ANNÉE 2016





THÈSE D'EXERCICE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1 sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

Thèse en vue du DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée sous forme de

Mémoire en vue de l'obtention du DIPLÔME D'ETUDES SPECIALISEES de Pharmacie Hospitalière Pratique et Recherche

présentée par

Elise Vène

Née le 05 mars 1988 à Villeneuve d'Ascq (59)

Développement et évaluation de nanoparticules dérivées du poly(acide malique) ciblant les cellules hépatiques cancéreuses humaines Thèse soutenue à Rennes le 12 Octobre 2016 devant le jury composé de :

Professeur Fréderic LAGARCE PU-PH, Université d'Angers

Docteur Agnès KOLB-LURTON Docteur en Pharmacie, Pôle Gériatrique Rennais

Docteur Vincent GICQUEL Docteur en Pharmacie, CHU Rennes

Docteur Thomas GICQUEL MCU-PH, Université de Rennes 1

Docteur Pascal LOYER Chargé de Recherche Inserm, Université de Rennes 1 *Directeur de thèse*

Professeur Isabelle MOREL PU-PH, Université de Rennes 1 Président de thèse

LISTE DES ENSEIGNANTS FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES ANNEE 2015-2016

PROFESSEURS

BOUSTIE	Joël
BURGOT	Gwenola
DONNIO	Pierre Yves
FAILI	Ahmad
FARDEL	Olivier
FELDEN	Brice
GAMBAROTA	Giulio
GOUGEON	Anne
LAGENTE	Vincent
LE CORRE	Pascal
LORANT (BOICHOT)	Elisabeth
MOREL	Isabelle
SERGENT	Odile
SPARFEL-BERLIVET	Lydie
TOMASI	Sophie
URIAC	Philippe
VAN DE WEGHE	Pierre
VERNHET	Laurent
PROFESSEURS ASSOCIES	
BUREAU	Loïc
DAVOUST	Noëlle
PROFESSEURS EMERITES	
CILLARD	Josiane
GUILLOUZO	André
MAITRES DE CONFERENCES	
ABASQ-PAOFAI	Marie-Laurence
ANINAT	Caroline
AUGAGNEUR	Yoann
BEGRICHE	Karima
	Latita
	Noiwenn
	Amduu
	Marylàne
	ivial yielle

COLLIN Xavier CORBEL Jean-Charles DAVID Michèle DELALANDE Olivier David DELMAIL DION Sarah DOLLO Gilles GICQUEL Thomas GILOT David GOUAULT Nicolas HITTI Eric JEAN Mickaël Valérie LECUREUR LE FERREC Eric LE PABIC Hélène LEGOUIN-GARGADENNEC Béatrice LOHEZIC-LE DEVEHAT Françoise MARTIN-CHOULY Corinne MINET Jacques MOURET-PLEIBER Liza NOURY Fanny **PINEL-MARIE** Marie-Laure PODECHARD Normand POTIN Sophie RENAULT Jacques ROUILLON Astrid

ATER

SMIDAImenPASCREAUGaëtanSAVARYCamilleALHARETHKhairallah

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Docteur Pascal Loyer,

Qui me fait le plaisir de diriger cette thèse.

Merci pour ta gentillesse, ta disponibilité, ton soutien et ton investissement dans mon projet professionnel.

Ta passion pour la recherche est contagieuse et j'ai énormément de chance de pouvoir travailler avec toi.

A Madame le Professeur Isabelle Morel,

Qui me fait l'honneur de présider cette thèse. Merci pour votre gentillesse et vos conseils.

Veuillez recevoir l'assurance de ma reconnaissance et mes sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur Fréderic Lagarce,

Qui me fait l'honneur de venir de l'UFR d'Angers pour évaluer ce travail. Merci pour votre disponibilité et votre gentillesse. Veuillez recevoir mes sincères remerciements.

A Madame le Docteur Agnès Kolb-Lurton,

Pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Merci votre excellente pédagogie, votre professionnalisme et votre extrême gentillesse. Mon stage dans votre service m'a énormément appris.

A Monsieur le Docteur Vincent Gicquel,

Pour avoir accepté de juger ce travail.

Merci votre écoute, vos conseils et votre disponibilité.

A Monsieur le Docteur Thomas Gicquel,

Qui me fait le plaisir de participer au jury de cette thèse, fraîchement nommé MCU-PH.

Merci pour tes précieux conseils, ton soutien mais aussi, et surtout, pour ta bonne humeur et ton sens de l'humour.

Tu m'as fait découvrir l'UMR991 et tu contribues largement à la construction de mes projets professionnels, je n'en serai pas là sans ton aide.

A Monsieur le Docteur Bruno Clément,

Pour m'avoir accueillie dans son unité de recherche.

A Madame le Docteur Sandrine Cammas-Marion,

Qui a co-encadré mon master 2.

Merci pour ton aide précieuse en chimie, ta sympathie et ta disponibilité.

A Kathleen et Catherine,

Pour m'avoir fait appris, avec beaucoup de pédagogie, les différentes techniques de laboratoire : la culture cellulaire, la cytométrie en flux, la microscopie...

Merci pour votre aide dans ce travail et votre gentillesse.

Merci à l'ensemble des membres de l'UMR 991 pour votre accueil durant mon année-recherche et plus particulièrement merci à toute l'équipe « Stress, Défenses et Régénération» pour votre bienveillance et vos remarques toujours constructives.

A l'ensemble des pharmaciens qui ont contribué à ma formation durant mon internat et plus particulièrement à mes maîtres de stage : Fabienne Aubin, Marie-Antoinette Lester, Catherine Hamon, Agnès Lurton-Kolb, Nicolas Bouchery, Marie Génevée et Véronique Catros,

Merci pour vos enseignements, j'ai énormément appris à vos côtés et vous en suis très reconnaissante.

A Laurent Hamon,

Qui m'encadre pour ce dernier (et non des moindres!) semestre d'internat,

Merci pour votre indulgence et votre bienveillance au cours de ces mois de rédaction de thèse. Je vous remercie pour vos précieux conseils, ce stage en stérilisation m'aura beaucoup apporté tant d'un point de vue professionnel que personnel.

A toutes les personnes avec qui j'ai travaillé au cours de mon internat, j'ai une pensée particulière pour les préparateurs et préparatrices de l'isolateur de Pontchaillou (Jedi forever !) et l'équipe de la pharmacie de Chantepie

Merci pour votre accueil et tout ce que vous m'avez appris et apporté.

A ma maman,

Merci d'avoir si souvent joué le « shadok », d'avoir toujours été disponible pour les fameuses « pause-balade» qui étaient pour moi de vraies bouffées d'oxygène pendant les périodes de révision d'examens. Merci d'être une « maman poule » si attentionnée et attentive... je pourrai en dire encore tellement mais je m'arrêterai là (sinon on va finir par devoir mettre nos lunettes de soleil...) en te remerciant d'être toi, tout simplement. J'espère réussir à être, un jour, une maman aussi merveilleuse que toi.

A mon vrai papa, celui qui s'est si bien occupé de moi.

Merci pour tous tes précieux conseils. Comme tu le dis si bien depuis la 1^{ère} année : « Couteau entre les dents et traces des dents sur le couteau » !

A Mathilde et Max : ma sœurette et mon « petit » frère,

Merci pour vos différences qui font que l'on ne s'ennuie jamais quand on est tous ensemble, en famille.

A ma Maminette et Henri,

Merci d'être si attentionnés envers moi et de toujours réussir à savoir où j'en suis dans mon parcours universitaire pourtant un peu sinueux.

Merci à toi, ma maminette, pour les séances de shopping, les déjeuners à la sortie de la fac, tes visites en Bretagne...je suis vraiment pourrie gâtée !

A mon papy,

Merci d'être présent à toutes les étapes de ma vie et d'avoir perpétué la tradition de mamie en brûlant un cierge à chacun de mes examens.

Et à **ma mamie**, qui vit toujours dans mon cœur. Si tu peux me voir, j'espère que tu es fière de moi.

A mon parrain, mon exemple ! Comme tu le dis, je suis tes traces mais à l'envers... J'espère que tu es fier de ta « ptite caille ». Merci d'être si attentionné et généreux. Merci d'être là aujourd'hui, avec Fanny, pour assister à ma thèse.

A Charles, je suis tellement heureuse d'être ta marraine !

A toute ma famille,

Merci pour votre bonne humeur et votre grain de folie qui font de chaque réunion de famille un moment de bonheur.

A mon Flo,

Merci de réussir à me supporter (même dans les moments où je vis terrée dans ma grotte !) et d'attendre si patiemment que je termine (enfin) mes études quitte à mettre tes projets entre parenthèses. « Moi y'aime bien » nos voyages à l'autre bout du monde, notre complicité, tes blagues débiles... Partager ta vie rend la mienne plus belle.

A mes amis d'enfance et de lycée alias « Le Groupe » : Cynthia, Coralie, Virginie, Vincent, Amandine, Aurélie, Denis, Simon, Amélie, Mehdi, Max et Caro Nous sommes toujours aussi soudés après toutes ces années ! Merci pour tous ces bons moments.

A mes amis de la fac de pharma de Lille :

Loulou, avec qui j'ai partagé cette folle aventure au pays des lamas, tu es ma meilleure amie ! Marie, mon lapinou, tu es une fille géniale ! Je t'adore. Long, mon binôme d'internat, tu es un ouf ! Patrick, Gonz, Pauline, Orane, Johannie, Guillemette, ALU, Gauthier et tous les autres Merci pour toutes les soirées, les verres au Mac Ewan's (notre fief !), les fous rires en pagaille et même pour les « missions BU ». Ces années pharma sont inoubliables !!! Et ce n'est pas fini... !

A Gaek, tu es comme un frère pour moi.

Merci pour ton aide, ton soutien, tes conseils et ton sale caractère !

A Chris et Cédric,

Merci pour votre amitié (même si je ne suis qu'une PR !).

A mes co-internes,

Justine alias « choupette », merci d'être aussi folle, drôle et pleine de vie. Comme tu le dis si bien: je te kiffe grave !

Adeline ma jumelle, merci d'être si attentive, si drôle et tout le temps de bonne humeur. Tu es au top ma wondercointerne !

Poupouss, ma Méd G préférée, merci pour ta joie de vivre et ton amitié qui m'est précieuse.

Marion la Monica Bellucci de la cytognétique et Claire la Julia de la FISH, vous êtes canons, surtout ne changez rien !

Claire la ratonne, Clémentine, Agnès et Pauline M.

Ces 8 semestres sont passés à toute vitesse à vos côtés. C'était un vrai bonheur de travailler avec vous.

A tous les internes de Rennes,

Les « vieux » : François le raton, Cécile Geoffraise, Caro, Pierre-Nic, Popo, Anne-Lise, Thomas, Cyril, Mlle Valérie, Marine D, Hélène M, Cyrille, Mathieu, Nico Mister Mabthera...

Les moins « vieux » : Jérémy, Anne-Claire, Cécile W, Clément, Guewen, Hélène D, Guillaume, Carmen, Sébastien, Maxime, Laura, Claude, Fabien, Charles-Patrick, Gabrielle, François, Brendan, Pauline R... La dream team :

- Maudette et Clairette, merci pour tous ces fous rires, ces supers moments en soirée, à la montagne... Avec vous, on ne s'ennuie jamais !
- Claire alias Dame Bertaux (tu vas me détester d'avoir écrit ça...), ma pile électrique. Merci pour tous ces innombrables moments passés ensemble ! Tu es une amie formidable, je sais que je peux compter sur toi et je serai toujours là pour toi aussi.
- Marinette et Cécile L, merci pour tous ces bons moments.
- o Palpacoptère et Christophecoptère, merci mes bons seigneurs merci !

Enfin, une petite dédicace à Valérie qui a hanté les couloirs de Pontchaillou avec moi en cette fin d'internat. Merci pour ta bonne humeur, ton soutien et ton sens de l'humour.

Je dédie cette thèse à mes parents. Je vous remercie pour votre soutien sans faille. Vous m'avez aidée à me surpasser tout au long de mes études. J'espère que vous êtes fiers de mon parcours. Je vous aime.

TABLES DES MATIERES

INTRODUCTION	
Chapitre 1 : Carcinome hépatocellulaire	
I. Le Foie	
I.1. Anatomie	
I.2. Histologie	20
I.3. Fonctions hépatiques	
I.4. Pathologies	
II. Epidémiologie	
II.1. Incidence et mortalité	
II.2. Facteurs de risques	
III. Dépistage et Diagnostic	
III.1. Dépistage	
III.2. Diagnostic	
IV. Classification pronostique BCLC	
IV.1. Stades précoces : Stades 0 et A	
IV.2. Stade intermédiaire : Stade B	
IV.3. Stades avancés : Stades C et D	
V. Traitement	
V.1. Traitements à visée curative	
V.2. Traitements palliatifs	
VI. Perspectives	
Chapitre 2 : Nanovecteurs	40
I. Les nanotechnologies	41
I.1. Définitions	
I.2. Historique	
I.3. Aujourd'hui	
II. Des nanotechnologies à la nanomédecine	
II.1. Applications médicales des nanotechnologies	
II.2. Nanomédecine et cancer	
III. Les Nanovecteurs	50
III.1. Mécanismes de ciblage	
III.2. Les trois générations de nanovecteurs	
III.3. Les différents types des nanovecteurs	53

IV. Nanoparticules dérivées du poly(acide malique) et ciblage du CHC	58
IV.1. Le poly(acide malique)	58
IV.2. Les nanoparticules dérivées du poly(acide malique)	59
IV.2. Stratégies de ciblage du CHC	60
Chapitre 3 : Partie expérimentale	63
I. Matériel et Méthodes	64
I.1. Collection de peptides courts	64
I.2. Culture cellulaire	65
I.3. Préparation des nanoparticules	68
I.4. Captation des nanoparticules par les cellules en culture	70
I.5. Evaluation de la toxicité des NPs	71
I.6. Analyse des données	72
II. Résultats	72
II.1. Essais de biocompatibilité	72
II.2. Mise au point des paramètres d'utilisation des NPs encapsulant du DiDoil	75
II.3. Influence des peptides hépatotropes sur la captation des NPs par des cellules hépatique	s en
culture	78
II.4. Influence des peptides hépatotropes sur la captation des NPs par des cellules non	
hépatiques en culture	83
II.5. Cinétique de captation des NPs par les cellules HepaRG hépatocytaires	86
III. Discussion et perspectives	87
CONCLUSION	92
BIBLIOGRAPHIE	94

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Localisation anatomique du foie	19
Figure 2 : Anatomie et segmentation hépatique	19
Figure 3: Les lobules hépatiques	21
Figure 4 : Biopsies hépatiques illustrant le développement de la fibrose.	22
Figure 5 : Evolution de l'atteinte hépatique au cours des hépatopathies	23
Figure 6 : Taux d'incidence standardisé sur l'âge pour le cancer du foie en 2012 d'après les	données
GLOBOCAN 2012	25
Figure 7 : Prévalence de l'infection chronique au virus de l'hépatite B chez les adultes (19 à	49 ans),
en 2005 [15]	27
Figure 8 : Les aflatoxines	28
Figure 9 : Algorithme diagnostic de CHC chez un patient cirrhotique d'après l'EASL-EORTC 2	2012 [10]
Figure 10 : Classification BCLC et stratégie thérapeutique associée [24]	32
Figure 11 : Destruction tumorale percutanée par radiofréquence avec guidage échographique	e 35
Figure 12 : Principe de la chimioembolisation	
Figure 13 : CyberKnife [®]	
Figure 14 : Nanorugosité des feuilles de lotus.	41
Figure 15 : Echelle de taille des nanotechnologies	42
Figure 16 : Figures emblématiques du développement des nanotechnologies	42
Figure 17 : Représentation d'un fullerène C ₆₀ et d'un nanotube	43
Figure 18 : Applications médicales des nanotechnologies [36]	44
Figure 19 : Répartition des produits de nanomédecine identifiés par le LEEM en 2013	46
Figure 20 : Répartition des 230 produits de nanomédecine identifiés par le LEEM en 2013 s	elon leur
application thérapeutique	48
Figure 21 : Produits de nanomédecine pour la santé humaine en développement clinique	selon le
LEEM en 2013	48
Figure 22 : Intérêts des nanovecteurs en oncologie	49
Figure 23: Représentation schématique de l'effet EPR [48]	50
Figure 24: Ciblage actif	51
Figure 25: Les trois générations de nanovecteurs	52
Figure 26: Les différents types de nanovecteurs, d'après Wicki et al	54
Figure 27: Structure d'un immunoconjugué [56]	55
Figure 28: Schéma de la structure d'un liposome unilamellaire	

Figure 29: Structure du <i>nab</i> -paclitaxel (Abraxane [®])	57
Figure 30: Nanosphère et nanocapsule	58
Figure 31: Structure du PMLA [65]	59
Figure 32: Synthèse des nanoparticules à base du copolymère PEG-b-PMLABe	59
Figure 33: Principe du <i>phage-display</i>	62
Figure 34: Morphologie en contraste de phase des cellules HepaRG à différents stades	66
Figure 35: Représentation schématique du protocole de culture des cellules HepaRG	66
Figure 36: Formulation des NPs Biot-PEG ₆₆ -b-PMLABe ₇₃ [DiDoil 1wt%]	69
Figure 37: Echafaudage moléculaire permettant l'exposition des peptides à la surface des NPs	70
Figure 38: Concentrations en cytokines pro-inflammatoires dans les milieux de culture c	des
macrophages et HepaRG progéniteurs	74
Figure 39: Evaluation de la cytotoxicité induite par les NPs	75
Figure 40: Effet du solvant de dissolution du fluorochrome sur le signal de fluorescence apr	rès
captation cellulaire	76
Figure 41: Evaluation de l'incidence des concentrations en copolymère, streptavidine et peptide s	sur
la captation cellulaire	78
Figure 42: Détection des NPs fluorescentes captées par les cellules HepaRG progénitrices p	par
cytométrie en flux et microscopie à fluorescence	79
Figure 43: Pourcentages de cellules hépatiques positives en cytométrie en flux après incubation av	/ec
les NPs fluorescentes	80
Figure 44: Analyse des rapports d'intensité de fluorescence mesurés par cytométrie en flux pour	les
cellules hépatiques ayant capté des NPs fluorescentes	82
Figure 45: Localisation cellulaire de NPs fluorescentes exposant le peptide RGD en surface	83
Figure 46: Pourcentages de cellules non hépatiques positives en cytométrie en flux après incubati	ion
avec les NPs fluorescentes	84
Figure 47: Analyse des rapports d'intensité de fluorescence mesurés par cytométrie en flux pour	les
cellules non hépatiques ayant capté des NPs fluorescentes	85
Figure 48: Cinétique de captation des NPs par les cellules HepaRG hépatocytaires	86
Figure 49: Rapports d'intensité de fluorescence pour l'ensemble des types cellulaires étudiés	91

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Nombre de nouveaux cas de cancer du foie estimé par région géographique et par sexe
d'après l'étude GLOBOCAN 2012 de l'IARC 24
Tableau 2 : Facteurs de risque de CHC selon les différentes zones géographiques, en 2000 [9] 26
Tableau 3 : Calcul du score de Child-Pugh définissant la gravité d'une cirrhose, d'après la Société
Nationale Française de Gastro-Entérologie 32
Tableau 4: Etudes pré-cliniques pour le traitement de tumeurs hépatiques par des nanoparticules
associées à un agent de ciblage [67]60
Tableau 5: Caractéristiques des douze peptides sélectionnés
Tableau 6: Lignées de cellules hépatiques humaines 67
Tableau 7: Lignées cellulaires non hépatique humaines
Tableau 8: Ensemencement des cellules pour les essais de captation de NPs 70
Tableau 9: Variation des concentrations en streptavidine, peptide RGD et copolymère

LISTE DES ABREVIATIONS

AA	Acide aminé
ADN	Acide desoxyribonucléique
АММ	Autorisation de mise sur le marché
AFB ₁	Aflatoxine B ₁
ASGP-R	Récepteur aux asialoglycoprotéines
Biot-PEG ₆₆ - <i>b</i> -PMLABe ₇₃	Copolymère poly(éthylène glycol)- <i>b</i> -poly(malate de benzyle)
СНС	Carcinome hépatocellulaire
CRB	Centre de ressources biologiques
DEB-TACE	Drug Eluting Beads - Trans Arterial ChemoEmbolization
DIDoil	1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindo dicarbocyanine perchlorate
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxide
EASL	European Association for the Study of the Liver
ENSCR	Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes
EPR	Enhanced Permeation and Retention
IARC	Agence internationale de recherche sur le cancer
IL	Interleukine
IRM	Imagerie par résonnance magnétique
LDH	Lactate déshydrogénase
LEEM	Syndicat français des entreprises du médicament
LPS	Lipopolysaccharide
МТТ	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltretrazolium bromide
NAFLD	Non Alcoholic Fatty Liver Disease
NASH	Non Alcoholic Steato Hepatitis
NNI	National Nanotechnology Initiative
NPs	Nanoparticules
NP-S-biot	Nanoparticule-streptavidine-biotine
NP-S-peptide	Nanoparticule-streptavidine-peptide
PBS	Phosphate-buffered saline
PEG	Poly(éthylène glycol)
PFA	Paraformaldéhyde
PMLA	Poly(acide β-malique)
PMLABe	Poly(malate de benzyle)
PST	Indice de performance de l'OMS

RCP	Réunion de concertation pluridisciplinaire
R&D	Recherche et Développement
SPM	Système des phagocytes mononucléés
SVF	Sérum de veau fœtal
TACE	Trans Arterial ChemoEmbolization
TDM	Tomodensitométrie
U.A	Unité arbitraire
VHB	Virus de l'hépatite B
VHC	Virus de l'hépatite C

INTRODUCTION

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est la principale tumeur maligne primitive du foie et représente la complication majeure des hépatopathies chroniques et de la cirrhose. Avec 782 000 nouveaux cas estimés en 2012, le CHC se place au sixième rang des cancers les plus fréquents au monde. Actuellement, le nombre de cas liés à l'infection par le virus de l'hépatite B, principal facteur de risque de CHC, diminue essentiellement grâce aux progrès sanitaires et la mise en place de la vaccination. Cependant, ces trente dernières années ont été marquées par une augmentation de l'incidence du CHC et ce, principalement dans les pays occidentaux. Au niveau mondial, cette augmentation est probablement due à plusieurs facteurs tels que l'accroissement des cas liés au VHC, le développement du diabète et de l'obésité, une meilleure identification diagnostique et une amélioration de la prise en charge de la cirrhose. Du fait d'un très mauvais pronostic, le CHC a un taux de mortalité élevé, qui le place au second rang mondial des causes de décès par cancer. Les patients porteurs d'un CHC au stade initial peuvent être guéris par résection chirurgicale, transplantation hépatique ou techniques ablatives. Les patients ayant un CHC à un stade avancé se voient proposer des traitements palliatifs tels que la chimio-embolisation transartérielle, la radioembolisation et, depuis 2007, une chimiothérapie utilisant un inhibiteur de la tyrosine-kinase, le Sorafénib (Nexavar[®]). Malgré ces progrès, l'arsenal thérapeutique pour le traitement des CHC reste limité en partie à cause de la chimiorésistance des tumeurs hépatiques aux agents anti-tumoraux conventionnels et de la distribution souvent insuffisante de ces agents au niveau du site tumoral. La recherche de nouvelles solutions thérapeutiques est donc un enjeu majeur de santé publique.

Au début du XXème siècle, Paul Ehrlich, prix Nobel de médecine en 1908, imagine le concept de « *magic bullet* » reposant sur l'utilisation d'agents thérapeutiques capables de cibler et détruire spécifiquement un pathogène ou une cellule cancéreuse sans affecter les cellules saines de l'hôte. Depuis les années 1970, la théorie de ce médecin Allemand se concrétise grâce au développement des thérapies ciblées et des nanotechnologies comme les nanovecteurs permettant d'acheminer un principe actif de manière spécifique vers son site d'action. L'application des nanotechnologies à la médecine, appelée « nanomédecine », représentent aujourd'hui un domaine scientifique et technique en plein essor, à l'interface entre chimie, physique et biologie. L'utilisation de la nanomédecine est particulièrement intéressante en cancérologie, domaine dans lequel les nanovecteurs peuvent permettre de libérer de fortes concentrations en agents cytotoxiques au niveau d'un site cible tout en limitant la toxicité pour les tissus sains. Cette approche est notamment séduisante pour les cancers résistants à la chimiothérapie tels que le CHC.

Dans le tissu hépatique, les nanoparticules sont reconnues et phagocytées par les macrophages, des cellules du système immunitaire. Les macrophages ne correspondant pas au type cellulaire responsable du CHC, l'accumulation au sein de ces cellules n'est donc pas optimale pour espérer un traitement efficace. De plus, les derniers développements de la recherche focalisent sur l'adjonction de motifs fonctionnels à la surface des nanovecteurs dans le but d'améliorer le ciblage cellulaire. Le principe est de greffer un motif qui reconnaitra, à la surface des cellules cibles, un récepteur afin de faciliter sa fusion ou endocytose avec cette cellule et la libération intracellulaire du principe actif. Dans ce contexte, l'unité Inserm UMR 991 « Foie, Métabolismes et Cancer » développe des nanoparticules dérivées du poly(acide malique), biodégradables et biocompatibles, en collaboration avec l'Ecole nationale supérieure de chimie de Rennes. Ces nanoparticules sont formulées à partir d'un copolymère associant le poly(éthylène glycol), connu pour diminuer la reconnaissance par les macrophages, et le poly(malate de benzyle). L'objectif de l'équipe est cibler les cellules hépatiques tumorales en ajoutant des peptides comme agent de ciblage à la surface des nanoparticules.

Après des étapes de synthèse et de formulation de polymères, l'équipe de Pascal Loyer et Sandrine Cammas-Marion a mis au point un échafaudage moléculaire en utilisant un système de pontage entre le polymère et le peptide basé sur la reconnaissance biotine-streptavidine. Cette construction permet d'évaluer rapidement en culture l'hépatotropisme de peptides d'intérêt sans synthèse chimique systématique. De plus, l'équipe a sélectionné, sur des critères bibliographiques et en compilant des données d'analyses transcriptomiques, douze peptides hépatotropes capables de reconnaître des récepteurs à la surface des hépatocytes et d'en améliorer ainsi le ciblage. Dans des travaux publiés en 2013, l'équipe a validé l'utilisation de cette construction pour fixer le peptide RGD à la surface des nanoparticules et a évalué sa captation par des cellules d'hépatome humain de la lignée HepaRG. Les expériences détaillées dans ce manuscrit s'inscrivent dans la continuité de ces travaux avec pour objectif de tester l'ensemble des peptides hépatotropes sélectionnés. Elles ont été réalisées au sein de l'équipe du Dr Loyer au cours d'une année-recherche, financée par l'Agence Régionale de Santé des Pays de la Loire, et durant ma dernière année d'internat.

Le travail présenté dans ce manuscrit s'articule autour de trois objectifs. Le premier objectif est de mettre au point une méthode d'encapsulation d'un fluorochrome dans les nanoparticules dérivées du poly(acide malique) pour visualiser la captation des nanoparticules par cytométrie en flux et microscopie à fluorescence. Le second est de poursuivre les essais de biocompatibilités menés par l'équipe. Enfin le troisième, et principal, objectif est d'évaluer l'influence de peptides, considérés comme hépatotropes, sur la captation des nanoparticules par des cellules hépatiques ou non hépatiques en culture

17

Chapitre 1 : Carcinome hépatocellulaire

I. Le Foie

I.1. Anatomie

Le foie est l'organe interne le plus volumineux du corps humain. Il pèse environ 2% du poids corporel total soit en moyenne 1,5kg chez l'adulte. Il est situé dans la partie supérieure droite de la cavité abdominale (Figure 1) et fait partie de l'appareil digestif.



Figure 1 : Localisation anatomique du foie www.e-cancer.fr

Le foie se compose de deux lobes principaux, délimités par le ligament falciforme : le lobe droit (environ 75 % du volume) et le lobe gauche (environ 25 % du volume) (Figure 2A). Selon la segmentation de Couinaud, fondée sur la distribution intrahépatique de la veine porte, le foie est divisé en **huit segments fonctionnels indépendants** (Figure 2B). Chaque segment est résécable chirurgicalement car ils disposent de leur propre vascularisation et drainage biliaire.





(A) Vue antérieure du foie et vascularisation (www.amfe.fr). (B) Segmentation hépatique selon Couinaud (www.arcagy.org)

Sur le plan vasculaire, le débit sanguin hépatique est de l'ordre de 1,5 litre par minute. Le foie est irrigué par deux circulations sanguines afférentes (Figure 2A) :

L'artère hépatique. Elle est issue de l'aorte et fournit du sang oxygéné représentant 20 à
30% du débit sanguin hépatique.

 La veine porte. Elle apporte le sang provenant du tube digestif et de la rate et assure 70 à 80% du débit sanguin.

La circulation efférente s'effectue par les veines hépatiques qui se jettent dans la veine cave inférieure.

I.2. Histologie

a. Les cellules hépatiques

Le foie est constitué de différents types cellulaires à savoir :

- Les hépatocytes : principales cellules fonctionnelles. Ils représentent environ 80% du volume du foie. Ce sont de grandes cellules polyédriques épithéliales polarisées. Les hépatocytes sont le siège d'une grande activité métabolique et sont, par conséquent, riches en organites cytoplasmiques.
- Les cholangiocytes : cellules épithéliales qui constituent les canaux biliaires.
- Les cellules endothéliales sinusoïdales : cellules bordant les sinusoïdes. Elles forment un endothélium fenestré permettant les échanges de petites molécules entre le sang et les hépatocytes.
- Les cellules de Küpffer : macrophages résidents du foie. Elles sont habituellement localisées dans la lumière des sinusoïdes.
- Les cellules stellaires ou cellules de Ito : principales cellules synthétisant les constituants de la matrice extracellulaire. Elles se localisent dans l'espace de Disse situé entre les hépatocytes et les sinusoïdes.
- Les cellules NK (Natural Killer) résidentes du foie ou « pit cells » : cellules impliquées dans la défense antivirale et antitumorale. Elles se situent dans la lumière des sinusoïdes, en contact avec les cellules endothéliales et les cellules de Küpffer.

b. Les lobules hépatiques

Le tissu hépatique est organisé en lobules (Figure 3). Il s'agit de structures polyédriques centrées sur une **veine centro-lobulaire** et limitées, en périphérie, par des **espaces portes**. Ces derniers comprennent un canal biliaire, une artère hépatique et une veine porte. Dans les lobules, les **hépatocytes sont empilés en travées monocouches séparées par des sinusoïdes**. Le sang rentre dans le lobule via les espaces porte pour se déverser dans les sinusoïdes où il est drainé vers la veine centro-lobulaire qui se jette ensuite dans les veines hépatiques. Les **canalicules biliaires** sont formés

entre des hépatocytes adjacents. Ils véhiculent la bile sécrétée par les hépatocytes jusqu'au canal biliaire situé en périphérie du lobule.



Figure 3: Les lobules hépatiques (A) Structure générale Source : www.quasargroupconsulting.com/anatomy/liver.php. (B) Espace de Disse [1]

I.3. Fonctions hépatiques

Le foie est un organe vital assurant des fonctions indispensables à notre organisme :

- Synthèse :
 - Métabolisme des lipides : le foie est impliqué dans la synthèse du cholestérol, des lipoprotéines plasmatiques et des phospholipides.
 - Métabolisme des glucides : le foie joue un rôle majeur dans la régulation de la glycémie (concentration de glucose dans le sang). Il est capable de synthétiser (glycogénogénèse) et dégrader le glycogène (glycogénolyse) et de synthétiser du glucose (néoglucogénèse).
 - Métabolisme des protéines : le foie synthétise l'essentiel des protéines circulantes telles que l'albumine, les facteurs de la coagulation, des protéines inflammatoires et de transport.
 - Production de la bile : le foie produit environ 600 mL de bile par jour. La bile est secrétée majoritairement par les hépatocytes mais aussi par les cholangiocytes.
- Détoxification :
 - Métabolisme des médicaments ou autres xénobiotiques (substances étrangères à l'organisme). Ces substances sont transformées par des réactions enzymatiques favorisant leur élimination par voie rénale et/ou biliaire.

- Formation de l'urée dans les hépatocytes. Cela permet d'éliminer les ions ammoniques (produits de dégradation des protéines).
- Conjugaison de la bilirubine non conjuguée (produit de dégradation de l'hémoglobine). Dans le foie, la bilirubine non conjuguée subit une glucuronoconjugaison qui permet son élimination par voie biliaire.
- Stockage : Glycogène (forme de stockage du glucose), vitamines A, D et B12, fer

I.4. Pathologies

a. Fibrose et cirrhose

Au cours des hépatopathies chroniques, les agressions tissulaires prolongées provoquent une réaction de « cicatrisation » pathologique appelée **fibrose hépatique** (Figure 4). Cette dernière se caractérise par des **dépôts excessifs de tissu fibreux** (matrice extracellulaire) qui vont profondément altérer la physiologie et l'architecture du foie.



Figure 4 : Biopsies hépatiques illustrant le développement de la fibrose. (A) Foie sain. (B) Fibrose. (C) Cirrhose. [2]

La fibrose hépatique est un processus chronique évolutif. Chez la majorité des patients, la progression vers la cirrhose, stade ultime du développement de la fibrose, intervient dans un délai 15 à 20 ans. La cirrhose se définit par la **disparition complète de l'architecture lobulaire** et la présence d'une fibrose entourant des **nodules de régénération** [3] (Figure 4). Ces derniers sont constitués d'amas d'hépatocytes générés par des cycles nécrose et de régénération cellulaire. La cirrhose est un

état pré-néoplasique et constitue le facteur de risque majeur de développement d'un **carcinome hépatocellulaire** (CHC) (Figure 5).



Figure 5 : Evolution de l'atteinte hépatique au cours des hépatopathies

b. Carcinome hépatocellulaire

Le carcinome hépatocellulaire, ou hépatocarcinome, est la principale **tumeur maligne primitive du foie** (environ 80% des cas). Il se développe à partir des **hépatocytes** qui se transforment en cellules tumorales suite à l'accumulation d'altérations génétiques et épigénétiques. Par ailleurs, des cellules souches hépatiques sont très certainement impliquées dans le développement tumoral et font actuellement l'objet de nombreuses recherches. L'oncogénèse hépatique est un processus long, multi-séquentiel et complexe dont les mécanismes cellulaires et moléculaires ne sont pas encore totalement élucidés.

Les autres tumeurs primitives du foie sont variées et se développent généralement sur un foie non cirrhotique, contrairement au CHC. Parmi celles-ci, peuvent notamment être cités [4] :

- Le cholangicarcinome intra-hépatique : se développe à partir des cholangiocytes.
- L'hépatoblastome : tumeur qui atteint presque exclusivement les enfants. Elle est constituée principalement de cellules épithéliales immatures (fœtales ou embryonnaires).
- L'angiosarcome : se développe à partir des cellules endothéliales bordant les sinusoïdes.

II. Epidémiologie

II.1. Incidence et mortalité

Selon les données publiées par le centre international de recherche sur le cancer (IARC) dans son étude GLOBOCAN 2012, le CHC est le **5**^{ème} cancer le plus fréquent chez l'homme et le **9**^{ème} chez

la femme dans la population mondiale [5]. Du fait de son **très mauvais pronostic**, le CHC est au **2**^{ème} **rang des cancers les plus mortels** derrière le cancer du poumon. En 2012, il a été responsable d'environ 745 000 décès dans le monde.

Au cours de cette même année, l'IARC a dénombré approximativement 782 000 nouveaux cas de CHC, majoritairement répartis en Asie (Tableau 1). En effet, la Chine, à elle seule, concentre près de 50% des nouveaux cas recensés en 2012 [6]. Les hommes sont plus touchés que les femmes avec un ratio hommes/femmes de 2,4 au niveau mondial. D'après les prévisions de l'IARC, l'incidence du cancer du foie va continuer à augmenter dans les années à venir et le nombre de nouveaux cas en 2020, dans le monde, est estimé à 950 000.

Zones Géographiques	Hommes	Femmes
Afrique	38 700	20 000
Amériques	40 300	22 900
Asie	430 700	163 700
Europe	42 800	20 600
Océanie	1 900	800
TOTAL (Monde)	554 400	228 000

Tableau 1 : Nombre de nouveaux cas de cancer du foie estimé par région géographique et par sexe d'après l'étude GLOBOCAN 2012 de l'IARC.

Le calcul des taux d'incidence standardisés sur l'âge permet de comparer les données de chaque pays à l'échelle mondiale. La répartition géographique des cas de CHC est hétérogène (Figure 6). Les taux d'incidence les plus élevés sont retrouvés en **Asie de l'est et en Afrique subsaharienne** avec par exemple, des taux d'incidence standardisés de 22 et 17 nouveaux cas pour 100 000 personnes en 2012 respectivement en Chine et en Côte d'ivoire. En France, l'incidence du CHC a augmenté de 1980 à 2012 en passant de 1909 à 8723 nouveaux cas diagnostiqués par an. Les taux d'incidence standardisés en 2012 sont de 12,1 chez l'homme et de 2,4 chez la femme soit un rapport hommes/femmes de 5,04 [7].



Figure 6 : Taux d'incidence standardisé sur l'âge pour le cancer du foie en 2012 d'après les données GLOBOCAN 2012

Ces disparités d'incidence à l'échelle mondiale tiennent à la différence de répartition des facteurs étiologiques du CHC [8].

II.2. Facteurs de risques

Le CHC survient presque toujours chez un patient atteint d'une maladie chronique du foie, au stade de cirrhose le plus souvent. La **cirrhose** est donc le facteur majeur de prédisposition au CHC puisque, dans 80% des cas, ce cancer se développe sur un foie cirrhotique [9]. Au total, environ un tiers des patients cirrhotiques développeront un CHC au cours de leur vie [10]. Au niveau mondial, il existe un **lien étroit entre l'épidémiologie du CHC et celle des principales causes de cirrhose** : le virus de l'hépatite B (VHB), le virus de l'hépatite C (VHC), la consommation excessive d'alcool et l'exposition aux aflatoxines [11]. L'impact de ces facteurs de risque varie en fonction de la zone géographique (Tableau 2).

Zones géographiques	Facteurs de risque			
	VHC	VHB*	Alcool	Autre
Europe	60-70%	10-15%	20%	10%
Amérique du Nord	50-60%	20%	20%	10%
Asie et Afrique	20%	70%	10%	<10%
				(aflatoxines)
Japon	70%	10-20%	10%	<10%

* Estimation faite à partir des sujets porteurs de l'antigène Hbs.

Tableau 2 : Facteurs de risque de CHC selon les différentes zones géographiques, en 2000 [9].

a. Hépatites virales chroniques

Classées comme carcinogènes chez l'Homme par l'IARC depuis 1994 [12], **les infections chroniques par le VHB et le VHC constituent le facteur de risque majeur de CHC** à l'échelle mondiale. En effet, 70 à 80% des cas de CHC sont associés à une hépatite chronique virale à VHB ou VHC [13]. Ces infections sont un problème mondial de santé publique avec approximativement 240 millions d'individus porteurs chroniques du VHB [14], [15] et entre 130 et 150 millions porteurs chroniques du VHC [16].

L'hépatite B chronique est responsable de près de 50% de la totalité des cas de CHC à l'échelon mondial [13]. Cette pathologie constitue le facteur de risque majeur de développer un CHC en Asie (hors Japon) et en Afrique subsaharienne (Tableau 2), zones où la prévalence d'hépatites B chroniques (Figure 7) et le taux d'incidence de CHC sont élevés (Figure 6). Il est estimé que 10 à 25% des personnes atteintes d'une hépatite B chroniques risquent de développer un CHC au cours de leur vie. L'infection par le VHB se propage par :

- exposition à du sang contaminé, par voie parentérale ou percutanée
- voie sexuelle via les liquides biologiques (sperme, sécrétions vaginales)
- transmission verticale de la mère à l'enfant : à la naissance et dans la période péri-natale.

Une fois infectée par le VHB, une personne ne développe pas systématiquement une hépatite chronique. La probabilité que l'infection devienne chronique dépend de l'âge auquel elle est contractée. En effet, selon l'OMS, 80 à 90% des nourrissons infectés par le VHB pendant leur première année de vie seront atteints d'une hépatite chronique. A l'inverse, chez l'adulte, le passage à la chronicité s'observe seulement dans moins de 5% des cas. Par conséquent, plus un individu a été infecté jeune par le VHB, plus la probabilité qu'il développe un CHC est importante [17]. Le risque de CHC liée à l'infection par le VHB est particulièrement élevé en zones d'endémie d'hépatite B car dans

ces régions le virus se transmet majoritairement de la mère à l'enfant. A l'inverse, en Europe et en Amérique, où le taux d'incidence du CHC est plus faible, l'infection est le plus souvent acquise à l'âge adulte par voie sexuelle ou parentérale [8].



Figure 7 : Prévalence de l'infection chronique au virus de l'hépatite B chez les adultes (19 à 49 ans), en 2005 [15]

L'hépatite C chronique est le facteur de risque majeur de développement du CHC aux Etats-Unis, en Europe, en Egypte et au Japon [18]. Le VHC se transmet par le **sang** principalement par l'utilisation de matériel souillé, pour l'injection de drogue par exemple, et par la transfusion de sang ou produits dérivés n'ayant pas fait l'objet de dépistage. Le passage à la chronicité est plus fréquent qu'avec le VHB puisque 55 à 85% des individus infectés par le VHC développent la forme chronique de la maladie. De plus, dans les 25 à 30 ans suivant l'infection par le VHC, 15 à 35% des patients développent une cirrhose. Parmi ces patients cirrhotiques, le risque de CHC est évalué entre 1 et 4% par an [13].

L'amélioration de la **sécurité transfusionnelle** via le dépistage des infections dans les dons de sang, la **vaccination contre le VHB** et l'émergence de **nouveaux traitements antiviraux** efficaces tels que le Sofosbuvir contribuent à diminuer l'incidence du CHC. Parmi ces moyens de prévention, la vaccination a un impact majeur, en particulier en Asie. A Taïwan, 30 ans après l'initiation de la vaccination universelle des nouveau-nés, le nombre d'individus âgés de moins de 30 ans porteurs du VHB a chuté de 10-17% à 0,7-1,7% et le taux de CHC a diminué de 80% [19].

b. Aflatoxines

Les aflatoxines sont des **mycotoxines** produites par des champignons appartenant au genre *Aspergillus*, majoritairement *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* [6]. Ces espèces fongiques contaminent principalement le maïs, les pistaches, les cacahuètes et les graines de coton cultivés et/ou stockés dans un environnement chaud et humide (Figure 8). Ces toxines sont considérées comme carcinogènes et génotoxiques chez l'Homme selon la classification de l'IARC [20].



Figure 8 : Les aflatoxines (A) Image en microscopie du champignon *Aspergillus flavus*. (B) Structure chimique de l'aflatoxine B1. (C) Maïs contaminé.

L'aflatoxine B₁ (AFB₁) est la plus fréquente et la plus toxique. Après ingestion d'aliments contaminés, l'AFB₁ est métabolisée au niveau hépatique en un dérivé époxyde actif capable de générer des dommages à l'ADN. Plus particulièrement, l'exposition à l'AFB1 est associée à une mutation caractéristique du gène suppresseur de tumeur p53 au niveau du codon 249 [14]. Dans les zones où la contamination des aliments est la plus forte (Afrique subsaharienne et Asie), cette signature mutationnelle est observée dans 30 à 60% des cas de CHC.

Le risque de développer un CHC est 4 fois plus important chez les personnes ayant un taux élevé d'AFB₁ en comparaison avec les individus sans ce facteur de risque. Par ailleurs, l'association entre AFB₁ et hépatite virale chronique (VHB et VHC) est synergique et potentialise donc le risque de CHC [6].

Dans des régions fortement contaminées telles que la Chine et Taiwan, le développement d'une **politique de sécurité alimentaire** a permis de réduire de manière importante l'exposition des individus et, par conséquent, le taux de mortalité lié au CHC [17].

c. Alcool

La **consommation excessive d'alcool** représente une cause majeure de cirrhose dans les pays développés et est associée avec une augmentation du risque de CHC. Une méta-analyse récente de 19 études prospectives a estimé que le risque de CHC est augmenté de 16% chez les personnes consommant plus de 3 verres d'alcool par jours [21]. Par ailleurs, l'alcool a un effet synergique avec les infections à VHB et VHC sur l'augmentation du risque de CHC en favorisant le développement d'une cirrhose [8].

d. Autres facteurs de risques

L'obésité, le diabète de type 2 et le syndrome métabolique sont des facteurs de risque de CHC. Ces pathologies sont fréquemment associées avec le développement d'une stéatose non alcoolique (*non alcoholicfattyliverdisease* : NAFLD). Cette dernière peut évoluer vers une stéatohépatite (*non alcoholicsteatohepatitis* : NASH) puis une cirrhose [22]. Depuis les années 80, la prévalence de l'obésité et du diabète de type 2 a augmenté de manière continue. Par conséquent, la proportion de CHC relative à ces pathologies devrait s'accroitre considérablement [6].

Certaines maladies héréditaires comme l'hémochromatose ou le déficit en alpha-1 antitrypsine sont associées à un risque accru de CHC [17].

III. Dépistage et Diagnostic

Jusqu'au début des années 1970, le diagnostic du CHC était fait, le plus souvent, lors de l'apparition de signes cliniques tels que des douleurs abdominales, une altération importante de l'état général, de la fièvre, etc ... La tumeur était alors volumineuse et/ou métastasée, le traitement curatif par résection chirurgicale n'était donc pas envisageable et la survie des patients était très faible, de l'ordre de quelques mois. Les progrès réalisés dans le domaine de l'**imagerie médicale** entre 1970 et 1980 ont permis d'améliorer le dépistage et le diagnostic du CHC. Durant cette période, trois méthodes d'imagerie « non invasive » ont vu successivement le jour : la tomodensitométrie (TDM), l'échographie et l'imagerie par résonance magnétique (IRM)[23].

III.1. Dépistage

Le but du dépistage est de diminuer la mortalité liée au CHC en **identifiant le cancer à un stade pouvant bénéficier d'un traitement curatif**. Les tumeurs concernées par ce type de traitement sont de petites tailles et généralement asymptomatiques. Il est donc nécessaire de les rechercher par une **surveillance régulière dans la population dite à haut risque** [10], [23] :

- Patients présentant une cirrhose compensée quelqu'en soit l'étiologie
- Patients présentant une cirrhose décompensée en attente de transplantation hépatique
- Patients non cirrhotiques porteurs d'une hépatite B chronique active

- Patients non cirrhotiques porteurs d'une hépatite B chronique ayant des antécédents familiaux de CHC
- Patients non cirrhotiques atteints d'une hépatite C chronique avec une fibrose hépatique au stade avancé

Selon les recommandations européennes publiées en 2012, le dépistage est fondé sur l'échographique hépatique effectuée tous les 6 mois.

III.2. Diagnostic

Le diagnostic de CHC est généralement suspecté après la découverte d'une ou plusieurs lésions focales nodulaires hépatiques à l'échographie, ou à l'occasion de symptômes en cas de tumeur évoluée.

La technique de référence pour faire le diagnostic de CHC est l'analyse histologique d'un fragment tumoral. Celui est obtenu par ponction biopsie hépatique et doit être comparé, chaque fois que c'est possible, à un fragment de foie non tumoral prélevé simultanément. Cependant, cette technique présente des risques tels que les complications hémorragiques et la dissémination tumorale sur le trajet de ponction. De ce fait, des critères diagnostiques non invasifs fondés sur les examens d'imagerie hépatique sont recommandés par l'European Association for the Study of the Liver (EASL). Ces critères ne sont applicables que chez les patients atteints de cirrhose. Dans ce contexte, l'EASL a défini un algorithme de diagnostic du CHC chez le patient cirrhotique en fonction de la taille du nodule découvert à l'échographie (Figure 9). Selon cette stratégie, le diagnostic de CHC est confirmé si le ou les nodules de plus d'1 cm de diamètre présentent un aspect typique d'hypervascularisation à l'IRM et/ou au scanner. Pour les nodules sur foie cirrhotique ne présentant pas un aspect typique de CHC à l'imagerie et pour tous les cas de CHC survenant sur foie sain, la réalisation d'une ponction biopsie hépatique pour analyse anatomopathologique est indispensable. Dans le cas où la biopsie est négative, cela n'élimine pas le diagnostic de CHC et devra conduire à une surveillance échographique tous les 4 mois. Cette même surveillance est appliquée aux nodules ne dépassant pas 1 cm de diamètre. S'il n'y a pas d'augmentation du diamètre avec un recul de 2 ans, la périodicité des contrôles redevient semestrielle.



Figure 9 : Algorithme diagnostic de CHC chez un patient cirrhotique d'après l'EASL-EORTC 2012 [10] * Il est recommandé de faire le diagnostic avec deux techniques d'imageries différentes sauf dans les centres experts où une seule technique d'imagerie suffit.

**Caractéristiques radiologiques : hypervascularisation au temps artériel avec lavage à la phase portale ou à la phase tardive

IV. Classification pronostique BCLC

Les classifications ont pour but d'établir le **pronostic** de la maladie et de sélectionner le **traitement adapté**. Le pronostic du CHC est lié à son stade de développement lors du bilan initial. D'après les recommandations de l'EASL, les principaux facteurs pronostics cliniques et biologiques chez les patients atteints d'un CHC sont [10]:

- Le statut tumoral : nombre et taille des nodules, présence d'une invasion vasculaire, dissémination extra-hépatique
- La fonction hépatique : calcul du score de Child-Pugh (Tableau 3), hypertension portale, ascite
- Etat général de santé du patient : indice de performance (PST) de l'OMS, comorbidités ...

	1 point	2 points	3 points	
Encéphalopathie	Absente	Confusion	Coma	
Ascite	Absente	Minime	Abondante	
Bilirubinémie (µmol/L)	< 35	35 à 50	> 50	
Albuminémie (g/L)	> 35	28 à 35	< 28	
Taux de prothrombine (%)	> 50	40 à 50	< 40	
La gravité de la cirrhose est croissante avec la valeur du score total :				
Score 5 et 6 : Classe A				
Score 7 à 9 : Classe B				
Score 10 à 15 : Classe C				

Tableau 3 : Calcul du score de Child-Pugh définissant la gravité d'une cirrhose, d'après la Société Nationale Française de Gastro-Entérologie

Pour la majorité des tumeurs solides, le stade du cancer est défini en utilisant la classification TNM qui consiste à évaluer la taille de la tumeur sur son site primitif, le nombre de ganglions envahis et la présence de métastases. Cependant cette classification n'est pas adaptée au CHC car elle ne tient pas compte du statut de la fonction hépatique et de l'état de santé du patient. Actuellement, l'EASL recommande l'utilisation de la **classification pronostique** *Barcelona Clinic Liver Cancer* (BCLC). Cette dernière divise les patients atteints de CHC en 5 stades de sévérité (0, A, B, C et D) selon les facteurs pronostics précédemment cités et permet ainsi de proposer une **prise en charge thérapeutique** (Figure 10).



Figure 10 : Classification BCLC et stratégie thérapeutique associée [24]

PST : indice de performance de l'OMS ; N1 : invasion ganglionnaire ; M1 : métastase(s) ; DDLT : transplantation hépatique de donneur décédé ; LDLT : transplantation hépatique de donneur vivant ; RF : radiofréquence ; PEI : Injection percutanée d'éthanol ; TACE : Chimioembolisation ; OS : survie globale ; SD : écart-type.

IV.1. Stades précoces : Stades 0 et A

Les CHC **très précoces** (stade 0) sont définis par la présence d'**une seule tumeur de diamètre inférieur à 2 centimètres** chez des patients en **bon état général** et avec une **fonction hépatique préservée** (Child A). Actuellement, dans les pays occidentaux, 5 à 10 % des patients sont diagnostiqués à ce stade. Ces tumeurs sont facilement accessibles aux traitements curatifs et la survie globale est de 80 à 90 % à cinq ans après résection ou transplantation hépatique.

Un CHC est dit précoce (stade A) s'il est constitué d'un seul nodule de plus de 2 centimètres ou de 2 à 3 nodules de moins de 3 centimètres de diamètre chez un patients en bon état général avec une fonction hépatique peu altérée (Child A ou B).

IV.2. Stade intermédiaire : Stade B

Ce stade correspond à des **tumeurs multiples sans dissémination extra hépatique** chez des patients asymptomatiques à la **fonction hépatique préservée**. Chez ces patients la médiane de survie sans traitement est de 16 mois.

IV.3. Stades avancés : Stades C et D

Le stade avancé (stade C) correspond à des tumeurs développées chez des patients symptomatiques avec invasion intra- ou extra-hépatique. La médiane de survie est de 6 mois avec des variations selon le niveau d'altération de la fonction hépatique.

Le **stade terminal** (stade D) concerne des patients présentant une **altération sévère de l'état général** reflétant une tumeur évoluée. La médiane de survie est de 3 à 4 mois.

V. Traitement

L'algorithme BCLC permet d'orienter la stratégie thérapeutique (Figure 10). Compte tenu des difficultés diagnostiques et de la complexité des indications thérapeutiques, les dossiers des patients doivent être discutés en réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP) spécialisée afin de valider le diagnostic et d'élaborer la proposition thérapeutique.

V.1. Traitements à visée curative

Les traitements curatifs comprennent les **traitements chirurgicaux** (transplantation hépatique et exérèse) et la **destruction percutanée**. Ces traitements sont réservés aux patients porteurs de tumeurs à des **stades précoces et en bon état général** (stades BCLC 0 et A).

a. Transplantation

La transplantation hépatique est un traitement de choix chez les patients atteints de CHC sur cirrhose car elle permet notamment de traiter de manière simultanée la tumeur et la cirrhose sous jacente. Elle est indiquée pour des CHC strictement localisés au foie, en l'absence de thrombose portale ou sus-hépatique chez des patients ne pouvant pas être traités par résection ou destruction percutanée. Dans ces conditions, le taux de survie à 5 ans est de l'ordre de 70% [25]. Cependant, la transplantation hépatique est limitée par les fréquentes contre-indications (âge, états physiologiques, comorbidités, alcoolisme actif...) et la pénurie de greffons. Cette dernière est responsable d'un long temps d'attente avant la transplantation exposant au risque de progression tumorale et donc de sortie des critères d'éligibilité. Cela peut justifier la mise en place d'un traitement « d'attente » par chimioembolisation artérielle, destruction percutanée ou la résection [26].

b. Résection

La résection hépatique est le **traitement de choix du CHC chez les patients non cirrhotiques** où des résections importantes peuvent être réalisées avec un faible taux de complications engageant le pronostic vital [10].

Pour les CHC sur cirrhose, l'utilisation de cette technique est discutée chez les patients ayant une fonction hépatique préservée (Child A) et pas de signe d'hypertension portale.

Le taux de survie est d'autant plus important que la tumeur réséquée est unique et de petite taille. Le taux à 5 ans pour des nodules uniques \leq 2 centimètres est de 66% contre 52% pour des tumeurs de 2 à 5 centimètres. Par ailleurs, les **récurrences sont fréquentes** et concernent environ 70% des patients dans les 5 premières années suivant la résection [10].

c. Destruction percutanée

La destruction percutanée est une alternative à la chirurgie. Il s'agit d'une méthode simple et habituellement bien tolérée, ayant l'avantage de préserver le foie non tumoral. En France, la

technique la plus utilisée est la **radiofréquence** qui détruit le tissu tumoral par hyperthermie via un l'application d'un courant électrique au sein de la tumeur (Figure 11). Après traitement, la survie à 5 ans est de 40 à 70% mais le **taux de récidive est élevé** [10]. Si la radiofréquence est impossible, l'alcoolisation percutanée est envisageable pour les CHC de diamètre inférieur à 2 centimètres. Cette technique consiste en l'injection d'éthanol absolu au niveau de la tumeur.



Figure 11 : Destruction tumorale percutanée par radiofréquence avec guidage échographique www.e-cancer.fr

d. Traitement adjuvant

Après résection ou destruction percutanée, le risque de récidive est élevé. Cependant, il n'y a, actuellement, aucun consensus validé pour recommander un traitement adjuvant. En revanche, la prise en charge parallèle de l'hépatopathie chronique améliore le pronostic et pourrait réduire le risque de récidive. Cette démarche passe par le **traitement de l'étiologie et des comorbidités** ainsi que la **prévention des complications** de l'hypertension portale en cas de cirrhose [26].

V.2. Traitements palliatifs

Les traitements palliatifs sont proposés chez les patients atteints d'un CHC à un stade intermédiaire ou avancé (stades BCLC B ou C) mais aussi pour des stades plus précoces en cas de contre-indication au traitement curatif. L'objectif des ces traitements n'est pas d'obtenir la guérison mais de prolonger la survie et de maintenir la meilleure qualité de vie possible pour le patient.

a. Chimioembolisation trans artérielle

La chimioembolisation trans artérielle (TACE) est considérée comme le traitement de **première ligne des patients porteurs d'un CHC de stade intermédiaire** (stade BCLC B) avec une fonction hépatique préservée, en bon état général et en l'absence de métastases. Elle permet une réponse tumorale partielle dans 15 à 55% des cas et retarde significativement la progression et l'invasion vasculaire [10]. La chimioembolisation est une technique de radiologie interventionnelle.

La chimioembolisation conventionnelle utilise le lipiodol, un agent de contraste huileux iodé, comme vecteur de la chimiothérapie. Dans un premier temps, un cathéter est introduit jusque dans l'artère hépatique alimentant la tumeur. Dans un deuxième temps, un agent cytotoxique, le plus souvent la doxorubicine, émulsionné dans du lipiodol est injecté via le cathéter (Figure 12). Enfin, un agent embolisant est utilisé pour obstruer l'artère nourricière de la tumeur. Cette méthode permet :

- d'augmenter la concentration intratumorale en chimiothérapie
- de prolonger l'effet cytotoxique
- de réduire la toxicité systémique
- d'entraîner l'ischémie de la tumeur



Figure 12 : Principe de la chimioembolisation www.gi.jhsps.org

Plus récemment, une nouvelle technique de chimioembolisation appelée DEB-TACE ou *Drug Eluting Beads - Trans Arterial ChemoEmbolization* s'est développée. Elle utilise des **microsphères** d'embolisation chargées de cytotoxiques, principalement la doxorubicine. Ces microsphères sont constituées d'un polymère non résorbable qui va relarguer le cytotoxique de manière contrôlée au niveau de la tumeur. De plus, elles ont un diamètre calibré et sont disponibles dans différentes tailles permettant ainsi de réaliser une embolisation dite sélective. Plusieurs types de microsphères sont disponibles sur le marché tel que HepaSphere[®] et DC-Bead[®]. Cette nouvelle technique est mieux
tolérée mais n'est pas supérieure en matière de survie par rapport à la chimioembolisation conventionnelle [27].

b. Traitement médicamenteux

Le tamoxifène, les anti-androgènes, l'interféron et l'octréotide sont inefficaces [26].

Le CHC est connu pour être l'un des cancers les plus chimio-résistants. De plus, l'existence d'une cirrhose peut perturber le métabolisme des chimiothérapies et augmenter leur toxicité. Actuellement, il n'existe pas de chimiothérapie systémique recommandée pour la prise en charge des patients atteints de CHC [10].

La découverte du Sorafénib (Nexavar®) a permis une avancée dans le traitement médical du CHC qui était jusqu'alors inexistant. Cette molécule est un inhibiteur multikinase qui a des effets anti-prolifératif sur les cellules tumorales et anti-angiogénique. Son efficacité a été démontrée pour la première fois dans l'essai multicentrique randomisé de phase III SHARP ayant comparé Sorafénib et placebo chez 602 malades atteints d'un CHC évolué. La survie globale était significativement allongée dans le bras Sorafénib avec une médiane de 10,7 mois contre 7,9 mois pour le bras placebo [28]. Depuis 2007, le Sorafénib est le traitement de référence pour les patients atteints d'un CHC au stade avancé avec une fonction hépatique préservée (stade BCLC C). Ce médicament est aussi indiqué chez les patients non éligibles pour un traitement spécifique (transplantation hépatique, résection, destruction percutanée ou chimioembolisation) ou en récidive après un tel traitement, en bon état général et avec une fonction hépatique préservée. Le traitement doit être arrêté en cas de progression tumorale avérée ou de survenue d'une toxicité inacceptable. Il n'existe pas de traitement de deuxième ligne pour les patients intolérants ou en échec à un traitement par Sorafénib. Dans ce cas, il est recommandé de proposer aux patients d'être inclus dans un protocole d'essai thérapeutique ou de mettre en place un traitement uniquement symptomatique visant à améliorer la qualité de vie. Il en est de même pour les patients en stade terminal (BCLC D).

VI. Perspectives

Malgré les progrès réalisés ces dernières années dans la prise en charge du CHC, **le pronostic de cette pathologie reste très sombre**. La mortalité est de 100% à 10 ans à l'exception des patients ayant bénéficié d'une transplantation hépatique, seul traitement réellement curatif permettant l'éradication du CHC et de sa cause principale: la cirrhose [29].Le recours à cette option n'est possible que pour une très faible proportion de malades du fait de la pénurie de greffons et des critères d'éligibilité à respecter pour y prétendre. Les espoirs convergent donc tous vers les avancées de la recherche pour trouver des solutions à ce problème majeur de santé publique. Les axes de recherche sont multiples et s'intéressent à tous les domaines de la prise en charge du CHC : prévention des facteurs de risques (cirrhose majoritairement), dépistage, diagnostic, identification de facteurs pronostics, thérapeutiques, mécanismes moléculaires impliqués dans la carcinogénèse, etc ...

L'amélioration des techniques d'ablation tumorale devrait permettre de prendre en charge des tumeurs plus volumineuses et donc de pouvoir proposer ce type de traitement dit curatif à davantage de patients. Par exemple, l'utilisation de sondes multipolaires pour la radiofréquence, l'électroporation irréversible, l'ablation par micro-ondes sont des techniques faisant actuellement l'objet d'études cliniques [10].Le recours à la **radiothérapie stéréotaxique** ou radiochirurgie est aussi en évaluation pour le CHC. Cette technique utilise des faisceaux de rayons convergents qui délivrent une forte dose d'irradiation à la tumeur avec une précision millimétrique. En France, ce traitement peut être réalisé dans des centres expérimentés disposant d'équipement tel que le CyberKnife® (Figure 13). Son emploi doit être réservé aux essais thérapeutiques ou discuté en RCP dans des cas où aucun traitement validé n'est possible [26].



Figure 13 : CyberKnife[®] www.unicancer.fr

L'arsenal thérapeutique est limité et d'efficacité modeste pour les patients atteints d'un CHC au stade intermédiaire ou avancé, voire inexistant pour ceux en échec après un traitement par Sorafénib. La recherche et le développement de nouvelles techniques, stratégies et molécules est donc la clef de voûte pour apporter des solutions thérapeutiques à ces patients. Parmi les stratégies thérapeutiques en développement peuvent être cités :

- Les combinaisons de traitements comme par exemple l'association de la chimioembolisation
 à la radiothérapie ou à la radiofréquence. De nombreuses études testent aussi l'association
 de thérapeutiques avec le Sorafénib.
- La radioembolisation qui associe embolisation et radiothérapie « interne ». Elle consiste en l'injection intra-artérielle hépatique d'une substance radioactive, le plus souvent il s'agit de microsphères couplées à l'Yttrium-90.

- Les thérapies ciblées. Par exemple, le Lenvatinib : un inhibiteur multikinase actuellement en essai de phase III vs Sorafénib. Le Tivantinib, un inhibiteur sélectif de MET, très prometteur, actuellement en essai de phase III.
- L'**immunothérapie** en particulier les inhibiteurs de points de contrôle immunitaires (*immune checkpoint inhibitors*) tel que les anticorps monocloaux anti-CTLA4, anti-PD1 et anti-PDL-1.
- Les **nanovecteurs** capables de transporter et libérer des principes actifs de manière ciblée au sein de la tumeur.

Chapitre 2 : Nanovecteurs

I. Les nanotechnologies

I.1. Définitions

Depuis plusieurs dizaines d'années, les scientifiques explorent le monde de l'infiniment petit appelé **nanomonde**. Le préfixe « nano » vient du grec « *nanos* » qui signifie : nain, très petit. Un nanomètre (nm) correspond à un **milliardième de mètre soit 10⁻⁹ m**. Comparativement, un nanomètre est 100 000 plus petit que l'épaisseur d'un cheveu. Les éléments nanométriques existent dans la nature et sont une source d'inspiration pour l'Homme pour comprendre ces phénomènes et développer des applications biomimétiques. Par exemple, les feuilles de lotus sont tapissées d'aspérités microscopiques appelées papilles, elles-mêmes recouvertes de nanoparticules de cire (Figure 14). Cette structure confère à ces feuilles un caractère superhydrophobe. Ainsi, les feuilles de lotus ont la capacité de s'auto-nettoyer car les gouttes d'eau roulent à leur surface en entraînant les contaminants particulaires [30].



Figure 14 : Nanorugosité des feuilles de lotus. (A) Feuille de lotus. (B) Une papille recouverte de cire observée au microscope à balayage. (C) Capacité d'auto-nettoyage

A l'échelle nanométrique, la matière possède des propriétés originales, différentes de celles observées à plus grande échelle. Les nanosciences s'intéressent à l'étude des nano-objets et des phénomènes associés découlant spécifiquement de leur taille. En pratique, l'utilisation de ces connaissances a donné naissance aux **nanotechnologies** qui ont pour but de concevoir, fabriquer et utiliser des structures dont au moins l'une des dimensions est comprise entre de 1 et 100 nm [31]. Comparativement au monde du vivant, les nanotechnologies sont du même ordre de grandeur que les protéines et les virus (Figure 15). Les nanosciences et les nanotechnologies constituent un champ de recherche transversal impliquant de nombreuses disciplines telles que la chimie, la physique, la biologie, l'informatique, l'optique, la science des matériaux, etc...



Figure 15 : Echelle de taille des nanotechnologies

I.2. Historique

Le développement des nanotechnologies est intimement lié à celui de la physique quantique. Le physicien **Richard Feynman** (Figure 16), prix Nobel de Physique en 1965, est considéré comme le fondateur des nanotechnologies. Au cours de son discours intitulé « *There's plenty of room at the bottom* » en 1959 devant la Société Américaine de Physique, il introduit l'idée de pouvoir manipuler la matière à un niveau atomique et incite la communauté scientifique à explorer le monde de l'extrêmement petit [32]. En 1974, **Norio Taniguchi**, Professeur à l'université de Tokyo, utilise pour la première fois le terme « nanotechnologie » pour désigner la possibilité de fabriquer des matériaux à l'échelle du nanomètre.



Figure 16 : Figures emblématiques du développement des nanotechnologies (A) Feynman. (B) Taniguchi. (C) Binning et Rohrer. (D) Smalley, Curl et Kroto

Cependant, les nanotechnologies sont réellement nées en 1981 avec l'apparition du **microscope à effet Tunnel** qui permet non seulement d'observer les atomes mais aussi de les déplacer un à un. Cette invention a valu à **Gerb Binning et Heinrich Rohrer**, chercheurs au laboratoire IBM à Zurich, le prix Nobel de physique en 1986. L'exploration du nanomonde s'accélère et trois chercheurs, **Richard Smalley, Robert Curl et Harold Kroto** découvrent les **fullerène**s en 1985. Il s'agit de nanostructures quasi sphériques composées d'un assemblage d'atomes de carbone

(Figure 17). Six ans plus tard, les nanotubes de carbone sont identifiés dans un sous-produit de synthèse des fullerènes.



Figure 17 : Représentation d'un fullerène C₆₀ et d'un nanotube www.surrealsciencestuff.wordpress.com

I.3. Aujourd'hui

Depuis quelques dizaines d'années, les nanotechnologies connaissent un développement en pleine expansion et sont devenues l'un des défis technologiques majeurs, parmi les plus prometteurs du XXI^{ème} siècle. La diversité des applications des nanotechnologies a suscité un engagement budgétaire massif dans la recherche et le développement (R&D) pour accélérer l'innovation. Au niveau mondial, les investissements se mesurent en milliards de dollars principalement aux Etats-Unis, en Europe et au Japon, où les nanotechnologies sont un axe prioritaire de recherche. En 2001, les Etats-Unis ont mis en place un programme de financement fédéral appelé « National Nanotechnology Initiative » (NNI) qui coordonne l'activité de vingt agences de R&D en nanotechnologies. Depuis sa création en 2001, la NNI a investi près de 24 milliards de dollars dans ce domaine de recherche [33]. Compte tenu de l'importance stratégique de ce champ d'étude, l'ensemble de la recherche mondiale se mobilise. En 2000, les dépenses annuelles publiques de R&D en nanotechnologies étaient de l'ordre de 270 millions de dollars pour les Etats-Unis, 245 pour le Japon et 200 pour l'Europe. Ces chiffres ont considérablement augmenté pour atteindre en 2008 : 1500 millions de dollars aux Etats-Unis, 950 pour le Japon et 1900 pour l'Europe [34]. Des complexes scientifiques dédiés aux nanosciences et nanotechnologies voient le jour tel que le campus MINATEC à Grenoble. Créé en 2006, ce dernier est l'un des premiers centres mondiaux dédiés aux micro- et nano-technologies.

Les avancées dans le domaine des nanosciences et des nanotechnologies offrent de nouvelles perspectives scientifiques et technologiques. Leurs applications sont considérables et concernent de très nombreux secteurs tels que : la santé, la cosmétique, l'électronique, l'automobile, l'industrie textile ou encore la communication. Même si l'existence des nanotechnologies est encore récente, elles font déjà partie de notre quotidien au travers des textiles hydrofuges, des raquettes de tennis en nanotubes de carbone ou de certaines crèmes solaires par exemple

II. Des nanotechnologies à la nanomédecine

L'utilisation des nanosciences et des nanotechnologies en médecine est appelée « nanomédecine » et constitue l'un des domaines d'application les plus prometteurs. L'exploitation des propriétés biologiques, physiques et chimiques des matériaux à l'échelle nanométrique permet de miniaturiser certains dispositifs et de concevoir des nano-objets capables d'interagir avec les entités biologiques moléculaires et cellulaires des organismes vivants [35].

II.1. Applications médicales des nanotechnologies

En 2013, le comité Biotechnologies du LEEM (syndicat français des entreprises du médicament) a réalisé une étude sur le domaine de la nanomédecine et a publié les résultats dans un rapport intitulé « Application des nanotechnologies à la médecine – Compétitivité et attractivité de la France Horizon 2025 » [36]. L'analyse a identifié 230 produits de nanomédecine en développement clinique ou ayant une autorisation de mise sur le marché (AMM). La taille des produits inclus dans l'étude pouvait être comprise entre 1 et 1000 nm si leurs propriétés physico-chimiques étaient spécifiques de l'échelle nanométrique. Les produits ont été classés en fonction de leur domaine d'utilisation : diagnostic in vitro ou in vivo, thérapeutique, médecine régénérative ou autres (Figure 18).



Figure 18 : Applications médicales des nanotechnologies [36]

a. Diagnostic

Les **diagnostics** *in vitro* s'effectuent par analyses biomédicales d'échantillons biologiques (tissus, liquides biologiques...). Dans ce domaine, l'utilisation des nanotechnologies vise à diminuer les quantités d'échantillons biologiques nécessaires mais aussi à miniaturiser et rendre plus performant les outils d'analyse. Parmi les technologies en développement peuvent être cités :

- Les **puces à ADN** : ce sont de petites plaques de verre, de plastique ou de silicium sur lesquelles sont synthétisées ou greffées plusieurs milliers ou centaines de milliers de séquences ADN. Elles permettent de mesurer le niveau d'expression de plusieurs milliers de gènes simultanément. Elles peuvent, par exemple, servir à identifier un microorganisme ou à repérer une anomalie génétique.

- Les laboratoires sur puce (*lab-on-chip*) : il s'agit de rassembler sur des surfaces de quelques centimètres carrées toutes les étapes du diagnostic, depuis le traitement de l'échantillon jusqu'au rendu du résultat. Ils ne sont encore qu'à un stade précoce de développement mais la miniaturisation des dispositifs d'analyse et les avancées en microfluidique devraient permettre de disposer, à terme, de tels systèmes capables de délivrer de multiples informations à partir d'un seul échantillon.
- Biocapteurs : ils utilisent un élément biologique, comme une enzyme, capable de reconnaitre et signaler la présence ou l'activité d'une molécule biologique en solution [37].
 Le signal biochimique est ensuite converti en signal électrique ou mécanique quantifiable.

Les **diagnostics** *in vivo* sont directement réalisés sur un organisme vivant principalement grâce aux techniques d'**imagerie médicale**. Dans ce domaine, l'application des nanotechnologies a pour but de concevoir des systèmes capables de détecter les maladies à un stade précoce et d'évaluer l'efficacité des thérapeutiques utilisées [37]. De nombreux nano-objets sont en cours de développement comme agent d'imagerie, par exemple :

- Les nanoparticules d'or peuvent être détectées par rayons X, imagerie photoacoustique,
 IRM [38]. Par ailleurs, elles peuvent servir de «plateforme» où sont greffés des agents de contraste comme le gadolinium ce qui permet une augmentation de la détection en IRM [39].
- Les nanoparticules d'oxyde de fer dont les propriétés magnétiques peuvent être exploitées dans le cadre de l'IRM.
- Les « quantum dots » sont des nanocristaux semi-conducteurs capables d'émettre de la lumière fluorescente après excitation par un laser. Leurs propriétés optiques dépendent de leur taille. Les nanocristaux composés de cadmium ne peuvent pas être utilisés chez l'Homme du fait de leur toxicité.

- Les nanoparticules transportant un agent de contraste

De plus, des molécules peuvent être ajoutées à la surface des nanoparticules afin de reconnaître spécifiquement certaines cellules.

b. Médecine régénérative

La médecine régénérative vise à reconstruire un tissu vivant fonctionnel pour réparer ou remplacer un tissu ayant perdu sa fonction suite au vieillissement, à une pathologie, un traumatisme ou une anomalie génétique [37]. L'avènement des **nanobiomatériaux** offre de nouvelles perspectives très prometteuses dans ce domaine. Ces matériaux peuvent être utilisés pour créer des implants et prothèses biocompatibles mais aussi pour constituer des supports pouvant être colonisés *in vitro* ou *in vivo* par des cellules.

c. Systèmes de délivrance de médicaments

Les produits à visée thérapeutique et plus particulièrement les systèmes de délivrance de médicaments constituent le principal domaine d'application des nanotechnologies en médecine (Figure 19). Ces nanosystèmes de délivrance regroupent les **dispositifs implantables** et les **nanovecteurs**.

Les nanotechnologies permettent de fabriquer des systèmes miniatures avec des réservoirs et des pompes capables de libérer le médicament qu'ils contiennent. Du fait de leur petite taille, ces dispositifs sont peu invasifs et peuvent être implantés dans le corps y compris dans le cerveau.

Les **nanovecteurs** sont capables de transporter un principe actif (PA) puis de le libérer au niveau de son site d'action, c'est le principe de la **vectorisation**. La taille des nanovecteurs leur permet de circuler dans le sang et d'arriver au niveau de leur(s) cible(s) sans avoir été retenus au niveau de certains organes et/ou sans emboliser accidentellement des vaisseaux sanguins.



Figure 19 : Répartition des produits de nanomédecine identifiés par le LEEM en 2013

A la suite de son introduction dans l'organisme, un PA se heurte à **différentes barrières** mécaniques, physico-chimiques, enzymatiques depuis son site d'administration jusqu'à son élimination. A une dose donnée, l'efficacité thérapeutique d'une molécule, ses éventuels effets indésirables et sa toxicité dépendent de sa distribution dans l'organisme. L'utilisation des nanovecteurs a pour objectifs de **protéger les PA de la dégradation**, d'**améliorer leur absorption** en facilitant la diffusion tissulaire, de **modifier leur profil pharmacocinétique** et leurs paramètres de **biodistribution** par ciblage tissulaire et/ou cellulaire [40]. Le défi majeur du développement des nanovecteurs est d'aboutir à des systèmes permettant de délivrer et concentrer un PA **spécifiquement au niveau de sa cible cellulaire sans affecter les cellules saines**. De plus, le développement de certains médicaments est parfois ralenti ou arrêté du fait de problèmes de solubilité ou de stabilité. Les nanovecteurs peuvent alors être une alternative intéressante pour l'administration de ces PA [41].

Pour être utilisés en médecine les nanovecteurs doivent être **biocompatibles**, **biodégradables** en petite(s) molécule(s) atoxique(s) de faible poids moléculaire ou au moins bioassimilables après libération du médicament, peu reconnus par les opsonines et le système des phagocytes mononucléés (SPM) et, en cas de transport de médicaments, la quantité encapsulée doit être importante et libérée de manière contrôlée [42]. Dans ce contexte, de nombreux systèmes ont été proposés tels que les liposomes et les nanoparticules qui seront présentés dans la suite de ce manuscrit.

d. Théranostique

La théranostique est une approche **combinant la thérapie et le diagnostic**. Le but de la théranostique n'est pas d'établir un diagnostic au sens strict du terme en identifiant la maladie et en définissant son stade de développement [43]. Grâce à cette technique, il est possible de visualiser la biodistribution et l'accumulation des PA permettant de prédire la réponse au traitement et d'identifier les patients à risque de développer des effets indésirables. Par conséquent, la théranostique permet de pré-sélectionner les patients potentiellement répondeurs au traitement. De plus, cette nouvelle technologie permet de suivre la réponse au traitement et d'ajuster éventuellement les doses [43], [44].

Les molécules utilisées pour le diagnostic et le traitement peuvent être administrées :

- simultanément au sein d'un même nanovecteur
- de manière séquentielle : dans un premier temps, le tissu cible est visualisé en imagerie grâce à un produit de contraste couplé à un agent de ciblage. Dans un deuxième temps, le traitement couplé au même agent de ciblage est administré.

II.2. Nanomédecine et cancer

Les nanotechnologies trouvent des applications dans de très nombreux domaines de la médecine dont le principal est l'oncologie suivi par l'infectiologie, la cardiologie et l'orthopédie. Parmi les 230 produits de nanomédecine identifiés par le LEEM en 2013, 78 d'entre-eux étaient utilisés en oncologie (Figure 20).



Figure 20 : Répartition des 230 produits de nanomédecine identifiés par le LEEM en 2013 selon leur application thérapeutique

L'utilisation des nanotechnologies en oncologie est en plein essor et constitue un axe fort de recherche, comme en témoigne la part importante de produits faisant l'objet d'études cliniques. En effet, selon le rapport du LEEM, près de 60% des produits de nanomédecine en développement clinique étaient destinés à l'oncologie en 2013 (Figure 21).



Figure 21 : Produits de nanomédecine pour la santé humaine en développement clinique selon le LEEM en 2013

Cette montée en puissance des nanotechnologies en cancérologie peut s'expliquer par:

- Les investissements financiers considérables alloués à la recherche dans ce domaine
- Le fait que le cancer soit l'une des principales causes de décès dans le monde constituant donc un problème majeur de santé publique
- Le fait que les patients atteints d'un cancer au stade avancé sont souvent dans une impasse thérapeutique avec une survie très limitée. Il est donc possible d'utiliser chez ces patients, dans le cadre d'essais cliniques, des traitements innovants dont les données de sécurité à long terme ne sont pas encore bien connues
- Les avantages en termes de délivrance de PA que confèrent les nanotechnologies comparativement aux chimiothérapies conventionnelles.

Généralement le manque de sélectivité des agents de chimiothérapie entraîne une exposition systémique importante. Ceci occasionne souvent des effets toxiques secondaires conduisant à l'utilisation de doses réduites d'anticancéreux ou à des arrêts temporaires ou permanents du traitement au détriment de l'efficacité thérapeutique. La capacité des nanovecteurs à délivrer des PA au sein même de la tumeur ou de l'organe atteint permettrait de réduire les effets indésirables des traitements et d'améliorer leur efficacité en augmentant les concentrations intra-tumorales en PA [41]. Cela permet donc d'améliorer l'index thérapeutique, c'est-à-dire la marge entre la dose efficace et la dose toxique, et le rapport bénéfice-risque des médicaments (

Figure **22**). De plus, le développement des nanovecteurs en oncologie pourrait offrir de nouvelles opportunités dans le traitement de cancers pour lesquels l'arsenal thérapeutique est encore limité en permettant l'utilisation de médicaments jusqu'alors non-administrables (faible solubilité, effets indésirables trop importants, macromolécules bioactives) [45], [46][44], [45]. Beaucoup d'espoirs sont placés dans ces technologies pour concevoir de nouvelles approches thérapeutiques et diagnostic en oncologie.



Figure 22 : Intérêts des nanovecteurs en oncologie

III. Les Nanovecteurs

III.1. Mécanismes de ciblage

En oncologie, les nanovecteurs ont pour but de libérer le PA qu'ils transportent spécifiquement au sein de la tumeur. Cette délivrance au niveau tumoral met en jeu un ciblage passif associé ou non à un ciblage actif.

a. Ciblage passif

Le phénomène d'accumulation spontanée des nanovecteurs au niveau tumoral est appelé ciblage passif (Figure 23). Il est dû à l'effet de **perméabilité vasculaire** et de **rétention tissulaire** connu sous le nom d'**effet EPR** (*Enhanced Permeation and Retention*) qui a été découvert par Matsumura et Maeda [47].



Figure 23: Représentation schématique de l'effet EPR [48]

Une fois dans la circulation sanguine, les nanovecteurs doivent traverser la paroi des vaisseaux pour atteindre leur(s) cible(s). Dans les tissus normaux, les jonctions serrées entre les cellules limitent le passage des nanovecteurs. A l'inverse, dans les tissus tumoraux et sur les sites infectieux ou inflammatoires, **l'endothélium vasculaire est plus perméable** car il est **fenestré** c'est-àdire qu'il présente des pores entre les cellules endothéliales [45]. De plus, les cellules tumorales produisent différents facteurs tels que le monoxyde d'azote (NO) et les prostaglandines qui vont augmenter la perméabilité vasculaire [49]. Cela permet aux nanovecteurs ayant une taille de 10 à 500 nm de quitter le compartiment vasculaire via les pores de l'endothélium pour s'accumuler dans l'espace interstitiel [50]. Par ailleurs, les vaisseaux lymphatiques sont généralement absents ou nonfonctionnels au niveau tumoral [45]. L'accumulation des nanovecteurs est donc d'autant plus importante qu'ils vont difficilement sortir de la tumeur du fait d'un **mauvais drainage lymphatique**. Cela ne s'applique pas aux nanovecteurs de trop petite taille qui ne sont pas retenus au niveau du tissu tumoral car ils sont éliminés par diffusion hors de l'espace interstitiel.

Le foie et la rate possèdent, eux aussi, un endothélium vasculaire fenestré. Il peut donc y avoir une extravasation des nanovecteurs au niveau de ces organes. Dans le foie, les nanovecteurs peuvent donc s'accumuler dans l'espace de Disse où ils seront au contact des cellules de Küpffer qui sont capables de les éliminer par phagocytose.

b. Ciblage actif

Le ciblage actif peut venir s'ajouter au ciblage passif pour augmenter l'accumulation des nanovecteurs sur le site d'intérêt et améliorer la spécificité de la délivrance du PA. Il implique la présence de **ligands à la surface des nanovecteurs** leur permettant de se lier à leur(s) cible(s). Le ligand utilisé est capable de **reconnaître un récepteur** surexprimé par les cellules tumorales ou par les cellules des vaisseaux de la tumeur (Figure 24). De plus, ce récepteur doit être peu ou pas exprimé par les cellules normales afin de minimiser l'impact du traitement sur les tissus sains. La liaison du nanovecteur au récepteur cellulaire favorise son entrée dans la cellule cible. Cette internalisation permet d'obtenir une meilleure efficacité antitumorale [51]. Les agents de ciblage sont variés, il peut s'agir d'anticorps monoclonaux ou de fragments d'anticorps, de peptides, de sucres, etc... [45]



Figure 24: Ciblage actif

III.2. Les trois générations de nanovecteurs

Les améliorations successives apportées pour surmonter les obstacles rencontrés *in vivo* permettent de discerner **trois générations de nanovecteurs** administrées par voie intravasculaire.



Figure 25: Les trois générations de nanovecteurs

a. Première génération

Les nanovecteurs de première génération possèdent une **surface non-modifiée**. Après injection intraveineuse, ces nanovecteurs sont rapidement **opsonisés** puis massivement captés par les **cellules du système des phagocytes mononucléés** (SPM) et en particulier par les **macrophages** résidents du foie (cellules de Küpffer), de la rate, des poumons et de la moelle osseuse. L'opsonisation des nanovecteurs circulants consiste principalement en l'adsorption à leur surface de protéines plasmatiques comme l'albumine et l'apolipoprotéine, de fractions du complément et d'immunoglobulines. La formation de cette couronne de protéines autour des nanovecteurs dépend de nombreux facteurs tels que la taille des nano-objets, leur charge de surface, leur hydrophobie. Suite à l'adsorption des protéines, les nanovecteurs sont reconnus via des récepteurs spécifiques présents à la surface des phagocytes puis sont internalisés [52].

Par conséquent, les nanovecteurs de première génération ciblent de manière passive les cellules du SPM et, en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques, d'autres tissus. Cette captation préférentielle permet de **limiter la toxicité** de certains PA en évitant l'accumulation dans des tissus particulièrement sensibles à ces drogues [53]. En 2000, le Myocet[®], une formulation de

doxorubicine encapsulée dans des liposomes, a reçu l'AMM pour le traitement du cancer du sein métastatique. Cette forme vectorisée a permis de réduire considérablement la cardiotoxicité de la doxorubicine.

b. Deuxième génération

La surface des nanovecteurs de deuxième génération est recouverte par des **polymères hydrophiles** et neutres, principalement le poly(éthylène glycol) (PEG), afin de limiter les interactions avec les protéines et en particulier les opsonines. Le PEG confère au nanovecteur un caractère de **furtivité** permettant de diminuer sa capture par le SPM et donc de **prolonger sa durée de vie plasmatique** [53], [54]. Ce polymère est le plus couramment utilisé car il présente l'avantage d'être biocompatible, soluble en milieu aqueux, non toxique et faiblement immunigène.

Les nanoparticules de deuxième génération dites « furtives » ont un temps de résidence vasculaire plus long que celles de première génération ce qui leur permet de s'accumuler au niveau des tumeurs et des sites inflammatoires, où l'endothélium vasculaire est plus perméable, en utilisant l'effet EPR.

c. Troisième génération

Les nanovecteurs de troisième génération sont furtifs et dotés sur leur surface d'un ligand (anticorps, peptide, sucre...) capable de reconnaître « sélectivement » des marqueurs spécifiques surexprimés à la surface de cellules cibles. Pour cette troisième génération de nanovecteurs, le ciblage est actif car il permet de délivrer le médicament de façon plus ciblée vers un type cellulaire donné via des **interactions ligand-récepteur ou antigène-anticorps** [40], [53].

III.3. Les différents types des nanovecteurs

Il existe une grande variété de composés destinés à la nanomédecine incluant les nanoparticules virales recombinantes, les conjugués PA-vecteur, les nanovecteurs inorganiques, lipidiques ou à base de polymères (Figure 26) [41]. Dans ce paragraphe seront présentés quelques exemples de nanovecteurs pour chaque catégorie; les nanoparticules virales ne seront pas abordées.



Figure 26: Les différents types de nanovecteurs, d'après Wicki et al.

a. Les conjugués PA-vecteur

Ces nanovecteurs sont ceux connaissant le plus de succès du point de vue du développement clinique en cancérologie [41]. Ils sont constitués d'un PA lié de manière covalente à un vecteur pouvant être un **polymère, un peptide ou un anticorps**.

Au sein de cette catégorie, les conjugués PA-anticorps, aussi appelés **immunoconjugués**, font l'objet d'un développement clinique en pleine expansion. Selon Wicki et *al*, plus de trente immunoconjugués étaient à l'étude dans le cadre d'essais thérapeutiques en 2014. Ces nanovecteurs permettent de combiner la spécificité d'un anticorps monoclonal à une molécule hautement cytotoxique (Figure 27) ou un agent radioactif afin de libérer ces derniers au sein de la tumeur tout en limitant l'impact sur les cellules saines. Les molécules cytotoxiques couplées aux anticorps sont 100 à 1000 fois plus puissantes que les médicaments de chimiothérapie classiques et agissent généralement par inhibition de la polymérisation de la tubuline ou par induction de cassures doublebrin de l'ADN [55]. Récemment deux immunoconjugués ont reçu l'**AMM en cancérologie** :

 Kadcyla[®] (trastuzumab-emtansine) : il s'agit d'un anticorps humanisé anti-HER2 couplé à un inhibiteur de la polymérisation de la tubuline (DM1 : dérivé de la maytansine). Depuis 2014,

54

ce conjugué dispose d'une AMM pour le traitement du cancer du sein métastatique ou localement avancé non résécable HER2-positif.

Adcetris[®] (brentuximab-vedotin) : il s'agit d'un anticorps chimérique anti-CD30 couplé à un inhibiteur de la polymérisation de la tubuline (monométhyl auristatine E). Depuis 2012, il a l'AMM pour le lymphome hodgkinien CD30-positif récidivant ou réfractaire et le lymphome anaplasique à grandes cellules systémique récidivant ou réfractaire.



Figure 27: Structure d'un immunoconjugué [56]

b. Les nanoparticules inorganiques

De part leurs propriétés physiques, optiques et/ou magnétiques, les nanoparticules inorganiques sont principalement utilisées en imagerie médicale et pour la destruction tumorale. De manière plus récente, elles sont aussi développées pour la délivrance de PA [57].

Les nanoparticules inorganiques les plus courantes sont les **nanoparticules d'or**, les **nanoparticules de silice**, les **nanocristaux semi-conducteur** (*Quantum Dot* ou boîtes quantiques) et les **nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer** [57], [58]. Ces dernières font partie des nanoparticules inorganiques les plus étudiées pour le développement d'applications biologiques. Elles sont désignées par le terme SPIO (*Superparamagnetique iron oxyde*) et USPIO (*Ultrasmall superparamagnetic iron oxyde*) en fonction de leur taille. Elles peuvent être utilisées comme agent de contraste en IRM, pour la thermo-ablation d'une tumeur ou pour le transport de PA. La surface de ces nanoparticules peut être recouverte d'un polymère afin d'augmenter leur stabilité, leur demi-vie plasmatique et leur biocompatibilité [57].

c. Les nanovecteurs lipidiques

Les nanovecteurs lipidiques sont essentiellement utilisés comme système de délivrance de PA. Il existe différents types de nanovecteurs à base de lipides parmi lesquels nous citerons :

Les **liposomes** sont des systèmes vésiculaires constitués d'une ou plusieurs bicouches de **phospholipides** organisés en phases lamellaires encapsulant un ou plusieurs compartiments aqueux (Figure 28). Ces nanovecteurs sont non toxiques et biocompatibles ce qui en fait des systèmes intéressants pour les applications en nanomédecine. Utilisés depuis de nombreuses années, les liposomes sont les premiers nanovecteurs à avoir obtenu une AMM. En effet, depuis 1996, **Caelyx**[®] (doxorubicine liposomale pegylée) est commercialisé en Europe pour le traitement du cancer du sein métastatique, du cancer ovarien, du myélome multiple et de la maladie de Kaposi. Aux Etats-Unis, ce médicament est commercialisé sous le nom Doxil[®]. Les liposomes présentent cependant quelques inconvénients tels qu'une faible capacité d'encapsulation, une stabilité modérée, une production délicate et un relargage précoce des PA dans le sang [54].



Figure 28: Schéma de la structure d'un liposome unilamellaire http://www.integratedhealth.com

Les **nanoparticules lipidiques solides** ou SLN (*Solid Lipid Nanoparticle*) sont constituées d'une matrice de lipides solide à température corporelle physiologique et stabilisée par une couche d'agents tensioactifs. Les lipides utilisés pour la fabrication de ces nanoparticules peuvent être des mono-, di- ou tri-glycérides, des cires ou des acides gras [59]. Ces nanovecteurs ont une stabilité et une capacité à encapsuler les molécules lipophiles supérieure à celle des liposomes.

L'unité INSERM UMR 1066 d'Angers développe des nanovecteurs appelés « nanocapsules lipidiques » caractérisés par une structure hybride entre des nanocapsules polymère et des liposomes. Ces nanocapsules se présentent sous la forme d'un cœur lipidique liquide entouré par une coque composée de lécithine de soja et d'un tensioactif pegylé [60]. Elles sont capables de

transporter des PA et des agents radioactifs. Des nanocapsules lipidiques chargées en rhénium-188 ont notamment démontré leur efficacité pour réaliser de la radiothérapie interne dans un modèle de CHC chez le rat [61].

d. Les nanovecteurs à base de polymères

Les polymères constituant les nanovecteurs peuvent être d'origine naturelle (protéines, peptides, cyclodextrine...) ou synthétique [41]. Ils permettent de formuler une large gamme de nanovecteurs tels des nanoparticules, des dendrimères, des micelles, des polymersomes, etc... Seules les nanoparticules seront détaillées dans la suite de ce paragraphe.

Une nanoparticule à base de protéine est particulièrement développée en cancérologie, il s'agit de la nanoparticule formée par l'**agrégation d'albumine humaine** pouvant être conjuguée avec des agents de chimiothérapie [62]. Ce système innovant de transport de médicament est appelé *nab*TM-technologie, *nab* signifiant « *nanoparticle albumin-bound* ». En 2007, Abraxane[®] (*nab*TM-paclitaxel) a obtenu l'AMM pour le traitement du cancer du sein, de l'adénocarcinome du pancréas et du cancer bronchique non à petites cellules (Figure 29). Ce nanovecteur permet de s'affranchir de la présence du crémophor pour solubiliser le paclitaxel en milieu aqueux et donc de diminuer la toxicité associée à l'utilisation de ce solvant. De plus, le *nab*TM-paclitaxel augmente la pénétration du cytotoxique dans les tissus tumoraux en traversant la barrière de cellules endothéliales par transcytose et effet EPR [63].



Figure 29: Structure du *nab*-paclitaxel (Abraxane[®]) D'après: *www.abraxane.eu*

Les **polymères de synthèse biodégradables** les plus étudiés pour la formulation de nanoparticules sont le poly(acide lactique) (PLA), le poly(acide glycolique) (PGA), le copolymère poly(acide lactique-co-glycolique) (PLGA) et le poly(cyanoacrylate) (PCA) [42]. Selon l'agencement des polymères, deux types de nanoparticules peuvent être définis (Figure 30) :

- Les nanosphères qui sont formées par un enchevêtrement de polymère. Le PA est dispersé dans cette matrice pour être vectorisé
- Les nanocapsules qui sont constituées d'une paroi de polymère entourant un compartiment huileux ou aqueux contenant les PA à transporter



Figure 30: Nanosphère et nanocapsule http://www.medscape.com

Le développement de nombreux polymères a permis la formulation de nanoparticules variées dont certaines font actuellement l'objet d'études cliniques ou pré-cliniques. Par exemple, Transdrug[™], une nanoparticule de poly(isohexylcyanoacrylate) chargée en doxorubicine [64] est actuellement utilisée dans un essai clinique de phase 3 pour les patients atteints d'un CHC au stade avancé après échec ou intolérance au traitement par sorafénib (Essai NCT01655693).

Au sein de l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes (ENSCR), le Docteur Cammas-Marion développe une nouvelle famille de nanoparticules à base d'un polymère dérivé du **poly(acide** β -malique) (PMLA). Ces nanoparticules font l'objet d'une collaboration entre l'ENSCR et notre équipe de recherche à l'Inserm UMR991 dans le but de mettre au point un système permettant de transporter un PA et de le délivrer de manière spécifique au niveau des cellules tumorales de CHC.

IV. Nanoparticules dérivées du poly(acide malique) et ciblage du CHC

IV.1. Le poly(acide malique)

Le poly(acide β -malique) ou PMLA (Figure 31) est un polymère produit par certains champignons et myxomycètes, **biocompatible et biodégradable** en acide malique dans des conditions physiologiques [65]. Ces propriétés présentent un véritable intérêt pour des applications en médecine et ont été mises à profit notamment pour le développement d'un conjugué macromoléculaire multifonctionnel appelé PolycefinTM [66]. Le PMLA et ses dérivés peuvent être obtenus à partir du PMLA naturel, extrait de *Physarum polycephalum* par exemple, ou par synthèse chimique à partir de l'acide aspartique [65].



Figure 31: Structure du PMLA [65]

IV.2. Les nanoparticules dérivées du poly(acide malique)

Le dérivé du PMLA entrant dans la composition des nanoparticules faisant l'objet des travaux présentés dans ce manuscrit est le **poly(malate de benzyle) (PMLABe)**, un polymère lipophile. La synthèse de ce polymère utilise le malolactonate de benzyle (MLABe) comme précurseur lui-même synthétisé à partir d'acide aspartique. Une réaction de polymérisation anionique par ouverture de cycle du MLABe en présence d'un macro-amorceur α -biotine ω -carboxy PEG₆₆ permet d'obtenir le **copolymère à blocs amphiphiles poly(éthylène glycol)**₆₆-*b*-**poly(malate de benzyle)**₇₃ portant une molécule de biotine (Biot) en fin de chaîne du PEG (Figure 32). Ce copolymère est noté **Biot-PEG**₆₆-*b*-**PMLABe**₇₃ et est utilisé pour formuler les nanoparticules par **nanoprécipitation**.



Figure 32: Synthèse des nanoparticules à base du copolymère PEG-b-PMLABe

Les nanoparticules obtenues sont dites « furtives » grâce à la présence du PEG et sont capables d'encapsuler de la doxorubicine ou certains fluorochromes. Elles se caractérisent par :

- Diamètre hydrodynamique mesuré par diffusion dynamique de la lumière = 85 nm
- Indice de polydispersité : 0,15
- Masse moléculaire du copolymère Biot-PEG₆₆-b-PMLABe₇₃ déterminée par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) = 17 900 g.mol⁻¹

Les travaux antérieurs de l'équipe ont démontré que ces nanoparticules vides ne présentaient pas de toxicité significative in vitro sur plusieurs lignées cellulaires cancéreuses et saines [65].

IV.2. Stratégies de ciblage du CHC

Différentes stratégies impliquant l'ajout de ligands spécifiques à la surface de nanovecteurs ont été mises en œuvre pour améliorer le ciblage du CHC. Le Tableau 4 répertorie des études précliniques en cours.

Ligand	Receptor	Drug-NP platform	Animal model ¹	Outcome	
				Compared to free drug and/or non-targeted NPs	Side-effects
Carbohydrate/polysa	ccharide				
Galactosamine	ASGPR	Mitomycin C-Xyloglucan	Cell line HepG 2 xenograft	14-Fold increase in drug uptake; 15-fold increase in vivo tumoral accumulation; 45% decrease in tumor volume; 27-fold increase in life span	Not evaluated
Galactosamine	ASGPR	DOX-Xyloglucan	Cell line HepG 2	Increased drug uptake; 45% decrease in tumor volume; increased tumor growth inhibition	Not evaluated
Galactose	ASGPR	5-FU-chitosan	Cell line H22 xenograft	Increased tumoral drug accumulation; 75% decrease in tumor size	Reduced toxicity
Galactose	ASGPR	5-FU-chitosan	Cell line H22 xenograft (Orthotopic)	1.5-Fold increase in tumoral drug accumulation; decrease in tumor size.	Undetectable
Galactose	ASGPR	5-FU-chitosan	Cell line H22 xenograft (Orthotopic)	85-Fold increase in tumoral drug accumulation; decreased tumor size; Increased life span; increased cytotoxicity in vitro; increased tumor cell apoptosis induction	Undetectable
Lactose	ASGPR	DOX-liposome	Cell line HepG 2 xenograft	4-Fold increase in drug uptake; 8-fold increase in tumoral drug accumulation; 81% decrease in tumor growth; increased life span.	Not evaluated
Protein/peptide					
17	Transferrin receptor	DOX-dendrimer	Cell line Bel-7402 xenograft	Increased drug uptake; 164–195% decrease in tumor volume.	Undetectable
A54	ND	DOX-iron oxide	Cell line BEL-7402 xenograft	Increased cytostatic effect; tumoral interstitial accumulation; absence of anti tumor effect in vivo.	Not evaluated
A54	ND	DOX-chitosan	Cell line BEL-7402 xenograft	Increased drug uptake; internalization capability; 3.4-fold increase in tumoral drug accumulation; increased tumor growth inhibition in vivo.	Reduced toxicity
RGD	integrins $\alpha v \beta 3$	PTX-PLGA	Liver tumor xenograft (Orthotopic)	Increased drug uptake in vitro; increased tumor growth inhibition; increased life span.	Undetectable
Apoliprotein A1	class B type 1 (SR-B1) receptor	DOX-HDL	Cell line LCI-D20 xenograft (Orthotopic)	Increased drug uptake; internalization capability; increased tumoral drug accumulation; 38% decrease in tumor size; increased tumor growth inhibition.	Loss of body weight
MoAb/Fab' CD 44	CD 44 ⁺ cells	DOX-liposome	Cell line HepG2 xenograft	7-Fold increase in tumoral drug accumulation; increased tumor growth inhibition; increased life span; increased tumor cell appotencie induction	Reduced toxicity
Anti-VEFG	VEGF receptor 2	DOX-liposome	Cell line BNL xenograft	Increase drug uptake; internalization capability; increased tumor growth inhibition; accumulation in the walls of blood vessels	Not evaluated
HAb 18	ND	DOX-PLGA	Cell line HepG2 xenograft	Specific binding leads to 1.5 fold increase in drug uptake; 64% decrease in tumor growth.	Undetectable
Vitamins Folate	Folate receptor	DOX-SPION	Cell line Vx2 injection into rabbits and DEN injection into rats	19-Fold decrease in tumor volume from rats; 21.5-fold decrease in tumor volume from rabbits; increased tumor growth inhibition; 23% decrease in mortality; tumor cell apoptosis induction and proliferation inhibition.	Reduced toxicity
Other molecules Glycyrrhetinic acid	ND	DOX-alginate (ALG)NP	Cell line H22 xenograft	Increased drug uptake; 79% increase in tumor growth inhibition; 40% decrease in mortality; tumor cell apoptosis	Undetectable
Glycyrrhetinic acid	ND	DOX-chitosan	Cell line QGY-7703	induction and cytostatic effect. Increased tumor growth inhibition; increased cytotoxicity	Not evaluated-
Glycyrrhetinic acid	ND	PTX Chitosan	xenograft Cell line H22	in vitro and in vivo. 88% increase in tumor growth inhibition.	Undetectable
Glycyrrhetinic acid	ND	Docetaxel-liposome	Cell line SMMC-7721 xenograft	Increased drug uptake; internalization capability; tumor growth inhibition in vitro and in vivo.	Not evaluated
Hyaluronic acid	ND	PTX-liposome	Cell line HepG2 xenograft	Increased pH-mediated drug uptake; increased tumoral drug accumulation; increased tumor growth inhibition; enhanced cytotoxicity in vivo and in vitro.	Not evaluated
Hematoporphyrin	LDL receptor	DOX-albumin	Cell line HepG2	Increased drug uptake; 33-fold increase in tumoral drug; 4-fold decrease in tumor size	Undetectable
1-Aminolactose	ND	DOX-liposome	Cell line AH 66 xenograft	Increased drug uptake; increased tumor growth inhibition.	Not evaluated

ND: Not described. ¹ Unless otherwise stated the cell lines were subcutaneously engrafted into athymic mice.

Tableau 4: Etudes pré-cliniques pour le traitement de tumeurs hépatiques par des nanoparticules associées à un agent de ciblage [67]

Les récepteurs aux asialoglycoprotéines (ASGP-R1 et 2) sont abondamment et uniquement exprimés par les cellules du parenchyme hépatique. De plus, bien qu'ils ne soient pas spécifiques des cellules tumorales, ces récepteurs sont significativement surexprimés dans les tumeurs hépatiques. Ces caractéristiques qui en font de bons candidats pour le ciblage actif, ont été mises à profit par de nombreuses équipes pour le développement de ligands spécifiques de type polysaccharides. Les ligands les plus étudiés, notamment en phase pré-clinique, sont le **galactose**, la **galactosamine** et le **lactose**. Cependant, le taux d'ASGP-R diminue dans les stades avancés de la maladie. Cette stratégie de ciblage aurait donc plus d'intérêts pour les CHC à un stade précoce [67].

D'autres ligands comme **l'acide folique** ou **l'acide glycyrrhétinique** sont utilisés comme agents de ciblage pour le CHC [68], [69]. L'acide folique se fixe sur le récepteur aux folates surexprimé dans de nombreuses tumeurs humaines. L'acide glycyrrhétinique est un triterpène naturel présentant une forte affinité pour le foie bien que les récepteurs hépatocytaires impliqués n'aient pas été identifiés.

Une autre approche possible consiste à fixer **des anticorps monoclonaux ou fragments d'anticorps** à la surface des nanovecteurs. Par exemple, un liposome portant un anti-CD44 fait actuellement l'objet d'études précliniques. Cette approche passant par la reconnaissance des cellules tumorales hépatiques CD44+ pourrait permettre de cibler des sous-populations de cellules souches du CHC responsables des rechutes et de la dissémination tumorale [67].

Différentes équipes recherchent également des **peptides courts** pour fonctionnaliser la surface de nanovecteurs. Le peptide HIYPRH (T7) présente une forte affinité pour les récepteurs à la transferrine TRF1 et TRF2 surexprimés dans le CHC. Le peptide AGKGTPSLETT (A54) se fixe de manière spécifique sur les cellules de CHC humain. Il a été identifié grâce à la **technique du phage display** [70] (Figure 33). Cette méthode est utilisée pour le criblage haut débit d'interactions protéiques. Son principe repose sur la présentation de peptides aléatoires à la surface de bactériophages recombinants qui sont mis en contact avec une culture cellulaire ou directement injectés *in vivo* chez l'animal. S'il y a une interaction entre le peptide exprimé à la surface du phage et sa cible, ce phage restera accroché et les autres seront éliminés par lavage. Ensuite, une élution permet de récupérer les phages fixés pour les amplifier et leur faire subir un second passage. Enfin, le séquençage de l'ADN des phages sélectionnés permet d'identifier les peptides pour lesquels ils codent. Par la suite, ces peptides peuvent être synthétisés et être utilisés en vectorisation.



Figure 33: Principe du *phage-display* www.neb.com

Dans la stratégie de ciblage par peptide, le plus utilisé est le **RGD** constitué de trois acides aminés (AA) : Arginine-Glycine-Acide aspartique. Découverte par Erkki Ruoslahti et *al*, cette séquence peptidique est un motif essentiel pour **l'adhésion cellulaire**. En effet, la séquence RGD est présente dans de nombreuses protéines de la matrice extracellulaire et leur permet de se fixer aux intégrines exprimées à la surface des cellules [71], [72]. Parmi ces récepteurs d'adhésion cellulaires, les **intégrines \alpha_v\beta_3** sont fortement exprimées par les **cellules endothéliales des néovaisseaux** et par la plupart des **cellules tumorales**. A l'inverse, elles sont peu retrouvées au niveau des cellules endothéliales normales et des tissus sains. Par conséquent, les intégrines $\alpha_v\beta_3$ sont des biomarqueurs de l'angiogénèse et constituent une cible attrayante pour le développement de traitements anticancéreux [73]. Des peptides courts contenant la séquence RGD ont donc été développés pour se fixer préférentiellement aux intégrines $\alpha_v\beta_3$. Les nanovecteurs portant ces peptides sont donc des outils intéressants pour cibler le réseau vasculaire tumoral notamment dans un contexte de CHC [67].

Notre équipe s'intéresse, elle aussi, à cette stratégie de **ciblage des cellules hépatiques tumorales par des peptides**. Nous disposons d'une collection de douze peptides hépatotropes identifiés dans la littérature et avons évalué leur intérêt comme agent de ciblage à la surface de nos nanoparticules Biot-PEG₆₆-*b*-PMLABe₇₃. Ces travaux sont présentés dans le chapitre suivant.

62

Chapitre 3 : Partie expérimentale

I. Matériel et Méthodes

I.1. Collection de peptides courts

A partir de données de la littérature, nous avons sélectionné **douze peptides** connus pour leur affinité vis-à-vis des cellules endothéliales tumorales et/ou des hépatocytes tumoraux. Il s'agit de peptides courts de synthèse, constitués de 5 à 21 acides aminés (AA) (ND : Non déterminé

Tableau 5).

Nom	Séquence en AA	Récepteur cible	Nombre d'AA	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Réf.
RGD	Cyclo(RGDYK)	Intégrines $\alpha_v \beta_3$	5	846	[71]
HCBP1	FQHPSFIK	ND	8	1230	[74]
HCBP4	PLPTLPLK	ND	8	1103	[74]
СРВ	Acétyl- CKNEKKNKIERNNKLKQPPK	Protéoglycanes à héparane sulfate	20	2705	[75]
GPC3 (L5-2)	YFLTTRQK	Glypican-3	8	1282	[76]
A54	AGKGTPSLETTPK	ND	13	1512	[70]
DKN	DKNLQLHK	ND	8	1220	[77]
CGK	CGKRK	Protéoglycanes à héparane sulfate	5	816	[78]
SP94	SFSIIHTPILPLK	ND	13	1691	[79]
GBVA10-9 (P16L)	CWVRLGRYLLRRLKTLFTK	ND Inhibe l'infection par le VHC	19	2648	[80]
CP15	VHLGYATK	ND	8	1113	[81]
SRIF-14	AGC(S-)KNFFWKTFTSC(S-)K	Récepteur à la somatostatine	15	1991	

ND : Non déterminé

Tableau 5: Caractéristiques des douze peptides sélectionnés

Le **peptide cyclique RGD** ne reconnait pas spécifiquement les cellules tumorales hépatiques mais il est largement utilisé pour cibler les cellules cancéreuses et les cellules endothéliales tumorales (cf chapitre 2). Par ailleurs, des travaux antérieurs de l'équipe ont démontré que l'ajout du peptide RGD à la surface des NPs Biot-PEG₆₆-*b*-PMLABe₇₃ augmentait significativement leur captation par les cellules d'hépatome HepaRG. De plus, une captation beaucoup plus faible des NPs portant le RGD en surface a été observée pour des modèles cellulaires non hépatiques [82]. Pour les expériences présentées dans ce manuscrit, le RGD sera donc utilisé comme notre peptide de référence.

Les cibles reconnues par les **peptides HCBP1, HCBP4, A54, DKN, CP15 et SP94** ne sont pas encore connues. Ces peptides ont été identifiés comme ayant une forte affinité pour des cellules de CHC par la technique de *phage-display* réalisée *in vitro* ou *in vivo*. Le peptide **CGK** a, lui aussi, été découvert grâce à la technique de *phage-display*. Il cible les cellules tumorales et les cellules des néovaisseaux par interaction avec des protéoglycanes à héparane sulfate.

Certains des peptides utilisés dérivent de protéines virales ou parasitaires. **CPB** est issu de la protéine circumsporozoite (CSP) de *Plasmodium berghei* impliquée dans l'infection hépatocytaire par le parasite. **GBVA10-9** est un peptide de synthèse qui dérive de la protéine NS5 du virus GB-A (GBV-A). Ce peptide est capable d'inhiber l'infection hépatocytaire par le virus de l'hépatite C en culture cellulaire.

Enfin, certains peptides sont issus de domaines fonctionnels de ligands naturels de récepteurs membranaires. C'est le cas de **SRIF-14** qui est une forme courte de la somatostatine et **GPC3** qui est un ligand du glypican-3, un protéoglycane à héparane sulfate membranaire. L'expression du glypican-3 et des récepteurs à la somastostatine est généralement augmentée au niveau des cellules tumorales de CHC.

I.2. Culture cellulaire

a. Lignées cellulaires hépatiques et hépatocytes humains primaires

Lignée HepaRG :

Cette lignée a été isolée d'une tumeur hépatique humaine différenciée développée consécutivement à une hépatite C chronique [83]. Ces cellules sont des **progéniteurs hépatiques bipotents** capables, à confluence, de se **différencier en hépatocytes ou en cellules biliaires** (Figure 34).

Les cellules HepaRG sont cultivées dans un milieu William's E (Gibco) supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (Thermoscientific), 1% de L-glutamine (Gibco), 5 µg/mL d'insuline (Sigma-Aldrich), 5.10⁻⁵ M d'hémisuccinate d'hydrocortisone (Serb) et 1% d'une solution de pénicilline/streptomycine (Gibco). Les cellules sont ensemencées à la densité de 2,5.10⁴ cellules par cm² et maintenues en culture à 37°C sous atmosphère humide contenant 5% de CO₂. Le milieu de culture est renouvelé tous les 2 à 3 jours. **Quatorze jours** après l'ensemencement, les cellules sont repiquées pour l'expansion ou maintenues dans le même milieu supplémenté par 2% de diméthylsulfoxyde (DMSO) (Sigma-Aldrich) afin de favoriser le processus de différenciation hépatocytaire (Figure 35). Après **30 jours de culture**, les cellules HepaRH sont différenciées et il est

alors possible de réaliser un **décollement sélectif** de la **population de type hépatocytaire**. Pour cela, la monocouche cellulaire est lavée deux fois avec 10 mL de tampon salin (PBS, Gibco) puis les hépatocytes sont décollés sélectivement par 5 mL d'un mélange volume à volume de trypsine (Gibco) et de PBS pendant 5 minutes à température ambiante.



Figure 34: Morphologie en contraste de phase des cellules HepaRG à différents stades (A) Progéniteurs bipotents à faible densité, jour 1 post-trypsinisation, (B) Cellules HepaRG au jour 7 post-trypsinisation, (C) Cellules HepaRG engagées vers la différenciation en hépatocytes (*H*) et en cellules biliaires (*BC*) au jour 14 posttrypsinisation, (D) HepaRG hépatocytaires et cellules biliaires au jour 30 post-trypsinisation en présence de 2% de DMSO pendant 15 jours, (E) HepaRG hépatocytaires et cellules biliaires, (F) HepaRG hépatocytaires après décollement sélectif et ensemencement à forte densité en présence de 2% de DMSO. Echelle : 100µm



Figure 35: Représentation schématique du protocole de culture des cellules HepaRG

<u>Autres lignées de cellules hépatiques humaines</u>

Cellules	Origine	Milieu de culture
Huh7	CHC	DMEM contenant 4,5 g/L de D-Glucose (Gibco) + 10% de SVF + 1% de pénicilline/streptomycine + 1% de L-glutamine + 1% de pyruvate
HepG2	СНС	MEM alpha (Gibco) + 10% de SVF + 1% de pénicilline/streptomycine + 1% de L-glutamine + 1% d'une solution d'AA non essentiels (MEM NEAA, Gibco)
SNU387	CHC	RPMI 1640 (Gibco) + 10% de SVF + 1% de pénicilline/streptomycine + 1% de L-glutamine + 1% de pyruvate + 1% tampon HEPES 1M + 2,5 g/L D-Glucose

Tableau 6: Lignées de cellules hépatiques humaines

• <u>Hépatocytes humains primaires</u>

Ils sont obtenus auprès du Centre de Ressources Biologiques (CRB) de Rennes et proviennent de trois patients différents. Ils sont cultivés dans le même milieu que les cellules HepaRG hépatocytaires.

b. Cellules non hépatiques

• Lignées cellulaires humaines

Cellules	Origine	Milieu de culture
HCT116	Carcinome colorectal	Mc Coy's 5a + Glutamax (Gibco) + 10% de SVF + 1% de pénicilline/streptomycine
NCI-H27	Carcinome pulmonaire non à petites cellules	RPMI 1640 + 10% de SVF + 1% de pénicilline/streptomycine + 1% de L-glutamine
CaCo2	Adénocarcinome colique	DMEM contenant 4,5 g/L de D-Glucose + 10% de SVF + 1% de pénicilline/streptomycine + 1% de MEM NEAA
RC21	Cellules rénales tumorales issues d'une pièce opératoire de patient (CRB Rennes)	RPMI 1640 + 10% de SVF + 1% de pénicilline/streptomycine + 1% de L-glutamine

Tableau 7: Lignées cellulaires non hépatique humaines

Pour l'ensemble de ces cellules, le milieu de culture est renouvelé tous les 2 à 3 jours et le repiquage est réalisé lorsque les cellules atteignent 70 à 80% de confluence. Les cultures sont maintenues dans un incubateur à 37°C en atmosphère humide contenant 5% de CO₂.

• Cellules primaires

Les **HUVEC** (Gibco) sont des cellules endothéliales primaires de veines de cordon ombilical. Elles sont cultivées dans du milieu Medium 200 (Gibco) supplémenté avec 10 mL de LSGS (Low Serum Growth Supplement, Gibco) et 1% de pénicilline/streptomycine.

Les **cellules mononucléées du sang périphérique** sont isolées d'un concentré leuco-plaquettaire non thérapeutique d'un donneur sain après centrifugation sur un milieu polysucrose – métrizoate de sodium dans des tubes UNI-SEPmaxi U-10 (Novamed). Ces cellules sont ensuite incubées pendant 15 minutes en présence d'anticorps anti-CD14 couplés à des microbilles magnétiques (Human CD14 Microbeads[®], Miltenyi Biotec) afin de sélectionner **la population monocytaire**. Ensuite, les monocytes sont ensemencés dans des plaques de 24 puits à une densité de 0,5.10⁶ cellules par puits et maintenus en culture à 37°C sous atmosphère humide contenant 5% de CO₂. Le milieu de culture utilisé est du RPMI 1640 supplémenté par 10% de SVF, 1% de pénicilline/streptomycine et 1% de L-glutamine. De plus, l'ajout du facteur de croissance GM-CSF à 50 ng/mL dans le milieu de culture pendant 7 jours permet la différenciation des monocytes en **macrophages** [84].

I.3. Préparation des nanoparticules

a. Formulation des nanoparticules et encapsulation d'un fluorochrome

Les nanoparticules (NPs) sont préparées à partir d'un **copolymère à blocs amphiphile Biot-PEG**₆₆-**b**-**PMLABe**₇₃ synthétisé à l'ENSCR par le Dr Cammas-Marion. Le **fluorochrome encapsulé** est le 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindo dicarbocyanine perchlorate (**DiDoil**, Interchim) dont les caractéristiques spectrales sont les suivantes : excitation=644nm/émission=665nm.

La formulation des NPs et l'encapsulation concomitante du DiDoil sont réalisées grâce à la technique de **nanoprécipitation** [85] (Figure 36). Deux protocoles distincts ont été mis en œuvre en fonction du solvant utilisé pour la dissolution du DiDoil :

Le copolymère Biot-PEG₆₆-b-PMLABe₇₃ (5 mg) est dissous dans 973 μL d'acétone et 27 μL (1wt%) d'une solution DiDoil/acétone (2 mg/mL) sont ajoutés. Ce mélange est ensuite ajouté dans 2 mL d'eau distillée sous forte agitation magnétique à température ambiante pendant 10 minutes. Le solvant organique est éliminé par évaporation sous vide.

- Le copolymère Biot-PEG₆₆-*b*-PMLABe₇₃ (5mg) est dissous dans 100 μ L de **diméthylformamide** (DMF) et 50 μ L (1wt%) d'une solution DiDoil/DMF (1 mg/mL) sont ajoutés. Ce mélange est ensuite ajouté dans 1 mL d'eau distillée, sous forte agitation magnétique à température ambiante. L'agitation est poursuivie pendant une heure.

Lors de la nanoprécipitation, le DiDoil est encapsulé dans le **cœur hydrophobe** des NPs composé du bloc PMLABe. Le bloc Biot-PEG forme la **couronne hydrophile** des NPs qui expose les résidus de biotine vers l'extérieur.

Enfin, la solution de NPs est filtrée sur une colonne d'exclusion stérique PD-10 Sephadex G-25 Medium (GE Healthcare) afin de piéger le fluorochrome libre, non encapsulé. La fraction éluée ainsi obtenue, contenant les NPs, est ensuite centrifugée à 20600 g durant 75 minutes à 4°C. A l'issu de la centrifugation, le surnageant est éliminé et le culot est repris par 1 mL d'eau Milli-Q stérile. La centrifugation entrainant une perte d'environ 50 % de la masse de copolymère, la concentration finale de la solution de NPs obtenue est de 2,5 mg/mL soit 140 µM.



Figure 36: Formulation des NPs Biot-PEG₆₆-b-PMLABe₇₃ [DiDoil 1wt%]

Des NPs « nues » c'est-à-dire uniquement constituées du polymère PMLABe sans couronne de PEG sont aussi formulées par l'ENSCR selon le même procédé que décrit précédemment. Ces NPs ne sont pas utilisées pour le criblage des peptides car elles ne présentent pas de résidus de biotine permettant la greffe des peptides en surface.

b. Greffage des peptides à la surface des nanoparticules

Les douze peptides, synthétisés par Eurogentec, sont **biotinylés** pour être **greffés à la surface des NPs Biot-PEG**₆₆-*b***-PMLABe₇₃[DiDoil 1wt%]. Le couplage entre les NPs et les peptides s'effectue par l'intermédiaire de la protéine streptavidine** [82] (Figure 37). Les peptides biotinylés sont solubilisés dans de l'eau Milli-Q stérile à des concentrations comprises entre 1,5 et 2,9 mM. La solution aqueuse de streptavidine (Eurogentec, Belgique) est préparée à la concentration finale de $182 \ \mu M$.



Figure 37: Echafaudage moléculaire permettant l'exposition des peptides à la surface des NPs

Le couplage NPs/peptide est réalisé de manière séquentielle, extemporanément, avant transfert sur les cellules en culture. Dans un premier temps, les solutions de peptides biotinylés et de streptavidine sont mélangées et incubées une heure à 4°C, puis la solution de NPs est ajoutée au mélange streptavidine/peptide. L'ensemble est homogénéisé puis placé à 4°C pendant une heure.

I.4. Captation des nanoparticules par les cellules en culture

a. Ensemencement des cellules

Pour réaliser les essais de captations des NPs, les cellules sont toutes ensemencées dans des plaques de 24 puits selon les conditions présentées dans le Tableau 8 :

Cellules	Nombre de cellules par puits	Temps de culture en puits avant l'ajout des NPs dans milieu de culture
HepaRG progéniteurs	100 000	1 jour
HepaRG hépatocytaires	350 000	1 jour
HepG2	300 000	2 jours
Hépatocytes humains primaires	300 000	2-3 jours
Huh7	100 000	2 jours
SNU387	80 000	1 jour
HCT116	300 000	1 jour
NCI-H727	250 000	4 jours
CaCo2	250 000	4 jours
HUVEC	300 000	1 jour
RC21	200 000	1 jour

Tableau 8: Ensemencement des cellules pour les essais de captation de NPs

b. Traitement des cellules et évaluation de la captation.

Le milieu de culture est ajouté aux mélanges NPs/streptavidine/peptide préparés extemporanément. Ce mélange est transféré sur les cellules à raison de 500 µL par puits. Après **20 heures d'incubation**, le milieu de culture est éliminé et les monocouches cellulaires sont lavées par 500 µL de PBS. Les cellules sont observées en **microscopie à fluorescence** à 590 nm (Microscope inversé Zeiss, Logiciel d'analyse d'images AxioVision) avant d'être détachées par 100 µL de trypsine et reprises dans 400 µL de milieu de culture. La suspension cellulaire est analysée par **cytométrie en flux** (FACSCalibur, Logiciel CellQuest, Becton Dikinson) pour quantifier la fluorescence (canal FL4-H) émise par le DiDoil présent dans les NPs captées par les cellules.

Pour l'étude de la **cinétique de captation** des NPs par les cellules **HepRG hépatocytaires**, à la fin de chaque période d'incubation, les cellules sont fixées par 100 µL de paraformaldéhyde (PFA) 4% pendant 10 minutes à 4°C. La suspension cellulaire est centrifugée 3 minutes. Le culot est solubilisé dans 300 µL de PBS puis analysé en cytométrie en flux.

c. Observation en microscopie confocale

Les cellules **HepaRG progénitrices** sont ensemencées dans des chambres de culture sur lame de verre (Chamber slide system, 8 puits, NUNC) à la densité de 4,5.10³ cellules par puits et, après 24 heures de culture, 300 µL du mélange NPs/streptavidine/peptide sont transférés dans les puits. Au bout de 20 heures d'incubation, les monocouches cellulaires sont lavées deux fois au PBS puis fixées avec 100 µL de PFA 4% pendant 15 minutes à 4°C. Après deux lavages au PBS, les noyaux sont colorés au Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) : la solution mère de Hoechst à 5 mg/mL est diluée au 1/5000 dans du PBS et 100 µL de cette préparation sont transférés dans les puits. Après 10 minutes d'incubation à température ambiante, deux lavages au PBS sont effectués et les chambres de culture sont décollées de la lame support. Une goutte de liquide de montage (Ultramount, Dako) est déposée et une lamelle est fixée sur la lame. Les cellules sont observées en **microscopie confocale** (SP8, Leica. Plateforme MRic photonics Biosit-Biogenouest).

I.5. Evaluation de la toxicité des NPs

a. Test de viabilité cellulaire au MTT

Les cellules sont ensemencées en plaque de 96 puits à raison de 10⁴ cellules par puits pour les **HepaRG progéniteurs** et 5.10⁴ cellules par puits pour les **HepaRG hépatocytaires**. Après 20h d'incubation avec les NPs, le milieu des puits est remplacé par 100 μ L d'une solution de 3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltretrazolium bromide (MTT) à 250 μ g/mL. Les cellules sont placées 2 heures à 37°C puis la solution de MTT est remplacée par 100 μ L de DMSO par puits. La plaque est mise sous agitation orbitale pendant 5 minutes puis la mesure de la densité optique est effectuée par spectrophotométrie à 535 nm (Multiskan FC, Thermo Scientific).

b. Dosage des cytokines pro-inflammatoires

Les macrophages et les HepaRG progéniteurs sont incubés pendant 24 heures avec 0,1 μ g/mL de lipopolysaccharide (LPS) ultrapur issu d'*Escherichia coli* O111:B4 (InvivoGen) pour stimuler la production de cytokines inflammatoires. Après incubation, les cellules sont mises en présence de milieu de culture seul ou supplémenté par des NPs ou 250 μ g/mL de cristaux d'acide urique (MSU) pendant une nuit. La production de cytokines est évaluée par quantification de l'interleukine- 1 β (IL-1 β), IL- 1 α et IL-6 dans les surnageants de culture. Le dosage est effectué par la méthode immunoenzymatique sandwich grâce à des Kits DuoSet® ELISA (R&D System). L'intensité de coloration est détectée par spectrophotométrie (iEMS Reader MF, Labsystems).

I.6. Analyse des données

Les analyses statistiques et graphiques sont effectuées avec le logiciel Prism 5.0[®] (GraphPad Software, La Jolla, Californie). Les valeurs sont exprimées en moyennes ± écart-types. Les tests statistiques ne sont réalisés que lorsque le nombre d'échantillons est supérieur ou égal à 6. Les différences entre les groupes ont été calculées soit par le test de Mann et Whitney soit par le test de Kruskal-Wallis suivi d'un post-test Dunn's. Une différence est considérée comme statistiquement significative avec une $p_{value} < 0.05$ (* ou \$: p < 0.05; ** ou \$\$: p < 0.01; ***ou \$\$\$: p < 0.001).

II. Résultats

II.1. Essais de biocompatibilité

Des travaux antérieurs de l'équipe ont montré que l'incubation avec des NPs à base de PMLABe, PEG-*b*-PMLABe ou Biot-PEG-*b*-PMLABe n'affecte pas significativement la viabilité cellulaire pour des concentrations en copolymère inférieures à 3 µM. Cette évaluation de la cytotoxicité a été menée par Huang et *al.* sur plusieurs modèles cellulaires, notamment Huh7, HCT116, CaCo2 et NCI-H727 [65]. De plus, l'ENSCR développe d'autres NPs à base de copolymères associant le PMLABe au
poly(3-hydroxybutyrate) (PHB). Dans une publication récente, Barouti et *al*. ont démontré que l'exposition aiguë et chronique aux NPs PMLA-*b*-PHB n'entraîne pas de toxicité significative vis-à-vis de cellules HepaRG progénitrices et hépatocytaires *in vitro* [86].

Dans le but de poursuivre ces travaux de caractérisation de la biocompatibilité des NPs à base de PMLABe, nous avons étudié leur effet sur l'activation de l'inflammasome à travers la production de cytokines pro-inflammatoires. De plus, notre de but étant de développer des NPs exposant des peptides hépatotropes à leur surface, nous avons évalué la cytotoxicité induite par ce type de nano-objets.

a. Evaluation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires

Des macrophages et des HepaRG progéniteurs ont été cultivés en absence ou en présence de LPS pour stimuler la production de cytokines pro-inflammatoires. Le **contrôle positif de l'activation de l'inflammasome** est réalisé par introduction de **cristaux d'acide urique (MSU)** dans le milieu de culture [84]. Le niveau d'activation de l'inflammasome a été évalué en mesurant les concentrations de **cytokines pro-inflammatoires IL- 6, IL-1α et IL-1β** dans les surnageants de culture (Figure 38).

En absence de pré-traitement des cellules par le LPS, seul l'IL-6 est détectable. Après stimulation par LPS, la sécrétion des trois cytokines augmente de manière importante mais l'incubation avec les NPs ne potentialise pas significativement cette production de cytokines proinflammatoires. Cela démontre donc que **ces nano-objets n'activent pas l'inflammasome dans notre modèle de macrophages primaires**. A l'inverse, l'incubation avec le MSU induit l'augmentation des concentrations en cytokines témoignant de l'activation de l'inflammasome, comme cela avait été déjà montré par Gicquel et *al*.

Les cellules HepaRG produisent beaucoup moins de médiateurs de l'inflammation et l'IL-6 est la seule cytokine détectable dans le milieu de culture de ces cellules. De la même manière que pour les macrophages, le pré-traitement par le LPS augmente la sécrétion d'IL-6 et l'incubation avec les NPs n'induit pas une recrudescence significative de cette production cytokinique. Par conséquent, **les NPs à base de PMLABe et de PEG-b-PMLABe n'activent pas l'inflammasome dans notre modèle de cellules hépatiques**.



Figure 38: Concentrations en cytokines pro-inflammatoires dans les milieux de culture des macrophages et HepaRG progéniteurs **p<0,01 ; Comparaisons par le test de Mann et Whitney

b. Evaluation de la viabilité cellulaire

Les HepaRG progéniteurs et hépatocytaires ont été incubés en absence ou en présence de NPs Biot-PEG₆₆-*b*-PMLABe₇₃ exposant ou non un peptide en surface. L'évaluation de la viabilité cellulaire *in vitro* permet de rechercher une éventuelle **cytotoxicité due aux NPs elles-mêmes ou à la nature du peptide**. Afin que la structure des NPs exposant ou non un peptide en surface soit similaire, le même échafaudage mettant en jeu la streptavidine comme intermédiaire de liaison a été utilisé. Pour obtenir les NPs sans peptide en surface, les peptides biotinylés sont remplacés par de la biotine au niveau des sites de fixation de la streptavidine. Nous disposons ainsi deux types de nano-objets : **NP-streptavidine-biotine** (NP-S-biot) et **NP-streptavidine-peptide** (NP-S-peptide).

Les résultats du test de réduction mitochondriale du MTT sont exprimés en pourcentage de cellules vivantes par rapport aux cellules incubées sans NPs dont la viabilité est arbitrairement fixée à 100%. Après incubation avec les NPs, la viabilité des cellules HepaRG progénitrices est légèrement

74

diminuée entre 80 et 90%. Cette diminution de la viabilité par rapport à la condition contrôle, sans NPs, est significative pour la plupart des NPs exposant un peptide en surface sauf RGD, HCBP₄ et CPB. Aucune différence significative n'est observée entre les cultures incubées en présence de NP-Speptide ou de NP-S-biot. Concernant les HepaRG hépatocytaires, la viabilité cellulaire varie de 77 \pm 4,7 % pour les NPs sans peptide en surface à 104 \pm 11,4% pour les NPs portant le peptide HCBP₄. Cependant, le nombre trop restreint d'échantillons n'a pas mis en évidence de différence statistique entre les différentes conditions de culture. L'ensemble de ces résultats est cohérent avec les données de viabilité cellulaire obtenues par Huang et *al*. avec les NPs à base du même copolymère [65].



Figure 39:Evaluation de la cytotoxicité induite par les NPs (A) HepaRG progéniteurs. (B) HepaRG hépatocytaires. *p<0,05 ; **p<0,01 ; Test de Mann et Whitney – comparaison par rapport à la condition sans NPs.

II.2. Mise au point des paramètres d'utilisation des NPs encapsulant du DiDoil

Les travaux antérieurs de l'équipe utilisaient des NPs fluorescentes grâce à la liaison covalente d'un fluorochrome, la fluorescéine amine, sur le copolymère au niveau du bloc PMLABe [82]. A l'aide de ces NPs, il avait été montré une captation par les cellules d'hépatome HepaRG. L'objectif de l'équipe est d'encapsuler des PA au sein des NPs et de permettre ensuite leur libération au niveau de cellules cibles. Nous avons donc décidé de nous rapprocher de cet objectif en **encapsulant un fluorochrome lipophile** permettant la **détection des NPs** en microscopie à fluorescence et cytométrie en flux. Ces modifications ont nécessité d'ajuster les protocoles de formulation et de greffage des peptides en surface.

a. Choix du solvant

Selon les recommandations du fournisseur, le DiDoil peut être dissous dans deux solvants : l'acétone ou le DMF. Par conséquent, deux suspensions de NPs ont été préparées à partir du copolymère Biot-PEG₆₆-*b*-PMLABe₇₃ et du DiDoil dissous dans l'un ou l'autre de ces deux solvants. Afin de déterminer si la nature du solvant utilisé lors de la formulation avait un impact sur le niveau de captation des NPs par les cellules, nous avons testé ces deux suspensions de NPs sur des **cellules HepaRG progénitrices**. Les travaux antérieurs de l'équipe montraient que l'ajout du peptide RGD, sur les NPs-fluorescéine amine, augmentait la captation cellulaire de 10 à 40 fois en comparaison des NPs sans peptide. Nous avons utilisé ce référentiel pour évaluer l'impact du solvant sur la captation cellulaire.

Pour les NPs formulées en présence de DMF, la **mesure de l'intensité de fluorescence** par **cytométrie en flux** a permis d'objectiver une captation environ 9 fois supérieure pour les NPs portant le peptide RGD par rapport à celles ne le portant pas (3557,74 ± 102,45 vs 381,21 ± 21,86, exprimée en unité arbitraire U.A). Par contre, pour les NPs formulées en présence d'acétone, l'ajout du peptide n'augmentait la captation que d'un facteur 3 (1170,14 ± 24,35 vs 374,39 ± 7,48 U.A) (Figure 40). C'est donc le DMF qui a été choisi pour la formulation de nos NPs encapsulant du DiDoil.



Figure 40: Effet du solvant de dissolution du fluorochrome sur le signal de fluorescence après captation cellulaire

b. Choix des concentrations

Comme détaillé dans la partie « Matériel et Méthodes », le greffage des peptides à la surface des NPs se fait par l'intermédiaire de la streptavidine. Il est donc nécessaire de déterminer les **concentrations optimales de streptavidine, peptide et copolymère** à utiliser lors de cette étape de couplage pour obtenir une captation cellulaire efficace. Pour cela, nous avons fait varier les concentrations des trois composés et évalué la captation par les **cellules HepaRG progénitrices** en mesurant l'intensité de fluorescence émise par ces cellules en **cytométrie en flux**. Quatre concentrations différentes de copolymère ont été testées, à savoir: 1, 2, 4 et 8 μM, toujours sur la base des travaux antérieurs de l'équipe [82].

La streptavidine présentant quatre **sites d'interaction avec la biotine**, des variations de la saturation par la biotine peuvent avoir des conséquences sur la captation cellulaire. Un des quatre sites doit être utilisé pour la fixation sur les NPs biotinylées. En théorie, il est donc possible de faire varier le peptide biotinylé dans un ratio molaire de 1 à 3 avec la streptavidine. Ainsi, pour chacune des quatre concentrations en copolymère, nous avons fait varier les concentrations en streptavidine et en peptide (RGD) selon le Tableau 9 :

Concentration en streptavidine (S) en μM	Concentration en peptide (R) en μM	Concentration en copolymère en μM
0	0	1
0,5	0,5-1	
1	1-2-3	
2	2-4-6	
0	0	2
1	1-2-3	
2	2-4-6	
4	4-8-12	
0	0	4
2	2-4-6	
4	4-8-12	
8	8-16-24	
0	0	8
4	4-8-12	
8	8-16-24	

Tableau 9: Variation des concentrations en streptavidine, peptide RGD et copolymère

L'intensité de fluorescence augmente avec les concentrations croissantes en copolymère de 1 à 4 μ M (Figure 41 A à C). L'utilisation du copolymère à forte concentration (8 μ M) n'apporte pas d'avantages en terme de captation cellulaire mais, au contraire, l'intensité de fluorescence est plus faible (Figure 41 D) que pour les concentrations de 2 et 4 μ M. De plus, des agrégats des NPs en suspension dans le milieu de culture ont été observés en microscopie à fluorescence pour les cellules incubées en présence de 8 μ M de copolymère (données non présentées). A la concentration de 1 μ M en copolymère, les quantités variables en streptavidine et RGD n'affectent pas la captation. Pour les concentrations en copolymère de 2, 4 et 8 μ M, l'utilisation d'un échafaudage copolymère/streptavidine/RGD selon le ratio 2/1/3 (histogrammes noirs Figure 41 B à D) inhibe fortement la captation.



Figure 41: Evaluation de l'incidence des concentrations en copolymère, streptavidine et peptide sur la captation cellulaire

A partir de ces données, nous avons décidé d'utiliser les concentrations suivantes pour les prochains essais de captation : **copolymère = 1 \muM, streptavidine = 1 \muM et peptide = 2 \muM (ratio 1/1/2). Ces concentrations ne correspondent pas aux intensités de fluorescence maximales observées avec le peptide RGD pour la captation cellulaire ; cependant ce choix a été fait pour éviter une saturation de la captation et permettre d'observer d'éventuelles différences entre les peptides à tester. De plus, l'utilisation de ces concentrations concorde avec les données des travaux antérieurs de l'équipe utilisant un copolymère fluorescent associé au montage NPs/streptavidine/peptide [82].**

II.3. Influence des peptides hépatotropes sur la captation des NPs par des cellules hépatiques en culture

Nous avons sélectionné et fait synthétiser une collection de 12 peptides biotinylés afin de déterminer quels étaient les plus affins pour les hépatocytes. Ces différents peptides ont été greffés à la surface des NPs puis testés sur des cellules hépatiques cancéreuses et saines (hépatocytes humains primaires). La captation des NPs a été évaluée par la détection du DiDoil encapsulé, en **microscopie à fluorescence et cytométrie en flux** (Figure 42).

78



Figure 42: Détection des NPs fluorescentes captées par les cellules HepaRG progénitrices par cytométrie en flux et microscopie à fluorescence
(A) NPs sans peptide en surface (NP-S-biot), (B) et (C) respectivement NPs portant les peptides RGD (NP-S-RGD) et CPB (NP-S-CPB). Echelle : 50 μM.

Toutes les cellules sont incubées pendant 20 heures en absence ou présence de NPs dans leur milieu de culture. Les NPs possèdent ou non des peptides en surface grâce au même montage que celui utilisé lors du test de viabilité cellulaire à savoir : NP-S-biot et NP-S-peptide. Lors de l'analyse par cytométrie en flux, l'**intensité de fluorescence** émise par les cellules cultivée sans NPs permet de positionner l'**intervalle M1** correspondant à la **fluorescence de base émise par les cellules**, en l'absence de fluorochrome. Les cellules dans l'intervalle M1 sont dites « négatives ». L'**intervalle M2** correspond à la **fluorescence émise par le DiDoil** encapsulé dans les NPs captées par les cellules. Ces cellules sont dites « positives ».

La figure 42 présente quelques données de cytométrie en flux obtenues pour les HepaRG progéniteurs. L'analyse révèle un histogramme de fluorescence fortement décalé vers la droite pour les cellules incubées en présence de NPs (avec ou sans peptide en surface) par rapport à la fluorescence de base émise par les cellules cultivées sans NPs. Ceci démontre que la majorité des cellules HepaRG a capté des NPs. La cytométrie en flux permet de quantifier à la fois le **pourcentage de cellules positives** c'est-à dire ayant captées des NPs fluorescentes mais aussi **l'intensité de la fluorescence émise** par ces cellules.

Pour les **cellules hépatiques tumorales**, une captation très efficace des NPs, avec ou sans peptide en surface, est observée (Figure 43 A à E). En effet, près de 100 % des cellules Huh7 et SNU387 sont positives après incubation avec les NPs. Il en est de même pour les cellules HepaRG avec des pourcentages de cellules positives d'environ 70 et 90 % respectivement pour les cellules hépatocytaires et progénitrices. Pour les cellules HepG2, le pourcentage de cellules positives est compris entre 53 et 87 %.



Figure 43: Pourcentages de cellules hépatiques positives en cytométrie en flux après incubation avec les NPs fluorescentes

* p<0,05 ; **p<0,01 ; Test de Mann et Whitney – comparaison par rapport à la condition biotine (sans peptide). \$ p<0,05 ; \$\$ p<0,01 ; \$\$\$ p<0,001 ; Test de Kruskal-Wallis et post-test de Dunn's – comparaison par rapport à la condition RGD</pre> A l'inverse, moins de 50 % des **hépatocytes humains primaires** sont fluorescents après incubation avec les NPs. En absence de peptide à la surface des NPs, le pourcentage de cellules positives n'est que de 4,2 ± 3,5 %. L'addition de peptides augmente significativement la captation, avec des pourcentages de cellules positives compris entre 19,8 et 41,4 %. Cependant ces valeurs restent inférieures à celles obtenues avec les lignées cellulaires de CHC.

La moyenne de l'intensité de fluorescence est le reflet de la quantité de NPs captées par les cellules. Pour toutes nos expériences, cette moyenne est calculée à partir des valeurs d'intensité de fluorescence mesurées uniquement pour les cellules positives situées dans l'intervalle M2. Afin de visualiser l'effet de la présence des peptides à la surface des NPs, pour chaque expérience, nous avons calculé le rapport entre les valeurs d'intensité de fluorescence en condition NP-S-peptide et celles en condition NP-S-biot. Ainsi le calcul permet d'avoir une intensité de fluorescence égale à 1 pour les cellules incubées avec des NPs sans peptide en surface (NP-S-biot) et de voir par quel coefficient est multipliée l'intensité de fluorescence lors de l'ajout d'un peptide.

Comme cela était attendu, l'ajout d'un peptide hépatotrope à la surface des NPs augmente la quantité de NPs captées par les **cellules hépatiques cancéreuses**. Quelque soit la lignée cellulaire d'hépatome utilisée, l'incubation avec des NPs exposant des peptides en surface augmente significativement la moyenne d'intensité de fluorescence (Figure 44 A à E). Pour les HepaRG hépatocytaires, la présence des peptides hépatotropes à la surface des NPs permet d'augmenter la captation d'un facteur compris entre 11,8 et 45,5. A l'inverse, l'incubation des **hépatocytes humains primaires** avec des NPs recouvertes de peptides hépatotropes n'augmente pas la moyenne d'intensité de fluorescence (Figure 44 F).

Nous avons ensuite comparé l'ensemble des peptides par rapport à notre peptide de référence, le RGD. Pour les HepaRG hépatocytaires, **HCBP1, CPB, A54, DKN et GBVA10-9** induisent une augmentation significative de l'intensité de fluorescence par rapport au RGD. Les peptides CPB et GBVA10-9 entraînent aussi augmentation statistiquement significative de l'intensité de fluorescence chez les cellules SNU387, HepG2 et HepaRG progénitrices.



Figure 44: Analyse des rapports d'intensité de fluorescence mesurés par cytométrie en flux pour les cellules hépatiques ayant capté des NPs fluorescentes

* p<0,05; **p<0,01; ***p<0.001; Test de Mann et Whitney – comparaison par rapport à la condition biotine (sans peptide). \$ p<0,05; \$\$ p<0,01; \$\$\$ p<0,001; Test de Kruskal-Wallis et post-test de Dunn's – comparaison par rapport à la condition RGD

Les images de captation cellulaire en microscopie à fluorescence conventionnelle non confocale suggèrent que les NPs se trouvent à l'intérieur des cellules (Figure 42). Afin de confirmer cette localisation, la technique de **microscopie confocale** a été utilisée pour les NP-S-RGD (Figure 45). Les premières images révèlent que les NPs fluorescentes (rouge) semblent être situées entre la membrane plasmique et le noyau (bleu).



Figure 45: Localisation cellulaire de NPs fluorescentes exposant le peptide RGD en surface

II.4. Influence des peptides hépatotropes sur la captation des NPs par des cellules non hépatiques en culture

Dans les expériences précédentes, nous avons démontré que les peptides sélectionnés favorisaient la captation par les cellules HepaRG et très peu par les hépatocytes primaires. Afin de confirmer si ces peptides privilégiaient une captation par les cellules d'hépatome, nous avons voulu évaluer l'impact de ces peptides sur l'efficacité de la captation des NPs par des **cellules non hépatiques.**

La présence des peptides à la surface des NPs entraîne une augmentation de la proportion de cellules positives et/ou de l'efficacité de captation pour l'ensemble des modèles cellulaires non hépatique testés (Figure 46 et Figure 47).

Le pourcentage de cellules ayant capté des NPs fluorescentes est variable d'un type cellulaire à l'autre. Comme observé pour les lignées cellulaires de CHC, la majorité des cellules non hépatiques captent très efficacement les NPs (Figure 46). Près de 100 % des cellules **HCT116** et **RC21** sont positives après incubation avec des NPs avec ou sans peptide en surface. De même, pour les NCI-**H727**, plus de 70 % des cellules sont fluorescentes après traitement. Pour les cellules **CaCo2**, le pourcentage de cellules positives est beaucoup plus faible, aux alentours de 10 à 25 %. A l'inverse de ce qui est observé pour les autres types cellulaires, la présence des peptides à la surface des NPs augmente le pourcentage de cellules positives pour les **HUVEC** qui passe de 38,8 ± 0,7 % en absence de peptide à plus de 92% en présence de peptide.



Figure 46: Pourcentages de cellules non hépatiques positives en cytométrie en flux après incubation avec les NPs fluorescentes

* p<0,05 ; **p<0,01; Test de Mann et Whitney – comparaison par rapport à la condition biotine (sans peptide).

Pour les lignées HCT116, CaCo2 et RC21, la présence de peptides à la surface des NPs augmente significativement l'intensité de fluorescence mesurée par cytométrie en flux comparativement aux NPs sans peptides (Figure 47). Cette même tendance est retrouvée chez les deux autres types cellulaires étudiés (NCI-H727 et HUVEC) mais le nombre trop restreint

84

d'échantillons n'a pas permis de réaliser de tests statistiques. Par conséquent, comme pour les cellules d'hépatome, les NPs sont captées en plus grande quantité par les cellules tumorales non hépatiques lorsqu'elles portent des peptides en surface. Cependant, l'augmentation de l'efficacité de captation induite par la présence de ces peptides n'est pas aussi importante que celle observée pour les cellules de CHC. En effet, l'intensité de fluorescence est augmentée d'un facteur d'environ 6 pour les NCI-H727, et les HUVEC et inférieur à 5 pour les trois autres lignées alors que pour les cellules HepaRG l'augmentation de captation est comprise entre 11 et 45 fois.



Figure 47: Analyse des rapports d'intensité de fluorescence mesurés par cytométrie en flux pour les cellules non hépatiques ayant capté des NPs fluorescentes

** p<0,01 ; ***p<0,001; Test de Mann et Whitney – comparaison par rapport à la condition biotine (sans peptide).
\$\$ p<0,01 ; Test de Kruskal-Wallis et post-test de Dunn's – comparaison par rapport à la condition RGD

De plus, pour les cellules non hépatiques, nous avons comparé la captation cellulaire des NP-S-RGD (peptide de référence) par rapport aux autres peptides. Seul le GBVA10-9 augmente significativement la captation par les cellules HCT116.

II.5. Cinétique de captation des NPs par les cellules HepaRG hépatocytaires

Par la suite, nous souhaitons mettre en place des expériences de cytotoxicité induite par les NPs encapsulant des principes actifs notamment antiprolifératifs et/ou cytotoxiques. Dans cette perspective, il nous a semblé nécessaire de déterminer la cinétique de captation des NPs par les cellules HepaRG afin de pouvoir comparer la cytotoxicité induite par un principe actif utilisé sans vectorisation ou encapsulé dans nos NPs portant un peptide pour une durée de traitement donnée. Nous avons sélectionné six peptides à savoir : notre peptide de référence **RGD** (5 AA), les **cinq peptides les plus affins pour les cellules HepaRG hépatocytaires.**

L'intensité de fluorescence mesurée après incubation avec les NP-S-biot est faible et leur cinétique de captation est lente et constante en comparaison avec les résultats observés en présence de NP-S-peptide (Figure 48). Ces résultats concordent avec ceux précédemment obtenus lors des essais de captation à 24 heures.



Figure 48: Cinétique de captation des NPs par les cellules HepaRG hépatocytaires

Pour les NP-S-peptide, **deux profils différents de captation** sont observés et semblent être en lien avec la taille des séquences peptidiques. Pour les peptides longs GBVA10-9 et CPB, la captation est très rapide sur les 4 à 6 premières heures. En effet, entre t = 0 et t=4 heures, l'intensité de fluorescence (exprimée en U.A) passe de 1,93 \pm 0,5 à 319,9 \pm 90 pour GBVA10-9 et à 316,1 \pm 7,2 pour CPB. Puis, de la 8^{ème} à la 24^{ème} heure, nous observons un ralentissement de la captation des NPs.

Concernant les peptides courts RGD, HCBP₁, A54 et DKN, la captation augmente de manière linéaire jusqu'à la 16^{ème} heure puis l'augmentation de la captation se poursuit mais de manière moins rapide. Cependant, l'efficacité de captation durant les 4 premières heures reste beaucoup plus faible avec les peptides RGD et DKN en comparaison de obtenus avec les peptides GBVA10-9 et CPB.

III. Discussion et perspectives

Les macrophages sont des composants essentiels du système immunitaire qui internalisent des antigènes endogènes et exogènes pour éliminer les pathogènes, les débris cellulaires ou les particules inertes. Ils sont capables de sécréter des médiateurs de l'inflammation, notamment des cytokines pro-inflammatoires telles que les interleukines IL-1 et IL-6. Il a été montré que certaines NPs peuvent induire la production d'IL-1 β par des macrophages humains *via* l'activation de l'inflammasome NLRP3 (NOD-like receptor family pyrin domain containing 3) [87], [88].

La plupart des macrophages résident dans les tissus, particulièrement dans le foie puisque cet organe concentre près de 80 % de la population totale des macrophages. Les NPs que nous développons étant destinées au ciblage du tissu hépatique, elles seront donc en contact, in vivo, avec les macrophages résidents du foie (cellules de Küpffer) qui pourront alors les phagocyter. Dans ce contexte, il nous semble donc intéressant d'évaluer si nos NPs sont capables d'activer les voies de signalisation conduisant à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Les résultats préliminaires ont permis de montrer que les NPs à base de PMLABe et PEG-b-PMLABe n'induisent pas la libération d'IL-1α, d'IL-1β ni d'IL-6 dans notre modèle de macrophages humains primaires. Des travaux récents ont mis en évidence que la production d'IL-1 β dans les macrophages humains nécessite deux stimuli indépendants : premièrement, un signal induisant la transcription et la traduction de la pro-IL-1 β puis un deuxième signal pour activer l'inflammasome NLRP3 qui va cliver la pro-IL-1ß grâce à sa caspase-1. Le LPS est capable d'induire le premier signal permettant la synthèse de pro-IL-1 β . La préactivation des macrophages par utilisation de LPS ultrapur a entrainé la sécrétion d'IL-1α, IL-1β et IL-6, comme cela avait déjà été démontré par Gicquel et al. [84]. Cependant, l'incubation des NPs avec les macrophages pré-activés n'a pas entraîné une augmentation de la libération de cytokines proinflammatoire. Cela indique donc que nos NPs n'activent pas significativement l'inflammasome. De plus, des travaux antérieurs de l'équipe ont montré que les NPs n'entraînaient pas une diminution de la viabilité cellulaire pour des concentrations en copolymère inférieures à 3 μ M. L'ensemble de ces données est donc en faveur d'une excellente biocompatibilité des NPs à base de PEG₆₆-*b*-PMLABe₇₃.

Le but de notre projet de recherche étant de développer des NPs exposant en surface des peptides utilisés pour cibler les hépatocytes tumoraux, nous avons évalué la cytotoxicité de tels nano-objets sur les cellules HepaRG. Les résultats du test de réduction mitochondriale du MTT sur les HepaRG progéniteurs ont mis en évidence une légère cytotoxicité après incubation avec la majorité des NPs couplées aux peptides. Des variations plus importantes de la viabilité cellulaire ont été observées pour les HepaRG hépatocytaires. A l'inverse de ce qui est observé avec les HepaRG progéniteurs, les NP-S-biot semblent induire une cytotoxicité pour les HepaRG hépatocytaires. Cependant, le nombre trop restreint d'échantillons ne permettant pas de réaliser des tests statistiques, des expériences supplémentaires sont nécessaires.

Les NPs biot-PEG₆₆-b-PMLABe₇₃ formulées par l'ENSCR sont capables d'encapsuler et de transporter des molécules dans leur cœur hydrophobe. L'un des nos objectifs a donc été d'adapter la méthode de formulation des NPs afin d'encapsuler du DiDoil, un fluorochrome lipophile. Ce dernier permet de détecter les NPs et de quantifier leur captation par des cellules en culture. Nos expériences ont permis de retenir le DMF, plutôt que l'acétone, comme solvant pour l'étape de nanoprécipitation puisque les NPs, formulées à partir de copolymère et DiDoil dissous dans le DMF, induisaient une meilleure captation par les cellules HepaRG. De manière intéressante, il a été constaté que le solvant utilisé pour la formulation avait un impact sur la captation des NP-S-RGD mais pas sur la captation des NP-S-biot suggérant que la nature du solvant n'aurait pas d'impact sur le rendement d'encapsulation du DiDoil. Ces résultats pourraient être dus à un effet du DMF sur l'auto-organisation du copolymère en NPs, plus favorable à l'exposition du peptide en surface. A l'heure actuelle, cette hypothèse n'a pas été vérifiée.

L'objectif principal du travail présenté dans ce manuscrit est d'étudier l'influence de peptides, considérés comme hépatotropes et sélectionnés à partir de données bibliographiques, sur la captation cellulaire des NPs biot-PEG₆₆-*b*-PMLABe₇₃. Ces peptides courts biotinylés ont donc été exposés à la surface des NPs *via* un greffage par la streptavidine sur le copolymère et testés sur différents types cellulaires hépatiques ou non.

Des essais de captation ont été menés sur quatre lignées cellulaires d'hépatome dérivées de CHC ainsi que sur des hépatocytes humains primaires provenant de trois lots différents. Comme en témoigne le pourcentage élevé de cellules positives en cytométrie en flux, la grande majorité des **cellules cancéreuses hépatiques** ont été capables de capter des NPs que ces dernières soient ou non recouvertes de peptides. A l'inverse, la présence des peptides hépatotropes influencent de manière significative l'efficacité de captation par ces cellules tumorales. En effet, l'ajout de ces peptides à la surface des NPs a permis d'augmenter fortement la quantité de NPs captées par ces cellules. Tous les peptides de la collection, une fois greffés à la surface des NPs, ont induit une augmentation de l'intensité de fluorescence émise par les cellules par rapport à l'intensité mesurée après incubation avec des NPs sans peptide en surface. Nous avons observée que la nature du peptide pouvait influencer le niveau de captation. Par exemple, l'ajout du GBVA10-9 à la surface des cellules a multiplié l'efficacité de captation par un facteur 45 tandis que le peptide SRIF-14 ne l'augmente que d'un facteur 20. L'utilisation du peptide RGD à la surface de nanovecteurs pour le ciblage de cellules tumorales est largement documentée dans la littérature. De manière intéressante, certains peptides de notre collection ont été capables d'induire une captation cellulaire plus importante que celle observée avec le RGD. Par exemple, pour les cellules HepaRG hépatocytaires, cinq peptides ont permis d'augmenter significativement la captation des NPs par rapport au RGD, à savoir : **HCBP₁**, **CPB**, **A54**, **DKN et GBVA10-9**.

Concernant les **hépatocytes humains primaires**, contrairement à ce qui est observé pour les cellules cancéreuses, la présence de peptide à la surface a augmenté significativement le pourcentage de cellules positives. Ce dernier reste cependant 2 à 3 fois plus faible que dans les cellules HepaRG. De plus, les peptides ont augmenté très faiblement l'intensité moyenne de fluorescence : de 1,5 à 2 fois par rapport à la condition sans peptide. Cela suggère donc que l'efficacité de captation des hépatocytes primaires permissifs reste limitée.

De façon générale, le ciblage des cellules d'hépatome par les NP-S-peptide est très efficace au regard de celui des hépatocytes primaires. De plus, les peptides GBVA10-9 et CPB ont été identifiés comme étant les plus affins pour les cellules d'hépatome HepaRG, HepG2 et SNU387.

D'autres essais de captation ont été réalisés sur des **cellules non hépatiques** dont quatre lignées de cellules tumorales et des cellules endothéliales primaires. Avec des pourcentages de cellules positives très variables en fonction des types cellulaires, l'addition de peptides a augmenté la captation des NPs pour toutes les lignées cellulaires testées. Cependant, la présence des peptides à la surface des NPs n'a permis d'augmenter la captation qu'au maximum d'un facteur 7 par rapport aux NP-S-biot.

L'ensemble de ces résultats confirment que les douze peptides sélectionnés sont de **bons candidats pour le ciblage du CHC**. Parmi eux, **GBVA10-9 et CPB** semblent être les plus intéressants de part leur forte affinité pour les cellules hépatiques tumorales (Figure 49). A court terme, nous souhaitons donc poursuivre l'étude de la captation des NPs *in vitro* sur des **modèles de cellules primaires** telles que des cellules épithéliales bronchiques et rénales et des cellules endothéliales d'aortes. Ces modèles sont importants pour évaluer l'impact des NPs sur des cellules saines avant de démarrer les études *in vivo* chez la souris. Par ailleurs, les profils de cinétiques de captation établis sur les HepaRG hépatocytaires serviront de base de travail pour l'élaboration et la mise en œuvre de tests de cytotoxicité et de captation en présence de **NPs encapsulant un PA.**

Par la suite, nos travaux se concentreront davantage sur l'étude de l'effet des peptides les plus hépatotropes à savoir CPB et GBVA10-9. Pour ce dernier, une stratégie de **greffage direct** sur le copolymère PEG-*b*-PMLABe a été mise en place. Ce greffage va permettre de s'affranchir de la présence de la streptavidine qui générait un encombrement non négligeable à la périphérie des NPs. Cette modification de la structure de nos NPs aura très probablement un impact sur la captation cellulaire. En effet, l'entrée dans les cellules et le transport intracellulaire dépendent de la structure et des caractéristiques physico-chimiques des nano-objets (taille, forme géométrique, charge, hydrophobie) [89]. Nous étudierons donc la captation cellulaire de ces NPs par différents types cellulaires ainsi que leur cytotoxicité.

Les mécanismes de captation cellulaire des NPs à base du copolymère biot-PEG₆₆-*b*-PMLABe₇₃ n'ont pas encore été étudiés. Cependant, les images réalisées en microscopie confocale pour les cellules HepaRG progénitrices incubées en présence de NP-S-RGD semblent être en faveur d'une localisation intracellulaire des NPs. De plus, des travaux récents de l'équipe ont montré que l'entrée de NPs dérivées du poly(acide malique) dans des cellules HepaRG se fait par **endocytose** [90]. Nous avons donc décidé d'explorer les processus d'internalisation des NPs une fois que les peptides seront liés de manière covalente au copolymère PEG-*b*-PMLABe.

A moyen terme, nous voulons tester nos NPs sur des **coupes « épaisses » de foies humains normaux et cancéreux.** Ce modèle d'explant *ex vivo*, actuellement en développement au sein de notre unité, nous permettrait d'évaluer la captation des NPS par les hépatocytes lorsqu'ils se trouvent dans leur microenvironnement au sein du tissu hépatique. De plus, une étude préliminaire *in vivo* a permis de montrer que les NPs à base de PEG-b-PMLABe n'induisent pas de toxicité majeure chez la souris [91]. Nous souhaitons donc étudier l'effet des nos nanovecteurs sur un modèle de CHC **chez la souris.**



Figure 49: Rapports d'intensité de fluorescence pour l'ensemble des types cellulaires étudiés

CONCLUSION

En vue de leur utilisation en médecine, les nanovecteurs d'agents anti-cancéreux doivent être biodégradables, biocompatibles et capables d'échapper au système immunitaire tout en libérant le PA qu'ils transportent de manière contrôlée et spécifique au niveau de sa cible cellulaire. Dans ce contexte, notre équipe développe une nouvelle famille de NPs, formulées à partir du copolymère biot-PEG₆₆-*b*-PMLABe₇₃, pouvant présentés des peptides à leur surface dans le but de vectoriser des drogues anticancéreuses pour le ciblage du CHC.

Nous avons montré que les NPs biot-PEG₆₆-*b*-PMLABe₇₃ n'induisent pas la production de cytokines pro-inflammatoires dans un modèle de macrophages humains primaires et qu'elles sont faiblement cytotoxiques pour la lignée cellulaire hépatique HepaRG. Ces résultats sont en faveur d'une excellente biocompatibilité de ces NPs dérivées du PMLA, comme cela avait déjà été mis en évidence dans des travaux antérieurs de l'équipe.

Afin d'exposer des peptides à la surface des NPs, nous avons utilisé la streptavidine comme intermédiaire de couplage entre les NPs biot-PEG₆₆-*b*-PMLABe₇₃ et les peptides biotinylés. Cet échafaudage moléculaire a nécessité des adaptations pour formuler nos NPs encapsulant un fluorochrome. Cela nous a conduit à privilégier le DMF comme solvant au cours de la nanoprécipitation et à utiliser les concentrations suivantes lors de l'étape de greffage des peptides : [biot-PEG₆₆-*b*-PMLABe₇₃] = 1 μ M, [streptavidine] = 1 μ M et [peptide] = 2 μ M.

Enfin, les douze peptides courts que nous avions sélectionnés à partir de données de la littérature pour leur hépatotropisme, ont été greffés à la surface de nos NPs. La détection de ces NPs par cytométrie en flux a permis d'évaluer leur captation par des cellules hépatiques et non hépatiques en culture. L'ensemble de ces travaux a permis d'identifier cinq peptides particulièrement affins pour la majorité des lignées de cellules tumorales hépatiques testées à savoir : HCBP1, A54, DKN, CPB et GBVA10-9. Ce dernier a été fixé de manière covalente sur le copolymère PEG₆₆-*b*-PMLABe₇₃.afin de s'affranchir de la présence de la streptavidine et fera l'objet d'études *in vivo* chez la souris à moyen terme.



NOM et Prénom : VENE Elise.....

TITRE DE LA THESE

Développement et évaluation de nanoparticules dérivées du poly(acide malique) ciblant les cellules hépatiques cancéreuses

humaines

Rennes, le 08/09/16 Le Président de thèse :

Le Directeur de thèse :

1

1 6 SEP. 2016



BIBLIOGRAPHIE

- D. H. Adams and B. Eksteen, "Aberrant homing of mucosal T cells and extra-intestinal manifestations of inflammatory bowel disease," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 6, no. 3, pp. 244–251, Mar. 2006.
- [2] P.Bedossa, "Fibrose hépatique : physiopathologie, diagnostic, pronostic," EMC Hépatologie, vol. 10, no. 2, pp. 1–9, Apr. 2015.
- [3] A. Sawadogo, N. Dib, and P. Cales, "Physiopathologie de la cirrhose et de ses complications," *Réanimation*, vol. 16, no. 7–8, pp. 557–562, Nov. 2007.
- [4] F. Cholet, J.-B. Nousbaum, N. Lagarde, and B. Turlin, "Tumeurs hépatiques malignes primitives en dehors du carcinome hépatocellulaire," *EMC Hépatologie*, vol. 1, no. 1, pp. 1–6, Jan. 2006.
- [5] J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D. M. Parkin, D. Forman, and F. Bray, "Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012," *Int. J. Cancer*, vol. 136, no. 5, pp. E359-386, Mar. 2015.
- [6] K. A. McGlynn, J. L. Petrick, and W. T. London, "Global epidemiology of hepatocellular carcinoma: an emphasis on demographic and regional variability," *Clin. Liver Dis.*, vol. 19, no. 2, pp. 223–238, May 2015.
- [7] Binder-Foucard F, Belot A, Delafosse P, Remontet L, Woronoff AS, and Bossard N, Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012: étude à partir des registres des cancers du réseau Francim. Saint-Maurice: Institut de veille sanitaire, 2013.
- [8] H. Nordenstedt, D. L. White, and H. B. El-Serag, "The changing pattern of epidemiology in hepatocellular carcinoma," *Dig. Liver Dis. Off. J. Ital. Soc. Gastroenterol. Ital. Assoc. Study Liver*, vol. 42 Suppl 3, pp. S206-214, Jul. 2010.
- [9] J. M. Llovet, A. Burroughs, and J. Bruix, "Hepatocellular carcinoma," *Lancet Lond. Engl.*, vol. 362, no. 9399, pp. 1907–1917, Dec. 2003.
- [10] European Association For The Study Of The Liver and European Organisation For Research And Treatment Of Cancer, "EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma," J. Hepatol., vol. 56, no. 4, pp. 908–943, Apr. 2012.
- [11] J.-C. Trinchet, "Hepatocellular carcinoma in 2014: current situation and future prospects," *Diagn. Interv. Imaging*, vol. 95, no. 7–8, pp. 705–708, Aug. 2014.
- [12] IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, "Biological agents. Volume 100 B. A review of human carcinogens," *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. World Health Organ. Int. Agency Res. Cancer*, vol. 100, no. Pt B, pp. 1–441, 2012.
- [13] H. B. El-Serag, "Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma," *Gastroenterology*, vol. 142, no. 6, p. 1264–1273.e1, May 2012.
- [14] "WHO | Hepatitis B," WHO. [Online].
- Available: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/. [Accessed: 24-Jul-2016].
- [15] J. J. Ott, G. A. Stevens, J. Groeger, and S. T. Wiersma, "Global epidemiology of hepatitis B virus infection: new estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity," *Vaccine*, vol. 30, no. 12, pp. 2212–2219, Mar. 2012.
- [16] "WHO | Hepatitis C," WHO. [Online].
- Available: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/. [Accessed: 24-Jul-2016].
- [17] C. Bosetti, F. Turati, and C. La Vecchia, "Hepatocellular carcinoma epidemiology," *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, vol. 28, no. 5, pp. 753–770, Oct. 2014.
- [18] T. C. Wirth and M. P. Manns, "The impact of the revolution in hepatitis C treatment on hepatocellular carcinoma," Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO, vol. 27, no. 8, pp. 1467–1474, Aug. 2016.
- [19] C.-J. Chiang, Y.-W. Yang, S.-L. You, M.-S. Lai, and C.-J. Chen, "Thirty-year outcomes of the national hepatitis B immunization program in Taiwan," *JAMA*, vol. 310, no. 9, pp. 974–976, Sep. 2013.

- [20] IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, "Chemical agents and related occupations," IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. World Health Organ. Int. Agency Res. Cancer, vol. 100, no. Pt F, pp. 9–562, 2012.
- [21] F. Turati, C. Galeone, M. Rota, C. Pelucchi, E. Negri, V. Bagnardi, G. Corrao, P. Boffetta, and C. La Vecchia, "Alcohol and liver cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective studies," Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO, vol. 25, no. 8, pp. 1526–1535, Aug. 2014.
- [22] Rinella ME, "Nonalcoholic fatty liver disease: A systematic review," JAMA, vol. 313, no. 22, pp. 2263–2273, Jun. 2015.
- [23] J.-C. Trinchet, "[Hepatocellular carcinoma: increasing incidence and optimized management]," *Gastroentérologie Clin. Biol.*, vol. 33, no. 8–9, pp. 830–839, Sep. 2009.
- [24] A. Villanueva, V. Hernandez-Gea, and J. M. Llovet, "Medical therapies for hepatocellular carcinoma: a critical view of the evidence," *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 10, no. 1, pp. 34–42, Jan. 2013.
- [25] J. M. Llovet, M. Schwartz, and V. Mazzaferro, "Resection and liver transplantation for hepatocellular carcinoma," Semin. Liver Dis., vol. 25, no. 2, pp. 181–200, 2005.
- [26] Blanc JF, Barbare JC, Boige V, Boudjema K, Créhange G, Decaens T, Farges O, Guiu B, Merle P, Selves L, and Trinchet JC, "Carcinome hépatocellulaire," *Thésaurus National de Cancérologie Digestive*, Juin-2015. [Online]. Available: http://www.tncd.org.
- [27] J. Lammer, K. Malagari, T. Vogl, F. Pilleul, A. Denys, A. Watkinson, M. Pitton, G. Sergent, T. Pfammatter, S. Terraz, Y. Benhamou, Y. Avajon, T. Gruenberger, M. Pomoni, H. Langenberger, M. Schuchmann, J. Dumortier, C. Mueller, P. Chevallier, R. Lencioni, and PRECISION V Investigators, "Prospective randomized study of doxorubicin-eluting-bead embolization in the treatment of hepatocellular carcinoma: results of the PRECISION V study," *Cardiovasc. Intervent. Radiol.*, vol. 33, no. 1, pp. 41–52, Feb. 2010.
- [28] J. M. Llovet, S. Ricci, V. Mazzaferro, P. Hilgard, E. Gane, J.-F. Blanc, A. C. de Oliveira, A. Santoro, J.-L. Raoul, A. Forner, M. Schwartz, C. Porta, S. Zeuzem, L. Bolondi, T. F. Greten, P. R. Galle, J.-F. Seitz, I. Borbath, D. Häussinger, T. Giannaris, M. Shan, M. Moscovici, D. Voliotis, J. Bruix, and SHARP Investigators Study Group, "Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma," *N. Engl. J. Med.*, vol. 359, no. 4, pp. 378–390, Jul. 2008.
- [29] I. Ruiz and C. Féray, "[Current management of hepatocellular carcinoma]," *Cancer Radiothérapie J. Société Fr. Radiothérapie Oncol.*, vol. 19, no. 6–7, pp. 410–415, Oct. 2015.
- [30] B. Bhushan, "Bioinspired structured surfaces," *Langmuir ACS J. Surf. Colloids*, vol. 28, no. 3, pp. 1698–1714, Jan. 2012.
- [31] M. C. Roco, "The long view of nanotechnology development: the National Nanotechnology Initiative at 10 years," *J. Nanoparticle Res.*, vol. 13, no. 2, pp. 427–445, Feb. 2011.
- [32] J. E. Hulla, S. C. Sahu, and A. W. Hayes, "Nanotechnology: History and future," *Hum. Exp. Toxicol.*, vol. 34, no. 12, pp. 1318–1321, Dec. 2015.
- [33] "NNI Budget | Nano." [Online]. Available: http://www.nano.gov/about-nni/what/funding. [Accessed: 30-Aug-2016].
- [34] "Les nanotechnologies : un nouveau paradigme cahier ANR n°5 juillet 2012." [Online]. Available:http://www.agence-nationale-recherche.fr/informations/actualites/detail/lesnanotechnologies-un-nouveau-paradigme-cahier-anr-n5-juillet-2012
- [35] European Commission and Directorate General for Research, *Nanomedicine: nanotechnology for health : European technology platform : strategic research agenda for nanomedicine.* Luxembourg: EUR-OP, 2006.
- [36] Comité Biotechnologies du LEEM, "Bionest Partners Final Report Applications des nanotechnologies à la médecine," Dec. 2013.
- [37] P. Boisseau and B. Loubaton, "Nanoscience and nanotechnologies: hopes and concerns. Nanomedicine, nanotechnology in medicine," *Comptes Rendus Phys.*, vol. 12, no. 7, pp. 620–636, Sep. 2011.
- [38] P. Padmanabhan, A. Kumar, S. Kumar, R. K. Chaudhary, and B. Gulyás, "Nanoparticles in practice for molecular-imaging applications: An overview," *Acta Biomater.*, vol. 41, pp. 1–16, Sep. 2016.

- [39] J.-A. Park, P. A. N. Reddy, H.-K. Kim, I.-S. Kim, G.-C. Kim, Y. Chang, and T.-J. Kim, "Gold nanoparticles functionalised by Gd-complex of DTPA-bis(amide) conjugate of glutathione as an MRI contrast agent," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 18, no. 23, pp. 6135–6137, Dec. 2008.
- [40] P. Couvreur and C. Vauthier, "Nanotechnology: Intelligent Design to Treat Complex Disease," *Pharm. Res.*, vol. 23, no. 7, pp. 1417–1450, Jun. 2006.
- [41] A. Wicki, D. Witzigmann, V. Balasubramanian, and J. Huwyler, "Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications," J. Controlled Release, vol. 200, pp. 138–157, Feb. 2015.
- [42] R. Singh and J. W. Lillard, "Nanoparticle-based targeted drug delivery," Exp. Mol. Pathol., vol. 86, no. 3, pp. 215–223, Jun. 2009.
- [43] L. Y. Rizzo, B. Theek, G. Storm, F. Kiessling, and T. Lammers, "Recent progress in nanomedicine: therapeutic, diagnostic and theranostic applications," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 24, no. 6, pp. 1159–1166, Dec. 2013.
- [44] T. Lammers, S. Aime, W. E. Hennink, G. Storm, and F. Kiessling, "Theranostic Nanomedicine," Acc. Chem. Res., vol. 44, no. 10, pp. 1029–1038, Oct. 2011.
- [45] F. Danhier, O. Feron, and V. Préat, "To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery," J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc., vol. 148, no. 2, pp. 135–146, Dec. 2010.
- [46] W. C. Zamboni, V. Torchilin, A. Patri, J. Hrkach, S. Stern, R. Lee, A. Nel, N. J. Panaro, and P. Grodzinski, "Best Practices in Cancer Nanotechnology Perspective from NCI Nanotechnology Alliance," *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 18, no. 12, pp. 3229–3241, Jun. 2012.
- [47] Y. Matsumura and H. Maeda, "A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs," *Cancer Res.*, vol. 46, no. 12 Pt 1, pp. 6387–6392, Dec. 1986.
- [48] M. E. Fox, F. C. Szoka, and J. M. J. Fréchet, "Soluble Polymer Carriers for the Treatment of Cancer: The Importance of Molecular Architecture," Acc. Chem. Res., vol. 42, no. 8, pp. 1141–1151, Aug. 2009.
- [49] H. Maeda, H. Nakamura, and J. Fang, "The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo," Adv. Drug Deliv. Rev., vol. 65, no. 1, pp. 71–79, Jan. 2013.
- [50] V. Torchilin, "Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect," Adv. Drug Deliv. *Rev.*, vol. 63, no. 3, pp. 131–135, Mar. 2011.
- [51] V. Sanna, N. Pala, and M. Sechi, "Targeted therapy using nanotechnology: focus on cancer," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 9, pp. 467–483, 2014.
- [52] E. Blanco, H. Shen, and M. Ferrari, "Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery," *Nat. Biotechnol.*, vol. 33, no. 9, pp. 941–951, Sep. 2015.
- [53] I. Brigger, C. Dubernet, and P. Couvreur, "Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 64, Supplement, pp. 24–36, Dec. 2012.
- [54] M. L. Hans and A. M. Lowman, "Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting," *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.*, vol. 6, no. 4, pp. 319–327, Aug. 2002.
- [55] E. Vigne and I. Sassoon, "[The growing field of immunoconjugates in oncology. A successful link(er) between antibodies and small cytotoxic molecules]," *Médecine Sci. MS*, vol. 30, no. 10, pp. 855–863, Oct. 2014.
- [56] C. Peters and S. Brown, "Antibody-drug conjugates as novel anti-cancer chemotherapeutics," *Biosci. Rep.*, vol. 35, no. 4, 2015.
- [57] H.-C. Huang, S. Barua, G. Sharma, S. K. Dey, and K. Rege, "Inorganic nanoparticles for cancer imaging and therapy," J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc., vol. 155, no. 3, pp. 344– 357, Nov. 2011.
- [58] A. C. Anselmo and S. Mitragotri, "A Review of Clinical Translation of Inorganic Nanoparticles," *AAPS J.*, vol. 17, no. 5, pp. 1041–1054, Sep. 2015.

- [59] M. Geszke-Moritz and M. Moritz, "Solid lipid nanoparticles as attractive drug vehicles: Composition, properties and therapeutic strategies," *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.*, vol. 68, pp. 982–994, Nov. 2016.
- [60] N. T. Huynh, C. Passirani, P. Saulnier, and J. P. Benoit, "Lipid nanocapsules: a new platform for nanomedicine," *Int. J. Pharm.*, vol. 379, no. 2, pp. 201–209, Sep. 2009.
- [61] C. Vanpouille-Box, F. Lacoeuille, J. Roux, C. Aubé, E. Garcion, N. Lepareur, F. Oberti, F. Bouchet, N. Noiret, E. Garin, J.-P. Benoît, O. Couturier, and F. Hindré, "Lipid nanocapsules loaded with rhenium-188 reduce tumor progression in a rat hepatocellular carcinoma model," *PloS One*, vol. 6, no. 3, p. e16926, 2011.
- [62] D. Lopez-Trabada Ataz, S. Dumont, and T. André, "[Nab-paclitaxel]," Bull. Cancer (Paris), vol. 102, no. 6, pp. 568–576, Jun. 2015.
- [63] D. A. Yardley, "nab-Paclitaxel mechanisms of action and delivery," J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc., vol. 170, no. 3, pp. 365–372, Sep. 2013.
- [64] L. Barraud, P. Merle, E. Soma, L. Lefrançois, S. Guerret, M. Chevallier, C. Dubernet, P. Couvreur, C. Trépo, and L. Vitvitski, "Increase of doxorubicin sensitivity by doxorubicin-loading into nanoparticles for hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo," *J. Hepatol.*, vol. 42, no. 5, pp. 736–743, May 2005.
- [65]Z. W. Huang, V. Laurent, G. Chetouani, J. Y. Ljubimova, E. Holler, T. Benvegnu, P. Loyer, and S. Cammas-Marion, "New functional degradable and bio-compatible nanoparticles based on poly(malic acid) derivatives for site-specific anti-cancer drug delivery," *Int. J. Pharm.*, vol. 423, no. 1, pp. 84–92, Feb. 2012.
- [66] J. Y. Ljubimova, M. Fujita, N. M. Khazenzon, B.-S. Lee, S. Wachsmann-Hogiu, D. L. Farkas, K. L. Black, and E. Holler, "Nanoconjugate based on polymalic acid for tumor targeting," *Chem. Biol. Interact.*, vol. 171, no. 2, pp. 195–203, Jan. 2008.
- [67] E. Fernandes, J. A. Ferreira, P. Andreia, L. Luís, S. Barroso, B. Sarmento, and L. L. Santos, "New trends in guided nanotherapies for digestive cancers: A systematic review," J. Controlled Release, vol. 209, pp. 288–307, Jul. 2015.
- [68] Y.-J. Li, M. Dong, F.-M. Kong, and J.-P. Zhou, "Folate-decorated anticancer drug and magnetic nanoparticles encapsulated polymeric carrier for liver cancer therapeutics," *Int. J. Pharm.*, vol. 489, no. 1–2, pp. 83–90, Jul. 2015.
- [69] O. Mezghrani, Y. Tang, X. Ke, Y. Chen, D. Hu, J. Tu, L. Zhao, and N. Bourkaib, "Hepatocellular carcinoma dually-targeted nanoparticles for reduction triggered intracellular delivery of doxorubicin," *Int. J. Pharm.*, vol. 478, no. 2, pp. 553–568, Jan. 2015.
- [70] Y.-Z. Du, L.-L. Cai, P. Liu, J. You, H. Yuan, and F.-Q. Hu, "Tumor cells-specific targeting delivery achieved by A54 peptide functionalized polymeric micelles," *Biomaterials*, vol. 33, no. 34, pp. 8858–8867, Dec. 2012.
- [71] W. Arap, R. Pasqualini, and E. Ruoslahti, "Cancer Treatment by Targeted Drug Delivery to Tumor Vasculature in a Mouse Model," *Science*, vol. 279, no. 5349, pp. 377–380, Jan. 1998.
- [72] E. Ruoslahti, "The RGD story: a personal account," *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.*, vol. 22, no. 6, pp. 459–465, Nov. 2003.
- [73] C. Zhan, B. Gu, C. Xie, J. Li, Y. Liu, and W. Lu, "Cyclic RGD conjugated poly(ethylene glycol)-copoly(lactic acid) micelle enhances paclitaxel anti-glioblastoma effect," J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc., vol. 143, no. 1, pp. 136–142, Apr. 2010.
- [74] B. Zhang, Y. Zhang, J. Wang, Y. Zhang, J. Chen, Y. Pan, L. Ren, Z. Hu, J. Zhao, M. Liao, and S. Wang, "Screening and identification of a targeting peptide to hepatocarcinoma from a phage display peptide library," *Mol. Med. Camb. Mass*, vol. 13, no. 5–6, pp. 246–254, Jun. 2007.
- [75] K. J. Longmuir, R. T. Robertson, S. M. Haynes, J. L. Baratta, and A. J. Waring, "Effective targeting of liposomes to liver and hepatocytes in vivo by incorporation of a Plasmodium amino acid sequence," *Pharm. Res.*, vol. 23, no. 4, pp. 759–769, Apr. 2006.
- [76] Y. L. Lee, B.-C. Ahn, Y. Lee, S.-W. Lee, J.-Y. Cho, and J. Lee, "Targeting of hepatocellular carcinoma with glypican-3-targeting peptide ligand," *J. Pept. Sci. Off. Publ. Eur. Pept. Soc.*, vol. 17, no. 11, pp. 763–769, Nov. 2011.

- [77] E. Jung, N. K. Lee, S.-K. Kang, S.-H. Choi, D. Kim, K. Park, K. Choi, Y.-J. Choi, and D. H. Jung, "Identification of tissue-specific targeting peptide," *J. Comput. Aided Mol. Des.*, vol. 26, no. 11, pp. 1267–1275, Nov. 2012.
- [78] J. A. Hoffman, E. Giraudo, M. Singh, L. Zhang, M. Inoue, K. Porkka, D. Hanahan, and E. Ruoslahti, "Progressive vascular changes in a transgenic mouse model of squamous cell carcinoma," *Cancer Cell*, vol. 4, no. 5, pp. 383–391, Nov. 2003.
- [79] A. Lo, C.-T. Lin, and H.-C. Wu, "Hepatocellular carcinoma cell-specific peptide ligand for targeted drug delivery," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 7, no. 3, pp. 579–589, Mar. 2008.
- [80] X. Liu, Y. Huang, M. Cheng, L. Pan, Y. Si, G. Li, Y. Niu, L. Zhao, J. Zhao, X. Li, Y. Chen, and W. Yang, "Screening and rational design of hepatitis C virus entry inhibitory peptides derived from GB virus A NS5A," J. Virol., vol. 87, no. 3, pp. 1649–1657, Feb. 2013.
- [81] Y. Zhang, J. Chen, Y. Zhang, Z. Hu, D. Hu, Y. Pan, S. Ou, G. Liu, X. Yin, J. Zhao, L. Ren, and J. Wang, "Panning and identification of a colon tumor binding peptide from a phage display peptide library," J. Biomol. Screen., vol. 12, no. 3, pp. 429–435, Apr. 2007.
- [82] P. Loyer, W. Bedhouche, Z. W. Huang, and S. Cammas-Marion, "Degradable and biocompatible nanoparticles decorated with cyclic RGD peptide for efficient drug delivery to hepatoma cells in vitro," Int. J. Pharm., vol. 454, no. 2, pp. 727–737, Oct. 2013.
- [83] P. Gripon, S. Rumin, S. Urban, J. Le Seyec, D. Glaise, I. Cannie, C. Guyomard, J. Lucas, C. Trepo, and C. Guguen-Guillouzo, "Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, no. 24, pp. 15655–15660, Nov. 2002.
- [84] T. Gicquel, S. Robert, P. Loyer, T. Victoni, A. Bodin, C. Ribault, F. Gleonnec, I. Couillin, E. Boichot, and V. Lagente, "IL-1β production is dependent on the activation of purinergic receptors and NLRP3 pathway in human macrophages," *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 29, no. 10, pp. 4162–4173, Oct. 2015.
- [85]O. Thioune, H. Fessi, J. P. Devissaguet, and F. Puisieux, "Preparation of pseudolatex by nanoprecipitation: Influence of the solvent nature on intrinsic viscosity and interaction constant," *Int. J. Pharm.*, vol. 146, no. 2, pp. 233–238, Jan. 1997.
- [86] G. Barouti, K. Jarnouen, S. Cammas-Marion, P. Loyer, and S. M. Guillaume, "Polyhydroxyalkanoate-based amphiphilic diblock copolymers as original biocompatible nanovectors," *Polym. Chem.*, vol. 6, no. 30, pp. 5414–5429, Jul. 2015.
- [87] L. Baron, A. Gombault, M. Fanny, B. Villeret, F. Savigny, N. Guillou, C. Panek, M. Le Bert, V. Lagente, F. Rassendren, N. Riteau, and I. Couillin, "The NLRP3 inflammasome is activated by nanoparticles through ATP, ADP and adenosine," *Cell Death Dis.*, vol. 6, p. e1629, 2015.
- [88] O. Lunov, T. Syrovets, C. Loos, G. U. Nienhaus, V. Mailänder, K. Landfester, M. Rouis, and T. Simmet, "Amino-functionalized polystyrene nanoparticles activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages," ACS Nano, vol. 5, no. 12, pp. 9648–9657, Dec. 2011.
- [89] G. Sahay, D. Y. Alakhova, and A. V. Kabanov, "Endocytosis of nanomedicines," J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc., vol. 145, no. 3, pp. 182–195, Aug. 2010.
- [90] E. Vene, G. Barouti, K. Jarnouen, T. Gicquel, C. Rauch, C. Ribault, G. M. Sophie, S. Cammas-Marion, and P. Loyer, "Opsonisation of nanoparticles prepared from poly(β-hydroxy butyrate)and poly(trimethylene carbonate)-b-poly(malic acid) amphiphilic diblock copolymers: Impact on the in vitro cell uptake by primary human macrophages and HepaRG hepatoma cells," Int. J. Pharm., Sep. 2016.
- [91] E. Vene, K. Jarnouen, Z. Wei Huang, B. Wahib, T. Montier, S. Cammas-Marion, and P. Loyer, "In vitro Toxicity Evaluation and in vivo Biodistribution of Polymeric Micelles Derived from Poly(ethylene glycol)-b-poly(benzyl malate) Copolyme," *Pharm. Nanotechnol.*, vol. 4, no. 1, pp. 24–37, Apr. 2016.

VENE Elise - Développement et évaluation de nanoparticules dérivées du poly(acide malique) ciblant les cellules hépatiques cancéreuse humaines

Thèse d'exercice - Diplôme d'Etudes Spécialisées : Pharmacie Hospitalière Pratique et Recherche - Université de Rennes 1 – 2016

Résumé :

Les nanotechnologies représentent aujourd'hui un domaine scientifique et technique en plein essor à l'interface entre chimie, physique et biologie. Leurs applications en médecine, et plus particulièrement l'utilisation des nanovecteurs permettant d'acheminer un principe actif de manière spécifique vers son site d'action, pourrait offrir de nouvelles opportunités dans le diagnostic et le traitement des cancers. Dans ce contexte, notre équipe développe une nouvelle famille de nanoparticules biodégradables et biocompatibles, formulées à partir du copolymère à blocs amphiphile biotine-poly(éthylène glycol)₆₆-*b*-poly(malate de benzyle)₇₃. En vue d'une application à la vectorisation de principes actifs destinés au traitement du carcinome hépatocellulaire, ces nanoparticules sont fonctionnalisées en surface par des peptides utilisés comme ligands de ciblage. L'objectif de ce travail a donc été d'évaluer l'influence d'une collection de 12 peptides hépatotropes, sélectionnés à partir de données bibliographiques, sur la captation cellulaire des nanoparticules dans des modèles de cellules hépatiques et non hépatiques. L'encapsulation d'un fluorophore dans les nanoparticules a permis leur détection par microscopie à fluorescence et cytométrie en flux et ainsi, d'évaluer leur captation par des cellules en culture. Les résultats des expériences ont permis de mettre en évidence cinq peptides particulièrement affins pour les cellules hépatiques cancéreuses.

Mots-clés : nanovecteurs - nanoparticules – poly(acide malique) – copolymère biodégradable – vectorisation – ciblage hépatique – peptide - carcinome hépatocellulaire - cellules HepaRG captation cellulaire

JURY : Président : Madame le Professeur Isabelle MOREL Assesseurs : Monsieur le Docteur Pascal LOYER, Directeur de thèse Monsieur le Professeur Fréderic LAGARCE Madame le Docteur Agnès KOLB-LURTON Monsieur le Docteur Vincent GICQUEL Monsieur le Docteur Thomas GICQUEL

Adresses de l'auteur : 3, rue Adolphe Touffait. 35000 RENNES