cui, J., Wong, C., Harris, D.K., Wei, H., Han, H.-S., Fukumura, D., Jain, R.K., et al. (2013b). Compact high-quality CdSe-CdS core-shell nanocrystals with narrow emission linewidths and suppressed blinking. *Nat. Mater.* *12*, 445–451.
- Cheng, H., Chi, C., Shang, W., Rengaowa, S., Cui, J., Ye, J., Jiang, S., Mao, Y., Zeng, C., Huo, H., et al. (2016). Precise integrin-targeting near-infrared imaging-guided surgical method increases surgical qualification of peritoneal carcinomatosis from gastric cancer in mice. *Oncotarget* *8*, 6258–6272.
- Cherrick, G.R., Stein, S.W., Leevy, C.M., and Davidson, C.S. (1960). INDOCYANINE GREEN: OBSERVATIONS ON ITS PHYSICAL PROPERTIES, PLASMA DECAY, AND HEPATIC EXTRACTION*. *J. Clin. Invest.* *39*, 592–600.
- Cheung, A., Bax, H.J., Josephs, D.H., Ilieva, K.M., Pellizzari, G., Opzoomer, J., Bloomfield, J., Fittall, M., Grigoriadis, A., Figini, M., et al. (2016). Targeting folate receptor alpha for cancer treatment. *Oncotarget* *7*, 52553–52574.
- Chinnathambi, S., Chen, S., Ganesan, S., and Hanagata, N. (2014). Silicon quantum dots for biological applications. *Adv. Healthc. Mater.* *3*, 10–29.
- Choi, S.W., and Mason, J.B. (2000). Folate and carcinogenesis: an integrated scheme. *J. Nutr.* *130*, 129–132.
- Covens, A.L. (2000). A critique of surgical cytoreduction in advanced ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* *78*, 269–274.
- Crane, L.M.A., Arts, H.J.G., van Oosten, M., Low, P.S., van der Zee, A.G.J., van Dam, G.M., and Bart, J. (2012). The effect of chemotherapy on expression of folate receptor-alpha in ovarian cancer. *Cell. Oncol. Dordr.* *35*, 9–18.
- Cristea, M., Han, E., Salmon, L., and Morgan, R.J. (2010). Practical considerations in ovarian cancer chemotherapy. *Ther. Adv. Med. Oncol.* *2*, 175–187.
- van Dam, G.M., Themelis, G., Crane, L.M.A., Harlaar, N.J., Pleijhuis, R.G., Kelder, W., Sarantopoulos, A., de Jong, J.S., Arts, H.J.G., van der Zee, A.G.J., et al. (2011). Intraoperative

- tumor-specific fluorescence imaging in ovarian cancer by folate receptor- α targeting: first in-human results. *Nat. Med.* *17*, 1315–1319.
- De Jesus, E., Keating, J.J., Kularatne, S.A., Jiang, J., Judy, R., Predina, J., Nie, S., Low, P., and Singhal, S. (2015). Comparison of Folate Receptor Targeted Optical Contrast Agents for Intraoperative Molecular Imaging. *Int. J. Mol. Imaging* *2015*.
- Decker, D.G., Fleming, T.R., Malkasian, G.D., Webb, M.J., Jeffries, J.A., and Edmonson, J.H. (1982). Cyclophosphamide plus cis-platinum in combination: treatment program for stage III or IV ovarian carcinoma. *Obstet. Gynecol.* *60*, 481–487.
- Dembele, F., Tasso, M., Trapiella-Alfonso, L., Xu, X., Hanafi, M., Lequeux, N., and Pons, T. (2017). Zwitterionic Silane Copolymer for Ultra-Stable and Bright Biomolecular Probes Based on Fluorescent Quantum Dot Nanoclusters. *ACS Appl. Mater. Interfaces* *9*, 18161–18169.
- Demir, R.H., and Marchand, G.J. (2012). Adnexal Masses Suspected to Be Benign Treated with Laparoscopy. *JSLs* *16*, 71–84.
- Despierre, E., Lambrechts, S., Leunen, K., Berteloot, P., Neven, P., Amant, F., O'Shannessy, D.J., Somers, E.B., and Vergote, I. (2013). Folate receptor alpha (FRA) expression remains unchanged in epithelial ovarian and endometrial cancer after chemotherapy. *Gynecol. Oncol.* *130*, 192–199.
- Dizon, D.S., Hensley, M.L., Poynor, E.A., Sabbatini, P., Aghajanian, C., Hummer, A., Venkatraman, E., and Spriggs, D.R. (2002). Retrospective analysis of carboplatin and paclitaxel as initial second-line therapy for recurrent epithelial ovarian carcinoma: application toward a dynamic disease state model of ovarian cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *20*, 1238–1247.
- Doufekas, K., and Olaitan, A. (2014). Clinical epidemiology of epithelial ovarian cancer in the UK. *Int. J. Womens Health* *6*, 537–545.
- van Driel, W.J., Koole, S.N., Sikorska, K., Schagen van Leeuwen, J.H., Schreuder, H.W.R., Hermans, R.H.M., de Hingh, I.H.J.T., van der Velden, J., Arts, H.J., Massuger, L.F.A.G., et al. (2018). Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy in Ovarian Cancer. *N. Engl. J. Med.* *378*, 230–240.
- DSouza, A.V., Lin, H., Henderson, E.R., Samkoe, K.S., and Pogue, B.W. (2016). Review of fluorescence guided surgery systems: identification of key performance capabilities beyond indocyanine green imaging. *J. Biomed. Opt.* *21*, 080901.
- Du, B., Jiang, X., Das, A., Zhou, Q., Yu, M., Jin, R., and Zheng, J. (2017). Glomerular barrier behaves as an atomically precise bandpass filter in a sub-nanometre regime. *Nat. Nanotechnol.* *12*, 1096–1102.
- Ducongé, F., Pons, T., Pestourie, C., Hérin, L., Thézé, B., Gombert, K., Mahler, B., Hinnen, F., Kühnast, B., Dollé, F., et al. (2008). Fluorine-18-Labeled Phospholipid Quantum Dot Micelles for in Vivo Multimodal Imaging from Whole Body to Cellular Scales. *Bioconjug. Chem.* *19*, 1921–1926.
- Duman, F.D., Erkisa, M., Khodadust, R., Ari, F., Ulukaya, E., and Acar, H.Y. (2017). Folic acid-conjugated cationic Ag₂S quantum dots for optical imaging and selective doxorubicin delivery to HeLa cells. *Nanomed.* *12*, 2319–2333.
- Elattar, A., Bryant, A., Winter-Roach, B.A., Hatem, M., and Naik, R. (2011). Optimal primary surgical treatment for advanced epithelial ovarian cancer. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD007565.
- Fagotti, A., Ferrandina, G., Fanfani, F., Ercoli, A., Lorusso, D., Rossi, M., and Scambia, G. (2006). A laparoscopy-based score to predict surgical outcome in patients with advanced ovarian carcinoma: a pilot study. *Ann. Surg. Oncol.* *13*, 1156–1161.

- Fagotti, A., Ferrandina, G., Fanfani, F., Garganese, G., Vizzielli, G., Carone, V., Salerno, M.G., and Scambia, G. (2008). Prospective validation of a laparoscopic predictive model for optimal cytoreduction in advanced ovarian carcinoma. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *199*, 642.e1-6.
- Fagotti, A., Gallotta, V., Romano, F., Fanfani, F., Rossitto, C., Naldini, A., Vigliotta, M., and Scambia, G. (2010). Peritoneal carcinosis of ovarian origin. *World J. Gastrointest. Oncol.* *2*, 102–108.
- Francaviglia, N., Iacopino, D.G., Costantino, G., Villa, A., Impallaria, P., Meli, F., and Maugeri, R. (2017). Fluorescein for resection of high-grade gliomas: A safety study control in a single center and review of the literature. *Surg. Neurol. Int.* *8*.
- Frangioni, J.V. (2003). In vivo near-infrared fluorescence imaging. *Curr. Opin. Chem. Biol.* *7*, 626–634.
- Frangioni, J.V. (2008). New Technologies for Human Cancer Imaging. *J. Clin. Oncol.* *26*, 4012–4021.
- Gandorfer, A., Haritoglou, C., and Kampik, A. (2008). Toxicity of indocyanine green in vitreoretinal surgery. *Dev. Ophthalmol.* *42*, 69–81.
- Gao, X., Yang, L., Petros, J.A., Marshall, F.F., Simons, J.W., and Nie, S. (2005). In vivo molecular and cellular imaging with quantum dots. *Curr. Opin. Biotechnol.* *16*, 63–72.
- Gerega, A., Zolek, N., Soltysinski, T., Milej, D., Sawosz, P., Toczyłowska, B., and Liebert, A. (2011). Wavelength-resolved measurements of fluorescence lifetime of indocyanine green. *J. Biomed. Opt.* *16*, 067010.
- Geszke-Moritz, M., Clavier, G., Lulek, J., and Schneider, R. (2012). Copper- or manganese-doped ZnS quantum dots as fluorescent probes for detecting folic acid in aqueous media. *J. Lumin.* *132*, 987–991.
- Gioux, S., Choi, H.S., and Frangioni, J.V. (2010). Image-Guided Surgery using Invisible Near-Infrared Light: Fundamentals of Clinical Translation. *Mol. Imaging* *9*, 237–255.
- Giovanelli, E., Muro, E., Sitbon, G., Hanafi, M., Pons, T., Dubertret, B., and Lequeux, N. (2012). Highly Enhanced Affinity of Multidentate versus Bidentate Zwitterionic Ligands for Long-Term Quantum Dot Bioimaging. *Langmuir* *28*, 15177–15184.
- Goff, B.A., Mandel, L., Muntz, H.G., and Melancon, C.H. (2000). Ovarian carcinoma diagnosis. *Cancer* *89*, 2068–2075.
- Gravel, E., Tanguy, C., Cassette, E., Pons, T., Knittel, F., Bernards, N., Garofalakis, A., Ducongé, F., Dubertret, B., and Doris, E. (2012). Compact tridentate ligands for enhanced aqueous stability of quantum dots and in vivo imaging. *Chem. Sci.* *4*, 411–417.
- Green, M., Haigh, S.J., Lewis, E.A., Sandiford, L., Burkitt-Gray, M., Fleck, R., Vizcay-Barrena, G., Jensen, L., Mirzai, H., Curry, R.J., et al. (2016). The Biosynthesis of Infrared-Emitting Quantum Dots in *Allium Fistulosum*. *Sci. Rep.* *6*, 20480.
- Griffiths, C.T. (1975). Surgical resection of tumor bulk in the primary treatment of ovarian carcinoma. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* *42*, 101–104.
- Griffiths, C.T., Parker, L.M., and Fuller, A.F. (1979). Role of cytoreductive surgical treatment in the management of advanced ovarian cancer. *Cancer Treat. Rep.* *63*, 235–240.
- Guo, W., Sun, X., Jacobson, O., Yan, X., Min, K., Srivatsan, A., Niu, G., Kiesewetter, D.O., Chang, J., and Chen, X. (2015). Intrinsically Radioactive [⁶⁴Cu]CuInS/ZnS Quantum Dots for PET and Optical Imaging: Improved Radiochemical Stability and Controllable Cerenkov Luminescence. *ACS Nano* *9*, 488–495.
- Gustafson, H.H., Holt-Casper, D., Grainger, D.W., and Ghandehari, H. (2015). Nanoparticle Uptake: The Phagocyte Problem. *Nano Today* *10*, 487–510.

- Han, M.S., and Tung, C.-H. (2014). Lessons learned from imaging mouse ovarian tumors: the route of probe injection makes a difference. *Quant. Imaging Med. Surg.* 4, 156–62.
- He, X., Nie, H., Wang, K., Tan, W., Wu, X., and Zhang, P. (2008). In vivo study of biodistribution and urinary excretion of surface-modified silica nanoparticles. *Anal. Chem.* 80, 9597–9603.
- Helle, M., Cassette, E., Bezdetsnaya, L., Pons, T., Leroux, A., Plénat, F., Guillemin, F., Dubertret, B., and Marchal, F. (2012). Visualisation of sentinel lymph node with indium-based near infrared emitting Quantum Dots in a murine metastatic breast cancer model. *PloS One* 7, e44433.
- Herly, L. (1944). Studies in Selective Differentiation of Tissues by Means of Filtered Ultraviolet Light. *Cancer Res.* 4, 227–231.
- Herr, D., Sallmann, A., Bekes, I., Konrad, R., Holzheu, I., Kreienberg, R., and Wulff, C. (2012). VEGF induces ascites in ovarian cancer patients via increasing peritoneal permeability by downregulation of Claudin 5. *Gynecol. Oncol.* 127, 210–216.
- Hirche, C., Mohr, Z., Kneif, S., Doniga, S., Murawa, D., Strik, M., and Hünerbein, M. (2012). Ultrastaging of colon cancer by sentinel node biopsy using fluorescence navigation with indocyanine green. *Int. J. Colorectal Dis.* 27, 319–324.
- Hoogstins, C.E.S., Tummers, Q.R.J.G., Gaarenstroom, K.N., Kroon, C.D. de, Trimbos, J.B.M.Z., Bosse, T., Smit, V.T.H.B.M., Vuyk, J., Velde, C.J.H. van de, Cohen, A.F., et al. (2016). A Novel Tumor-Specific Agent for Intraoperative Near-Infrared Fluorescence Imaging: A Translational Study in Healthy Volunteers and Patients with Ovarian Cancer. *Clin. Cancer Res.* 22, 2929–2938.
- Hu, K., Wang, H., Tang, G., Huang, T., Tang, X., Liang, X., Yao, S., and Nie, D. In Vivo Cancer Dual-Targeting and Dual-Modality Imaging with Functionalized Quantum Dots.
- Imamoglu, A., Awschalom, D.D., Burkard, G., DiVincenzo, D.P., Loss, D., Sherwin, M., and Small, A. (1999). Quantum information processing using quantum dot spins and cavity-QED. *ArXivquant-Ph9904096*.
- Jang, C., Lee, J.H., Sahu, A., and Tae, G. (2015). The synergistic effect of folate and RGD dual ligand of nanographene oxide on tumor targeting and photothermal therapy in vivo. *Nanoscale* 7, 18584–18594.
- Jeong, S., Song, J., Lee, W., Ryu, Y.M., Jung, Y., Kim, S.-Y., Kim, K., Hong, S.C., Myung, S.J., and Kim, S. (2017). Cancer-Microenvironment-Sensitive Activatable Quantum Dot Probe in the Second Near-Infrared Window. *Nano Lett.* 17, 1378–1386.
- Jin, T., Fujii, F., Komai, Y., Seki, J., Seiyama, A., Yoshioka, Y., Jin, T., Fujii, F., Komai, Y., Seki, J., et al. (2008). Preparation and Characterization of Highly Fluorescent, Glutathione-coated Near Infrared Quantum Dots for in Vivo Fluorescence Imaging. *Int. J. Mol. Sci.* 9, 2044–2061.
- Kalli, K.R., Oberg, A.L., Keeney, G.L., Christianson, T.J.H., Low, P.S., Knutson, K.L., and Hartmann, L.C. (2008). Folate receptor alpha as a tumor target in epithelial ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 108, 619–626.
- Kato, S., Itoh, K., Yaoi, T., Tozawa, T., Yoshikawa, Y., Yasui, H., Kanamura, N., Hoshino, A., Manabe, N., Yamamoto, K., et al. (2010). Organ distribution of quantum dots after intraperitoneal administration, with special reference to area-specific distribution in the brain. *Nanotechnology* 21, 335103.
- Keating, J.J., Okusanya, O.T., De Jesus, E., Judy, R., Jiang, J., Deshpande, C., Nie, S., Low, P., and Singhal, S. (2016). Intraoperative Molecular Imaging of Lung Adenocarcinoma Can Identify

- Residual Tumor Cells at the Surgical Margins. *Mol. Imaging Biol. MIB Off. Publ. Acad. Mol. Imaging* 18, 209–218.
- Kennedy, M.D., Jallad, K.N., Thompson, D.H., Ben-Amotz, D., and Low, P.S. (2003). Optical imaging of metastatic tumors using a folate-targeted fluorescent probe. *J. Biomed. Opt.* 8, 636–641.
- Kim, K.S., Lee, D., Song, C.G., and Kang, P.M. (2015). Reactive oxygen species-activated nanomaterials as theranostic agents. *Nanomed.* 10, 2709–2723.
- Kindelberger, D.W., Lee, Y., Miron, A., Hirsch, M.S., Feltmate, C., Medeiros, F., Callahan, M.J., Garner, E.O., Gordon, R.W., Birch, C., et al. (2007). Intraepithelial carcinoma of the fimbria and pelvic serous carcinoma: Evidence for a causal relationship. *Am. J. Surg. Pathol.* 31, 161–169.
- Kireeva, G.S., Gafton, G.I., Guseynov, K.D., Senchik, K.Y., Belyaeva, O.A., Beshpalov, V.G., Panchenko, A.V., Maydin, M.A., and Belyaev, A.M. (2018). HIPEC in patients with primary advanced ovarian cancer: Is there a role? A systematic review of short- and long-term outcomes. *Surg. Oncol.* 27, 251–258.
- Kitai, T., Inomoto, T., Miwa, M., and Shikayama, T. (2005). Fluorescence navigation with indocyanine green for detecting sentinel lymph nodes in breast cancer. *Breast Cancer Tokyo Jpn.* 12, 211–215.
- Kittel, C. (1996). *Introduction to solid state physics* (New York: Wiley).
- Kong, Y., Chen, J., Fang, H., Heath, G., Wo, Y., Wang, W., Li, Y., Guo, Y., Evans, S.D., Chen, S., et al. (2016). Highly Fluorescent Ribonuclease-A-Encapsulated Lead Sulfide Quantum Dots for Ultrasensitive Fluorescence in Vivo Imaging in the Second Near-Infrared Window. *Chem. Mater.* 28, 3041–3050.
- Kurman, R.J., and Shih, I.-M. (2010). The Origin and Pathogenesis of Epithelial Ovarian Cancer- a Proposed Unifying Theory. *Am. J. Surg. Pathol.* 34, 433–443.
- Labidi-Galy, S.I., Papp, E., Hallberg, D., Niknafs, N., Adleff, V., Noe, M., Bhattacharya, R., Novak, M., Jones, S., Phallen, J., et al. (2017). High grade serous ovarian carcinomas originate in the fallopian tube. *Nat. Commun.* 8, 1093.
- Lacroix, L.-M., Delpech, F., Nayral, C., Lachaize, S., and Chaudret, B. (2013). New generation of magnetic and luminescent nanoparticles for in vivo real-time imaging. *Interface Focus* 3, 20120103.
- Lakhman, Y., Akin, O., Sohn, M.J., Zheng, J., Moskowitz, C.S., Iyer, R.B., Barakat, R.R., Sabbatini, P.J., Chi, D.S., and Hricak, H. (2012). Early postoperative CT as a prognostic biomarker in patients with advanced ovarian, tubal, and primary peritoneal cancer deemed optimally debulked at primary cytoreductive surgery. *AJR Am. J. Roentgenol.* 198, 1453–1459.
- Landau, M.J., Gould, D.J., and Patel, K.M. (2016). Advances in fluorescent-image guided surgery. *Ann. Transl. Med.* 4.
- Larkin, J.M., Edwards, W.S., Smith, D.E., and Clark, P.J. (1977). Systemic thermotherapy: description of a method and physiologic tolerance in clinical subjects. *Cancer* 40, 3155–3159.
- Lee, J.H., Sahu, A., Jang, C., and Tae, G. (2015). The effect of ligand density on in vivo tumor targeting of nanographene oxide. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 209, 219–228.
- Leevy, C.M., Mendenhall, C.L., Lesko, W., and Howard, M.M. (1962). ESTIMATION OF HEPATIC BLOOD FLOW WITH INDOCYANINE GREEN*. *J. Clin. Invest.* 41, 1169–1179.
- Lei, H., Hofferberth, S.C., Liu, R., Colby, A., Tevis, K.M., Catalano, P., Grinstaff, M.W., and Colson, Y.L. (2015). Paclitaxel-loaded expansile nanoparticles enhance chemotherapeutic drug delivery

- in mesothelioma 3-dimensional multicellular spheroids. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* *149*, 1417-1425.e1.
- Li, J.J., Wang, Y.A., Guo, W., Keay, J.C., Mishima, T.D., Johnson, M.B., and Peng, X. (2003). Large-Scale Synthesis of Nearly Monodisperse CdSe/CdS Core/Shell Nanocrystals Using Air-Stable Reagents via Successive Ion Layer Adsorption and Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* *125*, 12567–12575.
- Libérale, G., Bourgeois, P., Larsimont, D., Moreau, M., Donckier, V., and Ishizawa, T. (2017). Indocyanine green fluorescence-guided surgery after IV injection in metastatic colorectal cancer: A systematic review. *Eur. J. Surg. Oncol. J. Eur. Soc. Surg. Oncol. Br. Assoc. Surg. Oncol.*
- Lichtman, J.W., and Conchello, J.-A. (2005). Fluorescence microscopy. *Nat. Methods* *2*, 910–919.
- Lieto, E., Galizia, G., Cardella, F., Mabilia, A., Basile, N., Castellano, P., Orditura, M., and Auricchio, A. (2018). Indocyanine Green Fluorescence Imaging-Guided Surgery in Primary and Metastatic Liver Tumors. *Surg. Innov.* *25*, 62–68.
- Lim, M.C., Seo, S.-S., Kang, S., Kim, S.K., Kim, S.H., Yoo, C.W., and Park, S.-Y. (2012). Intraoperative image-guided surgery for ovarian cancer. *Quant. Imaging Med. Surg.* *2*, 114–117.
- Linkov, P.A., Vokhmintsev, K.V., Samokhvalov, P.S., Laronze-Cochard, M., Sapi, J., and Nabiev, I.R. (2018). The Effect of Quantum Dot Shell Structure on Fluorescence Quenching By Acridine Ligand. *KnE Energy Phys.* *3*, 194–201.
- Liu, D., and Snee, P.T. (2011). Water-Soluble Semiconductor Nanocrystals Cap Exchanged with Metalated Ligands. *ACS Nano* *5*, 546–550.
- Liu, J., Erogbogbo, F., Yong, K.-T., Ye, L., Liu, J., Hu, R., Chen, H., Hu, Y., Yang, Y., Yang, J., et al. (2013a). Assessing Clinical Prospects of Silicon Quantum Dots: Studies in Mice and Monkeys. *ACS Nano* *7*, 7303–7310.
- Liu, W., Zhang, S., Wang, L., Qu, C., Zhang, C., Hong, L., Yuan, L., Huang, Z., Wang, Z., Liu, S., et al. (2011a). CdSe Quantum Dot (QD)-Induced Morphological and Functional Impairments to Liver in Mice. *PLOS ONE* *6*, e24406.
- Liu, X., Braun, G.B., Qin, M., Ruoslahti, E., and Sugahara, K.N. (2017). In vivo cation exchange in quantum dots for tumor-specific imaging. *Nat. Commun.* *8*, 343.
- Liu, Y., Ai, K., Yuan, Q., and Lu, L. (2011b). Fluorescence-enhanced gadolinium-doped zinc oxide quantum dots for magnetic resonance and fluorescence imaging. *Biomaterials* *32*, 1185–1192.
- Liu, Y., Njuguna, R., Matthews, T., Akers, W.J., Sudlow, G.P., Mondal, S.B., Tang, R., Gruev, V., and Achilefu, S. (2013b). Near-infrared fluorescence goggle system with complementary metal-oxide-semiconductor imaging sensor and see-through display. *J. Biomed. Opt.* *18*, 101303.
- Liu, Y., Endo, Y., Fujita, T., Ishibashi, H., Nishioka, T., Canbay, E., Li, Y., Ogura, S.-I., and Yonemura, Y. (2014). Cytoreductive surgery under aminolevulinic acid-mediated photodynamic diagnosis plus hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in patients with peritoneal carcinomatosis from ovarian cancer and primary peritoneal carcinoma: results of a phase I trial. *Ann. Surg. Oncol.* *21*, 4256–62.
- Lu, Y., and Low, P.S. (2002). Folate-mediated delivery of macromolecular anticancer therapeutic agents. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *54*, 675–693.
- Ma, N., Marshall, A.F., Gambhir, S.S., and Rao, J. (2010). Facile Synthesis, Silanization and Biodistribution of Biocompatible Quantum Dots. *Small Weinh. Bergstr. Ger.* *6*, 1520–1528.
- Ma, Y.-Y., Ding, H., and Xiong, H.-M. (2015). Folic acid functionalized ZnO quantum dots for targeted cancer cell imaging. *Nanotechnology* *26*, 305702.

- Maity, A.R., Saha, A., Roy, A., and Jana, N.R. (2013). Folic Acid Functionalized Nanoprobes for Fluorescence-, Dark-Field-, and Dual-Imaging-Based Selective Detection of Cancer Cells and Tissue. *ChemPlusChem* 78, 259–267.
- Markman, M. (2016). Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy in Ovarian Cancer: Where Do We Go From Here? *The Oncologist* 21, 529–531.
- Matsui, A., Tanaka, E., Choi, H.S., Winer, J.H., Kianzad, V., Gioux, S., Laurence, R.G., and Frangioni, J.V. (2010). Real-Time Intraoperative Near-Infrared Fluorescence Identification of the Extrahepatic Bile Ducts using Clinically-Available Contrast Agents. *Surgery* 148, 87–95.
- Matsumura, Y., and Maeda, H. (1986). A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res.* 46, 6387–6392.
- Matz, M., Coleman, M.P., Sant, M., Chirlaque, M.D., Visser, O., Gore, M., and Allemani, C. (2017). The histology of ovarian cancer: worldwide distribution and implications for international survival comparisons (CONCORD-2). *Gynecol. Oncol.* 144, 405–413.
- McGuire, W.P., Hoskins, W.J., Brady, M.F., Kucera, P.R., Partridge, E.E., Look, K.Y., Clarke-Pearson, D.L., and Davidson, M. (1996). Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer. *N. Engl. J. Med.* 334, 1–6.
- Meng, F., Liu, Y., Niu, J., and Lin, W. (2017). A novel fluorescent probe with a large Stokes shift for real-time imaging mitochondria in different living cell lines. *Tetrahedron Lett.* 58, 3287–3293.
- Mishra, A., Mishra, R., Gottschalk, S., Pal, R., Sim, N., Engelmann, J., Goldberg, M., and Parker, D. (2014). Microscopic Visualization of Metabotropic Glutamate Receptors on the Surface of Living Cells Using Bifunctional Magnetic Resonance Imaging Probes. *ACS Chem. Neurosci.* 5, 128–137.
- Moore, G.E. (1947). Fluorescein as an Agent in the Differentiation of Normal and Malignant Tissues. *Science* 106, 130–131.
- Munnell, E.W. (1968). The changing prognosis and treatment in cancer of the ovary: A report of 235 patients with primary ovarian carcinoma 1952–1961. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 100, 790–805.
- Munnell, E.W. (1969). Surgical treatment of ovarian carcinoma. *Clin. Obstet. Gynecol.* 12, 980–992.
- Nagaya, T., Nakamura, Y.A., Choyke, P.L., and Kobayashi, H. (2017). Fluorescence-Guided Surgery. *Front. Oncol.* 7.
- Nakamura, Y., Mochida, A., Choyke, P.L., and Kobayashi, H. (2016). Nanodrug Delivery: Is the Enhanced Permeability and Retention Effect Sufficient for Curing Cancer? *Bioconjug. Chem.* 27, 2225–2238.
- Neuwirth, M.G., Alexander, H.R., and Karakousis, G.C. (2016). Then and now: cytoreductive surgery with hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC), a historical perspective. 7, 18–28.
- Ngan, H.Y., Choo, Y.C., Cheung, M., Wong, L.C., Ma, H.K., Collins, R., Fung, C., Ng, C.S., Wong, V., and Ho, H.C. (1989). A randomized study of high-dose versus low-dose cis-platinum combined with cyclophosphamide in the treatment of advanced ovarian cancer. Hong Kong Ovarian Carcinoma Study Group. *Chemotherapy* 35, 221–227.
- Okuda, T., Yoshioka, H., and Kato, A. (2012). Fluorescence-guided surgery for glioblastoma multiforme using high-dose fluorescein sodium with excitation and barrier filters. *J. Clin. Neurosci. Off. J. Neurosurg. Soc. Australas.* 19, 1719–1722.

- Oostendorp, M., Douma, K., Hackeng, T.M., Post, M.J., van Zandvoort, M.A.M.J., and Backes, W.H. (2010). Gadolinium-labeled quantum dots for molecular magnetic resonance imaging: R1 versus R2 mapping. *Magn. Reson. Med.* *64*, 291–298.
- Ozols, R.F., Bundy, B.N., Greer, B.E., Fowler, J.M., Clarke-Pearson, D., Burger, R.A., Mannel, R.S., DeGeest, K., Hartenbach, E.M., and Baergen, R. (2003). Phase III Trial of Carboplatin and Paclitaxel Compared With Cisplatin and Paclitaxel in Patients With Optimally Resected Stage III Ovarian Cancer: A Gynecologic Oncology Group Study. *J. Clin. Oncol.* *21*, 3194–3200.
- Parker, N., Turk, M.J., Westrick, E., Lewis, J.D., Low, P.S., and Leamon, C.P. (2005). Folate receptor expression in carcinomas and normal tissues determined by a quantitative radioligand binding assay. *Anal. Biochem.* *338*, 284–293.
- Paster, E.V., Villines, K.A., and Hickman, D.L. (2009). Endpoints for Mouse Abdominal Tumor Models: Refinement of Current Criteria. *Comp. Med.* *59*, 234–241.
- Patel, C.M., Sahdev, A., and Reznick, R.H. (2011). CT, MRI and PET imaging in peritoneal malignancy. *Cancer Imaging* *11*, 123–139.
- Petrillo, M., Pedone Anchora, L., Tortorella, L., Fanfani, F., Gallotta, V., Pacciani, M., Scambia, G., and Fagotti, A. (2014). Secondary cytoreductive surgery in patients with isolated platinum-resistant recurrent ovarian cancer: a retrospective analysis. *Gynecol. Oncol.* *134*, 257–261.
- Phillips, E., Penate-Medina, O., Zanzonico, P.B., Carvajal, R.D., Mohan, P., Ye, Y., Humm, J., Gönen, M., Kalaigian, H., Schöder, H., et al. (2014). Clinical translation of an ultras-small inorganic optical-PET imaging nanoparticle probe. *Sci. Transl. Med.* *6*, 260ra149.
- Pic, E., Pons, T., Bezdetsnaya, L., Leroux, A., Guillemin, F., Dubertret, B., and Marchal, F. (2010). Fluorescence imaging and whole-body biodistribution of near-infrared-emitting quantum dots after subcutaneous injection for regional lymph node mapping in mice. *Mol. Imaging Biol. MIB Off. Publ. Acad. Mol. Imaging* *12*, 394–405.
- Piek, J.M., van Diest, P.J., Zweemer, R.P., Kenemans, P., and Verheijen, R.H. (2001). Tubal ligation and risk of ovarian cancer. *Lancet Lond. Engl.* *358*, 844.
- Pons, T., Pic, E., Lequeux, N., Cassette, E., Bezdetsnaya, L., Guillemin, F., Marchal, F., and Dubertret, B. (2010). Cadmium-free CuInS₂/ZnS quantum dots for sentinel lymph node imaging with reduced toxicity. *ACS Nano* *4*, 2531–2538.
- Pretorius, R.G., Petrilli, E.S., Kean, C.K., Ford, L.C., Hoeschele, J.D., and Lagasse, L.D. (1981). Comparison of the iv and ip routes of administration of cisplatin in dogs. *Cancer Treat. Rep.* *65*, 1055–1062.
- Przysiecka, I., Jucja, Michalska, M., Nowaczyk, G., Peplińska, B., Jesionowski, T., Schneider, R., and Jurga, S. (2016). iRGD peptide as effective transporter of CuInZn_xS_{2+x} quantum dots into human cancer cells. *Colloids Surf. B Biointerfaces* *146*, 9–18.
- Quek, C.-H., Leong, K.W., Quek, C.-H., and Leong, K.W. (2012). Near-Infrared Fluorescent Nanoprobes for in Vivo Optical Imaging. *Nanomaterials* *2*, 92–112.
- Raabe, A., Beck, J., Gerlach, R., Zimmermann, M., and Seifert, V. (2003). Near-infrared Indocyanine Green Video Angiography: A New Method for Intraoperative Assessment of Vascular Flow. *Neurosurgery* *52*, 132–139.
- Reinhart, M.B., Huntington, C.R., Blair, L.J., Heniford, B.T., and Augenstein, V.A. (2016). Indocyanine Green: Historical Context, Current Applications, and Future Considerations. *Surg. Innov.* *23*, 166–175.
- Reiss, P., Protière, M., and Li, L. (2009). Core/Shell Semiconductor Nanocrystals. *Small* *5*, 154–168.

- Renguo Xie, Ute Kolb, Jixue Li, Thomas Basché, and Alf Mews*, † (2005). Synthesis and Characterization of Highly Luminescent CdSe-Core CdS/Zn_{0.5}Cd_{0.5}S/ZnS Multishell Nanocrystals.
- Rizvi, S.B., Rouhi, S., Taniguchi, S., Yang, S.Y., Green, M., Keshtgar, M., and Seifalian, A.M. (2014). Near-infrared quantum dots for HER2 localization and imaging of cancer cells. *Int. J. Nanomedicine* 9, 1323–1337.
- Rodriguez, E.A., Wang, Y., Crisp, J.L., Vera, D.R., Tsien, R.Y., and Ting, R. (2016). New Dioxaborolane Chemistry Enables [18F]-Positron-Emitting, Fluorescent [18F]-Multimodality Biomolecule Generation from the Solid Phase. *Bioconjug. Chem.* 27, 1390–1399.
- Roggers, R., Kanvinde, S., Boonsith, S., and Oupický, D. (2014). The practicality of mesoporous silica nanoparticles as drug delivery devices and progress toward this goal. *AAPS PharmSciTech* 15, 1163–71.
- Rogosnitzky, M., and Branch, S. (2016). Gadolinium-based contrast agent toxicity: a review of known and proposed mechanisms. *Biometals* 29, 365–376.
- Rose, A. (1946). A Unified Approach to the Performance of Photographic Film, Television Pickup Tubes, and the Human Eye. *J. Soc. Motion Pict. Eng.* 47, 273–294.
- Rossof, A.H., Talley, R.W., Stephens, R., Thigpen, T., Samson, M.K., Groppe, C., Eyre, H.J., and Fisher, R. (1979). Phase II evaluation of cis-dichlorodiammineplatinum(II) in advanced malignancies of the genitourinary and gynecologic organs: a Southwest Oncology Group Study. *Cancer Treat. Rep.* 63, 1557–1564.
- Sabella, S., Carney, R.P., Brunetti, V., Malvindi, M.A., Al-Juffali, N., Vecchio, G., Janes, S.M., Bakr, O.M., Cingolani, R., Stellacci, F., et al. (2014). A general mechanism for intracellular toxicity of metal-containing nanoparticles. *Nanoscale* 6, 7052–7061.
- Sato, S., and Itamochi, H. (2014). Neoadjuvant chemotherapy in advanced ovarian cancer: latest results and place in therapy. *Ther. Adv. Med. Oncol.* 6, 293–304.
- Saxena, V., Sadoqi, M., and Shao, J. (2003). Degradation kinetics of indocyanine green in aqueous solution. *J. Pharm. Sci.* 92, 2090–2097.
- Schorge, J.O., McCann, C., and Del Carmen, M.G. (2010). Surgical Debulking of Ovarian Cancer: What Difference Does It Make? *Rev. Obstet. Gynecol.* 3, 111–117.
- Schwartz, P.E. (2008). What is the role of neoadjuvant chemotherapy in the management of ovarian cancer? *Oncol. Williston Park N* 22, 1118–1125; discussion 1130, 1132, 1134.
- Shibasaki, Y., Morita, Y., Sakaguchi, T., and Konno, H. (2016). Indocyanine Green-Related Transporters in Hepatocellular Carcinoma. *SpringerLink* 351–362.
- Shingleton, W.W., Parker, R.T., and Mahaley, S. (1961). Abdominal perfusion for cancer chemotherapy with hypothermia and hyperthermia. *Surgery* 50, 260–265.
- Shroff, R., Brooks, R.A., Zighelboim, I., Powell, M.A., Thaker, P.H., Mutch, D.G., and Massad, L.S. (2011). The utility of peritoneal biopsy and omentectomy in the upstaging of apparent early ovarian cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer Off. J. Int. Gynecol. Cancer Soc.* 21, 1208–1212.
- Siegel, R.L., Miller, K.D., and Jemal, A. (2018). Cancer statistics, 2018. *CA. Cancer J. Clin.* 68, 7–30.
- Sitbon, G., Bouccara, S., Tasso, M., Francois, A., Bezdetsnaya, L., Marchal, F., Beaumont, M., and Pons, T. (2014). Multimodal Mn-doped I-III-VI quantum dots for near infrared fluorescence and magnetic resonance imaging: from synthesis to in vivo application. *Nanoscale* 6, 9264–9272.

- Smith, A.M., Duan, H., Rhyner, M.N., Ruan, G., and Nie, S. (2006). A systematic examination of surface coatings on the optical and chemical properties of semiconductor quantum dots. *Phys. Chem. Chem. Phys. PCCP* 8, 3895–3903.
- Sokalska, A., Timmerman, D., Testa, A.C., Van Holsbeke, C., Lissoni, A.A., Leone, F.P.G., Jurkovic, D., and Valentin, L. (2009). Diagnostic accuracy of transvaginal ultrasound examination for assigning a specific diagnosis to adnexal masses. *Ultrasound Obstet. Gynecol. Off. J. Int. Soc. Ultrasound Obstet. Gynecol.* 34, 462–470.
- Soo Choi, H., Liu, W., Misra, P., Tanaka, E., Zimmer, J.P., Itty Ipe, B., Bawendi, M.G., and Frangioni, J.V. (2007). Renal clearance of quantum dots. *Nat. Biotechnol.* 25, 1165–1170.
- Soper, J.T., Johnson, P., Johnson, V., Berchuck, A., and Clarke-Pearson, D.L. (1992). Comprehensive restaging laparotomy in women with apparent early ovarian carcinoma. *Obstet. Gynecol.* 80, 949–953.
- Steinbacher (2008). Gd-Labeled Microparticles in MRI: In Vivo Imaging of Microparticles after Intraperitoneal Injection Jeremy. October 141, 520–529.
- Stewart, M.H., Susumu, K., Mei, B.C., Medintz, I.L., Delehanty, J.B., Blanco-Canosa, J.B., Dawson, P.E., and Mattoussi, H. (2010). Multidentate Poly(ethylene glycol) Ligands Provide Colloidal Stability to Semiconductor and Metallic Nanocrystals in Extreme Conditions. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 9804–9813.
- Sugarbaker, P.H., and Jablonski, K.A. (1995). Prognostic features of 51 colorectal and 130 appendiceal cancer patients with peritoneal carcinomatosis treated by cytoreductive surgery and intraperitoneal chemotherapy. *Ann. Surg.* 221, 124–132.
- Sugarbaker, P.H., Yu, W., and Yonemura, Y. (2003). Gastrectomy, peritonectomy, and perioperative intraperitoneal chemotherapy: the evolution of treatment strategies for advanced gastric cancer. *Semin. Surg. Oncol.* 21, 233–248.
- Sun, M., Sundaresan, G., Jose, P., Yang, L., Hoffman, D., Lamichhane, N., and Zweit, J. (2014). Highly stable intrinsically radiolabeled indium-111 quantum dots with multidentate zwitterionic surface coating: dual modality tool for biological imaging. *J. Mater. Chem. B* 2, 4456–4466.
- Sun, Y., Hatami, N., Yee, M., Phipps, J., Elson, D.S., Gorin, F., Schrot, R.J., and Marcu, L. (2010). Fluorescence lifetime imaging microscopy for brain tumor image-guided surgery. *J. Biomed. Opt.* 15, 056022.
- Suriamoorthy, P., Zhang, X., Hao, G., Joly, A.G., Singh, S., Hossu, M., Sun, X., and Chen, W. (2010). Folic acid-CdTe quantum dot conjugates and their applications for cancer cell targeting. *Cancer Nanotechnol.* 1, 19–28.
- Tasso, M., Giovanelli, E., Zala, D., Bouccara, S., Fragola, A., Hanafi, M., Lenkei, Z., Pons, T., and Lequeux, N. (2015a). Sulfobetaine-Vinylimidazole Block Copolymers: A Robust Quantum Dot Surface Chemistry Expanding Bioimaging's Horizons. *ACS Nano* 9, 11479–11489.
- Tasso, M., Singh, M.K., Giovanelli, E., Fragola, A., Loriette, V., Regairaz, M., Dautry, F., Treussart, F., Lenkei, Z., Lequeux, N., et al. (2015b). Oriented Bioconjugation of Unmodified Antibodies to Quantum Dots Capped with Copolymeric Ligands as Versatile Cellular Imaging Tools. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 7, 26904–26913.
- Tentes, A. -a. K., Tripsiannis, G., Markakidis, S.K., Karanikiotis, C.N., Tzegas, G., Georgiadis, G., and Avgidou, K. (2003). Peritoneal cancer index: a prognostic indicator of survival in advanced ovarian cancer. *Eur. J. Surg. Oncol. J. Eur. Soc. Surg. Oncol. Br. Assoc. Surg. Oncol.* 29, 69–73.

- Teraphongphom, N., Kong, C.S., Warram, J.M., and Rosenthal, E.L. (2017). Specimen mapping in head and neck cancer using fluorescence imaging. *Laryngoscope Investig. Otolaryngol.* *2*, 447–452.
- Thigpen, T., Shingleton, H., Homesley, H., LaGasse, L., and Blessing, J. (1979). cis-Dichlorodiammineplatinum(II) in the treatment of gynecologic malignancies: phase II trials by the Gynecologic Oncology Group. *Cancer Treat. Rep.* *63*, 1549–1555.
- Toffoli, G., Cernigoi, C., Russo, A., Gallo, A., Bagnoli, M., and Boiocchi, M. (1997). Overexpression of folate binding protein in ovarian cancers. *Int. J. Cancer* *74*, 193–198.
- Topaloglu, N., Gulsoy, M., and Yuksel, S. (2013). Antimicrobial photodynamic therapy of resistant bacterial strains by indocyanine green and 809-nm diode laser. *Photomed. Laser Surg.* *31*, 155–162.
- Torres, I.J., Litterst, C.L., and Guarino, A.M. (1978). Transport of model compounds across the peritoneal membrane in the rat. *Pharmacology* *17*, 330–340.
- Trapiella-Alfonso, L., Pons, T., Lequeux, N., Leleu, L., Grimaldi, J., Tasso, M., Oujagir, E., Seguin, J., d’Orlyé, F., Girard, C., et al. (2018). Clickable-Zwitterionic Copolymer Capped-Quantum Dots for in Vivo Fluorescence Tumor Imaging. *ACS Appl. Mater. Interfaces* *10*, 17107–17116.
- Trimble, E.L., and Christian, M.C. (2006). Intraperitoneal chemotherapy for women with advanced epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol. Oncol.* *100*, 3–4.
- Tummers, Q.R.J.G., Hoogstins, C.E.S., Peters, A.A.W., de Kroon, C.D., Trimbos, J.B.M.Z., van de Velde, C.J.H., Frangioni, J.V., Vahrmeijer, A.L., and Gaarenstroom, K.N. (2015). The Value of Intraoperative Near-Infrared Fluorescence Imaging Based on Enhanced Permeability and Retention of Indocyanine Green: Feasibility and False-Positives in Ovarian Cancer. *Plos One* *10*, e0129766.
- Tyrakowski, C.M., and Snee, P.T. (2014). A primer on the synthesis, water-solubilization, and functionalization of quantum dots, their use as biological sensing agents, and present status. *Phys. Chem. Chem. Phys.* *PCCP* *16*, 837–855.
- Ueland, F.R. (2017). A Perspective on Ovarian Cancer Biomarkers: Past, Present and Yet-To-Come. *Diagnostics* *7*.
- Umut, E. (2013). Surface Modification of Nanoparticles Used in Biomedical Applications. *Mod. Surf. Eng. Treat.*
- Vasey, P.A. (2003). Resistance to chemotherapy in advanced ovarian cancer: mechanisms and current strategies. *Br. J. Cancer* *89 Suppl 3*, S23-28.
- Veys, I., Pop, F.-C., Vankerckhove, S., Barbieux, R., Chintinne, M., Moreau, M., Nogaret, J.-M., Larsimont, D., Donckier, V., Bourgeois, P., et al. (2018). ICG-fluorescence imaging for detection of peritoneal metastases and residual tumoral scars in locally advanced ovarian cancer: A pilot study. *J. Surg. Oncol.* *117*, 228–235.
- Walling, M.A., Novak, J.A., and Shepard, J.R.E. (2009). Quantum Dots for Live Cell and In Vivo Imaging. *Int. J. Mol. Sci.* *10*, 441–491.
- Walsh, C. (2018). Targeted therapy for ovarian cancer: the rapidly evolving landscape of PARP inhibitor use. *Minerva Ginecol.* *70*, 150–170.
- Wang, J., Tan, X., Pang, X., Liu, L., Tan, F., and Li, N. (2016). MoS₂ Quantum Dot@Polyaniline Inorganic–Organic Nanohybrids for in Vivo Dual-Modal Imaging Guided Synergistic Photothermal/Radiation Therapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* *8*, 24331–24338.

- Wang, S., Jarrett, B.R., Kauzlarich, S.M., and Louie, A.Y. (2007). Core/Shell Quantum Dots with High Relaxivity and Photoluminescence for Multimodality Imaging. *J. Am. Chem. Soc.* *129*, 3848–3856.
- Wang, Y., Mang, M., Wang, Y., Wang, L., Klein, R., Kong, B., and Zheng, W. (2015). Tubal origin of ovarian endometriosis and clear cell and endometrioid carcinoma. *Am. J. Cancer Res.* *5*, 869–879.
- Wegner, K.D., and Hildebrandt, N. (2015). Quantum dots: bright and versatile in vitro and in vivo fluorescence imaging biosensors. *Chem. Soc. Rev.* *44*, 4792–4834.
- Wenzel, L.B., Huang, H.Q., Armstrong, D.K., Walker, J.L., Cella, D., and Gynecologic Oncology Group (2007). Health-related quality of life during and after intraperitoneal versus intravenous chemotherapy for optimally debulked ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *25*, 437–443.
- Wibowo, A.S., Singh, M., Reeder, K.M., Carter, J.J., Kovach, A.R., Meng, W., Ratnam, M., Zhang, F., and Dann, C.E. (2013). Structures of human folate receptors reveal biological trafficking states and diversity in folate and antifolate recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 15180–15188.
- Wu, M., Mukherjee, P., Lamont, D.N., and Waldeck, D.H. (2010). Electron Transfer and Fluorescence Quenching of Nanoparticle Assemblies. *J. Phys. Chem. C* *114*, 5751–5759.
- Wu, X., Liu, H., Liu, J., Haley, K.N., Treadway, J.A., Larson, J.P., Ge, N., Peale, F., and Bruchez, M.P. (2003). Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. *Nat. Biotechnol.* *21*, 41–46.
- Xi, L., and Jiang, H. (2016). Image-guided surgery using multimodality strategy and molecular probes. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* *8*, 46–60.
- Yaginuma, Y., and Westphal, H. (1992). Abnormal structure and expression of the p53 gene in human ovarian carcinoma cell lines. *Cancer Res.* *52*, 4196–4199.
- Yang, H., Santra, S., Walter, G.A., and Holloway, P.H. (2006). GdIII-Functionalized Fluorescent Quantum Dots as Multimodal Imaging Probes. *Adv. Mater.* *18*, 2890–2894.
- Yang, Y.A., Wu, H., Williams, K.R., and Cao, Y.C. (2005). Synthesis of CdSe and CdTe Nanocrystals without Precursor Injection. *Angew. Chem. Int. Ed.* *44*, 6712–6715.
- Yin, H., Yang, J., Zhang, Q., Yang, J., Wang, H., Xu, J., and Zheng, J. (2017a). iRGD as a tumor-penetrating peptide for cancer therapy (Review). *Mol. Med. Rep.* *15*, 2925–2930.
- Yin, Y., Tan, Z., Hu, L., Yu, S., Liu, J., and Jiang, G. (2017b). Isotope Tracers To Study the Environmental Fate and Bioaccumulation of Metal-Containing Engineered Nanoparticles: Techniques and Applications. *Chem. Rev.* *117*, 4462–4487.
- Yoo, J.-W., Chambers, E., and Mitragotri, S. (2010). Factors that Control the Circulation Time of Nanoparticles in Blood: Challenges, Solutions and Future Prospects.
- Yue, C., Liu, P., Zheng, M., Zhao, P., Wang, Y., Ma, Y., and Cai, L. (2013). IR-780 dye loaded tumor targeting theranostic nanoparticles for NIR imaging and photothermal therapy. *Biomaterials* *34*, 6853–6861.
- Zhang, C., Ji, X., Zhang, Y., Zhou, G., Ke, X., Wang, H., Tinnefeld, P., and He, Z. (2013a). One-pot synthesized aptamer-functionalized CdTe:Zn²⁺ quantum dots for tumor-targeted fluorescence imaging in vitro and in vivo. *Anal. Chem.* *85*, 5843–5849.

- Zhang, Y., Liu, J.-M., and Yan, X.-P. (2013b). Self-assembly of folate onto polyethyleneimine-coated CdS/ZnS quantum dots for targeted turn-on fluorescence imaging of folate receptor overexpressed cancer cells. *Anal. Chem.* *85*, 228–234.
- Zhao, J., Chen, J., Ma, S., Liu, Q., Huang, L., Chen, X., Lou, K., and Wang, W. (2018). Recent developments in multimodality fluorescence imaging probes. *Acta Pharm. Sin. B* *8*, 320–338.
- (2011). Folic acid-conjugated core/shell ZnS:Mn/ZnS quantum dots as targeted probes for two photon fluorescence imaging of cancer cells. *Acta Biomater.* *7*, 1327–1338.

7. Production scientifique

Publications

Mangeolle, T., Yakavets, I., Marchal, S., Debayle, M., Pons, T., Bezdetnaya, L., Marchal, F. (2018). Fluorescent Nanoparticles for the Guided Surgery of Ovarian Peritoneal Carcinomatosis. *Nanomaterials*. 8, 572. Acceptée le 22 juillet 2018.

Mangeolle, T., Yakavets, I., Lequeux, N., Pons, T., Bezdetnaya, L., Marchal, F. (2018). The targeting ability of fluorescent quantum dots to the folate receptor rich tumors. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. Soumise le 23 janvier 2019.

Communications orales et par poster

Mangeolle T., Pons T., Marchal F. *Multimodal nanoprobe for guided surgery of ovarian peritoneal carcinomatosis*. DocScilor 4th edition. Nancy, France. 15 juin 2017. Communication orale en langue anglaise

Mangeolle T., Pons T., Marchal F. *Multimodal nanoprobe for guided surgery of ovarian peritoneal carcinomatosis*. Open Readings 60th edition. Vilnius, Lituanie. 14-17 mars 2017. Poster en langue anglaise.

Mangeolle T. Nano-sondes multimodales pour guider la chirurgie des carcinomatoses péritonéales d'origine ovarienne. 4^{ème} Journée d'échange sur la recherche en cancérologie en Lorraine. Nancy, France. 17 Novembre 2017. Communication orale en langue Française.

Mangeolle T., Pons T., Marchal F. Nano-sondes multimodales pour guider la chirurgie des carcinomatoses péritonéales d'origine ovarienne. 10^{ème} Forum Cancéropole Grand-Est. Nancy, France. 24-26 novembre 2016. Communication orale en langue Française.

Mangeolle T., Pons T., Marchal F. Nano-sondes multimodales pour guider la chirurgie des carcinomatoses péritonéales d'origine ovarienne. Journée de l'école doctorale BioSE. Novembre 2016. Communication orale en langue Française. Prix des doctorants.

Manuscript Details

Manuscript number	PDPDT_2019_44
Title	THE TARGETING ABILITY OF FLUORESCENT QUANTUM DOTS TO THE FOLATE RECEPTOR RICH TUMORS
Article type	Research Paper

Abstract

Background. Quantum dots (QDs) bring new insights in cancer theranostics. Exceptional brightness together with the simple possibility to modify surface with targeting molecules make QDs attractive agents in fluorescence guided surgery and photodynamic therapy. Currently, many targeted QDs have been developed for theranostic purpose. However, their targeting ability was tested mainly in two dimensional monolayer tumor cell models, while our study includes 3D tumor model reflecting the specificity of in vivo tumor environment. Methods. Core/multilayer shell CdSe/CdS/ZnS QDs were conjugated with folic acid (FA) and characterized spectroscopically. Cytotoxicity of QDs on KB and A549 cells lines were evaluated using the MTT assay. Cellular uptake of QDs was assessed by epifluorescent microscopy. To study the distribution of QDs in tumor tissue, KB spheroids were prepared by means of the liquid overlay technique and then frozen cut of spheroids treated with QDs were imaged by epifluorescence microscopy. Results. We confirmed the specificity of QD-FA for the folic acid receptor positive KB cells. In 3D tumor spheroid model we demonstrated uptake enhancement of QD-FA compared with non-targeted QD. It was demonstrated that penetration profiles were similar for both QDs with penetration depth never exceeding 100 μm . Conclusions. We have demonstrated the effectiveness of FA conjugated QDs to target tumor spheroids thus confirming the crucial role of FR α receptor as a target. Further improvement of QD-FA targeting ability could be performed using dual targeting different targeting agents, such as FA and cyclic RGD.

Keywords	Photodiagnosis; nanoparticles; quantum dot; folic acid; multicellular tumor spheroids.
Corresponding Author	Lina Bezdetsnaya-Bolotina
Corresponding Author's Institution	Université de Lorraine
Order of Authors	Tristan Mangeolle, Ilya Yakavets, Nicolas Lequeux, Thomas Pons, Lina Bezdetsnaya-Bolotina, Frédéric Marchal
Suggested reviewers	Victor Loshchenov, Raphaël Schneider, Vladimir Sukhorukov

Submission Files Included in this PDF

File Name [File Type]

cover letter.docx [Cover Letter]

highlights.docx [Highlights]

Title page.docx [Title Page (with Author Details)]

MS.docx [Manuscript File]

fig1.tif [Figure]

fig2.tif [Figure]

fig3.tif [Figure]

fig4.tif [Figure]

fig5.tif [Figure]

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.

Pr. Ron ALLISON
Editor-in-Chief
Photodiagnosis and Photodynamic Therapy

Nancy, January 22nd, 2019

Dear Pr. Allison,

We are pleased to submit an original research article entitled “**The targeting ability of fluorescent quantum dots to the folate receptor rich tumors**” by *Tristan Mangeolle et al.* for consideration for publication in *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* journal.

In the present work we developed the quantum dots conjugated to folic acid, assessing their targeting ability in multicellular tumor spheroids made from FR- α -positive cancer cells. We have demonstrated the effectiveness of the quantum dots conjugated with folic acid to target tumor spheroids thus confirming the crucial role of folate receptor as a target.

Thank you for your considerations.

Truly yours,

Lina BEZDETAY, MD, PhD

Highlights

- The Quantum Dots-Folic Acid conjugates are selective to KB cells.
- Targeting ability of folic acid quantum dots was confirmed in 3D spheroid model.
- The penetration profile for both types of quantum dots were similar in spheroids
- The crucial role of FR α receptor as a target was confirmed *in vitro*

THE TARGETING ABILITY OF FLUORESCENT QUANTUM DOTS TO THE FOLATE RECEPTOR RICH TUMORS

Tristan Mangeolle^{a,b}, Ilya Yakavets^{a,b,c}, Nicolas Lequeux^d, Thomas Pons^d, Lina Bezdetsnaya^{a,b,*}, Frédéric Marchal^{a,e}

^a Centre de Recherche en Automatique de Nancy, Centre National de la Recherche Scientifique UMR 7039, Université de Lorraine, Campus Sciences, Boulevard des Aiguillettes, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France; tristanmangeolle1990@hotmail.fr;

^b Research Department, Institut de Cancérologie de Lorraine, 6 avenue de Bourgogne, 54519 Vandoeuvre-lès-Nancy, France ; i.yakavets@nancy.unicancer.fr (I.Y.); l.bolotine@nancy.unicancer.fr (L.B.); f.marchal@nancy.unicancer.fr (F.M.);

^c Laboratory of Biophysics and Biotechnology, Belarusian State University, 4 Nezavisimosti Avenue, 220030 Minsk, Belarus

^d LPEM, ESPCI Paris, PSL Research University ; CNRS UMR 8213 ; Sorbonne Université, 10, rue Vauquelin, 75005 Paris, France;

nicolas.lequeux@espci.fr (N.L); thomas.pons@espci.fr (T.P.)

^e Surgical Department, Institut de Cancérologie de Lorraine, 6 avenue de Bourgogne, 54519 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

* Corresponding author. E-mail : l.bolotine@nancy.unicancer.fr; Tel.: +33-(0)3-83-59-84-51

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59

Abstract

Background. Quantum dots (QDs) bring new insights in cancer theranostics. Exceptional brightness together with the simple possibility to modify surface with targeting molecules make QDs attractive agents in fluorescence guided surgery and photodynamic therapy. Currently, many targeted QDs have been developed for theranostic purpose. However, their targeting ability was tested mainly in two dimensional monolayer tumor cell models, while our study includes 3D tumor model reflecting the specificity of *in vivo* tumor environment.

Methods. Core/multilayer shell CdSe/CdS/ZnS QDs were conjugated with folic acid (FA) and characterized spectroscopically. Cytotoxicity of QDs on KB and A549 cells lines were evaluated using the MTT assay. Cellular uptake of QDs was assessed by epifluorescent microscopy. To study the distribution of QDs in tumor tissue, KB spheroids were prepared by means of the liquid overlay technique and then frozen cut of spheroids treated with QDs were imaged by epifluorescence microscopy.

Results. We confirmed the specificity of QD-FA for the folic acid receptor positive KB cells. In 3D tumor spheroid model we demonstrated uptake enhancement of QD-FA compared with non-targeted QD. It was demonstrated that penetration profiles were similar for both QDs with penetration depth never exceeding 100 μm .

Conclusions. We have demonstrated the effectiveness of FA conjugated QDs to target tumor spheroids thus confirming the crucial role of FR α receptor as a target. Further improvement of QD-FA targeting ability could be performed using dual targeting different targeting agents, such as FA and cyclic RGD.

Keywords: photodiagnosis; nanoparticles; quantum dot; folic acid; multicellular tumor spheroids.

60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118

1. Introduction

Cancer is the second most important cause of death worldwide [1]. Current therapeutic improvement mainly focuses on tumors targeting, where nanoparticles (NPs) show superior properties compared to current drugs. NPs display better tumor targeting through both passive and active targeting, large surface to volume ratio and versatile surface chemistry. Moreover, they can associate therapeutics and imaging capabilities of drugs for theranostic aims [2]. Among various types of inorganic NPs, quantum dots (QDs) have arguably affected bioimaging or drug delivery research, more than any other nanomaterial [3]. QDs are fluorescent nanoparticles with exceptional brightness, strong photostability, and adaptable surface chemistry. A great deal of current research and clinical trials is devoted to the assessment of the potential use of QDs as an alternative fluorescent marker [4–8]. Moreover, by using QDs fluorescent probe for both fluorescence guided surgery and as a drug carrier, QDs can achieve theranostic purpose [9,10].

However, poor water-solubility and disappointing biocompatibility of the high-quality hydrophobic QDs have limited their biological applications. It has been reported that water transfer with amphiphilic polymer (e.g. with poly(ethylene-glycol)) encapsulation and ligand exchange provides promising potential to overcome the hydrophobicity barrier and to improve the biological properties of bare uncoated QDs. At the same time, the polymer coating limits the accumulation and selectivity of NPs [11]. Active targeting could be a solution to overcome the lack of QD selectivity. Efficient tumor targeting by QDs can be achieved using tumor-specific ligands such as antibodies, peptides, sugars or vitamins. In the present work, we used QDs coated by a zwitterionic copolymer ligand to assess the improvement of QD selectivity upon their conjugation with folic acid (FA) as a targeting agent.

To the best of our knowledge, FA has attracted wide attention as a targeting agent for tumor detection and drug delivery [12,13]. FA is a highly stable, compatible with both organic and aqueous solvent, possesses non-immunogenic character, low molecular weight and has the ability to conjugate with a wide variety of molecules [14]. Moreover, the folate receptor- α (FR- α) is a well-known cancer cell associated protein which can actively internalize folate bound NPs via endocytosis [13]. FR- α is overexpressed in many solid malignancies, such as breast, ovary and lung cancer [15–17].

Many drugs, nucleic acid, paramagnetic or fluorescent imaging agents have been associated with folate, few of them are currently undergoing clinical trials [18]. Moreover, many folate conjugated QDs (QD-FA) were developed for therapeutics purpose [19–22]. As an example, QD-FA was even proposed as a potential photosensitizer in photodynamic therapy of cancer [23].

119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177

It is worth noting that previous studies were mainly focused on synthesis and active targeting of QD-FA on cell monolayer models, which do not reflect accurately the microenvironment of *in vivo* tumors [24]. The novelty of the present study is the use of three dimensional (3D) multicellular tumor spheroids (MCTSs), which resemble small avascular tumors [25], thus providing better insight into targeting ability and intratumor penetration of nanomedicines. In the present work, we developed the QD conjugated to FA, assessing their targeting ability in MCTSs made from FR- α -positive cancer cells. In the parallel we evaluated QDs uptake in conventional monolayer cells model.

2. Materials and Methods

2.1. Quantum dots synthesis, coating and characterization

Core/multilayer shell CdSe/CdS/ZnS QDs (6-7 nm) were synthesized as described elsewhere. Briefly, core was synthesized through solvothermal process with cadmium myristate and selenium powder as precursor in oleic acid. A multilayer shell was grown through successive ion layer adhesion and reaction (SILAR) [26,27]. To transfer hydrophobic QDs in aqueous media, a two-step ligands exchange was used. First; QDs were coated with 3-mercaptopropionic acid (MPA), a short labile ligand, to transfer them into water. Then, they were exchanged with a block copolymer ligand composed of a first block of poly(vinylimidazole) that bind to the QD surface, and a second statistical block composed of a sulfobetaine-based monomer and a primary-amine containing monomer in a 7:1 ratio [28]. After purification by ultracentrifugation and ultrafiltration, the primary amines on the QD ligands (1 molar equivalent, corresponding typically to 2.5 nmol of QDs) were reacted successively with 600 eq. bis(sulfosuccinimidyl) suberate for 1h at pH 7, then 1000 eq. of PEG₂₀₀₀-bis (NHS) for 4 h at pH 7, then with (QD-FA) or without (QD-Ctrl) 200 eq. folate-NHS for 1 h at pH 8. The remaining primary amines were then finally reacted with 1000 eq. of bis(sulfosuccinimidyl) suberate for 1 h at pH 7. Between each step, excess reactants were removed by three steps of ultrafiltration (Vivaspin-500, 100 kDa curoff).

UV-vis spectroscopy measurements were conducted using Lambda 35 spectrophotometer (Perkin Elmer, Waltham, USA) in the wavelength range of 325-650 nm in transmission mode using 1 cm quartz cuvette. Emission and excitation spectra were acquired using LS55 spectrophotometer (Perkin Elmer, Waltham, USA), emission spectra were obtained using 340 nm excitation, while excitation spectra were obtained using 608 nm emission settings. All measurements were made at room temperature.

Effects of QDs on the viability of KB and A549 cells line were evaluated using the MTT assay. Briefly, cells were plated into 96-well plates and after 24 h the culture medium was replaced

178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236

by 200 μ L QDs in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 1mM sodium pyruvate (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) and 10 % fetal bovine serum (FBS) suspension at concentrations of 0–200 nM. Controls were realized with untreated cells (in DMEM 1 mM pyruvate 10 % FBS) taken as 100 % viability. Absorbance of DQs-treated cells was normalized to the control values. After the end of incubation (24 h), cells were washed, 50 mL MTT (2 mg/ml) was added to each well and incubated at 37 °C for 2 h. The water-insoluble formazan crystals were solubilised with dimethyl sulfoxide (DMSO) and optical density was recorded on a microplate photometer (Multiskan Ascent, Thermo Labsystems, Finland) at 540 nm.

2.2. Cell culture and spheroid formation

KB (ATTC n°.CCL-17) and A549 (ATTC n°.CRM-CCL-185) were purchased from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA) and cultured according to standard mammalian tissue culture protocols and sterile technique. Both cell lines were cultured in DMEM supplemented with 1 mM sodium pyruvate (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) and 10 % FBS, using Falcon Tissue Culture Treated Flasks.

KB spheroids were obtained by using the liquid overlay technique. Briefly, 10 ml of 2.5×10^4 cells suspension in DMEM supplemented with 10 % FBS were incubated in 1 % agarose (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) coated flask 75 cm² and incubated at 37 °C, 5 % CO₂, maximal hygrometry. Every 24 h, 10 ml of completed media were added and the suspension was divided between two new agarose coated flasks. After three days of culture, whole cell suspension was placed into spinner flask (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) and incubated at 37 °C, 5 % CO₂, maximal hygrometry under 75 rpm agitation for seven days.

2.3. Western blot analysis

Cellular lysates for Western analyses were prepared in RIPA buffer (25 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1 % SDS, 1 % Triton X-100®, 0.5 % sodium deoxycholate and PMSF 0.1 mM). Protein concentration was determined using DC Protein Assay (Biorad, Hercules, USA). Samples containing 20 μ g of total cellular protein were denatured 30 min at 37 °C with Laemmli buffer and electrophoresed on a 10 % SDS-PAGE gel and electroblotted onto a 0.2- μ m nitrocellulose membrane. To block nonspecific binding, the membrane was incubated at room temperature for 1 h with 5 % nonfat dry milk in 10 mmol/L Tris-HCl buffer (pH 8.0) containing 150 mmol/L NaCl and 0.05 % Tween 20 (TBST). The blot was probed for 1 h with primary FR- α monoclonal antibody (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) and washed three times for 15 min with TBST. The specific protein was detected using secondary horseradish peroxidase-conjugated immunoglobulin G. The membrane was probed with secondary antibody for 45 minutes and

237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295

washed three times for 15 min, each with TBST. Proteins were visualized using Clarity ECL Western blot substrate kit (Biorad, Hercules, USA) and Azure c600 imager (Azure Biosystems, Dublin, USA).

2.4. Epifluorescent microscopy

KB or A549 cells were plated in Labtek Chamber at 2.5×10^4 cells per ml of DMEM, supplemented with 10% FBS. After 24 h, the medium was discarded and cells were washed three times with phosphate buffer saline (PBS). PBS was then replaced with FA-free or FA-saturated DMEM supplemented with 10% FBS for 2 h. Afterwards, QDs were added at 100 nM for 4 h. Before microscopy analysis, the medium was discarded and cells were washed three times with PBS.

KB spheroids were treated in a similar manner, but on agarose coated 12 well plates instead of labtek. Spheroids were washed three time in DMEM 10% FBS and placed on glass slide prior to microscope imaging or frozen at (-80) °C in Optimal cutting temperature prior to cryosection.

Fluorescent microscopy was performed on AX-70 Provis (Olympus, Tokyo, Japan) equipped with a 100 W mercury vapor lamp and a Peltier cooled CCD camera DP72 (Olympus, Tokyo, Japan). The filter was set at 400–440 nm band pass excitation associated with a 570 nm dichroic mirror and a 590 nm long pass emission filter for QDs fluorescence measurements.

Images were converted on 8-bits format and analyzed with ImageJ software [29]. Signal-to-background-ratio (SBR) was calculated as:

$$SBR = \frac{\text{Area of cell} \times \text{Mean fluorescence intensity of cell}}{\text{Area of cell} \times \text{Mean fluorescence intensity of background}}$$

2.6. Statistical analysis

R software (R development Core team) was used for all statistical analyses. Mean value and standard deviation were calculated using descriptive statistics. *t*-test was employed as the statistical method, $p < 0.05$ was considered to be statistically significant.

3. Results and discussion

3.1. QD characterization

The QDs were coated with a copolymeric ligand displaying sulfobetaine groups to ensure a good solubility in water and low nonspecific adsorption [28]. A small ($\approx 15\%$) portion of primary amine groups were inserted into the sulfobetaine monomers to enable conjugation with folic acid.

296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354

A poly(ethylene glycol) spacer was used to ensure a good availability of the terminal folic acid. Unreacted primary amines were then reacted with carboxylic acid-terminated short molecule to limit nonspecific interactions.

The QDs were characterized spectroscopically before (QD-Ctrl) and after (QD-FA) their conjugation with FA. Figure 1 displays the spectra of absorption, fluorescence excitation and fluorescence emission of both targeted and non-targeted QDs in buffer solution. The absorption spectra are typical for QDs [30], showing a gradual decrease in extinction with increase in the wavelength. The comparative analysis demonstrated that conjugation of QDs with FA did not significantly affect their absorbance characteristics in the range of 325-650 nm. The study of absorbance of purified QD-FA in UV-C range (250-300 nm) demonstrated the presence of FA characteristic bands, corresponding to an average of typically 10-15 FA molecules bound per QD (data not shown).

More dramatic changes appear in fluorescence spectra of QD-Ctrl upon their conjugation with FA. The conjugation results in significant quenching of fluorescence. Relative quantum yield of fluorescence drops down to 55 % of the initial value upon conjugation with FA. FA-induced quenching of QDs is a commonly reported albeit not perfectly understood issue [31]. Fluorescence quenching in such systems is proportional to the ratio between FA and QD and could be used for FA quantification [22]. Analysis of fluorescence quenching in QD-FA demonstrated FA/QD ratio similar to previously by absorbance measurements. At the same time, the shape of spectra remains unchanged, no shift was observed, thus indicating that the QD materials remained intact upon folate conjugation.

3.2. The interaction of QDs with 2D monolayer tumor cells

The *in vitro* studies were conducted in two tumor cell lines, KB and A549. KB cells are considered as FR- α -positive gold standard cell line. As a negative control we used human lung carcinoma A549 cells which are folate receptor negative [32]. To confirm it, Western blot analysis was performed to assess FR α expression in both cell lines (Figure 2A). As follows from Figure 2A KB cells displayed strong expression of FR α , while A549 were FR α -free.

We further assessed the QDs-induced toxicity in function of QDs concentrations. QD toxicity was estimated by MTT assay in both cell line models. Even at the highest QDs concentration (200 nM), both types of QDs did not cause significant changes in metabolic activity neither on KB cells (Figure 2A) nor on A549 cells (data not shown).

The accumulation of QDs in monolayer cells was studied using epifluorescence microscopy. Figure 3 exhibits the images of KB and A549 cells treated with QD-Ctrl or QD-FA for 4 hours.

355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413

To analyze the specificity of targeting, we conducted the experiments under two conditions: with and without pre-incubation of cells with FA.

Fluorescence from QD-FA was observed only in FA-starved KB cells, while fluorescence was undetectable in A459 cells or FA pre-incubated KB cells, as shown in figure 3A. The quantitative analysis of fluorescence images is presented in Figure 3B. According to obtained data, the saturation of folate receptors results in a significant inhibition of QD-FA uptake ($SBR = 1.6 \pm 0.5$ vs $SBR = 4.2 \pm 1.2$ without FA pre-incubation). Likewise, QDs accumulation was not detectable in the case of folate receptor-negative A549 cells, with or without FA pre-incubation ($SBR \approx 1$). These observations confirm the FR- α receptor specific endocytosis of QD-FA in monolayer cells.

3.3. The distribution of QDs in MCTSs

The experiments in 2D cells confirmed the essential role of folate in the intracellular QD targeting. However, 2D model does not fully reflect the interactions of QDs with tumors. To this purpose, we developed a FR- α receptor positive tumors spheroid KB cell model. This model better reflects tumors characteristics, such as heterogeneous cellular growth with peripheral proliferating cells and a quiescent core, several gradients, such as oxygen, pH and nutrients, decreasing from the periphery to the center of the spheroid and presence of extracellular matrix. Thus, spheroids are useful models to study nanoparticles penetration and their potential theranostic application [33].

Uptake of QD-Ctrl and QD-FA in KB spheroids was characterized by a significantly higher uptake of QD-FA after folate starvation ($SBR = 5.4 \pm 0.8$), while FA pre-incubated spheroids demonstrated low fluorescence after incubation with these QDs ($SBR = 2.8 \pm 0.2$) (Figure 4). Thus, similar to 2D cells, specificity of QD-FA was also confirmed in FR- α receptor positive 3D tumor spheroid model. It is interesting to note that QD-Ctrl displayed low but still detectable fluorescence signal irrespective of pre-incubation conditions in spheroid model ($SBR = 2.4 \pm 0.4$ or $SBR = 2.2 \pm 0.2$ with or without FA pre-incubation respectively). This low fluorescence signal could probably correspond to QDs localization in extracellular space.

4. Conclusions

We have demonstrated the effectiveness of FA conjugated QDs to target tumors spheroid model thus confirming the crucial role of FR α receptor as a target. Compared with untargeted QDs, QD-FA has few folic acids added on their surface, otherwise both types of QDs share similar charge and protein corona and therefore there are expected to display similar spheroid penetration.

414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472

Thus, higher SBR obtained in QD-FA treated KB spheroids is clearly due to improved uptake and is not related to the different penetration abilities of QDs.

Further improvement of QD-FA targeting ability could be performed using dual targeting different targeting agents, such as FA and cyclic RGD [34]. *In vivo* experiment with FA targeted nanoparticles have also shown the critical importance of a high load of FA per NPs [35], however a high probability to quench QDs fluorescence by FA should be considered [36]. Therefore, further optimization of QD-FA conjugates is warranted and spheroids model here could be of big value.

Funding: This research was funded by the Ligue Nationale Contre le Cancer, the Institut de Cancérologie de Lorraine and the Lorraine Region.

Acknowledgments: The authors thank Dominique Marius Le Prince (Nancy, France) for the proof-reading and corrections of the manuscript.

References

[1] Global Burden of Disease Cancer Collaboration, C. Fitzmaurice, C. Allen, R.M. Barber, L. Barregard, Z.A. Bhutta, H. Brenner, D.J. Dicker, O. Chimed-Orchir, R. Dandona, L. Dandona, T. Fleming, M.H. Forouzanfar, J. Hancock, R.J. Hay, R. Hunter-Merrill, C. Huynh, H.D. Hosgood, C.O. Johnson, J.B. Jonas, J. Khubchandani, G.A. Kumar, M. Kutz, Q. Lan, H.J. Larson, X. Liang, S.S. Lim, A.D. Lopez, M.F. MacIntyre, L. Marczak, N. Marquez, A.H. Mokdad, C. Pinho, F. Pourmalek, J.A. Salomon, J.R. Sanabria, L. Sandar, B. Sartorius, S.M. Schwartz, K.A. Shackelford, K. Shibuya, J. Stanaway, C. Steiner, J. Sun, K. Takahashi, S.E. Vollset, T. Vos, J.A. Wagner, H. Wang, R. Westerman, H. Zeeb, L. Zoeckler, F. Abd-Allah, M.B. Ahmed, S. Alabed, N.K. Alam, S.F. Aldhahri, G. Alem, M.A. Alemayohu, R. Ali, R. Al-Raddadi, A. Amare, Y. Amoako, A. Artaman, H. Asayesh, N. Atnafu, A. Awasthi, H.B. Saleem, A. Barac, N. Bedi, I. Bensenor, A. Berhane, E. Bernabé, B. Betsu, A. Binagwaho, D. Boneya, I. Campos-Nonato, C. Castañeda-Orjuela, F. Catalá-López, P. Chiang, C. Chibueze, A. Chitheer, J.-Y. Choi, B. Cowie, S. Damtew, J. das Neves, S. Dey, S. Dharmaratne, P. Dhillon, E. Ding, T. Driscoll, D. Ekwueme, A.Y. Endries, M. Farvid, F. Farzadfar, J. Fernandes, F. Fischer, T.T. G/Hiwot, A. Gebru, S. Gopalani, A. Hailu, M. Horino, N. Horita, A. Hussein, I. Huybrechts, M. Inoue, F. Islami, M. Jakovljevic, S. James, M. Javanbakht, S.H. Jee, A. Kasaeian, M.S. Kedir, Y.S. Khader, Y.-H. Khang, D. Kim, J. Leigh, S. Linn, R. Lunevicius, H.M.A. El Razek, R. Malekzadeh, D.C. Malta, W. Marcenes, D. Markos, Y.A. Melaku, K.G. Meles, W. Mendoza, D.T. Mengiste, T.J. Meretoja, T.R. Miller, K.A. Mohammad, A. Mohammadi, S. Mohammed, M. Moradi-Lakeh, G. Nagel, D. Nand, Q. Le Nguyen, S. Nolte, F.A. Ogbo, K.E. Oladimeji, E. Oren, M. Pa, E.-K. Park, D.M.

473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531

Pereira, D. Plass, M. Qorbani, A. Radfar, A. Rafay, M. Rahman, S.M. Rana, K. Søreide, M. Satpathy, M. Sawhney, S.G. Sepanlou, M.A. Shaikh, J. She, I. Shiue, H.R. Shore, M.G. Shrimel, S. So, S. Soneji, V. Stathopoulou, K. Stroumpoulis, M.B. Sufiyan, B.L. Sykes, R. Tabarés-Seisdedos, F. Tadese, B.A. Tedla, G.A. Tessema, J.S. Thakur, B.X. Tran, K.N. Ukwaja, B.S.C. Uzochukwu, V.V. Vlassov, E. Weiderpass, M. Wubshet Terefe, H.G. Yebyo, H.H. Yimam, N. Yonemoto, M.Z. Younis, C. Yu, Z. Zaidi, M.E.S. Zaki, Z.M. Zenebe, C.J.L. Murray, M. Naghavi, Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study, *JAMA Oncol.* 3 (2017) 524–548. doi:10.1001/jamaoncol.2016.5688.

[2] S. Swain, P.K. Sahu, S. Beg, S.M. Babu, Nanoparticles for Cancer Targeting: Current and Future Directions, *Curr. Drug Deliv.* 13 (2016) 1290–1302.

[3] C.T. Matea, T. Mocan, F. Tabaran, T. Pop, O. Mosteanu, C. Puia, C. Iancu, L. Mocan, Quantum dots in imaging, drug delivery and sensor applications, *Int. J. Nanomedicine.* 12 (2017) 5421–5431. doi:10.2147/IJN.S138624.

[4] A. Robe, E. Pic, H.-P. Lassalle, L. Bezdetnaya, F. Guillemain, F. Marchal, Quantum dots in axillary lymph node mapping: biodistribution study in healthy mice, *BMC Cancer.* 8 (2008) 111. doi:10.1186/1471-2407-8-111.

[5] M. Fang, M. Chen, L. Liu, Y. Li, Applications of Quantum Dots in Cancer Detection and Diagnosis: A Review, *J. Biomed. Nanotechnol.* 13 (2017) 1–16.

[6] K. Gonda, M. Miyashita, H. Higuchi, H. Tada, T.M. Watanabe, M. Watanabe, T. Ishida, N. Ohuchi, Predictive diagnosis of the risk of breast cancer recurrence after surgery by single-particle quantum dot imaging, *Sci. Rep.* 5 (2015) 14322. doi:10.1038/srep14322.

[7] D. Radenkovic, H. Kobayashi, E. Ramsey-Semmelweis, A.M. Seifalian, Quantum dot nanoparticle for optimization of breast cancer diagnostics and therapy in a clinical setting, *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 12 (2016) 1581–1592. doi:10.1016/j.nano.2016.02.014.

[8] T. Mangeolle, I. Yakavets, S. Marchal, M. Debayle, T. Pons, L. Bezdetnaya, F. Marchal, T. Mangeolle, I. Yakavets, S. Marchal, M. Debayle, T. Pons, L. Bezdetnaya, F. Marchal, Fluorescent Nanoparticles for the Guided Surgery of Ovarian Peritoneal Carcinomatosis, *Nanomaterials.* 8 (2018) 572. doi:10.3390/nano8080572.

[9] S. Kamila, C. McEwan, D. Costley, J. Atchison, Y. Sheng, G.R.C. Hamilton, C. Fowley, J.F. Callan, Diagnostic and Therapeutic Applications of Quantum Dots in Nanomedicine, *Top. Curr. Chem.* 370 (2016) 203–224. doi:10.1007/978-3-319-22942-3_7.

532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590

- [10] T. Deng, J. Wang, Y. Li, Z. Han, Y. Peng, J. Zhang, Z. Gao, Y. Gu, D. Deng, Quantum Dots-Based Multifunctional Nano-Prodrug Fabricated by Ingenious Self-Assembly Strategies for Tumor Theranostic, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 10 (2018) 27657–27668. doi:10.1021/acsami.8b08512.
- [11] J.V. Jokerst, T. Lobovkina, R.N. Zare, S.S. Gambhir, Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy, *Nanomed*. 6 (2011) 715–728. doi:10.2217/nnm.11.19.
- [12] M. Fernández, F. Javaid, V. Chudasama, Advances in targeting the folate receptor in the treatment/imaging of cancers, *Chem. Sci*. 9 (2018) 790–810. doi:10.1039/C7SC04004K.
- [13] A. Cheung, H.J. Bax, D.H. Josephs, K.M. Ilieva, G. Pellizzari, J. Opzoomer, J. Bloomfield, M. Fittall, A. Grigoriadis, M. Figini, S. Canevari, J.F. Spicer, A.N. Tutt, S.N. Karagiannis, Targeting folate receptor alpha for cancer treatment, *Oncotarget*. 7 (2016) 52553–52574. doi:10.18632/oncotarget.9651.
- [14] G.L. Zwicke, G.A. Mansoori, C.J. Jeffery, Utilizing the folate receptor for active targeting of cancer nanotherapeutics, *Nano Rev*. 3 (2012). doi:10.3402/nano.v3i0.18496.
- [15] R.J. Lutz, Targeting the folate receptor for the treatment of ovarian cancer, *Transl. Cancer Res*. 4 (2015) 118–126. doi:10.21037/3838.
- [16] D.J. O’Shannessy, E.B. Somers, J. Maltzman, R. Smale, Y.-S. Fu, Folate receptor alpha (FRA) expression in breast cancer: identification of a new molecular subtype and association with triple negative disease, *SpringerPlus*. 1 (2012). doi:10.1186/2193-1801-1-22.
- [17] D.J. O’Shannessy, G. Yu, R. Smale, Y.-S. Fu, S. Singhal, R.P. Thiel, E.B. Somers, A. Vachani, Folate receptor alpha expression in lung cancer: diagnostic and prognostic significance, *Oncotarget*. 3 (2012) 414–425. doi:10.18632/oncotarget.489.
- [18] L. Xu, Q. Bai, X. Zhang, H. Yang, Folate-mediated chemotherapy and diagnostics: An updated review and outlook, *J. Controlled Release*. 252 (2017) 73–82. doi:10.1016/j.jconrel.2017.02.023.
- [19] I.B. Bwatanglang, F. Mohammad, N.A. Yusof, J. Abdullah, M.Z. Hussein, N.B. Alitheen, N. Abu, Folic acid targeted Mn:ZnS quantum dots for theranostic applications of cancer cell imaging and therapy, *Int. J. Nanomedicine*. 11 (2016) 413–428. doi:10.2147/IJN.S90198.
- [20] I.B. Bwatanglang, F. Mohammad, N.A. Yusof, J. Abdullah, N.B. Alitheen, M.Z. Hussein, N. Abu, N.E. Mohammed, N. Nordin, N.R. Zamberi, S.K. Yeap, In vivo tumor targeting and anti-tumor effects of 5-fluororacil loaded, folic acid targeted quantum dot system, *J. Colloid Interface Sci*. 480 (2016) 146–158. doi:10.1016/j.jcis.2016.07.011.

591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649

- [21] R.-Y. Zhang, Z.-Y. Wang, X.-Q. Yang, Y. Xuan, K. Cheng, C. Li, X.-L. Song, Jie An, X.-L. Hou, Y.-D. Zhao, Folic acid modified Pluronic F127 coating Ag₂S quantum dot for photoacoustic imaging of tumor cell-targeting, *Nanotechnology*. 29 (2018) 055101. doi:10.1088/1361-6528/aa9acc.
- [22] Folic acid-conjugated core/shell ZnS:Mn/ZnS quantum dots as targeted probes for two photon fluorescence imaging of cancer cells, *Acta Biomater*. 7 (2011) 1327–1338. doi:10.1016/j.actbio.2010.10.012.
- [23] V. Morosini, T. Bastogne, C. Frochot, R. Schneider, A. François, F. Guillemin, M. Barberi-Heyob, Quantum dot-folic acid conjugates as potential photosensitizers in photodynamic therapy of cancer, *Photochem. Photobiol. Sci. Off. J. Eur. Photochem. Assoc. Eur. Soc. Photobiol*. 10 (2011) 842–851. doi:10.1039/c0pp00380h.
- [24] R. Edmondson, J.J. Broglie, A.F. Adcock, L. Yang, Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors, *Assay Drug Dev. Technol*. 12 (2014) 207–218. doi:10.1089/adt.2014.573.
- [25] I. Yakavets, I. Yankovsky, M. Millard, L. Lamy, H.-P. Lassalle, A. Wiehe, V. Zorin, L. Bezdetnaya, The alteration of temoporfin distribution in multicellular tumor spheroids by β -cyclodextrins, *Int. J. Pharm*. 529 (2017) 568–575. doi:10.1016/j.ijpharm.2017.07.037.
- [26] Y.A. Yang, H. Wu, K.R. Williams, Y.C. Cao, Synthesis of CdSe and CdTe Nanocrystals without Precursor Injection, *Angew. Chem. Int. Ed*. 44 (2005) 6712–6715. doi:10.1002/anie.200502279.
- [27] Renguo Xie, Ute Kolb, Jixue Li, and Thomas Basché, † Alf Mews*, Synthesis and Characterization of Highly Luminescent CdSe–Core CdS/Zn_{0.5}Cd_{0.5}S/ZnS Multishell Nanocrystals, (2005). doi:10.1021/ja042939g.
- [28] M. Tasso, E. Giovanelli, D. Zala, S. Bouccara, A. Fragola, M. Hanafi, Z. Lenkei, T. Pons, N. Lequeux, Sulfobetaine-Vinylimidazole Block Copolymers: A Robust Quantum Dot Surface Chemistry Expanding Bioimaging’s Horizons, *ACS Nano*. 9 (2015) 11479–11489. doi:10.1021/acs.nano.5b05705.
- [29] C.T. Rueden, J. Schindelin, M.C. Hiner, B.E. DeZonia, A.E. Walter, E.T. Arena, K.W. Eliceiri, ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data, *BMC Bioinformatics*. 18 (2017) 529. doi:10.1186/s12859-017-1934-z.
- [30] M. Tasso, M.K. Singh, E. Giovanelli, A. Fragola, V. Loriette, M. Regairaz, F. Dautry, F. Treussart, Z. Lenkei, N. Lequeux, T. Pons, Oriented Bioconjugation of Unmodified Antibodies to Quantum Dots Capped with Copolymeric Ligands as Versatile Cellular Imaging Tools, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 7 (2015) 26904–26913. doi:10.1021/acsami.5b09777.

650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708

- [31] P. Suriamoorthy, X. Zhang, G. Hao, A.G. Joly, S. Singh, M. Hossu, X. Sun, W. Chen, Folic acid-CdTe quantum dot conjugates and their applications for cancer cell targeting, *Cancer Nanotechnol.* 1 (2010) 19–28. doi:10.1007/s12645-010-0003-3.
- [32] J.A. Reddy, L.S. Haneline, E.F. Srouf, A.C. Antony, D.W. Clapp, P.S. Low, Expression and functional characterization of the beta-isoform of the folate receptor on CD34(+) cells, *Blood.* 93 (1999) 3940–3948.
- [33] M. Millard, I. Yakavets, V. Zorin, A. Kulmukhamedova, S. Marchal, L. Bezdetnaya, Drug delivery to solid tumors: the predictive value of the multicellular tumor spheroid model for nanomedicine screening, *Int. J. Nanomedicine.* (2017). doi:10.2147/IJN.S146927.
- [34] C. Jang, J.H. Lee, A. Sahu, G. Tae, The synergistic effect of folate and RGD dual ligand of nanographene oxide on tumor targeting and photothermal therapy in vivo, *Nanoscale.* 7 (2015) 18584–18594. doi:10.1039/c5nr05067g.
- [35] J.H. Lee, A. Sahu, C. Jang, G. Tae, The effect of ligand density on in vivo tumor targeting of nanographene oxide, *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 209 (2015) 219–228. doi:10.1016/j.jconrel.2015.04.035.
- [36] Copper- or manganese-doped ZnS quantum dots as fluorescent probes for detecting folic acid in aqueous media, *J. Lumin.* 132 (2012) 987–991. doi:10.1016/j.jlumin.2011.12.014.

709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767

Figure captions

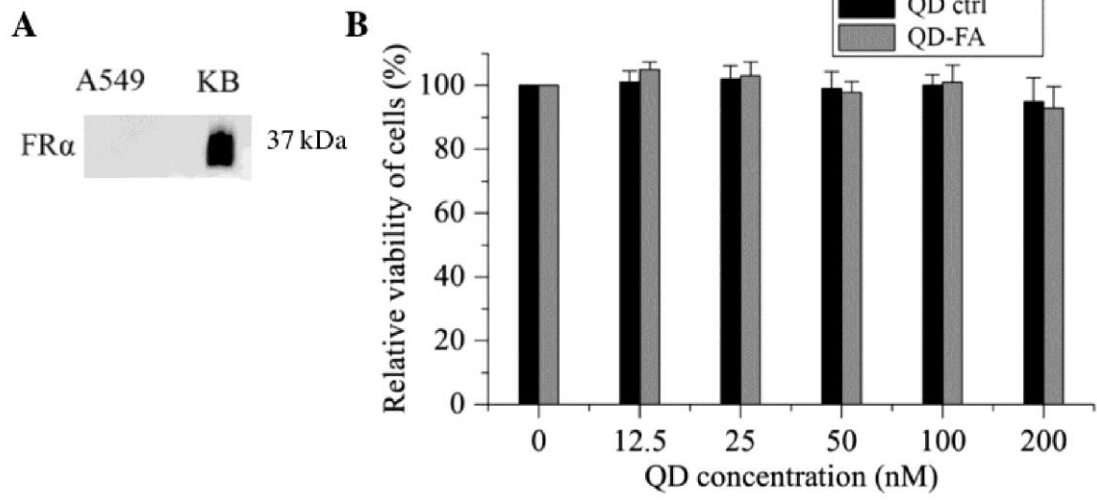
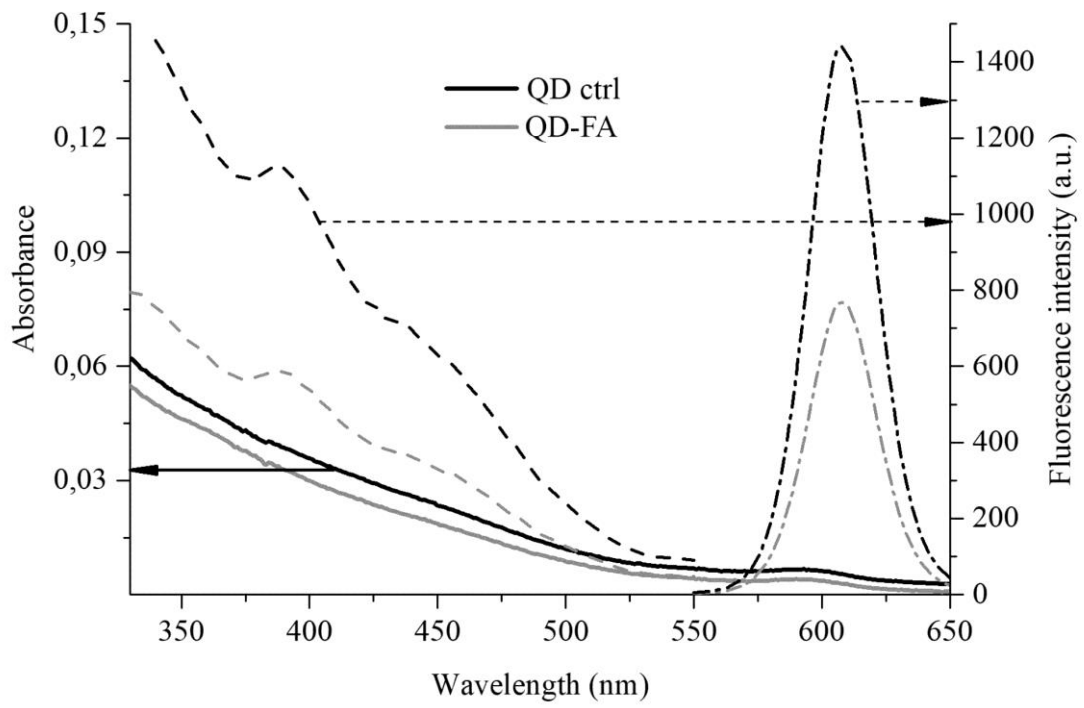
Figure 1. Spectra of absorbance (solid line), fluorescence excitation (dashed line) and fluorescence emission (dashed-dotted line) of control QDs (QD-Ctrl) (black line) and QDs conjugated with FA (QD-FA) (red line) in PBS. The fluorescence was excited at wavelength 340 nm and registered at 608 nm. The concentration of QDs was 10 nM.

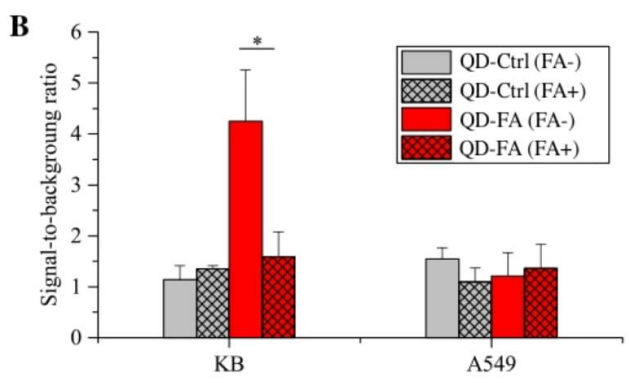
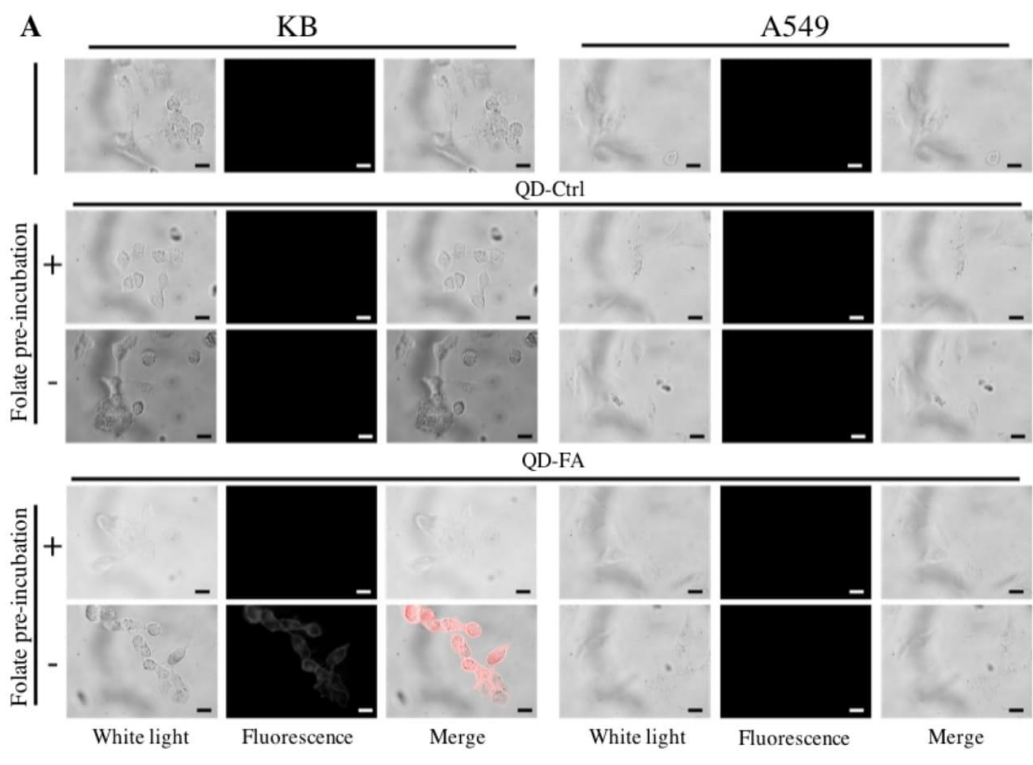
Figure 2. (A) Protein expression by Western blot analysis of folate receptor α (FR α) in A549 and KB cell lines. **(B)** Cell viability induced by QD-Ctrl (black columns) and QD-FA (red columns) in KB cells. KB cells were incubated in 96 well-plate for 24 h and treated with several QD concentrations for 24 h. Results are expressed in percentage to control non-treated samples.

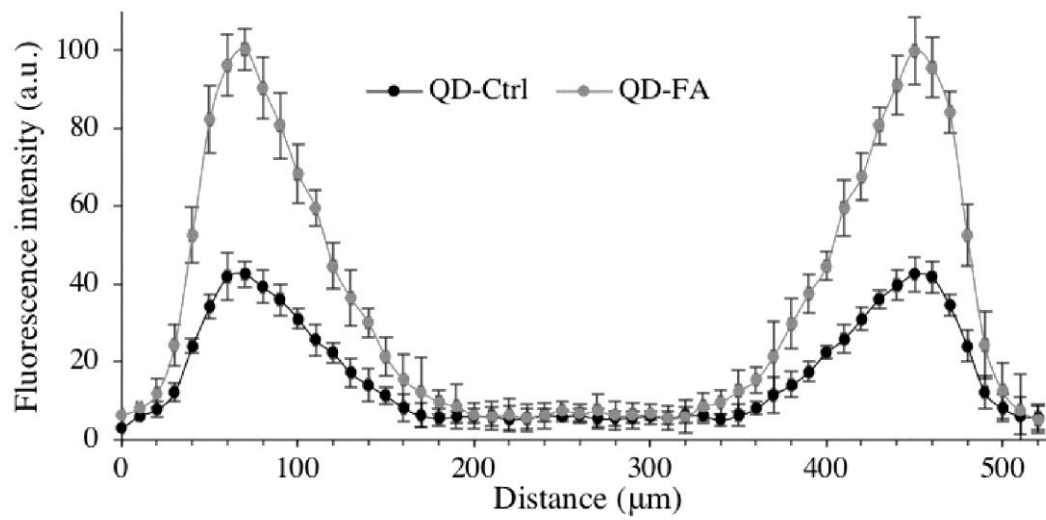
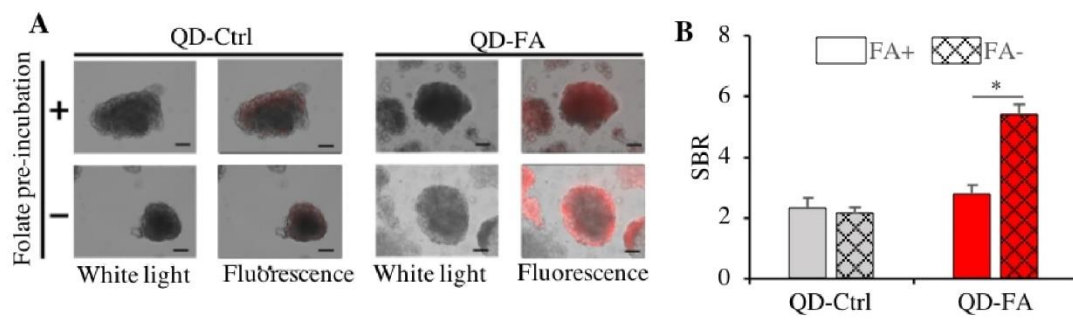
Figure 3. (A) The images of KB and A549 monolayer cells treated with QDs, for 4 hours, with or without folic acid preincubation. **(B)** Fluorescence signal-to-background ratio measured for each condition. The fluorescence was excited at 405-445 nm and registered up to 590 nm. The concentration of QDs was 100 nM. Scale bar = 10 μ m ; *: p-value < 0,05

Figure 4. (A) The images of KB spheroid incubated with QDs for 4 h, with or without folic acid pre-incubation. **(B)** SBR measured for each condition. The fluorescence was excited at λ = 405-445 nm and registered above 590 nm. The QD concentration was 100 nM. Scale bar = 100 μ m; *: p-value < 0,05

Figure 5. Mean fluorescence distribution profiles of QD-Ctrl and QD-FA across the KB spheroid cut after 4h incubation with QDs.







Nanosondes multimodales pour guider la chirurgie des carcinomatoses péritonéales d'origine ovarienne

Les cancers ovariens se distinguent par leur faible incidence, associée à une mortalité élevée, et représente la cinquième cause de mortalité par cancer pour la population féminine. Cette mortalité est due principalement à l'absence de symptômes aux stades précoces des cancers ovariens, retardant leur diagnostic, majoritairement posé lorsqu'une carcinomatose péritonéale est installée. La cavité abdominale est alors envahie par de nombreuses métastases.

Le traitement de référence est la chirurgie de cytoréduction complète et la chimiothérapie par voie intraveineuse. Lors de la chirurgie, le chirurgien doit inspecter la totalité de la surface de la cavité péritonéale, et éliminer des tumeurs de toutes tailles, mêmes submillimétriques. Faute de pouvoir détecter toutes les métastases, la cytoréduction est souvent partielle, avec pour conséquence une diminution des chances de guérison.

Afin de guider le chirurgien et améliorer le pourcentage de cytoréduction complète, des sondes fluorescentes, conçues pour marquer spécifiquement les tumeurs, ont été développées. Malgré des résultats encourageants, ces sondes souffrent de nombreuses limitations en termes de brillance, de stabilité, et de modularité. Dans ce contexte, de nombreuses nanoparticules, capables de passer outre ces limitations, suscitent un grand intérêt. Parmi celles-ci, des nanocristaux semi-conducteurs, appelés *quantum dots*, se distinguent par une brillance exceptionnelle.

Notre étude s'est basée sur ces *quantum dots*, associés à un agent de ciblage de référence pour les cancers ovariens, le folate. D'abord testées sur modèles cellulaires et tumoraux *in vitro*, ces nanoparticules ont démontré de bonnes capacités d'imagerie. Ces propriétés ont ensuite été expérimentées sur modèle murin de carcinomatose péritonéale. Enfin, la bioaccumulation des *quantum dots* restant un obstacle à leur application clinique, différentes alternatives ont été appliquées pour tenter d'obtenir leur excrétion.

Mots clés : cancers ovariens, chirurgie guidée par fluorescence, *Quantum dots*, carcinomatose péritonéale

Multimodal nanoprobe for guided surgery of ovarian peritoneal carcinomatosis

Ovarian cancers have a low incidence but a high mortality rate, making them the fifth cause of death by cancer for female population. This high mortality rate is associated with the absence of symptom at the early stage of ovarian cancer, often delaying the diagnosis to advanced stages, mainly peritoneal carcinomatosis. At this stage, metastases have already invaded the abdominal cavity.

The reference treatment combines a complete cytoreduction surgery and intravenous chemotherapy. During the cytoreduction, the surgeon must inspect the whole peritoneal surface, and remove all of all sizes, even sub-millimetric. Because of the difficulty to detect and to remove every cancerous tissue, cytoreduction is frequently incomplete, thus reducing the recovery rate.

To guide the surgeon and to increase the percentage of complete cytoreduction, fluorescent probes have been developed to target tumors specifically. Despite encouraging results, these probes suffer from many limitations such as low brightness, weak stability and cumbersome modularity. In this context, nanoparticles, that are able to outpass these limitations, have generated a growing interest. Among these nanoparticles, semiconductor nanocrystals, called quantum dots, display an exceptional brightness.

We investigated these quantum dots, associated with folate, a reference targeting agent for ovarian cancers. Firstly investigated on *in vitro* cellular and tumor model, folate targeted nanoparticles show encouraging imaging capabilities. These capabilities were also experimented on peritoneal carcinomatosis murine model. Finally, the main obstacle to quantum dot clinical application remains their bioaccumulation, therefore, different alternatives were explored to achieve excretion.

Key words : ovarian cancers, fluorescence guided surgery, quantum dot, peritoneal carcinomatosis