



# Cisplatine: une vieille molécule pour de nouveaux défis.: développement d'une prodrogue macromoléculaire multifonctionnelle applicable au traitement local du glioblastome

Hélène Lajous

## ► To cite this version:

Hélène Lajous. Cisplatine: une vieille molécule pour de nouveaux défis.: développement d'une prodrogue macromoléculaire multifonctionnelle applicable au traitement local du glioblastome. Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers; Université de Liège, 2018. Français. NNT: 2018ANGE0046 . tel-02178362

HAL Id: tel-02178362

<https://theses.hal.science/tel-02178362>

Submitted on 9 Jul 2019

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

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

# THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE D'ANGERS  
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605  
*Biologie Santé*

L'UNIVERSITE DE LIEGE

ECOLE DOCTORALE  
*Chimie moléculaire, supramoléculaire et fonctionnelle*

Spécialité : *Technologies biomédicales, Vectorisation, Nanomédecine, Thérapie cellulaire et génique, Médecine régénératrice et Biomatériaux*

Par

**Hélène LAJOUS**

## Cisplatine : une vieille molécule pour de nouveaux défis

Développement d'une prodrogue macromoléculaire multifonctionnelle applicable au traitement local du glioblastome

Thèse présentée et soutenue à Angers, le 22 mai 2018

Unités de recherche :

Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes Angers (CRCINA), INSERM U1232

Centre d'Etude et de Recherche sur les Macromolécules (CERM)

### Rapporteurs avant soutenance :

Pr. Karine ANDRIEUX  
Dr. Sandrine CAMMAS-MARION

Professeure, Université Paris Descartes  
Chargée de recherche, CNRS, HDR, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes

### Composition du Jury :

Pr. Christine JEROME  
Présidente

Professeure, Université de Liège

Pr. Karine ANDRIEUX  
Dr. Sandrine CAMMAS-MARION  
Dr. Elodie VAULEON  
Dr. Caroline ROBIC

Professeure, Université Paris Descartes  
Chargée de recherche, CNRS, HDR, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes  
MD, PhD, Centre Eugène Marquis, Service d'Oncologie Médicale, Université de Rennes  
PhD, Guerbet

Dr. Emmanuel GARCION  
Directeur de thèse

Directeur de recherche, INSERM, Université d'Angers

Dr. Philippe LECOMTE  
Co-directeur de thèse

Chercheur, FNRS, Université de Liège







*An Seppi*



*“One day, we imagine that cancer biology and treatment – at present, a patchwork quilt of cell biology, genetics, histopathology, biochemistry, immunology, and pharmacology – will become a science with a conceptual structure and logical coherence that rivals that of chemistry or physics.”*

Douglas Hanahan & Robert A. Weinberg, 2000.  
The hallmarks of cancer. Cell, 100, pp. 57-70.

*“Remember to look up at the stars and not down at your feet. Try to make sense of what you see and wonder about what makes the universe exist. Be curious. And however difficult life may seem, there is always something you can do and succeed at. It matters that you don't just give up.”*

Stephen Hawking



## Remerciements

Je souhaiterais tout d'abord remercier les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Je remercie le Pr. Karine Andrieux et le Dr. Sandrine Cammas-Marion d'accepter la lourde tâche de rapporteurs de ce travail de doctorat. Tout particulièrement, merci Sandrine pour ces échanges que nous avons eus à Bordeaux et par la suite, pour ce regain de motivation et de confiance que tu m'as donné. Je remercie le Pr. Christine Jérôme d'assurer la présidence de ce jury. Merci d'encourager les thèses en cotutelle à l'interface entre plusieurs domaines, et de m'avoir ainsi accueillie dans ton laboratoire dans le cadre du programme NanoFar. Merci d'être intervenue de sorte que je puisse soutenir ma thèse suivant les règles de l'université d'Angers. Merci pour ta gentillesse, ton enthousiasme constant, et cette grande humanité qui font de toi une personne appréciée de tous, en plus d'être admirée et respectée pour ton expertise scientifique. Je remercie le Dr Elodie Vauléon et le Dr Caroline Robic d'apporter leurs expertises transverses pour encore enrichir ce jury de thèse pluridisciplinaire.

Je tiens à remercier mes directeurs de thèse, le Dr Emmanuel Garcion et le Dr Philippe Lecomte. Merci Emmanuel, en tant que responsable de GLIAD, de m'avoir accueillie dans cette toute nouvelle équipe, sous l'égide de Marc Grégoire pour le CRCINA. Merci pour ton humanité, pour ton soutien et ta confiance là où d'autres se seraient contentés de dire que je n'avais pas le profil adapté, et pour ta gestion intransigeante et efficace des situations de crise. Merci Philippe de m'avoir accueillie au CERM alors que je ne connaissais rien à la chimie des polymères, et de m'avoir peu à peu initiée à la théorie et à la pratique de la polymérisation par ouverture de cycle. Je garde un excellent souvenir de vos cours de RMN qui m'ont passionnée et que j'espère reprendre lorsque j'en aurai davantage le temps.

Je remercie le jury rassemblé par l'école doctorale Biologie Santé d'avoir retenu mon dossier pour une présentation orale le 1<sup>er</sup> juillet 2014 visant à défendre mon projet, et estimé à l'issue de celle-ci que je méritais une allocation doctorale du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Finalement, je remercie la région Pays de la Loire d'avoir financé trois ans de ma thèse.

## Remerciements

---

Alors que l'aventure touche à sa fin, je souhaiterais adresser mes plus sincères remerciements à mes collègues, à mes amis, à ma famille. Il y a eu des moments de grande solitude durant ces trois ans et demi, mais jamais je n'aurais été capable de les traverser sans leur soutien, sans leur aide, sans ces échanges quotidiens qui ont enrichi mon monde.

Je remercie tout particulièrement le Dr Bénédicte Lelièvre pour son implication cruciale dans mon projet. Je m'excuse pour le nombre effarant de dosages, qui m'étaient néanmoins essentiels. A titre professionnel, je vous remercie pour ces échanges scientifiques si enrichissants, pour le regard clinique et l'ouverture que vous m'avez apportés, ainsi que pour m'avoir donné la possibilité de présenter mes travaux lors des journées de la SFERETE en décembre dernier. A titre plus personnel, je vous remercie pour votre bienveillance, votre gentillesse, votre compréhension, votre soutien, et en un mot votre grande humanité. Mon seul regret, outre de ne pas avoir pu travailler directement avec vous afin de mettre en place la méthode de spéciation des complexes du platine que nous avions évoquée, est de ne pas avoir réussi à partager avec vous ce café dont nous avons pourtant parlé à de nombreuses reprises ! J'espère que les semaines qui viennent me permettront de remédier à cela et de vous remercier pour tout ce que vous m'avez apporté.

Je remercie le Dr Raphaël Riva du CERM pour sa grande implication et sa participation active à mon projet de thèse, sa patience à expliquer et réexpliquer certains raisonnements théoriques, ainsi que pour ses conseils.

Avant de remercier mes chers collègues du CERM, de GLIAD et anciens collègues du MINT avec qui j'ai également beaucoup partagé, je souhaiterais remercier des personnels administratifs remarquables. Je pense tout particulièrement à Marion Toucheteau pour son investissement complet pour aider et faciliter les formalités administratives des doctorants NanoFar. Car même en étant de nationalité française, dans une université française, les procédures sont loin d'être simples. Merci infiniment pour votre gentillesse, votre écoute et votre efficacité sans faille. Je remercie Albertine Lucas, qui aura pris la relève pendant quelques mois. Je remercie Grégory Koné qui a aussi été d'une grande aide et d'une gentillesse à toute épreuve lors de ma candidature au concours de l'école doctorale. Il est des personnes comme lui qui ont le soleil dans la voix. Je tiens également à remercier tout particulièrement Catherine Lefèvre-Coissieu qui, bien que parfois irritée dans ses mails parce qu'encore une fois le doctorant n'est pas complètement dans les clous (je pense que

d'autres se reconnaîtront et souriront en lisant ces mots), s'est toujours révélée être d'une efficacité redoutable, qui n'a d'égale que sa gentillesse. A titre d'exemple marquant, j'ai été profondément touchée, suite aux attentats de Bruxelles, que vous ayez contacté chaque doctorant potentiellement en lien avec la Belgique pour vous assurer que nous étions sains et saufs. Je remercie Karine Couturier pour son aide dans les démarches préalables à la soutenance. Je tiens également à remercier Madame Ouréga Koffi, que je n'aurais probablement pas connue en d'autres circonstances, mais qui m'a offert la possibilité d'un logement substitutif durant les quatre mois de bataille avec les assurances suite à un dégât des eaux ayant ravagé mon appartement. En fin de thèse, c'était bien la dernière chose dont j'avais besoin, et son intervention m'a été d'un immense secours. Du côté de Liège, je remercie Madame Anne-Sophie Duwez d'avoir accepté ma demande de soutenance de thèse.

Cette thèse s'inscrit dans le cadre du programme Erasmus Mundus NanoFar pour les nanomédecines et les innovations pharmaceutiques initié par le Dr Frank Boury, que je remercie d'avoir autorisé la participation d'étudiants français. C'était une réelle chance de conférer une petite dimension internationale à mon projet, et cela m'a permis de rencontrer des personnes d'horizons très divers. J'en profite ici pour remercier mes collègues et amis NanoFar Reatul, Chiara, Howl, Elise, Vincent, Edward, Milad, Ana, et tous les autres. Je vous souhaite beaucoup de bonheur et de succès dans votre carrière à venir.

J'en arrive maintenant à mes très nombreux collègues. Une fois n'est pas coutume, commençons par la Belgique. Je ne peux m'empêcher ici de remercier une nouvelle fois Christine pour son accessibilité, sa gentillesse sans bornes et ses conseils scientifiques. Je remercie Christophe pour sa gentillesse et sa bonne humeur, et garderai en mémoire le souvenir d'une belle soirée d'été au bord de la piscine, agrémentée de bières locales, alors que je désespérais de mes polymérisations bien plus lentes que d'habitude. Je remercie Charlotte, ma petite sœur de cœur, pour nos échanges tellement riches, pour toutes ces fois où nous avons refait le monde, et notamment cette fois où nous avons dû mettre trois heures à remplir un container d'azote liquide... Je te remercie pour ton humanité, pour ta gentillesse infinie, pour ta sensibilité et ces expériences de vie partagées, pour cette oreille toujours attentive et à l'écoute, pour tes conseils de lecture et tes pensées positives. De façon plus scientifique et pragmatique, merci de m'avoir formée à la chimie des polymères, merci pour tes conseils, tes petits « trucs », ton intérêt permanent à comprendre mon projet, merci pour ton aide immense

## Remerciements

---

et pour tout ce que tu m'as appris. Grâce à toi, j'ai pris confiance en moi, petit-à-petit, j'ai gagné en autonomie, et j'ai appris à aimer la chimie ! J'aimerais remercier Bruno pour sa gentillesse et ses grommelleries mignonnes, pour nos concours à qui arrivera le premier avant 7 heures le matin, pour les sandwiches du jeudi midi, pour les jeux de cartes, et simplement pour sa profonde humanité. Un grand merci à Greg pour sa gentillesse et sa disponibilité, pour tout ce qu'il m'a appris, pour les multiples tubes à analyser en RMN du carbone et du fluor, pour ses astuces de MacGyver. Merci à Martine pour son aide, pour le souvenir d'échanges très humains, d'une belle soirée concert-souper avec Charlotte et d'un cours de yoga. Oufti, je ne t'oublie pas Jean-Michel, même si j'ai perdu de mes expressions belges difficilement assimilées ; merci pour ta gentillesse, pour les bons moments à jouer aux cartes et à en apprendre plus sur les coutumes et expressions locales. Merci à Valérie pour sa joie de vivre, son sourire constant, et pour ses coups de main. Enfin, j'aimerais adresser un immense merci aux autres doctorants que j'ai rencontrés en Belgique, qui sont devenus de vrais amis. Merci Mathilde pour ta bonne humeur constante, pour ta gentillesse, ainsi que pour tes bons petits plats ! Merci pour ton aide, tes conseils de rédaction et de paramétrage de ChemDraw, et ton soutien inaltérable durant ces derniers mois difficiles. S'il y a bien une raison pour laquelle je ne regretterai pas de m'être engagée dans cette thèse, c'est pour vous avoir rencontrés, toi et Tim (et j'espère bientôt votre petite Justine !), mais également Margot. Merci Margot pour tous nos échanges, pour nos balades, pour ta confiance de m'avoir choisie comme témoin. Merci pour ton soutien, ton écoute, ta disponibilité, tes conseils. Merci de m'avoir accueillie chez toi les trois semaines où je suis revenue à Liège synthétiser de nouveaux polymères. Je suis très heureuse de t'avoir rencontrée au cours de cette aventure, et j'espère que nous aurons de nombreuses occasions de nous revoir. Enfin, un grand merci aux autres girlzzz à l'international : Daniela, Rahmet, Zeynep, you are so kind and sweet girls, it was a huge pleasure to meet you and I hope we will keep in touch and meet again in the future. Une pensée pour Mirco aussi, pour Mohamed, Nagaraj, Satya, Stéphan, Jérémy, ... Pour Farid et Anthony. A Enza aussi, notamment pour cette dernière discussion que nous avons eue avant mon départ sur les accords tolèques. Sans quitter la Belgique mais en descendant de deux étages, je souhaiterais remercier Cédric pour m'avoir permis d'utiliser sa boîte à gants et pour sa gentillesse. A une centaine de kilomètres de là, à l'UCL, j'ai eu la chance de rencontrer Bernard Ucakar qui m'a montré quelques formulations et donner des conseils. Merci pour ta grande gentillesse et ton aide durant mes quelques passages à Bruxelles.

Pour faire la transition avec Angers, un merci tout particulier à Aurélien que j'ai connu à Liège et eu le plaisir de retrouver par la suite à Angers. C'a été un plaisir d'échanger avec toi sur tous les sujets possibles, dont quelques grandes conversations profondes. Merci pour les bons moments partagés, merci pour tout. Je tiens maintenant à remercier mes collègues de l'équipe GLIAD à Angers. Tout d'abord, un immense merci à Sylvie pour m'avoir formée à la biologie et par la suite pour avoir toujours gardé une oreille attentive, tant pour le travail que pour le reste. Merci pour tes conseils techniques et ton aide énorme durant ces longs mois. Merci pour ton attention de Maman lorsque j'étais malade, que j'ai eu mon accident de voiture. Rien qu'à voir ma tête, tu savais tout de suite quand ça n'allait pas, quand ce n'était pas le bon jour. J'espère retrouver une « Maman » du labo comme toi là où j'irai après... Natacha, Clément, finalement on aura passé quelques mois ensemble dans ce bureau, mais que dire... D'abord, merci à notre PCR préféré pour sa formation radioactivité qui ne me laisse finalement que peu de souvenirs théoriques, mais beaucoup d'anecdotes qui avec le temps auront été amplifiées et déformées au possible. Merci pour ton intérêt et ton investissement sur mon projet, pour nos échanges, pour tes idées, tes solutions, ton aide, pour ta gentillesse. Merci pour ces bons moments et pour les pauses thé. Natacha, merci d'avoir engagé cette manip *vivo* et de t'y être énormément impliquée. Merci pour ta gentillesse, ta franchise, ta façon d'être, nos bons moments de rigolades, et pour avoir également partagé des moments durs et des pleurs... Il m'est impossible de résumer tous ces mois en quelques mots. Je t'attends donc de pied ferme à ma soutenance pour qu'on en parle. Et je vous attends aussi dans nos montagnes pour un petit tour de moto ! A special thank to Shubaash for your kindness, your patience, your desire to help people, your precious advice, your friendship, and last but not least... your amazing and unforgettable butter chicken! Une pensée particulière pour Claire : nous avons commencé ensemble à Angers, formulé ensemble nos premières LNC, j'ai réalisé mon dernier dosage de protéines avec ton aide... Merci pour ta gentillesse et pour le reste... Merci aux autres personnes de l'équipe, Laurence pour ta gentillesse et tes conseils multiples, notamment en prévention, hygiène et sécurité, Anne pour vos conseils en biologie cellulaire, François pour ton œil toujours très critique, jusqu'au bout, sur mon projet... qui aurait valu beaucoup plus d'échanges et de discussions ! Je regrette que nous n'en ayons pas eu davantage l'occasion car je respecte tes idées et je pense que tu aurais pu apporter énormément à ce projet. Merci à Charlotte que j'ai eu le plaisir de connaître sur la fin, à mon co-bureau de quelques mois, Thomas, et à tous les autres doctorants. Merci aux secrétaires Céline, Laurence et Patricia.

## Remerciements

---

Un clin d'œil tout particulier à Mineke ; le monde est petit et c'est une coïncidence incroyable de s'être rencontrées à Angers. J'espère que nous nous reverrons à la montagne la prochaine fois !

Ayant commencé ma thèse dans une période de transition et de restructuration, je souhaiterais remercier certaines personnes du MINT qui m'ont énormément aidée, épaulée. Tout d'abord, un grand merci à Jérôme pour tes conseils en chimie, pour toutes les fois où nous avons refait le monde, en politique comme en recherche (un pléonasme ?). Elise, je te remercie pour tes explications de physique quantique et d'autres conversations scientifiques passionnantes. J'ai beaucoup d'admiration pour toi et ton engagement dans la recherche. Merci d'avoir pris le temps de discuter de mon projet, de m'avoir permis d'avoir accès au nanosight et surtout de m'avoir redonné confiance en moi et estime dans mon travail, simplement en me disant que c'était bien comme je procédais. Cela te semblera probablement mineur, mais c'était essentiel pour moi à un moment où, perdue dans les méandres de mon projet, dans un véritable labyrinthe, je ne rencontrais que des impasses. Je remercie Jean-Christophe de m'avoir formée au nanosight et d'avoir échangé avec moi sur quelques points très précis de physique. Merci à Nolwenn pour son dynamisme si motivant, son efficacité extrême, son implication professionnelle. Merci à Olivier pour la gestion du laboratoire cytostatique, à Laurent et Florence pour leurs conseils en IRM, à Edith pour la gestion administrative. Je remercie enfin tous les post-doc et doctorants qui ont permis de rendre les mois éprouvants d'avant la séparation un peu plus agréables à vivre et ainsi compensé le climat délétère régnant au laboratoire. Un grand merci à Alison avec qui j'ai eu le plaisir de partager le bureau et quelques soirées de manip très tardives. Merci à Juan d'avoir essayé de m'apprendre l'espagnol, et à Maria-Lina pour les rayons de soleil que tu as diffusés pendant les quelques mois que tu as passés à Angers et pour nos balades en bord de Maine. J'espère à bientôt en Argentine !

Je souhaiterais également remercier toutes les personnes qui ont participé à ce projet *via* les plateformes. Merci à Catherine et Jérôme de PACeM. J'ai beaucoup appris de toi, Catherine. Au-delà de la cytométrie de flux, je te remercie pour tes conseils de lecture, et plus largement d'avoir partagé avec moi ta philosophie de vie. Merci pour ces petits moments que nous avons gagnés sur le quotidien. Merci Jérôme pour ta patience et ton aide. Merci aux agents du SCIAM, auparavant Guillaume, et encore Romain et Florence. Merci Romain, outre pour ces heures à ne pas trop savoir quoi regarder au microscope, pour tes conseils musicaux et ta gentillesse. Merci à Benjamin Siegler du PIAM pour sa disponibilité et son aide à essayer d'interpréter des spectres RMN complexes. Merci à Pierre et Jérôme du SCAHU de s'assurer scrupuleusement du respect des pratiques éthiques en expérimentation animale. Merci enfin à Anthony Rousseau de l'Institut des Molécules et Matériaux du Mans pour ses images MET complémentaires.

Je souhaiterais vivement remercier Michel Terray, directeur marketing chez Malvern Instruments, de m'avoir apporté un éclairage nouveau sur les méthodes de DLS. Merci pour votre investissement, pour la formation particulière que vous m'avez proposée alors même que ma thèse se terminait. J'aurais gagné un temps précieux si je vous avais rencontré deux ans plus tôt...

J'ai également une pensée pour Abdessamad Kobi qui m'a entrouvert la porte du monde des plans d'expériences. Avec une quantité plus importante de polymères, j'aurais voulu mettre au point un vrai plan d'expériences rigoureux comme nous l'avions évoqué.

Je remercie Valérie Desquiret-Dumas pour sa disponibilité et sa patience à m'expliquer et à réaliser avec moi des enrichissements en mitochondries, ainsi que pour son dynamisme, son enthousiasme et sa gentillesse durant ces quelques heures de manip. Je remercie également Vincent Procaccio et Céline Bris pour l'étude préliminaire de génomique et les échanges très intéressants qui en ont découlé.

Un grand merci à Jean-Paul Issartel pour les données de transcriptomique qui ont encore de nombreux secrets à révéler ...

## Remerciements

---

Je souhaiterais remercier mes collègues du département Génie Biologique de l'IUT d'Angers. Je remercie tout particulièrement Christian Legros de m'avoir fait confiance et donné la possibilité d'assurer un contrat de moniteur à l'IUT durant deux années consécutives. Je remercie Arnaud Chevrollier pour la confiance qu'il m'a accordée en me laissant enseigner aux licences pro BAEMOVA et encadrer Lucille Esnault sur son projet tutoré – Lucille que je remercie d'ailleurs pour l'intérêt qu'elle aura porté à ce travail bibliographique. Alors que tu rigolais en disant que j'étais à l'avant-garde de la recherche et de la technologie en travaillant sur une molécule connue depuis le XIX<sup>ème</sup> siècle, tu m'as ouvert au monde des mitochondries, et j'ai découvert un univers insoupçonné ! Je remercie Emilie Roy-Vessières pour son aide, ses explications et son investissement dans les TP de comportement animal, Caroline Laillau pour son aide et son soutien logistique durant ces mêmes séances de TP, Mathilde Munier pour nos échanges durant les soutenances de projets tutorés et de stages, Emmanuel Guivarc'h pour le premier cours fantastique que tu nous as fait lors de la formation au monitorat, ainsi que mes étudiants de DUT et de Licence Pro.

Il me reste à remercier mes amis extérieurs à la thèse. Un très grand merci à ma petite Emilie, rencontrée au cours de la formation expérimentation animale à Nantes. Merci pour ta gentillesse, simplement d'être là. Le hasard (vraiment ?) a fait que nous nous sommes retrouvées dans le même train du retour pour Paris, non seulement dans la même voiture mais encore les deux places côté-à-côte. Cela ne pouvait qu'être un signe ! et le début d'une amitié sincère, pour longtemps. Une pensée toute particulière et un immense merci vont à Damien, pour ton soutien depuis de nombreuses années. Merci pour tes conseils à tous niveaux, bien que je mesure déjà ta déception d'apprendre que je n'aurais finalement pas rédigé ma thèse en LaTeX ! Même si tu me fais rire à te sentir responsable de la voie que j'ai choisie, rassure-toi : je m'y suis engagée de ma propre volonté, forte de tes conseils et de nombreux autres avis. Merci pour tes encouragements, d'avoir été là pour moi, d'avoir toujours cru en moi.

Je souhaite également remercier mes collègues de NeuroSpin que j'ai quittés après quelques mois seulement pour m'engager dans une autre voie : Vincent pour ton soutien à poursuivre en thèse alors même que tu risquais de perdre le financement sur lequel tu m'avais engagée pour dix-huit mois, Yann, Denis, David, Leila, ...

J'aimerais remercier mes mentors pour lesquels j'ai une pensée attendrie : Jocelyn Chanussot et Jérôme Mars. Sans vous, je ne serai probablement pas là où j'en suis aujourd'hui, et je vous en suis infiniment reconnaissante. Jocelyn, c'est une anecdote lors du premier cours que vous donnez qui m'a motivée à toujours plus me rapprocher de la médecine, *via* le traitement d'images, la passerelle vers le cursus d'ingénierie biomédicale, puis mes expériences en IRM, les associations de données en imagerie génétique, pour finalement en arriver aux nanomédecines en oncologie... tout en prônant une approche pluridisciplinaire et des échanges entre les différents acteurs pour une meilleure compréhension des besoins médicaux, des attentes des patients et de leur famille, des défis technologiques sous-jacents. Avec Jérôme, vous avez cru en moi lorsque je doutais, vous m'avez donné ma chance alors que mes études ne me plaisaient pas et que je me perdais en chemin. Vous m'avez soutenue dans mon choix d'interrompre mes études pendant un an, parce qu'il y avait un projet derrière, que je souhaitais cela constructif, et vous m'y avez aidée. Je vous remercie d'avoir été là et de m'avoir accompagnée pendant plusieurs années. Je remercie également Franz Bruckert de m'avoir admise dans sa filière d'ingénierie biomédicale, pour ses nombreux conseils et son gigantesque réseau. Je remercie Madame Vabre pour sa gentillesse et pour m'avoir permis de réaliser un stage de découverte dans son laboratoire, et ainsi alimenté mon envie de travailler à l'interface avec le médical. J'aimerais également remercier Didier pour son soutien, ses conseils et les réflexions partagées sur la recherche, bien qu'un peu amères... Enfin, j'aimerais remercier Laurent, qui m'a soutenue durant des périodes difficiles et qui, je pense, a continué de croire en moi et d'être présent à distance alors que moi-même je n'y croyais plus.

Malgré les exigences énormes de la thèse, la vie ne s'arrête pas pour autant et bonheurs et malheurs alternent subtilement. J'ai une pensée sincère et émue pour les personnes qui se sont envolées ces dernières années. Sepp. Yvonne. Colette. La Dédée. Mamoum. Combien de fois il m'arrive encore de me dire que je vais t'appeler ce soir... Ces départs ont été accompagnés d'arrivées heureuses : Alexandre, Elie, Hugo, Justine, et bientôt un petit Damien Junior. J'ai tellement hâte de souhaiter la bienvenue de vive voix à ceux que je n'ai pas encore eu la joie de rencontrer ! Et la vie continue...

## Remerciements

---

Je remercie ma belle-famille pour son soutien durant ces années de travail intense, et d'absence... Merci Jeanne, Dominique. Mon projet a pris une autre dimension à l'été 2015... Merci les Choup's. Merci à « Mamie Myans » qui est si gentille avec moi, et m'a presque adoptée... J'espère ne plus être l'éternelle absente et pouvoir désormais aussi participer aux fêtes de famille, profiter des weekends, des anniversaires, de toutes ces petites occasions qui égayent le quotidien.

Ich bin oft im Gedanken bei Dir, lieber Onkel Otto, der wie ein Opa für mich ist... Es tut mir Leid, dass ich mich selten bei Dir melde. Du kannst aber sicher sein, dass ich Dir schreibe, sobald ich mit diesem Manuscript fertig bin! Ich danke meiner ganzen Familie für ihre Unterstützung. Herzlichen Dank!

Je remercie sincèrement et affectueusement Marion et Tarek pour leur soutien et les moments de bonheur partagés ensemble. Ces années à distance ont été très difficiles pour moi et j'espère trouver un équilibre plus stable désormais. Marion, merci pour ton soutien, ta disponibilité, tes conseils dès que j'ai besoin, et ce depuis toujours. Merci d'être là, simplement. Tu comptes tellement pour moi... Je remercie mes deux trésors, Ibtissem et Alexandre, mes rayons de soleil qui, par un sourire, un éclat de rire, un mot, une grimace, une petite phrase toute spontanée et naturelle et adorable, m'ont redonné du courage et de la motivation pour continuer à avancer sur ce chemin difficile que j'ai choisi. Comme l'a dit Ibtissem : « Quand Tata Hélène sera au chômage, elle viendra à la maison et on ira voir Guignol ensemble ! ». Vivement de vous retrouver...

Papa et Maman, je vous remercie tendrement et sincèrement pour tout ce que vous avez fait pour moi. Merci pour votre soutien indéfectible durant tout mon parcours. Merci de m'avoir toujours fait confiance, toujours accompagnée, même sur les routes qui n'étaient ni les plus sûres ni les plus simples. Merci d'avoir accepté mes virages, mes demi-tours. Maman, merci de m'avoir appelée si souvent, particulièrement ces derniers mois alors que tu savais que c'était si compliqué. Merci de m'avoir écoutée, d'avoir pris sur toi pour entendre des choses que j'aurais pu t'épargner, d'avoir été là, présente, et toujours attentive et de bon conseil. Merci de me rappeler que chaque jour est un cadeau... Papa, merci pour ton soutien total. Combien de fois me suis-je rappelée la petite phrase en apparence anodine que tu me répétais pendant la prépa : « Ce n'est pas un sprint, c'est un marathon ». Je viens de courir le marathon le plus long de ma vie... Et c'est entièrement grâce à vous si je suis arrivée là où je suis aujourd'hui. Je ne sais pas comment je pourrais vous remercier un jour de tout ce que vous avez fait et enduré pour moi, pour m'épauler, pour m'aider. J'espère qu'au-delà d'être soulagés que ça se termine enfin, vous serez fiers de moi...

Enfin, à toi qui a élu domicile dans mon cœur, à toi qui donne un sens à ma vie et qui m'accompagne... Merci pour ton soutien, pour ton aide immense, pour tes conseils que je n'arrivais pas toujours à entendre, à comprendre, pour ta confiance, pour ta patience, pour ton écoute. Merci d'avoir tenu malgré cette distance nous séparant, malgré la difficulté des épreuves traversées ces dernières années. Merci de m'avoir encouragée et soutenue dans mes choix alors même que je doutais de moi. Merci pour nos aventures nature, nos escapades, tantôt en montagne tantôt en bord de Loire. Merci pour cet incroyable road-trip à travers l'Irlande dont mes collègues entendent encore parler. Merci pour ces passions que tu me partages et ces découvertes musicales qui ont égayé mon quotidien. Car une page est sur le point de se tourner, un nouveau chapitre va s'écrire, que je souhaite de tout cœur celui d'une vie heureuse, plus jamais à des centaines de kilomètres de distance. Merci d'avoir été là durant toutes ces années. Cette fin de thèse signifie beaucoup, car désormais nous serons deux au quotidien pour affronter les épreuves de la vie. Car comme le dit si bien Grand Corps Malade, bientôt je n'aurai plus peur du dimanche soir...



# ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné(e) Hélène LAJOUS  
déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une  
partie d'un document publiée sur toutes formes de support, y compris l'internet,  
constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.  
En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées  
pour écrire ce rapport ou mémoire.

signé par l'étudiant(e) le **22 / 03 / 2018**

A handwritten signature in blue ink that reads "Hélène Lajous". The signature is written diagonally from the bottom left towards the top right. It features a stylized 'H' and 'L' at the beginning, followed by 'élène' and 'lajous' in a cursive script.

**Cet engagement de non plagiat doit être signé et joint  
à tous les rapports, dossiers, mémoires.**

Présidence de l'université  
40 rue de rennes – BP 73532  
49035 Angers cedex  
Tél. 02 41 96 23 23 | Fax 02 41 96 23 00





## Table des Matières

<b>TABLE DES FIGURES</b>	<b>vii</b>
<b>TABLE DES TABLEAUX</b>	<b>xi</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b>	<b>xiii</b>
<b>CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GENERALE &amp; PRESENTATION DU PROJET</b>	<b>1</b>
INTRODUCTION GENERALE	3
PRESENTATION DU PROJET	18
<b>CHAPITRE 2 : ARTICLE DE REVUE “REVISING DNA TARGETING BY ADDUCT FORMATION FOR THE TREATMENT OF SOLID TUMORS: SPECIAL FOCUS ON CISPLATIN”</b>	<b>29</b>
ABSTRACT	33
STRATEGIC PATHS TOWARDS ANTICANCER THERAPY	34
1. RATIONALE AND CONVENTIONAL USE OF ALKYLATING AGENTS AND PLATINUM DERIVATIVES IN CLINICAL PRACTICE	37
1.1. Mechanism	39
1.2. Resistance	44
1.3. Radiosensitization	50
1.4. Polychemotherapy	54

## Table des Matières

---

<b>2. OPTIMIZATION OF THE USE OF ALKYLATING AGENTS AND PLATINUM DERIVATIVES</b>	<b>60</b>
2.1. Drug administration and dosage	61
2.2. Alternative and neglected targets	66
2.3. Innovative synergies	68
2.4. Development of smart nanocarriers	74
<b>CONCLUDING REMARKS</b>	<b>84</b>
 <b>CHAPITRE 3 : GENESE DU PROJET</b>	 <b>87</b>
<b>1. MATERIEL</b>	<b>94</b>
<b>2. TECHNIQUES DE CARACTERISATION</b>	<b>95</b>
<b>3. SYNTHÈSE, FONCTIONNALISATION ET CARACTERISATION DES COPOLYMERES</b>	<b>100</b>
3.1. Synthèse d'un macroagent de contraste IRM	100
3.2. Synthèse d'un copolymère amphiphile fonctionnalisable en vue d'une réticulation sur le cisplatine	109
<b>4. FORMULATION ET CARACTERISATION DE NANOPARTICULES POLYMÈRE</b>	<b>119</b>
4.1. Formulation de nanoparticules DTPA( $\text{Gd}^{3+}$ )PEO- <i>b</i> -PCL dédiées à l'imagerie par résonance magnétique	120
4.2. Formulation de nanoparticules PEO- <i>b</i> -poly[(carbonate-CO <sub>2</sub> PhF <sub>5</sub> )-co-(ε-CL)] réticulées sur le cisplatine	132
4.3. Préparation de nanoparticules mixtes	135
<b>5. DISCUSSION</b>	<b>135</b>

<b>CHAPITRE 4 : ARTICLE SCIENTIFIQUE “HYBRID Gd<sup>3+</sup>/CISPLATIN CROSS-LINKED POLYMER NANOPARTICLES ENHANCE PLATINUM ACCUMULATION AND FORMATION OF DNA ADDUCTS IN GLIOBLASTOMA CELL LINES” PUBLIE DANS BIOMATERIALS SCIENCE</b>	
<b>LAJOUS ET AL., BIOMATER. SCI., 2018, 6, 2386</b>	<b>143</b>
ABSTRACT	148
GRAPHICAL ABSTRACT	149
INTRODUCTION	150
EXPERIMENTAL SECTION	152
1. Materials	152
2. Characterization	154
3. Polymer synthesis and functionalization	157
4. Formulation of multifunctional cisplatin cross-linked polymeric nanoparticles	160
5. <i>In vitro</i> drug release	161
6. Cell culture	161
7. Biocompatibility assay	162
8. Cell viability assay	162
9. Intracellular platinum accumulation	163
10. Binding of platinum to DNA	163
11. <i>In vivo</i> MRI monitoring of the infusion of Gd-DTPA nanoparticles within the brain after convection-enhanced delivery	164
12. Statistical analysis	165

## Table des Matières

---

<b>RESULTS AND DISCUSSION</b>	<b>166</b>
1. Polymer synthesis and functionalization	166
2. Formulation and characterization of multifunctional cisplatin cross-linked polymeric nanoparticles	174
3. <i>In vitro</i> drug release from the nanoparticles	184
4. Copolymer biocompatibility	186
5. Time course of platinum accumulation in glioblastoma cells and subsequent formation of DNA adducts	187
<b>CONCLUSION</b>	<b>196</b>
 <b>CHAPITRE 5 : L'EXPLORATION DE CIBLES ALTERNATIVES MARGINALISEES DU CISPLATINE EST-ELLE EN MESURE D'APPORTER UN BENEFICE THERAPEUTIQUE SIGNIFICATIF</b>	<b>201</b>
 <b>CHAPITRE 6 : CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES</b>	<b>215</b>
 <b>ANNEXE 1 : PROTOCOLE D'ENRICHISSEMENT EN MITOCHONDRIES PAR CENTRIFUGATION DIFFERENTIELLE</b>	<b>227</b>
 <b>ANNEXE 2 : PROTOCOLE DE DOSAGE DE PROTEINES PAR LA METHODE BCA</b>	<b>229</b>
 <b>ANNEXE 3 : PROTOCOLE D'ISOLEMENT DE MITOCHONDRIES, MACS MITOCHONDRIA ISOLATION KIT, HUMAN (MILTENYI BIOTEC)</b>	<b>231</b>
 <b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>233</b>
 <b>CURRICULUM VITAE</b>	<b>261</b>



## Table des Matières

---

## Table des Figures

### Chapitre 1 :

Figure 1.1 : Acquisitions IRM dans un cas de suspicion de glioblastome ( <i>Source : Imaging Consult</i> )	6
Figure 1.2 : Activation du temozolomide à pH physiologique et action cytotoxique à l'ADN	8
Figure 1.3 : Courbes de Kaplan-Meier de la probabilité de survie globale en fonction du traitement ( <i>D'après : Stupp et al. 2005</i> )	9
Figure 1.4 : Le système nerveux central est isolé et protégé des toxines de la circulation générale par trois barrières physiologiques naturelles	12
Figure 1.5 : Coupe transversale d'un capillaire à proximité du système nerveux central mettant en évidence la structure de la barrière hématoencéphalique	14
Figure 1.6 : Indication du Gliadel® dans le traitement du glioblastome	16

### Chapitre 2 :

Figure 2.1 : Various mechanisms of action of antineoplastic drugs on DNA:	
(A) Intercalation of doxorubicin between strands of DNA double helix	41
(B) Methylation of DNA by temozolomide	42
(C) Cross-linking of DNA induced by complexation with cisplatin	42
Figure 2.2: FDA-approved platinum derivatives for cancer treatment	44
Figure 2.3: Main mechanisms of cell resistance to alkylating agents and platinum derivatives	45
Figure 2.4: Advantages of nanovectorization of alkylating agents or platinum derivatives over traditional regimens	75

### Chapitre 3 :

Figure 3.1 : Etapes de synthèse d'un macroagent de contraste IRM sur la base d'un copolymère biséquencé amphiphile $\alpha$ -acétal-PEO- <i>b</i> -PCL	92
Figure 3.2 : Synthèse et fonctionnalisation d'un copolymère PEO- <i>b</i> -poly[(carbonate-CO <sub>2</sub> PhF <sub>5</sub> )-co-(ε-CL)]	93
Figure 3.3 : Conception de nanoparticules hybrides à base de copolymères amphiphiles	94

## Table des Figures

---

Figure 3.4 : Spectre RMN $^1\text{H}$ dans le toluène deutéré de l' $\alpha$ -acétal-PEO-OH synthétisé (A) avant et (B) après addition d'isocyanate de trichloroacétyle à 250 MHz	104
Figure 3.5 : Spectre RMN $^1\text{H}$ du copolymère (A) $\alpha$ -acétal- $\text{PEO}_{116}$ - <i>b</i> - $\text{PCL}_{16}$ et (B) $\alpha$ -aldéhyde- $\text{PEO}_{116}$ - <i>b</i> - $\text{PCL}_{16}$ (TMS, 400 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	107
Figure 3.6 : Spectres RMN (A) $^1\text{H}$ et (B) $^{19}\text{F}$ du carbonate- $\text{CO}_2\text{PhF}_5$ (TMS, 400 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	111
Figure 3.7 : Spectre RMN $^1\text{H}$ des copolymères (A) $\text{PEO}_{120}$ - <i>b</i> -poly[(carbonate- $\text{CO}_2\text{PhF}_5$ ) <sub>5</sub> -co-( $\varepsilon$ -CL) <sub>6</sub> ] (TMS, 400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) (B) $\text{PEO}_{120}$ - <i>b</i> -poly[(carbonate-spacer-OH) <sub>5</sub> -co-( $\varepsilon$ -CL) <sub>6</sub> ] (TMS, 400 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ), (C) $\text{PEO}_{120}$ - <i>b</i> -poly[(carbonate-spacer-COOH) <sub>5</sub> -co-( $\varepsilon$ -CL) <sub>6</sub> ] (TMS, 400 MHz, DMF)	118
Figure 3.8 : Suivi de stabilité dans le temps des nanoparticules polymère	121
Figure 3.9 : Imagerie par MET de nanoparticules PEO- <i>b</i> -PCL : (A) blanches, et (B) décorées en leur surface de gadolinium après dilution au cinquantième	121
Figure 3.10 : Images d'un phantom constitué de nanoparticules de DTPA( $\text{Gd}^{3+}$ )PEO- <i>b</i> -PCL en solution à différentes concentrations dans le plasma obtenues par IRM à 7 T, 25 °C (A) Image pondérée $T_2$ ( $TE = 104$ ms) et (B) cartographie $T_2$ correspondante ; (C) image pondérée $T_1$ ( $TR = 3$ s) et (D) cartographie $T_1$ correspondante Les différents échantillons correspondent à des concentrations en gadolinium de : (1) 0,714 mM, (2) 0,476 mM, (3) 0,357 mM, (4) 0,286 mM, (5) 0,0714 mM, (6) 0 mM (plasma), (7) 0 mM (eau)	125
Figure 3.11 : Etude de relaxométrie des nanoparticules DTPA( $\text{Gd}^{3+}$ )PEO- <i>b</i> -PCL dans le plasma	125
Figure 3.12 : Images axiales pondérées $T_2$ du cerveau d'un rat 30 minutes après injection par CED de nanoparticules polymère décorées de Gd-DTPA	129
Figure 3.13 : Images coronales pondérées $T_1$ du cerveau d'un rat 30 minutes après injection par CED de nanoparticules polymère décorées de Gd-DTPA	130
Figure 3.14 : Cartographies $T_1$ de cerveaux de rats en axiale 30 minutes, 17 heures, 72 heures et 96 heures après injection de nanoparticules polymère décorées de Gd-DTPA	131
Figure 3.15 : Imagerie par MET de nanoparticules PEO- <i>b</i> -poly[(carbonate-spacer-COOH)-co-( $\varepsilon$ -CL)] réticulées sur le cisplatine	134
Figure 3.16 : Principe de l'analyse du suivi individuel de particules (NTA) (adapté de la documentation technique de Malvern)	140

Chapitre 4 :

Figure 4.1: Scheme of the synthesis process: (A) Successive ring-opening polymerization of carbonate-CO <sub>2</sub> PhF <sub>5</sub> and ε-CL from the terminal hydroxyl group of α-acetal-PEO-OH and further functionalization, (B) Anchorage of the NH <sub>2</sub> -Bn-DTPA(Gd <sup>3+</sup> ) complex on the α chain-end of the copolymer	167
Figure 4.2: SEC chromatograms of: (A) the synthesized α-acetal-PEO-OH and the triblock copolymer α-acetal-PEO- <i>b</i> -poly(carbonate-CO <sub>2</sub> PhF <sub>5</sub> )- <i>b</i> -PCL in THF, and (B) the functionalized triblock copolymer α-acetal-PEO- <i>b</i> -poly(carbonate-spacer-COOH)- <i>b</i> -PCL in DMF	169
Figure 4.3: <sup>1</sup> H NMR spectrum of α-acetal-PEO-OH in deuterated toluene at 250 MHz	169
Figure 4.4: <sup>1</sup> H NMR spectrum of α-acetal-PEO- <i>b</i> -poly(carbonate-CO <sub>2</sub> PhF <sub>5</sub> )- <i>b</i> -PCL (TMS, 400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	171
Figure 4.5: <sup>1</sup> H NMR spectrum of α-acetal-PEO- <i>b</i> -poly(carbonate-spacer-COOH)- <i>b</i> -PCL (TMS, 400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	174
Figure 4.6: Cisplatin activation by aquation within cells and resulting hydrated forms	175
Figure 4.7: Cross-linking of activated cisplatin with carboxylate functional groups of DTPA(Gd <sup>3+</sup> )-PEO- <i>b</i> -poly(carbonate-spacer-COO <sup>-</sup> )- <i>b</i> -PCL copolymer	176
Figure 4.8: TEM micrographs of (A) 4.12 ± 0.5 wt% and (B) 20.0 ± 2.5 wt% cisplatin-loaded cross-linked polymeric nanoparticles	180
Figure 4.9: T <sub>2</sub> -TurboRARE axial MRI sequence of serial transections of the brain in the antero-posterior axis showing: (A) the tumor of a control mouse 24 hours after injection of a 5% glucose solution, (B) and (C) the distribution of Gd-DTPA nanoparticles (1.97 μM) in the tumor and in the associated tumor margins respectively one hour and 24 hours following CED infusion, (D) an enlargement of the AP2 slice	183
Figure 4.10: Cumulative platinum released profiles from 8.66 ± 1.1 wt% cisplatin-loaded cross-linked nanoparticles according to the medium acidity	184
Figure 4.11 : Overall survival of glioblastoma cells after an 18 hour-exposure to different copolymer concentrations	187
Figure 4.12: Time course of: (A) intracellular platinum accumulation from free cisplatin and (B) subsequent formation of Pt-DNA adducts, (C) intracellular platinum accumulation from 8.51 ± 0.4 wt% cisplatin-loaded cross-linked polymeric nanoparticles and (D) subsequent formation of Pt-DNA adducts in human glioblastoma cell lines	191
Figure 4.13: Comparative time course of: (A) intracellular platinum accumulation, (B) subsequent formation of Pt-DNA adducts, and (C) relative intracellular platinum amount distributed to DNA in human glioblastoma cells depending on the drug form For purposes of clarity, and since inter-variability between both cell lines has already been discussed previously, statistically significant differences were only mentioned while comparing the impact of the form of the drug	193

Chapitre 5 :

Figure 5.1 : Viabilité (A) des cellules U-87MG et (B) des cellules U-251MG en fonction de la concentration en cisplatine et de son mode de vectorisation 204

Figure 5.2 : Cinétique (A) de l'accumulation intracellulaire de composés platinés, de la formation (B) d'adduits à l'ADN et (C) d'adduits à la mitochondrie après traitement des cellules U-87MG et U-251MG avec une solution clinique de cisplatine 208

Figure 5.3 : Comparaison, suivant le mode de vectorisation du cisplatine, et après 48 heures de traitement, (A) de l'accumulation intracellulaire de composés platinés, de la formation (B) d'adduits à l'ADN et (C) d'adduits à la mitochondrie 209

Figure 5.4 : Impact de la vectorisation du cisplatine sur sa distribution au sein de la cellule 210

## Table des Tableaux

### Chapitre 2 :

Table 2.1: FDA-approved alkylating agents and affiliated compounds for anticancer therapy	38
Table 2.2: FDA-approved anticancer drugs often combined with cisplatin in clinical practice and related indication	56
Table 2.3: Other chemotherapeutics commonly used with cisplatin and related indication	59

### Chapitre 3 :

Tableau 3.1 : Mesure de taille de nanoparticules polymère	121
Tableau 3.2 : Relaxivité longitudinale de quelques agents de contraste à base de gadolinium utilisés en routine clinique (Shen et al. 2015)	122
Tableau 3.3 : Comparatif entre relaxivités des nanoparticules de DTPA( $Gd^{3+}$ )PEO-b-PCL et relaxivités du chélate de gadolinium associé (Gd-DTPA) dans le plasma à 7 T, 25 °C	126
Tableau 3.4 : Temps de relaxation moyens mesurés sur une région d'intérêt de la zone d'infusion de l'agent de contraste comparativement à une zone contrôle délimitée en contralatérale	129

### Chapitre 4 :

Table 4.1: Features of $8.78 \pm 0.35$ wt% cisplatin-loaded cross-linked nanoparticles	177
Table 4.2: Stability of $9.90 \pm 1.6$ wt% cisplatin-loaded cross-linked nanoparticles over time	179
Table 4.3: Measurement of longitudinal and transversal relaxivities respectively of both the Gd-DTPA chelate and Gd-DTPA nanoparticles at 7 T, 25 °C, in water	181
Table 4.4: Modeling of the release profile of cisplatin from $8.66 \pm 1.1$ wt% cisplatin-loaded cross-linked nanoparticles according to the Ritger and Peppas' theory	186

## Table des Tableaux

---

## Liste des Abréviations

<i>ABC</i> :	transporteurs ABC <i>ATP-binding cassette transporters</i>
<i>ADN (DNA)</i> :	acide désoxyribonucléique <i>deoxyribonucleic acid</i>
<i>AIC</i> :	5-aminoimidazole-4-carboxamide <i>5-aminoimidazole-4-carboxamide</i>
<i>AMPK</i> :	protéine kinase activée par l'AMP <i>AMP-activated protein kinase</i>
<i>ARN (RNA)</i> :	acide ribonucléique <i>ribonucleic acid</i>
<i>ATCC</i> :	<i>American Type Culture Collection</i>
<i>ATP</i> :	adénosine triphosphate <i>adenosine triphosphate</i>
<i>ATP7A/B</i> :	transporteurs du cuivre <i>ATPase copper transporting α/β</i>
<i>ATRX</i> :	retard mental dont le syndrome comporte une α-thalassémie <i>α thalassemia/mental retardation syndrome X-linked</i>
<i>BCA</i> :	acide bicinchoninique <i>bicinchoninic acid assay</i>
<i>BCL-2</i> :	lymphome / leucémie à cellules B <i>B-cell leukemia/lymphoma 2</i>
<i>BCNU</i> :	1,3-bis(2-chloroéthyl)-1-nitrosourée, carmustine <i>carmustine, Gliadel®</i>
<i>BCR-ABL</i> :	gène de fusion BCR-ABL, gène de Philadelphie, chromosome Ph1 <i>breakpoint cluster region/Abelson</i>
<i>BEL7404</i> :	lignée humaine de cellules d'hépatocarcinome <i>human liver carcinoma cell line</i>
<i>BHE</i> :	barrière hémato-encéphalique <i>blood-brain barrier</i>
<i>BRCA1/2</i> :	gène 1/2 du cancer du sein <i>breast cancer 1/2</i>
<i>BSA</i> :	albumine de sérum bovin <i>bovine serum albumine</i>
<i>BSO</i> :	buthionine sulfoximine <i>buthionine sulfoximine</i>

CAC :	concentration d'agrégation critique <i>critical aggregation concentration</i>
CAKI-2 :	lignée humaine de cellules de carcinome rénal <i>human clear cell renal cell carcinoma line</i>
<i>CED</i> :	injection par infusion convective <i>convection-enhanced delivery</i>
$\epsilon$ -CL :	$\epsilon$ -caprolactone <i><math>\epsilon</math>-caprolactone</i>
<i>CMC</i> :	concentration micellaire critique <i>critical micellar concentration</i>
<i>CTR1</i> :	transporteur du cuivre 1 <i>copper transporter 1</i>
<i>D</i> :	dispersité <i>dispersity</i>
<i>cis</i> -DDP :	<i>cis</i> -diaminedichloroplatine(II) <i>cis-diamminedichloroplatinum(II)</i>
<i>DDS</i> :	système de libération de drogue <i>drug delivery system</i>
<i>DLC</i> :	charge en drogue <i>drug-loading content</i>
<i>DLS</i> :	diffusion dynamique de la lumière <i>dynamic light scattering</i>
<i>DMEM</i> :	milieu de culture DMEM <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
<i>DMEM/F-12</i> :	mélange 1:1 de DMEM et de Ham's F-12 <i>mix 1:1 of DMEM and Ham's F-12</i>
DMF :	<i>N,N</i> -diméthylformamide <i>N,N-dimethylformamide</i>
$\overline{DP}_n$ :	degré de polymérisation moyen en nombre <i>mean polymerization degree</i>
<i>DPD</i> :	dihydropyrimidine déshydrogénase <i>dihydropyrimidine dehydrogenase</i>
<i>DTPA</i> :	acide diéthylènetriamine pentaacétique <i>diethylenetriaminepentaacetic acid</i>
<i>EA</i> :	acide étacryniqve <i>ethacrylic acid</i>
EDX :	énergie dispersive de rayons X <i>energy dispersive X-ray spectroscopy</i>

---

<i>EGF:</i>	facteur de croissance épidermique <i>epidermal growth factor</i>
<i>EGFR:</i>	récepteur au facteur de croissance épidermique <i>epidermal growth factor receptor</i>
<i>EGFRvIII:</i>	variant III de l'EGFR <i>epidermal growth factor receptor variant III</i>
<i>EMA:</i>	Agence Européenne des Médicaments <i>European Medicines Agency</i>
<i>EMT:</i>	transition épithélio-mésenchymateuse <i>epithelial-mesenchymal transition</i>
<i>EPR:</i>	effet de perméabilité et de rétention accrue <i>enhanced permeability and retention</i>
<i>ERCC1:</i>	groupe 1 de complémentation croisée de la réparation par excision <i>excision repair cross-complementation group 1</i>
<i>ESI:</i>	électronébulisation <i>electrospray ionisation</i>
<i>ESMO:</i>	Société Européenne d'Oncologie Médicale <i>European Society for Medical Oncology</i>
<i>FCS:</i>	sérum de veau fœtal <i>fetal calf serum</i>
<i>FDA:</i>	Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux <i>Food and Drug Administration</i>
<i>FLAIR:</i>	séquence IRM d'inversion récupération avec suppression du signal de l'eau <i>FLuid Attenuated Inversion Recovery sequence</i>
<i>FOV:</i>	champ de vue <i>field of view</i>
<i>FT:</i>	transformée de Fourier <i>Fourier transform</i>
<i>5FU:</i>	5-fluorouracile <i>5-fluorouracil</i>
<i>FUS:</i>	ultrasons focalisés <i>focused ultrasound</i>
<i>GBM :</i>	glioblastome <i>glioblastoma</i>
<i>GLUT-1:</i>	transporteur du glucose 1 <i>glucose transporter 1</i>
<i>GSH:</i>	glutathion, forme réduite <i>glutathione, reduced state</i>

## Liste des Abréviations

---

<i>GST:</i>	glutathion S-transférase <i>glutathione S-transferase</i>
<i>GTP:</i>	guanosine triphosphate <i>guanosine triphosphate</i>
<i>dGTP:</i>	désoxyguanosine triphosphate <i>deoxyguanosine triphosphate</i>
<i>HCT116 :</i>	lignée humaine de cellules de carcinome colorectal <i>human colon cancer cell line</i>
<i>HER2:</i>	récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain <i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
<i>HLB:</i>	balance hydrophile-lipophile <i>hydrophilic-lipophilic balance</i>
<i>HSP:</i>	protéines de choc thermique <i>heat shock proteins</i>
<i>IC50:</i>	concentration inhibitrice 50 <i>50% growth inhibitory concentration</i>
<i>ICP-MS:</i>	spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif <i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i>
<i>IDH1/2:</i>	isocitrate déshydrogénase 1/2 <i>isocitrate dehydrogenase 1/2</i>
<i>IFRT:</i>	radiothérapie focalisée de la zone atteinte <i>involved-field radiation therapy</i>
<i>IL-13R:</i>	récepteur de l'interleukine 13 <i>interleukin-13 receptor</i>
<i>IM:</i>	intramusculaire <i>intramuscular</i>
<i>INCA :</i>	Institut National du Cancer (France) <i>French National Cancer Institute</i>
<i>INSERM :</i>	Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale <i>French national institute for health and medical research</i>
<i>IP:</i>	intrapéritonéale <i>intraperitoneal</i>
<i>IRM (MRI) :</i>	imagerie par résonance magnétique <i>magnetic resonance imaging</i>
<i>IRON:</i>	<i>Innovative Radiopharmaceuticals in Oncology and Neurology</i>
<i>IV:</i>	intraveineuse <i>intravenous</i>

---

<i>MALDI:</i>	spectrométrie de masse à source d'ionisation laser <i>matrix assisted laser desorption ionisation mass spectrometry</i>
<i>MALDI-TOF:</i>	MALDI couplée à un analyseur à temps de vol <i>matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry</i>
<i>MAP:</i>	protéine kinase activée par des agents mitogènes <i>mitogen-activated protein</i>
<i>MDM2:</i>	<i>mouse double minute 2</i>
<i>MDR:</i>	résistance multi-drogues <i>multidrug resistance</i>
<i>MET (TEM) :</i>	microscopie électronique en transmission <i>transmission electron microscopy</i>
<i>MGMT:</i>	6-O-méthylguanine-ADN méthyltransférase <i>6-O-methylguanine-DNA methyltransferase</i>
<i>miRNA:</i>	microARN <i>microRNA</i>
<i>MMR:</i>	réparation des mésappariements <i>mismatch repair</i>
$\bar{M}_n$ :	masse molaire moyenne en nombre <i>number average molar mass</i>
<i>bis-MPA :</i>	acide 2,2-bis(hydroxyméthyl)propionique <i>2,2-bis(hydroxymethyl)propionic acid</i>
<i>MPPs:</i>	peptides pénétrant dans les mitochondries <i>mitochondria-penetrating peptides</i>
<i>MRP1/2:</i>	protéine 1/2 associée à la résistance multi-drogues <i>multidrug resistance-associated protein 1/2</i>
<i>MS:</i>	spectrométrie de masse <i>mass spectrometry</i>
<i>MSME:</i>	séquence IRM multi-coupes multi-échos <i>Multi-Slice Multi-Echo sequence</i>
<i>MTD:</i>	dose maximale tolérée <i>maximum tolerated dose</i>
<i>MTIC :</i>	5-(3-méthyltriazène-1-yl)imidazole-4-carboxamide <i>5-(3-methyltriazen-1-yl)imidazole-4-carboxamide</i>
<i>mTOR:</i>	cible de la rapamycine chez les mammifères <i>mechanistic target of rapamycin</i>
<i>MTS:</i>	3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-tétrazolium <i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium</i>

## Liste des Abréviations

---

<i>MWCO:</i>	seuil de coupure <i>molecular weight cut-off</i>
NAA :	N-acétylaspartate <i>N-acetylaspartate</i>
<i>NCI:</i>	Institut National du Cancer (Etat-Unis) <i>National Cancer Institute (USA)</i>
<i>NER:</i>	réparation par excision de nucléotides <i>nucleotide excision repair</i>
<i>NK1R:</i>	récepteur de la neurokinine 1 <i>neurokinin-1 receptor</i>
<i>NTA:</i>	analyse du suivi individuel de particules <i>nanoparticle tracking analysis</i>
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé <i>World Health Organization</i>
PACeM :	Plateforme d'Analyses Cellulaires et Moléculaires
<i>PBS:</i>	tampon phosphate salin <i>phosphate buffered saline</i>
PC :	polycarbonate <i>polycarbonate</i>
PCL :	poly( $\epsilon$ -caprolactone) <i>poly(<math>\epsilon</math>-caprolactone)</i>
<i>PCR:</i>	réaction en chaîne par polymérase <i>polymerase chain reaction</i>
<i>PDGF-A:</i>	facteur de croissance dérivé des plaquettes $\alpha$ <i>platelet-derived growth factor A</i>
<i>PDGFR-A:</i>	récepteur au facteur de croissance dérivé des plaquettes $\alpha$ <i>platelet-derived growth factor receptor A</i>
<i>PEG:</i>	poly(éthylène glycol) <i>poly(ethylene glycol)</i>
<i>PEO:</i>	poly(oxyde d'éthylène) <i>poly(ethylene oxide)</i>
<i>bis-PFC :</i>	<i>bis</i> -(pentafluorophényl)carbonate <i>bis-(pentafluorophenyl)carbonate</i>
<i>PFS:</i>	survie sans progression <i>progression-free survival</i>
<i>PI3K:</i>	phosphoinositide 3-kinase <i>phosphoinositide 3-kinase</i>

---

<i>PKC:</i>	protéine kinase C <i>protein kinase C</i>
<i>PLA:</i>	poly(acide lactique) <i>poly(lactic acid)</i>
<i>PLGA:</i>	poly(acide lactique-co-glycolique) <i>poly(lactic-co-glycolic acid)</i>
<i>PRIMEX :</i>	Plateforme de Radiobiologie et d'Imageries Expérimentales
<i>PRISM :</i>	Plateforme de Recherche en Imagerie et Spectroscopie Multi-modales
<i>PSS:</i>	<i>Polymer Standards Service GmbH</i>
<i>Pt-DNA:</i>	adduits de platine à l'ADN <i>platinated DNA adducts</i>
<i>PTEN:</i>	phosphatase et homologue de la tensine <i>phosphatase and tensin homolog</i>
<i>qPCR:</i>	réaction en chaîne par polymérase quantitative <i>quantitative polymerase chain reaction</i>
$r_1$ :	relaxivité longitudinale <i>longitudinal relaxivity</i>
$R_1$ :	vitesse de relaxation longitudinale <i>longitudinal relaxivity rate</i>
$r_2$ :	relaxivité transversale <i>transverse relaxivity</i>
$R_2$ :	vitesse de relaxation transversale <i>transverse relaxivity rate</i>
<i>RARE:</i>	séquence IRM rapide pondérée T <sub>1</sub> <i>Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement sequence</i>
<i>RARE_vtr:</i>	séquence RARE à temps de répétition variable <i>RARE sequence with variable repetition time</i>
<i>RB :</i>	rétinoblastome <i>retinoblastoma</i>
<i>RMN (NMR) :</i>	résonance magnétique nucléaire <i>nuclear magnetic resonance</i>
<i>ROP:</i>	polymérisation par ouverture de cycle <i>ring-opening polymerization</i>
<i>ROS:</i>	espèces oxygénées réactives <i>reactive oxygen species</i>
<i>RSD:</i>	écart-type relatif <i>relative standard deviation</i>

## Liste des Abréviations

---

RT :	radiothérapie <i>radiotherapy, radiation therapy</i>
SCAHU :	Service Commun d'Animalerie Hospitalo-Universitaire
SCIAM :	Service Commun d'Imagerie et d'Analyses Microscopiques
SD:	écart-type <i>standard deviation</i>
SE:	erreur standard <i>standard error</i>
SEC:	chromatographie d'exclusion stérique <i>size-exclusion chromatography</i>
SFR :	Structure Fédérative de Recherche
siRNA:	petits ARN interférents <i>small interfering RNA</i>
SN :	substitution nucléophile <i>nucleophilic substitution</i>
SPIO:	oxydes de fer superparamagnétiques <i>superparamagnetic iron oxides</i>
T <sub>1</sub> :	temps de relaxation longitudinale <i>longitudinal relaxivity time</i>
T <sub>2</sub> :	temps de relaxation transversale <i>transverse relaxivity time</i>
TE :	temps d'écho <i>echo time</i>
TERT:	transcriptase inverse de la télomérase <i>telomerase reverse transcriptase</i>
THF :	tétrahydrofurane tetrahydrofuran
TKI:	inhibiteur de tyrosine kinase <i>tyrosine kinase inhibitor</i>
TLK286:	canfosfamide <i>canfosfamide</i>
TMZ :	témozolomide <i>temozolomide</i>
TR :	temps de répétition <i>repetition time</i>
TTField:	champ de traitement de la tumeur <i>tumor treating field</i>

<i>Turbo-RARE:</i>	séquence IRM rapide d'écho de spin <i>fast spin echo sequence</i>
<i>U-251MG :</i>	lignée humaine de cellules de glioblastome <i>human glioblastoma cell line</i>
<i>U-87MG :</i>	lignée humaine de cellules de glioblastome <i>human glioblastoma cell line</i>
<i>USPIO:</i>	nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques <i>ultrasmall superparamagnetic iron oxides</i>
<i>VEGF:</i>	facteur de croissance de l'endothélium vasculaire <i>vascular endothelial growth factor</i>
<i>VEGF-A:</i>	facteur de croissance de l'endothélium vasculaire α <i>vascular endothelial growth factor A</i>
<i>VEGFR:</i>	récepteur au facteur de croissance de l'endothélium vasculaire <i>vascular endothelial growth factor receptor</i>
<i>XPA/XPF:</i>	groupe de complémentation A/F du <i>xeroderma pigmentosum</i> <i>xeroderma pigmentosum complementation group A/group F</i>



---

Chapitre 1 :  
Introduction Générale  
& Présentation du Projet

---

## Introduction Générale & Présentation du Projet

---

## Introduction générale

Les tumeurs primitives du système nerveux central sont à l'origine de 7 % des décès par cancer avant 70 ans alors même qu'elles ne représentent que 2 % de l'ensemble des tumeurs primitives diagnostiquées chaque année dans le monde. Leur incidence est de 7 personnes sur 100.000 (Vigneswaran et al. 2015). Les gliomes, tumeurs primitives cérébrales les plus courantes, constituent un enjeu de santé publique majeur (Olar & Aldape 2012). Ils se développent à partir des cellules gliales (astrocytes, oligodendrocytes, épendymocytes et cellules microgliales) qui constituent à elles seules 90 % du cerveau. Avec à ce jour près de 83.400 articles sur PubMed dont plus de 3.500 publiés durant les neuf derniers mois, les gliomes relèvent d'un large champ d'investigations. Parmi ces recherches, plus d'une publication sur trois en moyenne s'intéresse plus particulièrement au glioblastome dont la prise en charge thérapeutique demeure un véritable défi. Classé astrocytome de grade IV par l'organisation mondiale de la santé (OMS), le glioblastome, représentant plus de la moitié des cas de gliome, constitue la tumeur primitive la plus fréquente et agressive du système nerveux central avec une incidence de 3,19 habitants sur 100.000 aux Etats-Unis et une survie à 5 ans inférieure à 5 % (Gallego 2015; Louis et al. 2016). Rare chez l'enfant, le glioblastome est diagnostiqué à un âge moyen de 55 ans dans le cas d'une tumeur primaire apparue *de novo* chez un patient sans antécédent, de 40 ans dans le cas de métastases issues d'un astrocytome diffus de bas grade ou d'un astrocytome anaplasique (Wilson et al. 2014; Tamimi & Juweid 2017). L'augmentation de l'incidence du glioblastome constatée au cours de ces trente dernières années s'explique par l'augmentation globale de l'espérance de vie et de l'âge moyen de la population, mais également par un diagnostic plus systématique et facile d'accès. Certains facteurs ont en outre été identifiés comme susceptibles d'augmenter le risque d'apparition du glioblastome : âge, sexe, origine ethnique, prédisposition génétique, certains polymorphismes génétiques et exposition antérieure à une radiothérapie du crâne (Baldi et al. 2010). A ce jour, 1.221 essais cliniques à travers le monde, dont 74 en France, visent à améliorer le pronostic du glioblastome. Les protocoles ainsi mis en place ont pour objectifs d'une part une meilleure compréhension des mécanismes biologiques sous-jacents au développement tumoral et la mise en évidence de biomarqueurs moléculaires, d'autre part l'évaluation de l'efficacité de nouvelles stratégies thérapeutiques telles que de nouvelles combinaisons de chimiothérapie et le recours à d'autres voies d'administration.

Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans les tumeurs du système nerveux central passe notamment par la mise en évidence de similarités ou de différences permettant respectivement de les regrouper ou de les distinguer par classe. La classification clinique proposée par l'OMS distingue ainsi les gliomes en fonction de leur morphologie, du type cellulaire dont ils sont principalement issus et de leur grade de malignité (score de I à IV) (Louis et al. 2016). Une classification propre aux glioblastomes a également été mise en place sur la base de la pathogenèse moléculaire de la tumeur : classique, pronurale, neurale et mésenchymale (Davis 2016). Une analyse plus fine des caractéristiques moléculaires propres aux tumeurs regroupées dans une même classe pourrait permettre d'identifier des stratégies thérapeutiques adaptées, ciblées, dans l'optique d'une médecine plus personnalisée. L'essor des plateformes de séquençage génomique, couplé aux avancées technologiques en analyse de données, a permis de mettre à jour la complexité du profil génétique des glioblastomes. Trois voies de signalisation cellulaire principales ont ainsi été identifiées comme activées dans cette pathologie : la voie du récepteur à la tyrosine kinase / Ras / phosphoinositide 3-kinase (PI3K) dans 88 % des cas, la voie p53 dans 87 % des cas, et la voie cycline / rétinoblastome (RB) dans 78 % des cas. La plupart des glioblastomes présentent des altérations de ces voies de signalisation qui se traduisent par une prolifération cellulaire accélérée et incontrôlée puis l'acquisition d'une immortalité par échappement aux points de contrôle au cours du cycle cellulaire. En parallèle, des altérations moléculaires sous-jacentes ont été mises en évidence : sur-expression du récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR) et du MDM2 (mouse double minute 2), délétion de p53, perte d'hétérozygotie du chromosome 10q, induisant une mutation de l'homologue du phosphate et de la tensine (PTEN) et mutation du promoteur TERT dans les glioblastomes primaires, surexpression du facteur de croissance dérivé des plaquettes alpha et de son récepteur (PDGF A / PDGFR A), rétinoblastome, perte d'hétérozygotie du chromosome 19q, mutations sur les isocitrates déshydrogénases 1 et 2 (IDH1, IDH2), sur p53 et ATRX dans les glioblastomes secondaires (Kohsaka & Tanaka 2013; Hanif et al. 2017). Une meilleure compréhension des voies de signalisation cellulaire impliquées dans l'initiation et le développement du glioblastome porte en son sein l'espoir de l'identification de cibles thérapeutiques spécifiques adaptées à la mise en place de thérapies moléculaires plus pertinentes. Il est néanmoins primordial de garder à l'esprit que la plupart des stratégies proposées à ce jour se concentrent essentiellement sur les cellules tumorales proliférantes, laissant en marge leurs homologues en dormance, et ce en dépit même de leur fort potentiel tumorigène.

Généralement situé à l'étage sus-tentoriel, un glioblastome est suspecté devant des signes neurologiques qui s'aggravent rapidement : on parle d'extension en « tache d'huile ». Les symptômes (hypertension intracrânienne, troubles du comportement ou de la motricité liés à l'effet de masse exercé par la tumeur, épilepsie) sont variés, non spécifiques et dépendent de la taille et de la localisation de la masse tumorale, ce qui rend le diagnostic délicat (Lemée 2015). L'imagerie par résonance magnétique (IRM) cérébrale constitue l'examen de référence pour confirmer la présence d'un foyer tumoral, le localiser précisément en regard des autres structures anatomiques, évaluer son étendue, diagnostiquer d'éventuelles complications et participer à la décision d'opérabilité. Le diagnostic différentiel permet en outre d'éliminer d'autres pathologies telles qu'un accident vasculaire cérébral ischémique, un abcès, un lymphome ou une lésion inflammatoire (Bracard et al. 2006). Le protocole d'imagerie appliqué en routine clinique consiste en l'enchaînement de séquences de pondérations différentes comme illustré par la Figure 1.1 : imagerie pondérée T<sub>2</sub> avec un recours aux séquences d'inversion-récupération de type FLAIR, acquisition en écho de spin T<sub>1</sub> avant et après injection de chélates de gadolinium, imagerie de perfusion cérébrale et de diffusion. Il peut également être complété par une analyse spectroscopique. Classiquement, un glioblastome apparaît comme une masse volumineuse de densité hétérogène, mal délimitée, en hyposignal sur une imagerie pondérée T<sub>1</sub> avant injection de chélates de gadolinium. Le rehaussement de contraste observé après injection de l'agent de contraste du fait de la rupture de la barrière hématoencéphalique et de la perméabilité capillaire permet d'apprécier comparativement l'étendue de la zone lésée. La séquence T<sub>2</sub> FLAIR met en évidence une prise de contraste périphérique et hétérogène caractéristique d'un œdème péri-lésionnel en forme d'anneau délimitant un centre nécrotique (Ducray & Guillevin 2007). Les avancées technologiques en imagerie multiparamétrique permettent d'aller plus loin et de préciser le diagnostic en étudiant notamment la vascularisation ; l'imagerie de perfusion rend ainsi possible la mise en évidence d'un profil de néoangiogenèse caractéristique de lésions malignes et clé dans le potentiel évolutif de la tumeur. L'imagerie de diffusion constitue un outil de diagnostic différentiel d'un éventuel accident vasculaire cérébral ou d'un abcès. Le recours à la spectroscopie traduit le métabolisme tumoral : une augmentation significative de la choline associée à un effondrement du N-acétylaspartate (NAA) par rapport au pic de créatinine (stable) pris comme référence met en effet en perspective une prolifération importante et une infiltration cellulaire au sein du parenchyme, argument en faveur d'un geste d'exérèse plus large (Ganslandt et al. 2005). L'apparition d'un doublet de lactates et d'un pic

de lipides, caractéristiques respectivement de l'augmentation du métabolisme anaérobie et d'une zone de nécrose, viennent compléter la signature spectroscopique d'un glioblastome (Grand et al. 2006).

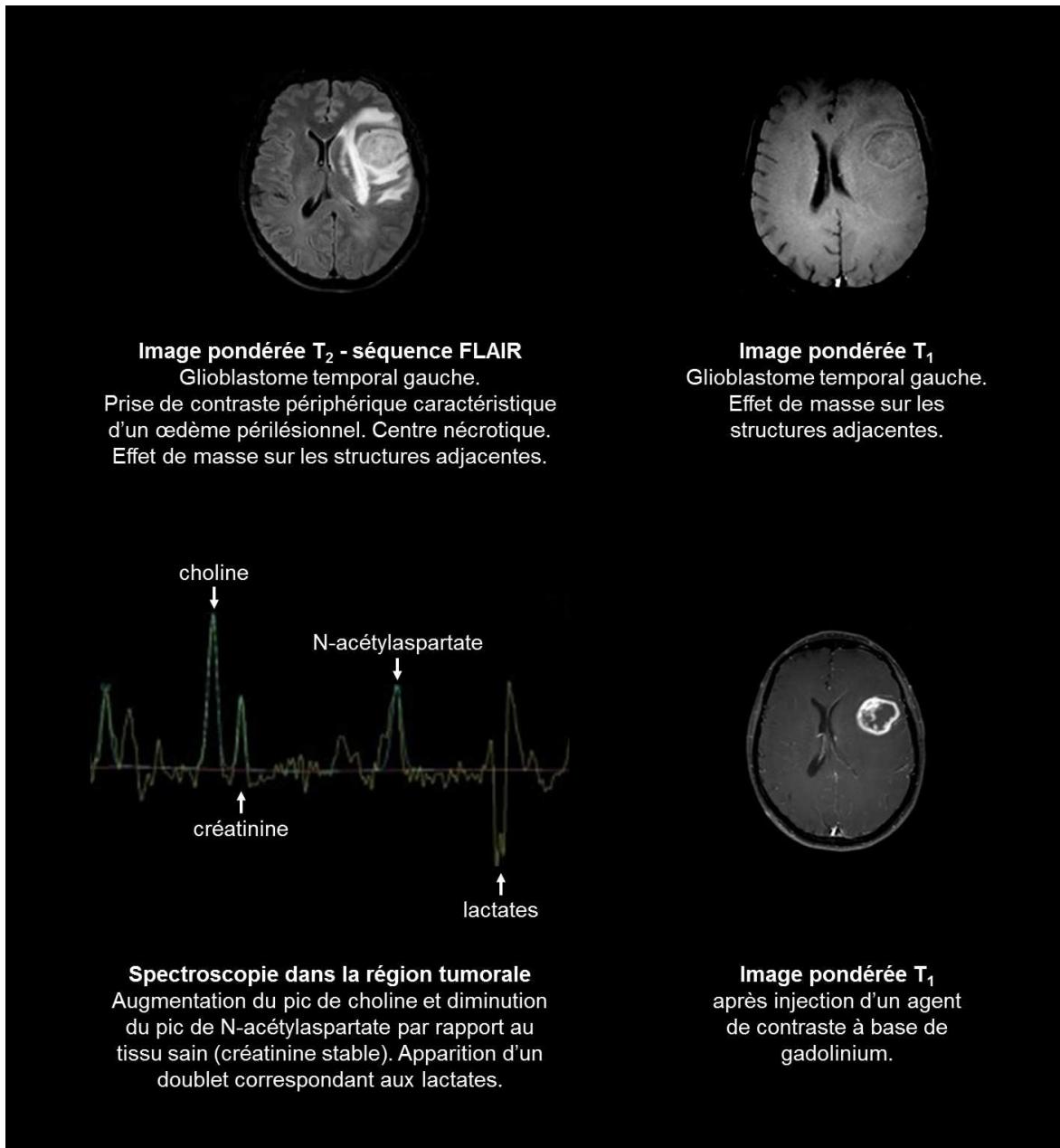


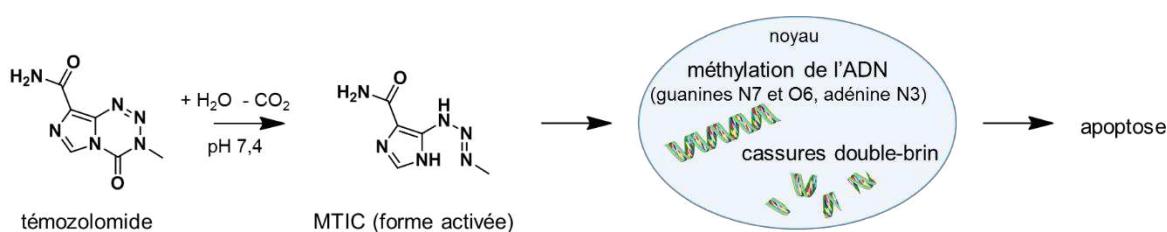
Figure 1.1 : Acquisitions IRM dans un cas de suspicion de glioblastome

(Source : Imaging Consult)

Toutefois, comme c'est le cas dans de nombreux types de cancer, l'examen anatomo-pathologique demeure nécessaire pour révéler la nature exacte de la tumeur, dont un ou plusieurs fragments sont prélevés par biopsie ou lors d'une exérèse chirurgicale de la masse tumorale, d'autant que la signature moléculaire est devenue un aspect clé fondamental dans la prise en charge thérapeutique ultérieure (Wilson et al. 2014). Le pronostic dépend de nombreux paramètres intrinsèques à la tumeur (type, grade, signature moléculaire) mais également à l'état de santé général du patient. L'absence de diagnostic précoce, la rapidité de progression de cette tumeur très infiltrante ainsi que la fréquence des récurrences localement, dans 80 % des cas et ce même après résection chirurgicale, dans les marges de la cavité d'exérèse, confèrent au glioblastome un caractère malin extrêmement agressif et un pronostic qui demeure très défavorable (Dresemann 2010; Dolecek et al. 2012; Fernandes et al. 2017).

Historiquement, le glioblastome était traité par résection de la masse tumorale suivie d'une radiothérapie externe cerveau entier. En effet, dès 1979, Michael D. Walker et ses collaborateurs ont montré que la dose d'irradiation appliquée aux gliomes malins est directement corrélée à la médiane de survie des patients, les cassures double brin générées à l'ADN entraînant l'entrée en apoptose des cellules tumorales (Walker et al. 1979). Malheureusement, dans le cas du glioblastome, le bénéfice de combiner chirurgie et radiothérapie est mineur, avec une médiane de survie dépassant à peine un an et des complications impactant de façon considérable la qualité de vie du patient (Wilson et al. 2014; Davis 2016). En 2005, un nouveau protocole de prise en charge du glioblastome a été défini suite aux résultats encourageants d'une étude clinique multicentrique de phase III portée notamment par le Professeur Roger Stupp du Centre Hospitalier Universitaire Vaudois. Devenu le traitement de référence pour les patients nouvellement atteints de glioblastome avant 70 ans, le « régime de Stupp » consiste en une exérèse chirurgicale la plus large possible de la masse tumorale, lorsque cela est sûr, suivie d'une chimiothérapie radiosensibilisante au témozolomide. Une première phase dite d'induction consiste en un fractionnement de la dose totale de 60 Gy en trente séances réparties sur six semaines, cinq jours par semaine, à raison de 2 Gy par séance focalisés sur la tumeur et ses marges (IFRT), associée à une prise quotidienne de témozolomide par voie orale (75 mg/m<sup>2</sup>/jour). Ce traitement est interrompu pendant quatre semaines, puis complété par une phase dite de consolidation qui consiste en six cycles de chimiothérapie de 28 jours, à raison de 150 à 200 mg/m<sup>2</sup>/jour les cinq premiers jours de chaque cycle (Stupp et al. 2005; Weller et al. 2014;

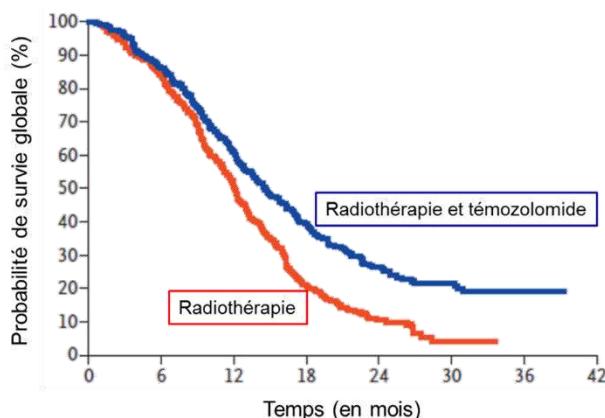
Davis 2016). A l'issue de ce traitement, 70 % des patients atteints de glioblastome sont victimes d'une récidive dans l'année suivant le diagnostic. Une reprise chirurgicale est proposée dans le cas où l'emplacement de la tumeur et son accessibilité le permettent. Des techniques d'irradiation très focalisées ou internes telles que la radiochirurgie par Gamma Knife et la curiethérapie, un re-challenge au témozolomide, le recours au bevacizumab ainsi qu'une mono- ou polychimiothérapie associant nitrosourées, carboplatine, étoposide ou irinotecan peuvent également être considérés (Weller et al. 2014; Davis 2016).



**Figure 1.2 :** Activation du témozolomide à pH physiologique et action cytotoxique à l'ADN

Le témozolomide, un dérivé triazènene, est une prodrogue de la famille des agents alkylants. Administré par voie orale, il est capable de franchir la barrière hématoencéphalique même intacte et présente un profil de toxicité modéré. A pH physiologique, il est spontanément converti en sa forme active, le MTIC [(methyl-triazène-1-yl)-imidazole-4-carboxamide], responsable de son activité cytotoxique par méthylation des bases puriques de l'ADN, préférentiellement les guanines N7 et O6 ainsi que l'adénine N3, entraînant des cassures double brin à l'ADN et finalement l'apoptose des cellules comme schématisé sur la Figure 1.2 (Roos et al. 2007; Zhang et al. 2012; Lombardi & Assem 2017). Bien que pièce maîtresse du traitement de référence pour les patients nouvellement diagnostiqués de glioblastome, le témozolomide voit son efficacité considérablement limitée par un polymorphisme génétique caractérisé par la non-méthylation du promoteur du gène de la 6-O-méthylguanine-ADN méthyltransférase (MGMT), une enzyme impliquée dans les processus de réparation de l'ADN et notamment dans la prise en charge des adduits méthylés communément induits par l'utilisation d'agents alkylants. A l'inverse, la méthylation du gène promoteur, courante chez les patients atteints de glioblastome, inhibe son expression et augmente par conséquent la sensibilité des cellules aux lésions causées par les agents

alkylants (Ostrom et al. 2013; Van Thuijl et al. 2015). En ce sens, la méthylation de la MGMT est de bon pronostic dans la prise en charge des patients atteints de glioblastome puisqu'elle potentialise l'efficacité du témozolomide, ce que démontre une augmentation de la médiane de survie des patients concernés par cette mutation à 21,7 mois (Hegi et al. 2005). Des études réalisées aux Etats-Unis où le témozolomide a été introduit dès 1999 ont confirmé une augmentation modérée mais significative de la survie des patients diagnostiqués atteints de glioblastome dans le courant des années 2000, tendance conforme à celle décrite à l'issue de l'essai clinique de phase III ayant consacré l'utilisation du témozolomide dans le protocole standard de Stupp (Darefsky et al. 2012; Koshy et al. 2012). Toutefois, malgré une augmentation représentée sur la Figure 1.3 de la médiane de survie des patients de 12,1 à 14,6 mois, du taux de survie à 2 ans de 10,9 % à 27,2 % et du taux de survie à 5 ans de 1,9 % à 9,8 %, le pronostic demeure sombre et cette thérapie n'est donc que palliative (Stupp et al. 2009; Darefsky et al. 2012; Koshy et al. 2012).



**Figure 1.3 :** Courbes de Kaplan-Meier de la probabilité de survie globale en fonction du traitement (D'après : Stupp et al. 2005)

Face à ce constat d'échec, des investigations sont menées dans différentes voies pour essayer de mettre au point des alternatives thérapeutiques. L'immunothérapie présente un large panel de possibilités : anticorps monoclonaux, vaccins, virus oncolytiques, agents immunomodulateurs pour une activation du système immunitaire contre la tumeur (Seystahl et al. 2016). Le glioblastome étant caractérisé par une vascularisation très importante, les stratégies anti-angiogéniques ont rapidement semblé prometteuses. Le bevacizumab est un

anticorps monoclonal humanisé recombinant dirigé contre le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF). En se liant au VEGF-A circulant, il empêche l'interaction de ce dernier avec son récepteur et inhibe ainsi le processus de néo-angiogenèse au sein de la tumeur. Le microenvironnement tumoral est par conséquent déstabilisé et la tumeur se rétracte (Carlsson et al. 2014). Approuvé par la FDA dans la prise en charge de glioblastomes récurrents, le bevacizumab utilisé en adjuvant du protocole standard de Stupp pour le traitement de glioblastomes nouvellement diagnostiqués a permis d'améliorer la survie sans progression de la maladie (PFS) (Fernandes et al. 2017). L'œdème cérébral vasogénique est souvent moins marqué chez les patients traités au bevacizumab et leur dépendance aux corticostéroïdes réduite, permettant une meilleure qualité de vie, malgré un risque de thrombose accru. Malheureusement, aucun bénéfice n'a été observé sur la survie globale, ce qui laisse à penser que le recours à cette molécule pourrait être intéressant à des stades précoce pour contenir la croissance tumorale. Toutefois, des modèles humains et murins ont également montré une amplification du caractère infiltrant des cellules, probablement due au maintien de la tumeur en conditions hypoxiques (Carlsson et al. 2014). Toujours dans l'idée de cibler l'EGFR, surexprimé dans la moitié des cas de glioblastome et responsable de la prolifération cellulaire, du caractère infiltrant, de l'angiogenèse et de la perte de la capacité d'apoptose des cellules tumorales, un vaccin spécifique contre son variant III (EGFRvIII) a été développé et évalué au cours d'essais cliniques chez des patients nouvellement diagnostiqués de GBM. Cette approche, qui concerne environ 30 % des patients surexprimant effectivement l'EGFRvIII, n'a montré aucun bénéfice en terme de survie (Davis 2016). Il est à noter que l'EGFRvIII entraîne une radiorésistance des cellules de glioblastome en amplifiant les mécanismes de réparation des cassures à l'ADN. En ce sens, des inhibiteurs de l'EGFRvIII rétabliraient une meilleure sensibilité aux irradiations, d'où l'intérêt d'investiguer dans cette direction (Carlsson et al. 2014). Dans le large champ offert par l'immunothérapie, certains groupes de recherche tentent d'éduquer le système immunitaire du patient à combattre lui-même sa pathologie. Le DCVax® développé par Northwest Biotherapeutics consiste en une plateforme technologique personnalisée ayant pour objectif de mobiliser les acteurs du système immunitaire du patient contre tous les biomarqueurs caractéristiques exprimés par ses propres cellules tumorales. Dans le cas du DCVax-L, des monocytes prélevés chez le patient sont mis en culture au laboratoire et différenciés en cellules dendritiques. Après maturation, ces cellules dendritiques sont activées et mises au contact du tissu tumoral issu de la biopsie afin de les formater à le détruire. Elles sont alors

isolées et administrées au patient sous la forme d'un vaccin personnalisé par injection intradermale dans le bras, à raison de trois injections séparées de deux semaines chacune. L'information qu'elles ont assimilée *in vitro* est alors transmise au système immunitaire en place qui s'attaque aux cellules tumorales en reconnaissant leurs biomarqueurs propres. Le DCVax-L est actuellement en essai clinique de phase III pour de nouveaux cas de glioblastome. Les essais cliniques de phase I et II antérieurs ont montré que l'espérance de vie médiane pour les patients traités au DCVax-L approchait les trois ans (Carlsson et al. 2014). De manière analogue, Agenus utilise des protéines de choc thermique (HSP) extraites du patient pour véhiculer des peptides issus de la biopsie. Les glycoprotéines 96 sont en effet impliquées dans le transport de protéines de l'intérieur de la cellule à sa surface en vue d'une reconnaissance par le système immunitaire, notamment dans le cas d'antigènes spécifiques aux cellules tumorales. Administré par voie intradermale, le Prophage G100 a pour but d'activer les lymphocytes T de façon à ce qu'ils éradiquent la tumeur. Combiné au traitement standard dans une étude clinique de phase II, ce vaccin personnalisé a permis de significativement augmenter la médiane de survie des patients à 23,3 mois (Carlsson et al. 2014). Après manipulation génétique, les virus oncolytiques sont capables de cibler des populations cellulaires spécifiques, notamment des tumeurs. Dans le cas d'un patient non immunisé contre le type de virus utilisé, celui-ci peut s'installer dans une cellule hôte *via* la reconnaissance de ses marqueurs de surface (ciblage des récepteurs EGFRvIII, PDGFR, IL-13R), s'y étendre et finalement la détruire. Une fois la population cellulaire contre laquelle il est dirigé éradiquée, le virus n'est pas capable de se répliquer et peut être éliminé par un traitement antiviral (Carlsson et al. 2014). Des inhibiteurs de petites molécules sont également étudiés en vue de sur- ou sous-exprimer des gènes impliqués dans les voies de signalisation cellulaires identifiées dans la pathogenèse du glioblastome, en inhibant ainsi le développement. A ce jour, la littérature sur ce domaine demeure peu fournie (Carlsson et al. 2014; Davis 2016).

Des limitations essentielles à toutes ces stratégies de chimiothérapie résultent notamment de l'importante hétérogénéité des cellules tumorales ainsi que de leur caractère infiltrant. La diffusion des agents anticancéreux au sein du système nerveux central est conditionnée par leur taille et leur lipophilie (Mrugala 2013). Des phénomènes de résistance innée ou acquise entrent également en jeu et constituent autant de problématiques à la mise en place d'un traitement efficace dans le temps (Kohsaka & Tanaka 2013). En outre, la

biodisponibilité du principe actif est considérablement limitée par l'existence de la barrière hématoencéphalique et l'efficacité des pompes d'efflux (Gallego 2015).

Comme l'illustre la Figure 1.4, le système nerveux central est en effet protégé du reste de l'organisme par trois barrières physiologiques qui lui assurent l'environnement strictement contrôlé nécessaire à son développement et à son fonctionnement. Les interfaces entre le système nerveux central et le sang sont de deux types : la barrière hématoencéphalique, localisée au niveau de l'épithélium des microvaisseaux cérébraux, et la barrière hémoméningée, localisée au niveau de l'épithélium des plexus choroïdes dans lesquels est sécrété le liquide céphalo-rachidien. Une troisième interface, qualifiée d'arachnoïde ou de barrière méningo-encéphalique, sépare le liquide céphalo-rachidien du système nerveux central. Elle se trouve au niveau de la membrane arachnoïde qui entoure complètement le système nerveux central, juste sous la *dura mater* (Strazielle & Ghersi-Egea 2013).

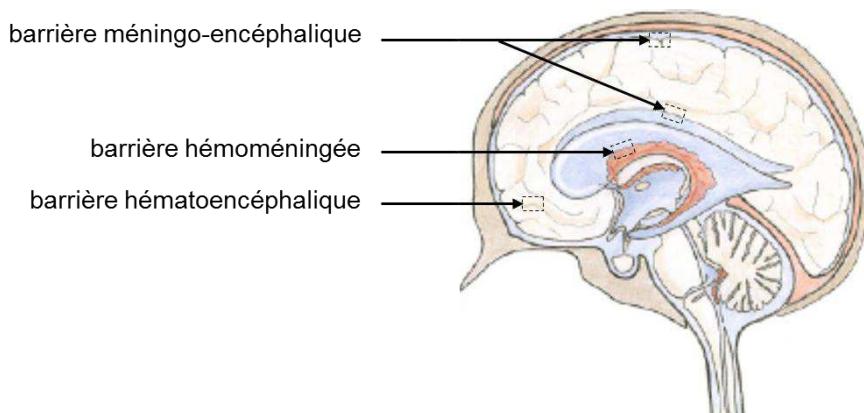


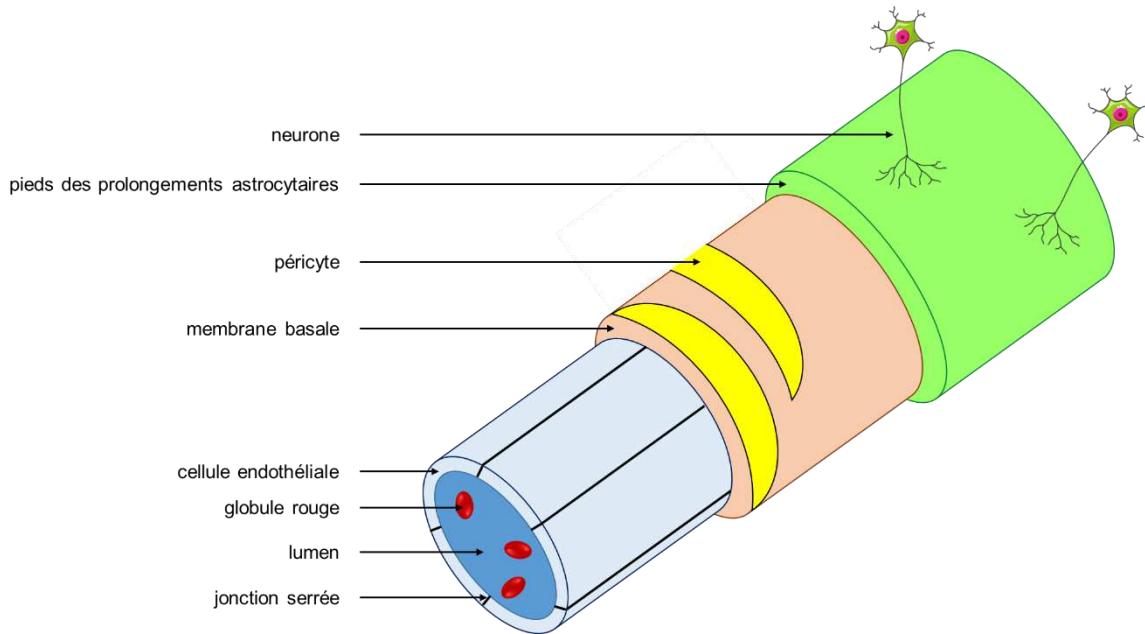
Figure 1.4 : Le système nerveux central est isolé et protégé des toxines de la circulation générale par trois barrières physiologiques naturelles

A l'interface entre le sang et le parenchyme cérébral, la barrière hémato-encéphalique (BHE) se caractérise par une faible perméabilité qui lui permet de contrôler les échanges entre ces deux entités et ainsi de protéger le système nerveux central des toxines véhiculées dans la circulation générale. L'existence d'une barrière physique isolant le système nerveux central des organes périphériques a été pressentie à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle par Paul Ehrlich après avoir observé que l'injection d'un colorant de type bleu trypan par voie intraveineuse menait à la coloration de tous les organes à l'exception du cerveau et de la moelle épinière.

Réciproquement, l'injection de bleu trypan dans le liquide céphalo-rachidien colorait exclusivement les cellules du cerveau. La barrière hématoencéphalique peut ainsi être assimilée à un bouclier qui protège le système nerveux central de toxines et des variations de concentrations chimiques dans la circulation générale. La BHE est composée de cellules endothéliales, d'une membrane basale continue, de péricytes et de pieds des prolongements astrocytaires comme schématisé sur la Figure 1.5. Les cellules endothéliales sont étroitement connectées les unes aux autres par des protéines de jonction, ce qui limite les échanges par voie paracellulaire entre la circulation générale et le système nerveux central. L'absence de fenestrations et le faible nombre de vésicules pinocytiques réduisent les possibilités de transport par transcytose (Garg et al. 2015). Les astrocytes sont nécessaires à l'intégrité de la BHE, les péricytes et la membrane basale lui confèrent une stabilité structurelle. La combinaison de ces différents types cellulaires constitutifs de la BHE diminue considérablement sa perméabilité face aux substances polaires hydrophiles de masse molaire supérieure à  $500 \text{ g.mol}^{-1}$ , et donc aux macromolécules développées à des fins de thérapie et de diagnostic (Fan & Yeh 2014). Les nutriments tels que le glucose et les acides aminés essentiels nécessaires au métabolisme énergétique du cerveau sont pris en charge par des systèmes de transport spécifiques (protéine de transport du glucose GLUT-1 et récepteurs L1 et y+). Des pompes d'efflux reconduisent l'excès d'acides aminés vers la circulation générale et des transporteurs d'ions assurent l'équilibre en concentration des ions sodium, potassium et chlore de part et d'autre de la BHE (Burgess et al. 2015). En régulant ainsi de façon dynamique l'environnement fermé dans lequel baigne le système nerveux central, la BHE assure l'homéostasie nécessaire à son intégrité et à son bon fonctionnement. En présence d'un glioblastome, la barrière hématoencéphalique est partiellement lésée. Toutefois, la perméabilité accrue qui en résulte localement est très hétérogène, n'assurant donc pas nécessairement l'accès des agents thérapeutiques au foyer tumoral si celui-ci se trouve dans une région où la vascularisation est normale et la BHE intacte (Nance et al. 2014).

L'utilisation de principes actifs hydrophiles ou de masses molaires trop élevées pour diffuser à travers la BHE après une administration systémique nécessite donc de recourir à des stratégies alternatives permettant de contourner ces barrières naturelles. L'administration locorégionale du principe actif directement dans le parenchyme cérébral par infusion convective (CED) s'est développée durant ces vingt dernières années. La CED de macromolécules dans le cerveau a été initialement proposée par Bobo et collaborateurs en

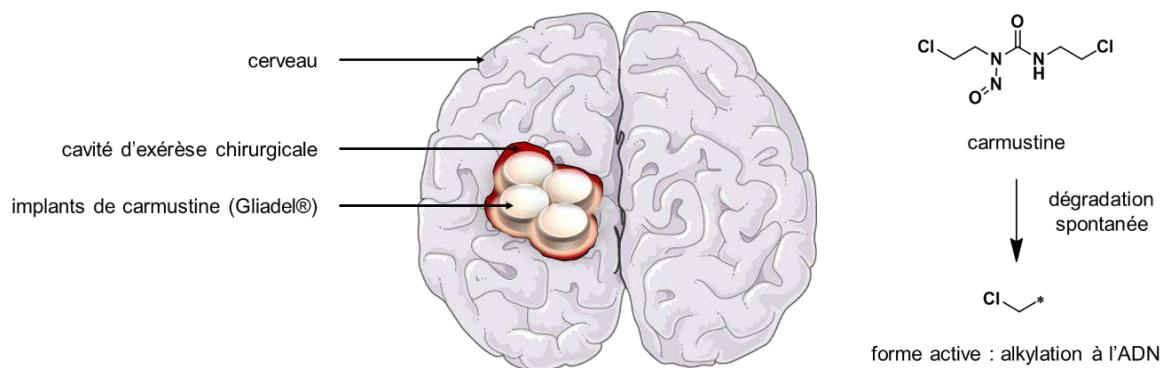
1994 (Bobo et al. 1994). Cette technique a pour but l'infusion continue d'un agent thérapeutique au sein du système nerveux central *via* un cathéter. L'injection est rendue possible par un gradient de pression positif assuré par une pompe. La CED permet ainsi de contourner la BHE et de cibler la région à traiter en infusant *in situ* des agents thérapeutiques de différentes masses molaires tout en limitant les effets secondaires associés à une injection systémique. En outre, l'utilisation d'un gradient de pression améliore considérablement la diffusion de l'agent en termes de volume et d'homogénéité de la distribution au sein du tissu comparativement à une injection classique (Zhou et al. 2012; Arshad et al. 2015; Vogelbaum & Aghi 2015). Malgré des résultats encourageants sur des modèles murins de gliome, les essais cliniques ayant recours à cette technique se sont jusqu'à présent soldés par des échecs (Zhang et al. 2016). En cause son caractère invasif avec le placement de cathéters directement dans le lit de résection à l'origine de complications chirurgicales (hémorragie, infection), voire de troubles neurologiques. Le risque d'échappement des agents infusés vers le liquide céphalo-rachidien limite en outre la concentration du principe actif au niveau de sa cible et peut s'avérer neurotoxique (Siegal 2013).



**Figure 1.5 :** Coupe transversale d'un capillaire à proximité du système nerveux central mettant en évidence la structure de la barrière hématoencéphalique

Couramment utilisée dans la prise en charge du glioblastome, la chirurgie peut donner lieu à l'implantation en fin d'opération d'implants de carmustine (Gliadel®) au sein même de la cavité d'exérèse (Wilson et al. 2014). Ce traitement d'appoint pour implantation intracrânienne est formé d'une matrice copolymère à base de polyanhydride biodégradable, le polifeprosan 20, permettant une libération contrôlée de la carmustine dont il est imprégné. De même que le témozolomide, la carmustine, ou bis-chloroéthylnitrosourée (BCNU), appartient à la classe des agents alkylants. Les implants, entre un et huit disques de 1,45 cm de diamètre, chacun imbibé de 7,7 mg de carmustine (3,85 %), sont disposés au creux de la cavité de résection de façon à la recouvrir intégralement, comme schématisé sur la Figure 1.6. Dans cet environnement aqueux, les liaisons anhydrides du copolymère sont hydrolysées, libérant ainsi la carmustine qui diffuse dans tout le tissu environnant. Cette prodrogue est alors dégradée pour former le métabolite actif nécessaire à l'alkylation de l'ADN, à la réticulation de l'ADN et de l'ARN ainsi qu'à la carbamylation des protéines, conduisant finalement à l'apoptose de la cellule (Lombardi & Assem 2017). Avec une durée de vie de plusieurs semaines, les implants de carmustine ont été approuvés en 2002 par la FDA comme traitement de première intention des patients diagnostiqués *de novo* de gliome malin aux Etats-Unis (Gallego 2015). Le recours au Gliadel® demeure néanmoins sujet à controverses puisque les effets secondaires (mauvaise cicatrisation, infection pouvant nécessiter une explantation) encourus par les patients sont lourds et le bénéfice de survie limité (Bregy et al. 2013; Fernandes et al. 2017; Hanif et al. 2017). Pourtant, des études précliniques amont ont montré un bénéfice considérable de l'utilisation de ces implants grâce à la libération locale de fortes concentrations de carmustine dans leur voisinage. La translation chez l'homme semble limitée de par le faible volume traité, la diffusion vers les marges étant réduite (Zhou et al. 2012). Dans ce contexte, il existe un besoin urgent de mettre en place des approches thérapeutiques alternatives pour une prise en charge efficace du glioblastome.

Le mode d'administration d'agents thérapeutiques au cerveau *via* la voie intranasale est également à l'étude. En effet, la vascularisation de la muqueuse nasale étant importante, le principe actif pourrait être absorbé rapidement et rejoindre le liquide céphalo-rachidien voisin de l'épithélium nasal pour être directement délivré au cerveau, augmentant ainsi localement la biodisponibilité de la drogue sans avoir à franchir la barrière hématoencéphalique (Burgess et al. 2015).



**Figure 1.6 :** Indication du Gliadel® dans le traitement du glioblastome

Alternativement, une méthode non invasive ayant recours aux ultrasons focalisés (FUS) sur une région précise du cerveau permet d'ouvrir transitoirement la barrière hématoencéphalique. Des études précliniques sur des modèles oncologiques, de Parkinson et d'Alzheimer ont démontré la faisabilité d'ainsi acheminer des agents thérapeutiques administrés par voie systémique directement dans le cerveau. Le recours à des agents de contraste sous forme de microbilles remplies de gaz permet de contrôler et cibler les régions cérébrales d'intérêt très précisément par IRM (Fan & Yeh 2014). Préalablement injectées par voie intraveineuse, ces microbilles sont suivies par IRM jusqu'à atteindre la région où l'on souhaite perméabiliser la BHE. A cet endroit, le faisceau d'ultrasons excite les microbilles qui concentrent l'énergie acoustique et se mettent à osciller à la fréquence de l'onde ultrasonore : on parle de cavitation stable. L'alternance entre contraction et expansion des microbilles sous les changements de pression de l'onde acoustique engendre alors une stimulation mécanique des vaisseaux ainsi que des effets chimiques et thermiques à l'origine d'une perméabilité localement accrue de la BHE : les étroites jonctions la constituant se desserrent pour laisser entrer les agents thérapeutiques au sein du système nerveux central. Ce phénomène transitoire se produit sur une fenêtre de quelques heures et est totalement réversible (Nance et al. 2014). La transposition de cette technique vers la clinique demeure pour l'heure limitée du fait de questions latentes concernant le risque d'ainsi exposer le système nerveux central à la circulation générale lors d'une ouverture même temporaire de la BHE et la possibilité de répéter des expositions aux ultrasons de façon sécurisée (Burgess et al. 2015; Davis 2016).

Des alternatives à un traitement médicamenteux conventionnel sont également à l'étude comme c'est le cas des champs de traitement de la tumeur (Tumor Treating Fields,

TTFields). Ces champs électriques alternatifs de faible intensité et de moyenne fréquence (100-300 kHz) sont responsables de l'interruption de la division des cellules tumorales suite à une perturbation du fuseau mitotique et de l'appareil contractile de la cellule à l'origine d'aberrations caryotypiques, puis de leur mort (Seystahl et al. 2016). Ils affectent principalement les cellules tumorales à fort potentiel prolifératif, épargnant ainsi les cellules saines quiescentes ou dont la multiplication est plus lente. Les risques de dommages collatéraux sont ainsi limités. Le dispositif portatif Optune® développé suivant ce principe par Novocure consiste en une grille de transducteurs non invasifs. Il a reçu l'approbation de la FDA aux Etats-Unis en octobre 2015 dans le cadre d'un traitement adjuvant au témozolomide pour les patients nouvellement diagnostiqués de GBM dans la région sus-tentorielle après exérèse chirurgicale et radiochimiothérapie au témozolomide suivant le régime de Stupp. Une analyse des données obtenues sur 315 patients randomisés a montré que l'utilisation d'Optune® en combinaison du témozolomide lors de la phase d'entretien du régime de Stupp augmentait la survie globale des patients à 20,5 mois (Davis 2016).

Malgré une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires soutenant la pathogenèse du glioblastome et le développement d'un véritable arsenal thérapeutique et technologique, la prise en charge de cette terrible pathologie n'a pas connu d'avancée majeure en routine clinique. Le traitement de référence demeure le protocole défini par Stupp en 2005, avec une médiane de survie de 14,6 mois après diagnostic d'un glioblastome primaire (Stupp et al. 2005). De multiples approches alternatives ont été envisagées, qu'elles soient ciblées, locales, médicamenteuses, ou qu'elles en réfèrent à l'utilisation de rayonnement ionisants ou acoustiques, mais la transposition à la clinique reste difficile. L'essor des nanotechnologies depuis la fin du XX<sup>ème</sup> siècle a également touché le domaine de la médecine et donné jour à la possibilité de vectoriser des principes actifs directement à leurs cibles, concentrant ainsi la dose efficace sur les cellules d'intérêt tout en épargnant les tissus sains environnants. La combinaison de ces systèmes de libération contrôlée de drogues à d'autres stratégies actuellement approuvées par les autorités sanitaires porte en son sein de nombreux espoirs dans la mise au point d'une issue thérapeutique efficace et favorable contre le glioblastome. La recherche internationale pluridisciplinaire et translationnelle est-elle sur la voie du paradigme de "magic bullet" invoqué il y a plus d'un siècle par Paul Ehrlich (Ehrlich 1906) ?

## Présentation du Projet

Malgré une intensification de la recherche ayant conduit à une meilleure compréhension des mécanismes de pathogenèse du glioblastome, son pronostic demeure singulièrement mauvais. Le bénéfice thérapeutique des agents antinéoplasiques classiques se perd dans la circulation générale, inondant les organes périphériques d'effets secondaires, ne diffusant généralement pas à travers la barrière hématoencéphalique jusqu'au système nerveux central, ne permettant par conséquent pas d'atteindre localement la concentration efficace suffisante à un effet thérapeutique. Le glioblastome demeurant exclusivement confiné au parenchyme cérébral, un contrôle local de la pathologie est essentiel dans sa prise en charge. Le développement de thérapies ciblées et confinées innovantes, associé à une administration par voie locorégionale telle qu'une infusion convective stéréotaxique, pourrait ainsi significativement améliorer l'issue. Dans ce contexte, les nanomédecines, structures de taille submicronique (inférieure à 100 nm dans au moins une dimension) développées pour des applications médicales, offrent des perspectives prometteuses. De par leur taille et leurs propriétés physicochimiques modulables, les nano-objets interagissent de façon unique avec les systèmes biologiques. Lorsqu'ils véhiculent un principe actif, le devenir de ce dernier ne dépend plus seulement de ses propriétés intrinsèques mais également de celles de son vecteur. Sa libération à proximité immédiate des cellules cibles confère à cette stratégie des avantages substantiels en termes de biodisponibilité, de pharmacocinétique, d'efficacité, de réduction des effets secondaires et par conséquent de réduction des doses (Peer et al. 2007). Depuis une vingtaine d'années, plusieurs groupes de recherches s'intéressent au développement de systèmes de libération de drogues : liposomes, nanoparticules, hydrogels, micelles conçues à partir de polymères biocompatibles et (bio)dégradables approuvés par les autorités sanitaires (Kataoka et al. 2012; Lehner et al. 2013; Nazir et al. 2014; Bregoli et al. 2016). Ces systèmes intelligents sont capables de combiner plusieurs modalités *via* leur fonctionnalisation à l'aide d'agents de contraste ou de ligands spécifiques au ciblage des cellules tumorales (Nishiyama & Kataoka 2006; Oerlemans et al. 2010; Ling et al. 2012; Cabral & Kataoka 2014; Mouffouk et al. 2015). Le concept de théranostique, fusion des termes « thérapie » et « diagnostic », vise au développement de systèmes intégrant un agent thérapeutique et un agent d'imagerie. L'IRM, examen de référence dans le diagnostic du glioblastome, est adaptée à l'imagerie des

tissus mous et au suivi de croissance tumorale. Non invasive, elle bénéficie d'une résolution spatiale élevée. Dans certaines pathologies, l'injection d'agents de contraste (chélates de gadolinium, nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques) est nécessaire au rehaussement du contraste entre tissus sains et lésés pour un diagnostic fiable et de qualité. Des systèmes micellaires fonctionnalisés à l'aide d'agents de contraste IRM greffés à leur surface ou incorporés en leur cœur ont été développés de façon à suivre par imagerie la diffusion de l'objet au sein du tissu (Mi et al. 2013; Cabral & Kataoka 2014; Mouffouk et al. 2015). De telles plateformes de taille nanométrique sont susceptibles de renseigner sur la localisation du principe actif vectorisé et pourraient ainsi permettre d'optimiser la planification du traitement en temps réel.

Conformément au traitement standard approuvé par les autorités sanitaires depuis 2005, la chimiothérapie radiosensibilisante à base d'agents alkylants (témozolamide) joue un rôle clé dans le bénéfice de survie des patients nouvellement diagnostiqués de glioblastome (Stupp et al. 2005). La radiothérapie externe constitue la base incontournable de leur prise en charge. Néanmoins, son efficacité est considérablement limitée par des mécanismes de résistance non complètement élucidés liés aux caractéristiques biologiques intrinsèques des cellules tumorales, notamment des cellules souches cancéreuses, et au microenvironnement dans lequel elles se développent (Mukherjee et al. 2009; Chargari et al. 2012). Ainsi, l'efficacité de la radiothérapie utilisée en routine clinique dans le traitement de nombreux types de cancer pourrait être maximisée par l'utilisation concomitante d'une chimiothérapie qui sensibilise les cellules en leur induisant des lésions multiples à l'ADN (Wilson et al. 2006; Carlson et al. 2009; Chalmers et al. 2009). D'autres agents alkylants ou apparentés, tels que les dérivés du platine, ont été étudiés dans la littérature comme alternative au traitement du glioblastome (Zustovich et al. 2009; Rocha et al. 2014). Il a ainsi été montré sur un modèle syngénique de glioblastome que l'administration intracérébrale de cisplatine ou de carboplatine à l'aide de pompes osmotiques en synergie d'une radiothérapie externe (rayonnement synchrotron ou photonique) ou interne augmentait significativement la médiane de survie des rats, conduisant même à des rémissions complètes (Biston et al. 2004; Rousseau et al. 2007; Rousseau et al. 2009; Rousseau et al. 2010; Barth et al. 2011; Bobyk et al. 2012; Yang et al. 2014). La CED permet de fortement concentrer les complexes activés de platine au sein du tissu tumoral comparativement à une injection systémique (intraveineuse ou intraartérielle) tout en limitant les effets secondaires (Cheung-Ong et al. 2013; Shi et al.

2015). Un essai clinique de phase I a par ailleurs validé la faisabilité d'une injection de carboplatine directement dans le parenchyme cérébral par CED dans l'optique de traiter le glioblastome (White et al. 2012).

Le *cis*-diaminedichloroplatine(II), ou cisplatine, constitue l'une des plus anciennes molécules aux propriétés antinéoplasiques connue. Alors que le cisplatine est synthétisé pour la première fois en 1844, Rosenberg découvre son activité antitumorale par sérendipité plus d'un siècle après. En effet, en 1968, Rosenberg étudie l'influence d'un champ électrique sur des cultures d'*E. coli*. Au cours de leur croissance, les bactéries deviennent filamenteuses, ce qui est révélateur d'une inhibition de la synthèse d'ADN attribuée aux électrodes de platine (Page et al. 1999). Les études qui découlent de cette expérience conduisent à la reconnaissance de l'activité anticancéreuse du cisplatine et à son approbation par la FDA dès 1972 (Prestayko et al. 1979). Chef de file des agents alkylants et apparentés, le cisplatine a révolutionné la prise en charge du cancer des testicules, autre « sanctuaire » isolé du reste de l'organisme par un système de barrières, dont le pronostic est désormais favorable (Kelland 2007). Référence dans le traitement du cancer des testicules, mais aussi du cancer cervico-facial et du cancer des ovaires, le cisplatine est également communément utilisé dans le traitement du cancer du col de l'utérus, du sein, de la vessie, de l'œsophage et des poumons, ainsi que de gliomes métastatiques (Rocha et al. 2014). Il s'agit d'un complexe de coordination de structure rigide et de géométrie plan carré avec un atome de platine central dans un état divalent, deux ligands amine stables positionnés en configuration *cis* et deux groupements chlorés labiles. Ceux-ci peuvent être substitués par des substrats nucléophiles présents dans les protéines et les acides nucléiques pour former des liaisons covalentes fortes avec l'atome de platine (Siddik 2002). C'est ce qui se produit au sein de la cellule : le cisplatine s'y lie aux bases puriques de l'ADN et de l'ARN, principalement aux guanines et dans une moindre mesure aux adénines, ainsi qu'aux autres sites nucléophiles que présentent nombre de protéines (Johnstone et al. 2015). Les adduits à l'ADN se présentent sous la forme de liaisons intrabrins entravant la réPLICATION de l'ADN et sa transcription en ARN (Kelland 2007). En ce sens, le cisplatine exerce une activité antinéoplasique intrinsèque, dont une partie des mécanismes d'action demeure non élucidée. De par son atome central de platine de numéro atomique élevé, le cisplatine augmente le dépôt de dose lorsqu'il est utilisé en combinaison d'une radiothérapie externe (Benzina et al. 2006; Wilson et al. 2006; Hoebers et al. 2008). Le bénéfice de la radiothérapie est *a fortiori* maximisé par une augmentation de la

capture cellulaire du cisplatine, par une formation accrue de complexes actifs de Pt(II) en présence de radicaux libres générés par les radiations ionisantes, et par l'inhibition des mécanismes de réparation des lésions radio-induites à l'ADN (Hennequin & Favaudon 2002; Wilson et al. 2006). Réciproquement, la réparation de l'ADN lésé par la radiothérapie ne peut être efficace si l'enzyme dédiée n'est pas en mesure de s'y fixer du fait de réparations aberrantes ou d'adduits déjà engagés avec des complexes de Pt(II). Enfin, l'interruption temporaire du cycle cellulaire par le cisplatine permet d'obtenir un effet synergique avec les irradiations. Malgré le bénéfice thérapeutique apporté par la chimiothérapie radiosensibilisante, il est nécessaire de rappeler que le profil de toxicité du cisplatine freine son injection systémique du fait d'une néphrotoxicité, d'une neurotoxicité et d'une ototoxicité élevées (Stathopoulos 2013).

#### Objectifs du Doctorat :

Concevoir, développer, caractériser et évaluer des nanodispositifs copolymère multifonctionnels combinant le transport d'un agent chimiothérapeutique radiosensibilisant, le cisplatine, à celui d'un agent de contraste dédié au suivi non invasif par IRM de la biodistribution de la nanoplateforme injectée directement en intracérébrale par CED.

La stratégie adoptée pour mener à bien ce projet est détaillée ci-après :

- (i) Synthèse de copolymères séquencés amphiphiles biocompatibles par polymérisation par ouverture de cycle

La conception de copolymères séquencés amphiphiles à base de poly(oxyde d'éthylène) (PEO) en tant que segment hydrophile et de polyesters aliphatiques tels que la poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL), le poly(acide lactique) (PLA) ou le poly(acide lactique-co-acide glycolique) (PLGA) en guise de squelette hydrophobe présente un intérêt tout particulier dans l'optique de formuler des micelles polymère (Cajot et al. 2013) capables de reconnaître un déterminant cellulaire (Oerlemans et al. 2010; Freichels et al. 2011; Freichels, Alaimo, et al. 2012; Freichels, Pourcelle, et al. 2012; Xu et al. 2013; Cabral & Kataoka 2014; Mouffouk et al. 2015; Grossen et al. 2017) ou de véhiculer une molécule « traceur » dans l'idée de développer de nouveaux agents de contraste, notamment pour l'imagerie par résonance magnétique (Grogna et al. 2010; Oerlemans et al. 2010; Grogna et al. 2011; Mouffouk et al.

2015). Les chaînes de copolymères amphiphiles s’auto-assemblent spontanément dans l’eau sous la forme de micelles, une nanostructure au cœur hydrophobe et à la couronne hydrophile caractérisée par une grande stabilité (Harper et al. 2010). Ces systèmes biocompatibles, (bio)dégradables, dont plusieurs sont en cours d’évaluation dans le cadre de divers essais cliniques, favorisent notamment la biodisponibilité de principes actifs hydrophobes (Xu et al. 2013; Garg et al. 2017; Grossen et al. 2017). En outre, le choix des différentes séquences d’un copolymère détermine, de par ses caractéristiques physicochimiques, des facteurs clés aux nanovecteurs telles que la taille moyenne des micelles formées, leur stabilité dans le temps et suivant le milieu dans lequel elles se trouvent, la charge en drogue ou encore la cinétique de libération du principe actif, rendant ainsi ces systèmes aisément modulables (Nishiyama & Kataoka 2006; Baba et al. 2012). Notons à cet effet que la polymérisation par ouverture de cycle permet de contrôler précisément la longueur de chaque séquence (Penczek et al. 2007; Jérôme & Lecomte 2008; Seyednejad et al. 2011; Carlotti & Peruch 2015; Grossen et al. 2017). De nombreux travaux décrits dans la littérature rapportent l’accumulation sélective et substantielle au sein des tumeurs solides du principe actif véhiculé par des micelles polymère, un facteur favorable à une efficacité accrue de la thérapie anticancéreuse (Harper et al. 2010; Baba et al. 2012; Grossen et al. 2017). L’utilisation courante de poly(oxyde d’éthylène) pour la séquence hydrophile formant la couronne des micelles confère en outre un caractère furtif à ces nanosystèmes qui échappent à l’opsonisation et présentent ainsi un profil pharmacocinétique favorable inhérent à la biodisponibilité prolongée du principe actif dans la circulation générale (Gref et al. 2000; Peer et al. 2007; Grossen et al. 2017).

Dans la perspective de la conception d’une nanomédecine et des défis biologiques sous-jacents, une attention toute particulière sera accordée au choix des différentes entités pour qu’elles soient compatibles avec une injection dans le système nerveux central. En outre, la translation vers la clinique se trouve simplifiée lorsque les briques constitutives du système ont préalablement été approuvées par les autorités sanitaires dans le cadre d’études de toxicologie. Le PEO est biocompatible, bio-éliminable et approuvé par la FDA pour diverses applications biomédicales (Matsumura 2005; Bjugstad et al. 2010; Alconcel et al. 2011; Banerjee et al. 2012; Liu et al. 2017). Les polyesters aliphatiques sont biocompatibles et (bio)dégradables (Matsumura 2005; Woodruff & Hutmacher 2010; Seyednejad et al. 2011; Dash & Konkimalla 2012; Manavitehrani et al. 2016; Grossen et al. 2017). Les polycarbonates sont également largement utilisés pour des applications biomédicales

(Chapanian et al. 2009; Xu et al. 2014). Des polycarbonates hydrophiles biodégradables ont notamment été proposés comme une alternative pertinente aux matériaux furtifs à base de poly(oxyde d'éthylène) (Engler et al. 2015). Dans notre cas, une séquence en polycarbonate proche de celle développée dans ces travaux et facilement fonctionnalisable sera utilisée afin de rendre possible la réticulation du copolymère sur le cisplatine. Les conditions à la synthèse de copolymères amphiphiles multifonctionnels seront déterminées et optimisées. L'alcool amorceur de la réaction de polymérisation de l'oxyde d'éthylène sera soigneusement choisi dans l'optique du greffage ultérieur d'un complexe de gadolinium (Gd-DTPA) en bout de chaîne  $\alpha$  du PEO. Dans ce contexte, le contrôle des bouts de chaîne est primordial.

(ii) Fonctionnalisation des copolymères en vue de leur conférer la capacité de réticuler sur le cisplatine

Bien que les micelles polymère soient caractérisées par une grande stabilité en solution aqueuse déterminée par leur faible concentration micellaire critique, concentration en-deçà de laquelle les chaînes copolymère ne sont plus capables de s'auto-assembler spontanément dans l'eau pour former des micelles, la dilution engendrée par leur injection dans la circulation générale est susceptible de conduire à leur dissociation (Cajot et al. 2011). Une réticulation des chaînes copolymère sur un principe actif confère une plus grande stabilité à la structure micellaire, alors plus rigoureusement qualifiée de nanoparticule polymère. La réticulation peut soit intervenir au niveau du cœur hydrophobe de la particule soit au niveau de la couronne hydrophile. Dans le premier cas, elle est souvent irréversible. Dans le second, elle permet au système d'intégrer une charge élevée en drogue à la structure nanoparticulaire mais risque parallèlement d'interférer avec ses propriétés de furtivité en limitant la mobilité des segments hydrophiles (Cajot et al. 2011). Le lien assurant la conjugaison entre la drogue et le copolymère est généralement conçu pour être rompu par réaction enzymatique, par hydrolyse ou via un stimulus externe, rendant ainsi possible une libération contrôlée et prolongée du principe actif confiné à sa cible (Harper et al. 2010; Xue et al. 2013).

La conception de systèmes de libération de drogues réticulés sur le cisplatine repose sur la grande labilité de ses deux ligands chlore. La synthèse et la fonctionnalisation de polymères porteurs de groupements carboxylate capables de se substituer aux atomes de chlore permet la conjugaison de l'atome de platine central des complexes de Pt(II) activés aux chaînes copolymère par chimie de coordination (Nishiyama et al. 2003; Cabral et al. 2005; Nishiyama & Kataoka 2006; Ye et al. 2006; Matsumura & Kataoka 2009; Harper et al. 2010;

Ding et al. 2011; Kowalcuk et al. 2011; Huynh et al. 2012; Cabral & Kataoka 2014; Li et al. 2014; Duan et al. 2015).

Dans le contexte de cette étude, le monomère synthétisé en vue de former la séquence polycarbonate (PC) porte une fonction ester activée qui permet une fonctionnalisation simple des copolymères séquencés préalablement synthétisés (Sanders et al. 2010; Engler et al. 2013). Une fonctionnalisation par des groupements acide carboxylique rendra ainsi possible, une fois ces fonctions déprotonées, la formation de liaisons de coordination avec le cisplatine dans l'optique de la formulation de nanoparticules réticulées sur le cisplatine.

- (iii) Formulation d'une prodrogue macromoléculaire à base de cisplatine : caractérisation physicochimique des nanoparticules multifonctionnelles ainsi formées associant agent antinéoplasique et agent de contraste IRM

La formulation de nanosystèmes hybrides sur la base des copolymères séquencés ainsi synthétisés et fonctionnalisés adviendra par réticulation des fonctions carboxylates sur le cisplatine. Des liaisons chimiques fortes stabiliseront ainsi la particule. En ce sens, le système formé s'apparentera à une prodrogue macromoléculaire formée à partir de cisplatine. Le complexe de Gd-DTPA à la surface des nanoparticules devrait leur conférer une relaxivité accrue à haut champ magnétique et donc des propriétés d'imagerie intéressantes. Cette nanoplateforme innovante sera finement caractérisée en termes de propriétés physicochimiques (taille, potentiel zéta, stabilité dans le temps en solution, profil de libération de la drogue) et relaxométriques.

- (iv) Evaluation biologique de l'efficacité thérapeutique de cette prodrogue macromoléculaire comparativement à celle du cisplatine libre en synergie d'une radiothérapie externe

Des capacités de radiosensibilisation des cellules sont prêtées aux agents alkylants ou apparentés (Akerley et al. 2002; Benzina et al. 2006; Wilson et al. 2006; Hoebers et al. 2008; Kil et al. 2008; Carlson et al. 2009; Chalmers et al. 2009; Eckert et al. 2010; Martel-Lafay 2016). Ainsi, le cisplatine maximiserait le bénéfice de la radiothérapie en augmentant les dommages causés à l'ADN ainsi que le dépôt de dose. La présence d'atomes lourds de gadolinium en surface de la nanoparticule pourrait encore moduler le dépôt de dose. Dans ce cadre, l'efficacité thérapeutique de la prodrogue macromoléculaire développée sera évaluée *in vitro* comparativement à celle du cisplatine libre en synergie d'une radiothérapie externe. La

viabilité de cellules humaines de glioblastome ainsi exposées sera analysée en conditions normoxiques de culture, et les mécanismes sous-jacents approchés par l'étude comparative de la capture cellulaire du cisplatine et de la formation d'adduits à l'ADN.

- (v) Etude fondamentale sur des mécanismes d'action du cisplatine non entièrement élucidés et sa capacité à attaquer d'autres cibles que celles traditionnellement décrites dans la littérature

Des analyses transcriptomiques et génomiques seront réalisées sur des cellules humaines de glioblastome après exposition au cisplatine. Une attention particulière sera prêtée à la cinétique du traitement. Les mécanismes d'action du cisplatine sur d'autres organites cellulaires seront interrogés sur la base du postulat avancé que les mitochondries constituaient des cibles alternatives au cisplatine.

- (vi) Etude préclinique préliminaire : évaluation de l'efficacité thérapeutique et suivi par IRM de la prodrogue macromoléculaire sur un modèle xénogénique de glioblastome humain implanté en orthotopique chez la souris immunodéprimée après injection stéréotaxique par infusion convective

Une étude préliminaire de survie chez le rongeur a été envisagée pour évaluer la nanomédecine ainsi développée. Toutes les stratégies clés mentionnées précédemment ont été combinées : traitement au cisplatine pour son effet cytotoxique propre en synergie d'une radiothérapie externe, injection locale directement dans le parenchyme cérébral par infusion convective et utilisation d'un nanovecteur protégeant le principe actif jusqu'à sa cible. La fonctionnalisation de la nanoplateforme par un agent de contraste IRM permet en outre le suivi de sa biodistribution au sein du tissu et la détermination du volume de distribution de la drogue.

Ce projet s'inscrit dans le cadre du programme doctoral Erasmus Mundus NanoFar pour les nanomédecines et les innovations pharmaceutiques. Il a été réalisé en cotutelle internationale de thèse entre l'Université d'Angers, représentée par le Dr Emmanuel GARCION, Directeur de Recherche (DR2) INSERM rattaché au Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes Angers (CRCINA, INSERM U1232) et l'Université de Liège, représentée par le Dr Philippe LECOMTE, Chercheur Qualifié FNRS rattaché au Centre d'Etude et de Recherche sur les Macromolécules (CERM).

## Introduction Générale & Présentation du Projet

---

Cisplatine : une vieille molécule pour de nouveaux défis.

*Développement d'une prodrogue macromoléculaire multifonctionnelle applicable au traitement local du glioblastome.*

Ce manuscrit s'articule autour de cinq points majeurs :

- (i) une revue de la littérature faisant état de la place des agents alkylants et assimilés depuis le rationnel de leur utilisation en routine clinique depuis plus d'un demi-siècle jusqu'aux derniers développements technologiques pour le traitement des tumeurs solides : des exemples clés de l'utilisation du cisplatine dans ces stratégies thérapeutiques seront tout particulièrement détaillés ;
- (ii) un préambule aux résultats explicitant la stratégie mise en place au cours du doctorat, les ajustements, les méthodes utilisées et certains résultats préliminaires ;
- (iii) un article scientifique décrivant la conception et l'évaluation biologique d'une prodrogue macromoléculaire bifonctionnelle applicable au traitement locorégional du glioblastome : synthèse d'un copolymère séquencé, formulation de nanoparticules réticulées sur le cisplatine et décorées de gadolinium dans la perspective d'un suivi par IRM de l'infusion de la drogue en per- et post-opératoire, évaluation biologique sur deux lignées humaines de glioblastome et comparaison avec la drogue libre ;
- (iv) une réflexion plus fondamentale sur la base de résultats préliminaires exploratoires visant à une meilleure compréhension des mécanismes d'action du cisplatine et à l'identification de cibles alternatives jusqu'à présent marginalisées qui pourraient pourtant jouer un rôle clé dans l'activité anticancéreuse ;
- (v) une discussion consécutive à l'analyse croisée de ces différents résultats soulevant de nouvelles perspectives.

## Introduction Générale & Présentation du Projet

---

---

Chapitre 2 : Article de Revue

“Rethinking alkylating(-like) agents  
for solid tumor management:  
special focus on cisplatin”

accepté pour publication dans Trends  
in Pharmacological Sciences

---



## Rethinking alkylating(-like) agents for solid tumor management: special focus on cisplatin

### Table of Contents:

ABSTRACT	33
STRATEGIC PATHS TOWARDS ANTICANCER THERAPY	34
1. RATIONALE AND CONVENTIONAL USE OF ALKYLATING AGENTS AND PLATINUM DERIVATIVES IN CLINICAL PRACTICE	37
1.1. Mechanism	39
1.2. Resistance	44
1.3. Radiosensitization	50
1.4. Polychemotherapy	54
2. OPTIMIZATION OF THE USE OF ALKYLATING AGENTS AND PLATINUM DERIVATIVES	60
2.1. Drug administration and dosage	61
2.2. Alternative and neglected targets	66
2.3. Innovative synergies	68
2.4. Development of smart nanocarriers	74
CONCLUDING REMARKS	84



## Rethinking alkylating(-like) agents for solid tumor management: special focus on cisplatin

Hélène Lajous,<sup>a,b</sup> Bénédicte Lelièvre,<sup>c</sup> Philippe Lecomte,<sup>b,\*</sup> and Emmanuel Garcion<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> CRCINA, INSERM, Université de Nantes, Université d'Angers, Angers, France

<sup>b</sup> Center for Education and Research on Macromolecules (CERM), CESAM Research Unit, University of Liege, B6a Sart-Tilman, B-4000 Liege, Belgium

<sup>c</sup> Centre régional de pharmacovigilance, Laboratoire de pharmacologie-toxicologie, CHU Angers, 4 rue Larrey, F-49100 Angers, France

\* Equivalent contribution

### Abstract

Solid tumors consist of an excessive multiplication and uncontrolled proliferation of cells that become immortal. They are responsible for more than 95% of cancer-induced mortality. Various strategies are used among surgery, chemotherapy and radiotherapy, often in combination to each other, to contain the expansion of cancer and eradicate it. Alkylating agents form a class of anticancer medicine well-known to induce irreversible DNA double-strand breaks which result in cell apoptosis. Cisplatin is the oldest platinum derivative, assimilated to an alkylating-like agent, the front runner that dramatically improved the prognosis of germinal cells cancer during the second half of the XX<sup>th</sup> century. Still used as the gold-standard treatment in the management of testis, ovarian and head and neck cancers, cisplatin remains a key antineoplastic agent in the landscape of oncology. Additional synergies can be rolled out to maximize DNA damage, as it is the case with external radiotherapy or polychemotherapy. Yet, systemic toxicity limits these approaches by inducing severe side effects to surrounding organs and tissues. Therefore, tailored drug delivery systems can further enhance the efficiency of alkylating agents by bypassing natural barriers such as the blood brain barrier and directly delivering the drug to its target. In this framework, this review aims at giving an overview of the context and paradigm of an intensive resort to alkylating agents in clinical practice but also at defining more precisely their field of action for an optimized use. As a result, it first focuses on the rationale and conventional use of alkylating agents in the treatment of solid tumors in the clinic before searching for new horizons for revisiting these old molecules, with a special focus on cisplatin.

## HIGHLIGHTS

Alkylating agents and platinum derivatives are pivotal drugs in the management of solid tumors.

According to how they are conventionally used in the clinical practice, alkylating agents and platinum derivatives face drastic limitations due to innate or acquired drug resistance.

The design of alternative therapeutic strategies aiming at revisiting these old drugs to give them a new impetus is of paramount importance.

Potentiation of the treatment schedule may rely on the circumvention of drug resistance mechanisms, new routes of administration, the targeting of critical organelles within cancer cells, the search for synergistic effects and the resort to smart drug delivery systems that allow for combining several functionalities.

**Key words:** alkylating agents, cisplatin, local treatment, synergies, nanomedicine, solid tumors

## Strategic paths towards anticancer therapy

Various molecular mechanisms underlying the pathogenesis of tumors are still under investigation. According to Patrick Bateson, “understanding how the parts relate to each other is a precondition to understanding process and understanding process is the precursor to uncovering principles” (Bateson 2006). A better insight into this machinery, including causes, involved proteins and potential targets, would definitely help for a better management of cancer with the ultimate view of personalized medicine. To date, instead of fighting against an unknown, perhaps systematic, causal entity responsible for cancer, research in oncology mainly focuses on patients’ symptoms and aims at treating hallmarks acquired by normal cells that progressively evolve to a neoplastic state. Hanahan and Weinberg describe these specific features as sustained proliferative signaling, evasion from growth suppressors, immune destruction avoidance, replicative immortality possibility, tumor-promoting inflammation,

invasion and metastasis activation, angiogenesis induction, genome instability and mutation, cell death resistance and cellular energetics deregulation (Hanahan & Weinberg 2000; Hanahan & Weinberg 2011). To reverse these acquired features, global strategies, namely chemotherapy and radiotherapy, still consist in the mainstay of treatment of solid tumors by addressing specific mechanisms involved in the process of tumorigenesis.

More targeted strategies have also been developed. Among them, imatinib (Gleevec<sup>®</sup>), a tyrosine kinase inhibitor (TKI), specifically targets the ATP-binding site of the BCR-ABL tyrosine kinase that stimulates uncontrolled cell growth in white blood cells. This abnormal signaling arises from the so-called Philadelphia fusion gene caused by a reciprocal translocation between chromosomes 9 and 22. During the phase III clinical trial, imatinib showed astonishing effects in patients with chronic myelogenous leukemia, ultimately increasing the survival rate at five years from 30% to 89% with a relapse rate of about 17%. At 5 years, 98% of patients presented a complete hematologic response (Druker et al. 2006). Imatinib is currently the gold-standard treatment for the management of chronic myelogenous leukemia, but is also used in several forms of gastrointestinal stromal tumors. Referred to as the “silver bullet”, imatinib outstandingly demonstrated how a better understanding of underlying cellular and molecular pathways in the pathogenesis of cancer can lead to relevant and efficient therapeutic strategies (Pray 2008).

Another kind of targeted strategies relies on one of the formerly mentioned hallmarks of cancer: angiogenesis, namely the fast formation of an abnormal neovascular network with altered permeability from pre-existing vessels that is able to promote tumor growth and dissemination within the organism. The resulting tumor microenvironment is characterized by an increased production of vascular endothelial growth factor (VEGF), a pro-angiogenic factor of poor prognosis. When interacting with its receptor (VEGF-R) located on endothelial cells, VEGF triggers an intracellular signaling cascade that results in endothelial cells’ proliferation forming new vessels (Al-Abd et al. 2017). As such, VEGF represents a putative target for so called antiangiogenic therapies that aims at cutting-off resources in forms of oxygen and nutrients from blood supply to the expanding solid tumors through the regression of this tortuous vascular network. Bevacizumab (Avastin<sup>®</sup>) is a recombinant humanized monoclonal antibody that selectively binds to VEGF, thus preventing interaction with its receptor (Carlsson et al. 2014). As a result, it selectively targets tumor cells depending on a

new vascular tree. Bevacizumab received FDA approval as first-line treatment for breast cancer, advanced colorectal cancer and for advanced, metastatic or recurrent non-small cell lung cancer in combination with platinum-based chemotherapy (Jenab-Wolcott & Giantonio 2009; Lauro et al. 2014). However, these innovative alternatives to conventional management of cancer have been developed with various degrees of success depending on the patient pathogenesis (Ye 2016; Yang et al. 2017).

At the crossroads of these different strategies, a promising alternative in the management of cancer could rely on revisiting drugs through an optimization of the treatment planning, the investigation of new synergies, the setting-up of other routes of administration or the resort to nanomedicine to carry the encapsulated drug straight to its target. In this framework, alkylating agents are old molecules still currently widely used in the front-line treatment of several types of solid tumors. Their targets are multiple since these antineoplastic drugs are known to bind to nucleophilic sites such as DNA, RNA and proteins. Among them, platinum derivatives do not alkylate but rather complex with their nucleophilic targets. Although historically affiliated to alkylating agents, they should therefore rather be referred to as “alkylating-like” agents. Half of cancer patients experience platinum-based drug therapy (Mezencev 2015; Gibson 2019). Thus, the clinical relevance of platinum compounds is key in daily practice. Cisplatin is the oldest platinum drug approved by the FDA. Although alternative platinum derivatives have been developed to improve its therapeutic index, cisplatin remains the leader molecule of platinum complexes and one of the most compelling anticancer drugs with a pivotal role in the management of solid tumors (Kelland 2007; Johnstone et al. 2015). Therefore, cisplatin will be addressed as a prototypic platinum-based anticancer agent to exemplify paradigms, mechanisms, limitations and new directions that fall under a broader understanding of the future of alkylating agents and platinum compounds in the clinic.

In the following, we provide an up-to-date review of the rationale and conventional use of alkylating agents and platinum derivatives in clinical practice. Then, we focus on optimization ways, synergies and innovative alternatives that pave the way for rethinking how to potentiate their anticancer efficacy, laying down future challenges for these old molecules in the treatment of solid tumors, with the ultimate view of personalized medicine.

## 1. Rationale and conventional use of alkylating agents and platinum derivatives in clinical practice

Bari Harbor, 1943. After bombing of their ship, the crew exposed to sulfur mustards showed considerable bone-marrow and lymph nodes depletion. Selective toxicity to lymphoid tissues suggested to resort to mustard gas in the treatment of lymphoma. First promising clinical outcomes gave rise to a huge optimism leading to the synthesis and development of various alkylating agents and platinum derivatives (DeVita & Chu 2008). As such, they are the oldest class of anticancer medicine and are still widely used in clinical practice for various indications. They especially remain the gold-standard for first-line treatment of brain tumors, leukemia and lymphoma, and are also used in combination with other antineoplastic drugs, for instance in the management of breast cancer. The DrugBank database reports all FDA-approved alkylating agents and affiliated compounds in worldwide use, their initial indications, delivery type and administration route, as listed in Table 2.1 (Wishart et al. 2018). Other alkylating agents (e.g. mitolactol that has been granted orphan drug designation from the FDA for the treatment of invasive carcinoma of the uterine cervix and as adjuvant therapy in the treatment of primary brain tumors) and platinum complexes (lobaplatin for inoperable metastatic breast cancer, chronic myelogenous leukemia and small cell lung cancer in China, heptaplatin for gastric cancer in Korea, nedaplatin for (non-)small cell lung cancer, esophageal cancer and head and neck cancer, and miriplatin for hepatocellular carcinoma in Japan) are also currently in use in humans (Gibson 2019).

**Table 2.1:** FDA-approved alkylating agents and affiliated compounds for anticancer therapy <sup>a</sup>  
*IV, intravenous.*

Drug	Approval year	Indication	Delivery type	Route
<b>Azoture mustards</b>				
Mechlorethamine	1949	Lung cancer Leukemia Lymphoma	Single	IV injection Intracavitory Intrapericardial
Chlorambucil	1957	Leukemia Lymphoma	Single	Oral
Cyclophosphamide	1959	Lymphoma Multiple myeloma Leukemia Brain cancer Ovarian cancer Retinoblastoma Breast cancer	Single or in combination	Oral IV injection
Uracil mustard	1962	Leukemia Lymphoma	Single	Oral
Melphalan	1964	Multiple myeloma Ovarian cancer	Combination	IV injection Oral
Estramustine phosphate sodium	1981	Prostate cancer	Combination	Oral
Ifosfamide	1988	Testicular cancer	Combination	IV injection
Bendamustine hydrochloride	2008	Lymphoma Leukemia	Single	IV injection
<b>Nitrosoureas</b>				
Lomustine (CCNU)	1976	Brain cancer Lymphoma	Single or in combination	Oral
Carmustine (BCNU)	1977	Brain cancer Lymphoma Multiple myeloma	Single or in combination	IV injection
Streptozocin	1982	Pancreatic cancer	Single	IV injection
Carmustine wafers (Gliadel®)	1996	Brain cancer	Single or in combination	Intracranial implantation
<b>Platinum salts</b>				
Cisplatin	1978	Testicular cancer Ovarian cancer Bladder cancer	Single or in combination	IV injection
Carboplatin	1989	Ovarian cancer	Single or in combination	IV injection
Oxaliplatin	2004	Colon cancer Colorectal cancer	Combination	IV injection

Drug	Approval year	Indication	Delivery type	Route
<b>Others</b>				
Busulfan	1954	Leukemia	Combination	Oral IV injection
Thiotepa	1959	Breast cancer Ovarian cancer Bladder cancer	Single	IV injection Intravesical instillation
Pipobroman	1966	Leukemia	Single	Oral
Procarbazine hydrochloride	1969	Lymphoma	Combination	Oral
Mitomycin C	1974	Stomach cancer Pancreatic cancer Bladder cancer	Single or in combination	IV injection
Dacarbazine	1975	Melanoma Lymphoma	Single or in combination	IV injection
Altretamine	1990	Ovarian cancer	Single	Oral
Temozolomide	2005	Brain cancer	Single or in combination	Oral
Trabectedin	2015	Soft tissue sarcoma	Single	IV injection

<sup>a</sup> Marketing authorization and clinical practice guidelines are likely to evolve over time and depending on the country.

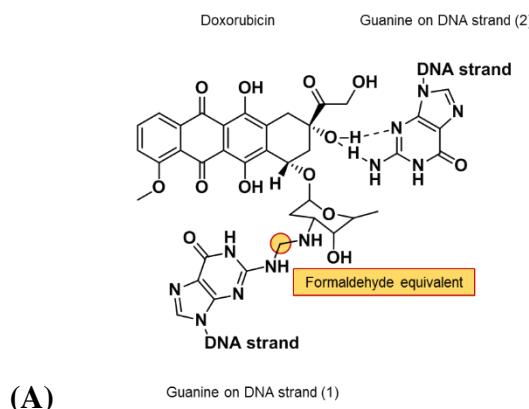
## 1.1. Mechanism

Anticancer agents are traditionally classified in chemical families according to their mechanism of action. Antimetabolites are structural analogs of natural substrates dedicated to cell growth. They are responsible for interferences with the normal metabolism of cells or even substitute the expected metabolite, which results in nucleic acid synthesis disruption during the S phase of the cell cycle. Intercalating and alkylating agents are reported to directly interact with DNA by intra- or interstrand crosslinking which inhibit DNA replication and downstream RNA transcription. Spindle poisons disrupt mitotic spindle assembly, making cells unable to achieve normal mitosis.

When focusing on DNA as a key target in anticancer therapy, we mainly consider intercalating and alkylating agents whose mechanisms of action strictly differ. Although they exhibit interesting anticancer properties, intercalators do not fit in the scope of this review. However, the mechanism underlying their interaction with DNA is briefly reminded by taking

the example of anthracycline antibiotics. Doxorubicin forms with guanine a covalent bond (formaldehyde equivalent) on one DNA strand and hydrogen bonds on the opposite strand to further stabilize the structure, as illustrated on Figure 2.1-(A). Interactions with DNA preferentially occur with neighboring GC base pairs, allowing the planar aromatic ring of the drug for sliding between the DNA double helix. As a result, DNA stays unwound and its replication is made impossible. It is worth noticing that doxorubicin-sensitive cells are characterized by higher levels of formaldehyde – by which covalent bond with DNA is mediated – in comparison with resistant tumor cells or even normal cells, suggesting that intercalation of doxorubicin in between DNA strands may promote higher efficacy of the drug, even though complementary cytotoxic mechanisms certainly occur (Yang et al. 2014). Another way of interacting with DNA relies on alkylation. Alkylators consist of compounds of various biochemical structures that are able to replace a hydrogen atom in an electronegative molecule by an alkyl group under physiological conditions (Brookes & Lawley 1964). More specifically, an alkylating agent is described in organic chemistry as a reactant which allows for the transfer of an alkyl group, i.e. an alkane lacking a hydrogen atom, from one to another molecule. Nucleophilic substitution thus occurs by  $S_N1$  or  $S_N2$  mechanism – depending on the kinetics of the reaction – and results in covalent binding to an organic macromolecule. The major nucleophilic centers inside cells are ionized thiol groups, unionized amines, ionized phosphates and carboxylic acids (Warwick 1963). Based on the observation that exposure to alkylating agents entails chromosomal aberrations in dividing cells, DNA was described as the target site of alkylation within cells (Trams et al. 1961; Hall & Tilby 1992). This hypothesis can be further supported by its high molar mass, which makes DNA the major nucleophilic substrate for alkylation within the organism, far ahead RNA and proteins (Connors 1974). Such interactions with nucleic acids are likely to induce irreversible damage. Indeed, the faster cells proliferate, the more they are sensitive to DNA damage. Therefore, cancer cells should be more sensitive to alkylation than normal cells. Alkylation mainly occurs during S phase, while DNA is replicating: both strands are separated and nucleophilic substrates thus easily reachable (Page et al. 1999). A blockage in G2-phase was also reported (Meyn & Murray 1984). Bifunctional agents such as azoture mustards and platinum salts are able to form intra- or intercatenary bridges between both strands in close vicinity, producing more DNA damages than nitrosoureas that are composed of a single reactive group. Alkylating agents are more likely to bind to exposed nucleophilic sites in the

grooves of the DNA double helix: guanine (positions N<sub>7</sub>, O<sub>6</sub>, N<sub>2</sub> and N<sub>3</sub>), adenine (N<sub>3</sub> and N<sub>7</sub>) and cytosine bases (N<sub>3</sub>) (Lenglet 2012). The resulting adducts prevent strands from uncoiling and separating, making DNA replication and RNA transcription impossible where the alkylation occurred (Noll et al. 2006). Temozolomide (TMZ) is a small orally available lipophilic molecule of high interest in the treatment of malignant gliomas because of its ability to cross the blood-brain barrier. First synthesized in 1984, it acts as a prodrug as illustrated by Figure 2.1-(B). Indeed, TMZ is spontaneously hydrolyzed at physiological pH in its active metabolite, 5-(3-methyltriazen-1-yl)imidazole-4-carboxamide (MTIC). MTIC is quickly converted to 5-aminoimidazole-4-carboxamide (AIC) and methyldiazonium ( $\text{CH}_3\text{N}_2^+$ ) (Babu et al. 2013). This highly reactive cation is further able to methylate purine bases of DNA, preferentially O<sub>6</sub> and N<sub>7</sub> guanines, and to a less extent A<sub>3</sub> adenine (Roos et al. 2007; J. Zhang et al. 2012; Lombardi & Assem 2017). Intervention of DNA mismatch repair enzymes is necessary to avoid inhibition of DNA replication. However, enzyme attempts to excise O<sub>6</sub>-methylguanine adducts are associated with DNA single- or double-strand breaks that ultimately lead to cell apoptosis (Agarwala & Kirkwood 2000). Yet, reparation mechanisms can also take place: for instance, alkylation on guanine N<sub>7</sub> leads to its excision and further breaking of DNA strand. The guanine-cytosine couple can then be replaced by adenosine-thymine, leading to cell mutations that are continuously recovered along subsequent replications. It is worth highlighting that the toxicity profile of alkylating agents is directly linked to the nature of DNA damage. Indeed, methylation of purine bases induced by temozolomide results in milder hematologic toxicity compared to DNA chemical cross-linking generated by nitrosoureas, procarbazine and platinum derivatives.



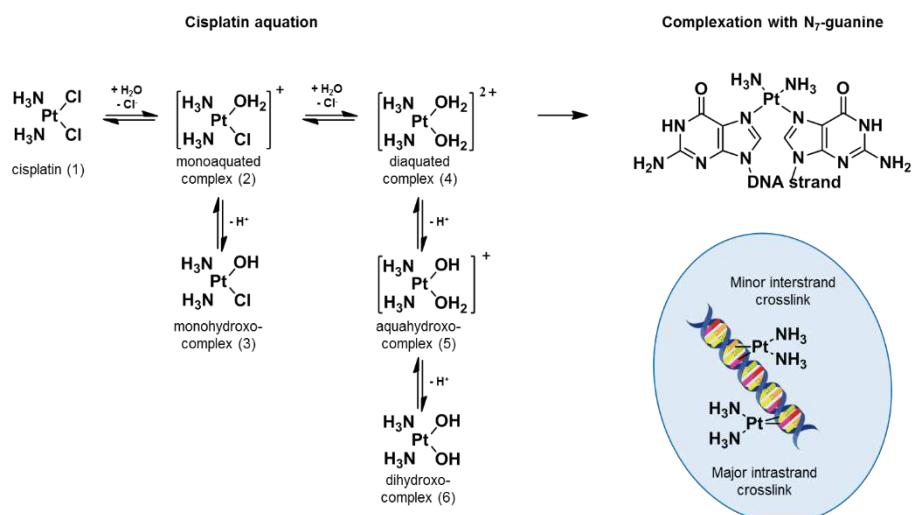
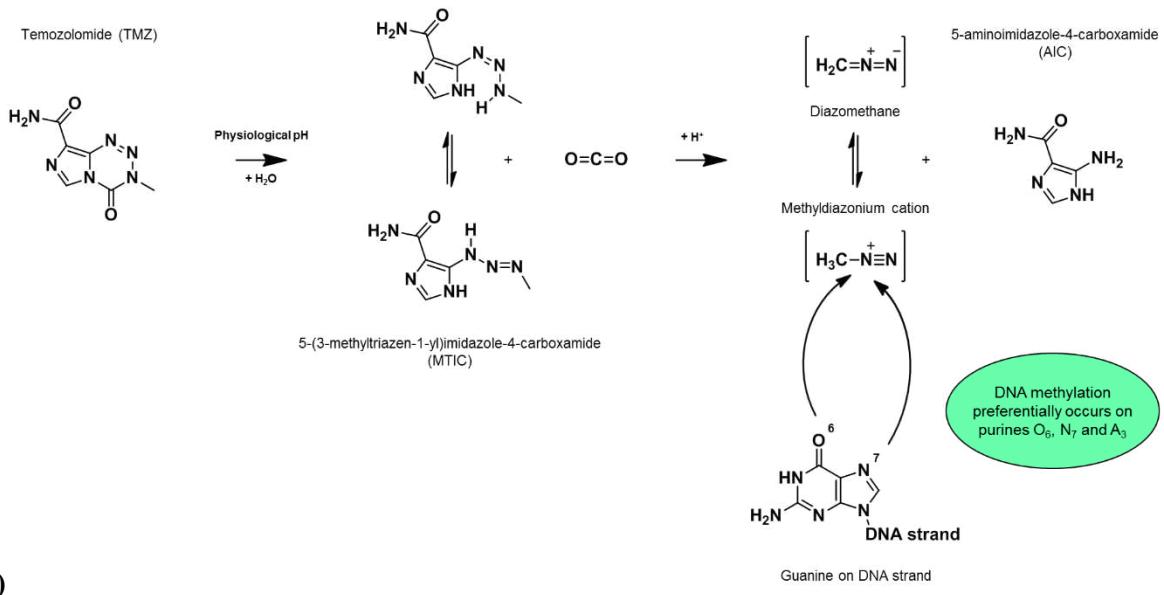


Figure 2.1 : Various mechanisms of action of antineoplastic drugs on DNA:

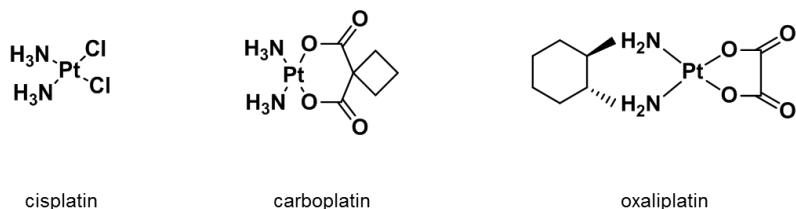
**(A)** Intercalation of doxorubicin between strands of DNA double helix

**(B)** Methylation of DNA by temozolomide

**(C)** Cross-linking of DNA induced by complexation with cisplatin

Platinum derivatives, whose main representatives are depicted on Figure 2.2, are historically affiliated to alkylating agents. Though platinum compounds directly interact with DNA, their mechanism of action however differs on a chemical point of view in that they entail a complexation reaction instead of a strictly speaking alkylation. In this regard, this review will focus on molecules traditionally considered as alkylating agents, but a special attention will be paid to distinguish alkylating agents and platinum derivatives (or “alkylating-like” agents). Platinum complexes, including the FDA-approved cisplatin, carboplatin and oxaliplatin, are stabilized by various ligands that can be substituted by nucleophilic substrates present in proteins and nucleic acids to form a strong coordination bound with the central platinum atom. In that way, platinum compounds are considered as alkylating agents even though they do not interact with biological macromolecules through an alkyl group but rather by complexation. Among them, cisplatin was serendipitously discovered in 1965 by Rosenberg who was studying the influence of applying an electrical field to *E. coli* bacterial culture. Because of the platinum electrodes, this experiment resulted in a filamentous growth of bacteria standing for a DNA synthesis inhibition (Page et al. 1999). Subsequent investigations led to FDA approval of cisplatin as an antineoplastic agent in 1972 and its use as a gold-standard in the treatment of testis, ovarian and head and neck cancers (Prestayko et al. 1979). Thus, it has enabled to dramatically improve the prognosis of germinal cancer cells (Kelland 2007). *Cis*-diamminedichloroplatinum(II) (*cis*-DDP), or cisplatin, is the oldest and leader molecule of platinum salts. It is a metallic coordination complex of square-planar geometry with the central platinum atom in a divalent state (Siddik 2002). It has a rigid structure with two labile chlorine groups and two stable amine ligands located in a *cis*- configuration. Cisplatin requires the substitution of at least one chloride group by water for its activation, a process called aquation, which is illustrated on Figure 2.1-(C). This hydrolysis automatically occurs once cisplatin is captured because of the small chloride concentration within the cell compared to its 5- to 30-fold equivalents in the extracellular space. Reactivity of these Pt(II) complexes is determined by the ability of every ligand to be substituted by a nucleophile, following the order:  $\text{H}_2\text{O} > \text{Cl}^- \gg \text{HO}^-$ . As a result, the diaquated complex (**4**) is the most reactive species, followed by the monoaquated (**2**) and aquahydroxo (**5**) complexes. Conversely, cisplatin (**1**) and monohydroxo-complex (**3**) are relatively inert kinetically. The dihydroxo-complex (**6**) is not expected to react with any nucleophile (Mezencev 2015). Once within the cell, active Pt(II) species will complex with nucleophilic ligands: N<sub>7</sub>-sites of purine

DNA or RNA bases, mainly guanine and to a lesser extent adenine, and nucleophilic sites on several proteins (Corte-Rodríguez et al. 2015; Johnstone et al. 2015). Adducts related to cisplatin are mainly due to guanine intrastrand cross-linking with its monoaquated species that further impede DNA replication and transcription (Siddik 2002; Kelland 2007).



**Figure 2.2:** FDA-approved platinum derivatives for cancer treatment

Alterations caused by mono-functional alkylating agents can especially be avoided because of DNA reparation enzymes that even lead to further chromosomal aberrations in dividing cells and chemo-induced cancers such as leukemia in Hodgkin disease or ovarian cancers. Double-strand alkylating agents such as platinum compounds induce covalent bounds between two DNA strands that are much more difficult to repair. However, repair mechanisms available at each checkpoint of the cell cycle enable cancer cells exposed to cisplatin to escape their lethal fate and partly resist to cytotoxicity. Various biological mechanisms also occur that induce acquired resistance to alkylating agents.

## 1.2. Resistance

Intrinsic or acquired resistance to alkylating agents and platinum derivatives is considered as a multifactorial phenomenon involving several major mechanisms, such as reduced accumulation (impaired uptake versus increased efflux out of the tumor cell) through alterations of membrane protein trafficking, increased cytoplasmic inactivation through non-specific interactions with endogeneous nucleophilic molecules or macromolecules such as glutathione, methionine, metallothionein and proteins, increased levels of DNA repair or DNA damage tolerance. These pleiotropic processes can be explained at the molecular level by up- or down-regulated expression of several microRNA, transcription factors and small GTPases and altered expression of regulatory proteins involved in signal transduction

pathways that control apoptosis (Page et al. 1999; Kartalou & Essigmann 2001; Siddik 2002; Siddik 2003; Shi et al. 2010; Shen et al. 2012; Cheung-Ong et al. 2013; Dasari & Tchounwou 2014; Amable 2016; Fennell et al. 2016). Figure 2.3 illustrates the main mechanisms involved in cell resistance to alkylating agents and platinum derivatives.

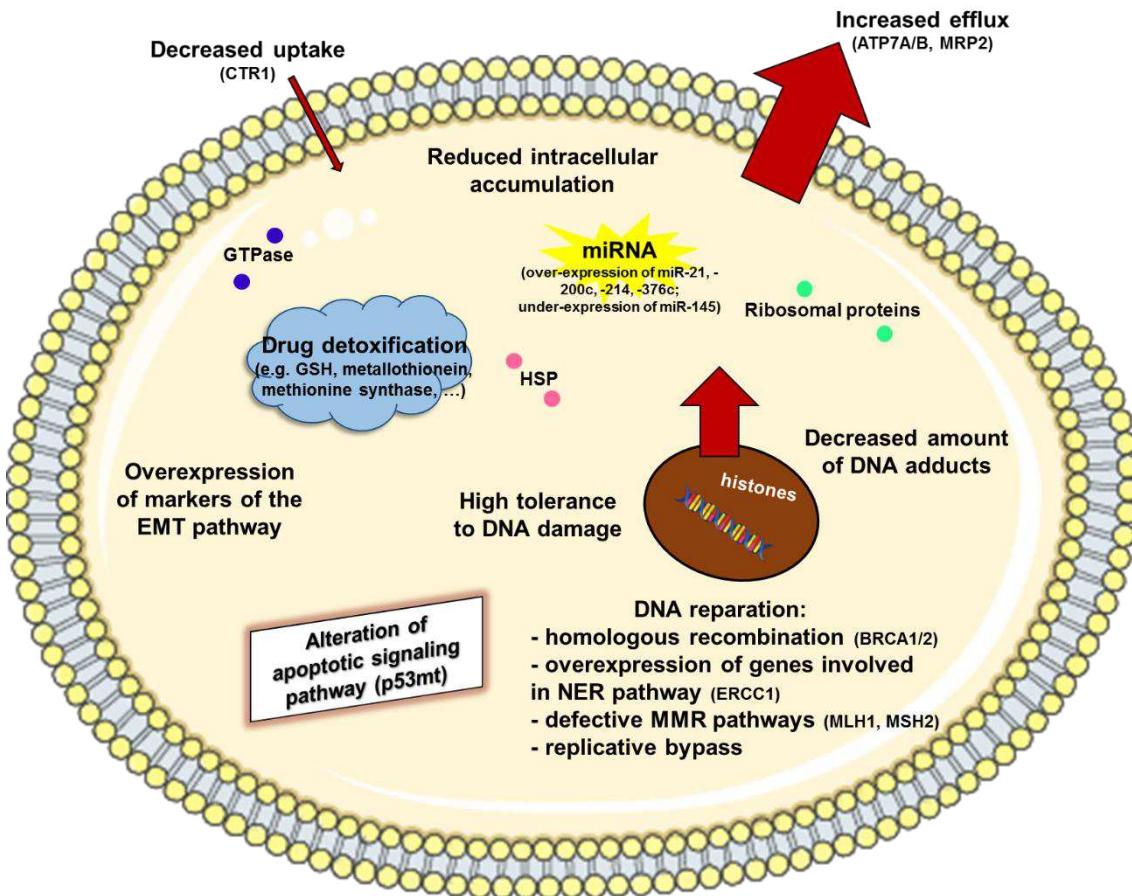


Figure 2.3: Main mechanisms of cell resistance to alkylating agents and platinum derivatives

ATP7A/B, copper-extruding P-type ATP binding cassettes A/B. BRCA1/2, breast cancer 1/2 early onset. CTR1, copper transporter 1. EMT, epithelial-mesenchymal transition. ERCC1, excision repair cross-complementation group 1. GSH, reduced glutathione. HSP, heat shock proteins. miRNA, microRNA. MMR, mismatch repair.

MRP2, multidrug resistance protein 2. NER, nucleotide excision repair. p53mt, p53 mutated.

One of the main factors that causes drug resistance relies on the reduction of its intracellular accumulation (Corte-Rodríguez et al. 2015). Impaired influx or conversely active efflux (or

both) result in less cytotoxicity and consequently in acquired resistance. Decreased influx is assumed to occur from altered transporter-mediated uptake, functional or structural modifications in organelles or in membrane potential that also reduce endocytosis. Conversely, active efflux is mediated by an increased export of the drug out of the cell. Cisplatin is reported to enter cells either by passive diffusion or by copper transporter 1 (CTR1) mediated uptake. However, cisplatin itself is responsible for fast degradation of membrane transporter CTR1, resulting in a decreased influx in human cells (Shen et al. 2012; Dasari & Tchounwou 2014). As such, genetic knockout of CTR1 makes cells become resistant whereas increased CTR1 expression levels commonly demonstrated high sensitivity to cisplatin *in vivo* (Shen et al. 2012). Conversely, membrane transporters like the ATP-binding cassette transporters MRP1 are commonly described in the literature as key agents of cell detoxification and chemoprotection in that they efflux various compounds, including anticancer drugs, thus modulating their pharmacokinetics. The multidrug associated resistance protein 2 (MRP2) and the copper exporters ATP7A and ATP7B have been reported to modulate platinum derivatives efflux and therefore to be involved in acquired resistance (Kelland 2007). Cisplatin efflux mechanisms from the nucleus back to the cytoplasm may also account for resistance to platinum compounds with a reduced distribution of the drug to its target (Stewart 2007).

To overcome cytotoxicity of a drug, tumor cells trigger an overall abnormal phenotype by silencing or activating expression of various genes that become therefore involved in drug resistance. Various intracellular organites may develop complex strategies linked to their role within cell organization when exposed to drug cytotoxicity. For instance, heat shock proteins (HSP) that are over-expressed in cisplatin resistant cells modulate protein homeostasis, small GTPases control the DNA repair machinery and are involved in the cytoskeleton formation and protein trafficking, ribosomal proteins manage gene response to environmental stress, histones maintain chromatin structure and function and are involved in both transcription and DNA repair. DNA methylation is involved in silencing of various genes. As such, aberrant DNA methylation can alter the sensitivity to anticancer agents by inactivating genes whose expression mediates cytotoxicity. Interestingly, hypermethylation of the p53 homolog p73 and further associated gene silencing are strongly associated with sensitivity to alkylating agents. Indeed, *in vitro* down-regulation of p73 expression results in high sensitivity to alkylating agents (Shen et al. 2012). Despite a significant increase in the median survival of

glioblastoma newly diagnosed patients since the introduction of temozolomide combined with radiotherapy as a standard of care in 2005, the efficiency of this alkylating agent is dramatically limited by a genetic polymorphism which consists of unmethylation of the gene's promoter of 6-O-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT), an enzyme especially involved in the repair of methylated DNA adducts. Conversely, methylation of the gene's promoter inhibits its expression and further improves cell sensitivity to temozolomide (Ostrom et al. 2013; Van Thuijl et al. 2015). This frequent mutation in glioblastoma diagnosed patients is therefore of good prognosis, leading to an increase of the median survival of patients with methylated MGMT (Hegi et al. 2005). In case of cisplatin, reparation of DNA adducts is associated with cisplatin resistance. DNA is commonly described as the main target of cisplatin aquated complexes, but other intracellular nucleophilic sites, including RNA, various proteins and thiol molecules, constitute as many alternative targets of cisplatin. According to the Hard-Soft Acid-Base theory, hydrolyzed Pt(II) soft acids would preferentially react with soft, easily polarizable bases and form covalent rather than ionic bonds, hence the high affinity of cisplatin for sulfur-containing nucleophiles over amines (Mezencev 2015). With a concentration of 0.5 to 10 mM, the tripeptide glutathione (GSH) is the most abundant thiol within the cell. Cisplatin binds to glutathione with high affinity, leading to an inactive Pt-GSH complex further eliminated out of the cell. As such, GSH prevents platinum active metabolites from binding to DNA by sequestering them (Garrido et al. 2008; Galluzzi et al. 2014). The resulting glutathione-modified xenobiotics are further recognized by pumps that promote their efflux from the cell (Fonseca et al. 2011). In addition, glutathione is supposed to take part in DNA reparation by quenching Pt-DNA monoadducts before their conversion into cytotoxic DNA cross-links and to reduce cisplatin-induced oxidative stress that further counters anticancer activity (Stewart 2007; Garrido et al. 2008; Chen & Kuo 2010). Several tumor cell lines that have acquired resistance to cisplatin show an increased amount of GSH which further support its implication in drug resistance mechanism. Metallothionein proteins are also constituted of high amounts of sulphur-rich amino acids, in this case cysteine (Kelland 2007). They exhibit a high affinity to metals. As such, they regulate zinc homeostasis but they are also able to bind to cisplatin, thus playing a key role in drug detoxification process. As a result, upregulation of metallothionein expression was found out to be correlated with cisplatin resistance in hepatocellular carcinomas and non-small cell lung cancer (Stewart 2007).

DNA is considered as the main target of cisplatin. Thus, cross-linking, damage recognition and repair mechanisms may be involved in drug resistance. Since cisplatin requires primary activation to exert its anticancer activity, an elevated intracellular pH may be responsible for a reduced DNA cross-linking with DNA. Thus, several cisplatin-resistant cell lines displayed upregulated levels of proton pumps expression (Stewart 2007). Among its current indication in several solid tumors, cisplatin has provided a real breakthrough in the management of testis cancer with an astonishing improved cure rate in men diagnosed with metastatic testicular cancer from 5% to 60% when administered in polychemotherapy with vinblastine and bleomycin, and even to 80% after vinblastine had been substituted with etoposide. This high response of testis cells to cisplatin chemotherapy could be explained by an intrinsic hypersensitivity that was associated with a reduced ability to repair DNA adducts through the nucleotide excision repair (NER) pathway, ultimately leading to cell apoptosis. Several NER proteins, including xeroderma pigmentosum complementation group A (XPA) and F (XPF) and the excision repair cross-complementing-1 (ERCC1), displayed lower levels in testis cancer compared to other tumor types (Kelland 2007). Clinical evidence further supports the role of the NER pathway in resistance to platinum-based chemotherapy with poor outcomes in ovarian and non-small cell lung cancer overexpressing ERCC1 (Stewart 2007; Galluzzi et al. 2012). As such, ERCC1 could be used as a relevant biomarker to predict patient response to cisplatin (O’Grady et al. 2014). Besides, due to its mutagenic properties, cisplatin induces base-pair substitutions that arise at potential sites of fixations. As a result, overexpression of genes involved in the mismatch repair (MMR) pathway could also be responsible for an increased DNA repair that causes resistance to cisplatin (Shen et al. 2012). However, even though Pt-DNA adducts are recognized, they cannot be efficiently handled by MMR, which proceeds to so-called “futile cycles” that may ultimately induce double-strand breaks and subsequent cell apoptosis. Alternatively, proteins involved in the MMR pathway can bind to cisplatin adducts, thus automatically triggering apoptosis. As a result, a defective MMR pathway has been reported to take part in the development of cell resistance to cisplatin (O’Grady et al. 2014). Tumor suppressors BRCA1/2 also play a key role in resistance to cisplatin by enabling homologous recombination-mediated repair of DNA double strand breaks. Even BRCA2-mutated ovarian carcinomas that primarily respond to platinum-based chemotherapy may relapse with acquired drug resistance due to secondary intragenic mutations in BRCA2, ultimately restoring its wild-type function (Shen et al. 2012). As a

result, BRCA status could enable personalized chemotherapeutic regimen as a predictive biomarker of patient response to cisplatin (O'Grady et al. 2014). Thus, the repair machinery of chromosomal aberrations in cells is supported by a huge and complete arsenal that may even induce drug resistance. Increased tolerance to DNA damage is also involved in resistance to cisplatin (Kartalou & Essigmann 2001). For instance, replicative bypass allows a cell for synthesizing DNA even despite preliminary alterations that may not have been accurately recognized due to deficient MMR, therefore for further going through the G2 phase of the cell cycle where damage can be efficiently repaired before mitosis (Damia & D'Incalci 1998; Garrido et al. 2008). Thus, DNA polymerase  $\eta$  has been reported to mediate cell tolerance to cisplatin (Kelland 2007). P53 tumor suppressor is often mutated in human cancer cells, which entails genomic instability and altered apoptotic signaling pathway, and ultimately promotes drug resistance. Although this mechanism may arise from an altered expression of several anti- and pro-apoptotic factors, only p53 defective function demonstrated clinical relevance when associated with platinum resistance (Stewart 2007). Drug tolerance and cell survival pathways are mediated by mRNA that constitute targets of miRNA. As such, alterations in miRNA expression may result in triggering drug resistance. For instance, miR-214 has been reported to promote cell survival by targeting PTEN in human ovarian carcinomas, thus inducing cell resistance to cisplatin. Overexpression of miR-376c prevents ovarian cancer cells from apoptosis induced by DNA-damaging agents whereas siRNA anti-miR-376c increases cell sensitivity to cisplatin. Clinical evidence suggests that overexpression of miR-200c and miR-21, as well as underexpression of miR-145, were significantly correlated with low overall patient survival (Shen et al. 2012). Besides, cisplatin was shown to trigger overexpression of markers of the epithelial to mesenchymal transition (EMT) pathway. miRNA synergistic effect, as observed in EMT tongue squamous cell carcinoma with downregulation of miR-200b and miR-15b, resulted in phenotypic modifications leading to cells characterized by an increased motility, an invasive potential and drug resistance. However, mimics for these miRNA allowed for reversing the EMT behavior and further led to cell sensitivity to cisplatin. Thus, several therapeutic strategies are investigated with the perspective of regulating miRNA expression to reverse drug resistance, especially by modulating apoptotic signaling pathways (Shen et al. 2012).

Another alternative to circumvent innate or acquired cell resistance to cisplatin consists in the development of new platinum derivatives (Kelland 2007). These compounds are of high

interest since they are reported to present a milder toxicity profile compared to cisplatin and to alter all cells whatever their stage in the cell cycle, even dormant cells. Indeed, stem cells with an undifferentiated phenotype located in the tumor margins also constitute a hurdle to cancer treatment since they are not sensitive neither to radio- nor to chemotherapy. Platinum-based chemotherapy in combination with taxanes is the standard-of-care for advanced ovarian cancer after surgical excision. Despite primary efficacy of this first-line treatment, up to three-fourth of patients face inevitable recurrences that exhibit drug resistance. Acquired resistance can arise from intermittent free drug resting periods between two cycles of chemotherapy where clones of tumor cells grow and develop resistance to cisplatin. In addition, autophagy is often associated to cisplatin resistance in ovarian cancer but also in lung adenocarcinoma through activation of the AMPK / mTOR signaling pathway (Dasari & Tchounwou 2014; Wu et al. 2015). In this framework, drug resistance has become a major challenge for cancer therapy. More effective strategies are thus required to overcome this hurdle.

### **1.3. Radiosensitization**

Radiotherapy (RT) constitutes a key strategy in the treatment of several solid tumors, including lung, breast, pelvis or prostate cancers (Delaney et al. 2005; Baskar et al. 2012). Radiation beam causes ionization of cell atoms by the ejection of an electron by Compton or photoelectric effects, or excitation by the transfer of an electron from an orbital to another one of higher energy level. Electron interaction with water molecules, namely water radiolysis, generates free radicals that further react with cell components, especially DNA, to form mainly single-strand (>99%) but also double-strand breaks. In the presence of oxygen, the amount of free radicals as well as their aggressiveness increase due to the formation of highly reactive oxygen species (ROS). Intervention of these free radicals therefore entail an indirect action on DNA. However, direct interaction can also occur, to a less extent, when macromolecules present within the cell environment are directly subject to ionization. Single-strand breaks are easily repaired by the DNA repair machinery of the cell whereas double-strand breaks are lethal. Maximization of RT effects on tumor tissue requires a differential effect compared to healthy surrounding parenchyma. As such, focalization of beam radiation, optimization of the treatment schedule and modulation of the tumor tissue response to irradiation by chemotherapy are of paramount importance knowing that higher radiation doses can irreversibly damage normal surrounding tissues and generate radiation-induced secondary

cancers (Shenoy & Singh 1992; Martel-Lafay 2016). Local focalized RT enables the delivery of a higher dose of ionizing radiation to the target tumor volume by focused beams, such as in three-dimensional conformational radiotherapy or hadrontherapy (Miladi et al. 2015). Therefore, RT efficiency is concentrated on tumor cells, sparing normal cells. Fractionation of the dose and spacing out of RT sessions over time allow for gaining a differential effect between highly proliferative tumor cells and quiescent or slower dividing normal cells. Modulation of the tumor response to RT can be achieved by resorting to various antineoplastic agents and has been extensively investigated in alkylating- and platinum-based strategies with the aim of amplifying the differential effects between tumor and normal cells (Akerley et al. 2002; Benzina et al. 2006; Hoebers et al. 2008; Kil et al. 2008; Carlson et al. 2009; Chalmers et al. 2009; Eckert et al. 2010; Martel-Lafay 2016). The mechanisms of interaction between cisplatin and RT that may result in a synergetic effect have especially been described (Wilson et al. 2006). RT could increase the cellular uptake of cisplatin and promote the activation of toxic Pt(II) complexes following the formation of ROS within the intracellular space. Conversely, cisplatin could entail an arrest of the cell cycle and inhibit the molecular repair machinery that tackles radiation-induced DNA damage, thus achieving a synergetic effect. However, RT efficiency remains limited by the spatial localization and extent of various solid tumors, their invasiveness, and sometimes their intrinsic radioresistance, especially when dealing with hypoxic tumors due to an inadequate supply of nutrients from the anarchic microvasculature related to neoangiogenesis (Horsman 1995).

RT is currently used in clinical practice as a gold-standard in the treatment of gliomas. From 1979, Michael D. Walker and collaborators showed indeed that irradiation dose delivered to malignant gliomas was highly correlated to the median survival of patients (Walker et al. 1979). In the case of glioblastoma, the most frequent and aggressive form of glioma, benefit of RT alone or in combination with safe surgical resection of the tumor mass did not enable a median survival higher than one year. In addition, side effects related to whole brain irradiation were severe (Wilson et al. 2014; Davis 2016). In that context, resort to temozolomide, an alkylating agent capable of crossing the blood brain barrier, in combination with RT has enabled to significantly increase the median survival of newly diagnosed glioblastoma patients from 12.1 to 14.6 months with minimal additional toxicity (Stupp et al. 2005; Weller et al. 2014). In addition, adjuvant temozolomide-based chemoradiotherapy provided superior antitumor activity compared to a sequential RT followed by temozolomide

administration (Carlson et al. 2009; Chalmers et al. 2009). This protocol, known as Stupp regimen, has become the gold-standard for management of newly diagnosed glioblastoma. Results on glioblastoma evidence superior efficiency of concurrent chemoradiotherapy compared to RT alone. Clinical studies on advanced head and neck squamous cell carcinoma and cervical cancer have demonstrated the same trend which can be explained by a more accurate locoregional control of the pathology and subsequently a better prognosis (Hoebers et al. 2008). A metaanalysis on the resort to chemotherapy in the treatment of non-small cell lung cancer that was historically treated with RT alone demonstrated a statistically significant increase in overall survival with an absolute benefit at five years of 4.5% associated with a reduction of the risk of locoregional recurrence and progression (Martel-Lafay 2016). Thus, administration of antineoplastic agents concurrent to RT aims at reducing or at least containing tumor cell proliferation that would otherwise quickly entail radioresistance. Both strategies seem complementary since DNA is more sensitive to chemotherapy during S phase of the cell cycle due to its higher exposition at the time of synthesis and replication, while cells are more radiosensitive during G<sub>2</sub>/M phase. In addition, alkylating agents block cells and make them accumulate in G<sub>2</sub>/M phase where they are the most sensitive to RT, providing a potential synergistic effect of both strategies (Tippayamontri et al. 2012). However, radioresistance of tumor cells can occur from disruption of blood supply to the altered tissue after surgery and chemotherapy, leading to hypoxic foci (Jin et al. 2007). An alternative to address the issue of radioresistance relies on the modification of the tumor radiosensitivity by use of chemical radiosensitizers that simultaneously enhance the therapeutic benefit of RT locally and tackle tumor cells by independent cytotoxicity of the drug itself (Miladi et al. 2015). In some cases, this combination can however be associated with acute toxicity because of side effects on normal surrounding tissues. Instead, tumor-specific radiosensitizing chemotherapy alternatives should yield to a synergistic therapeutic effect and prevent from healthy tissue toxicity (Tomoda et al. 2015).

Several molecules have been assumed to exhibit properties that bypass tumor radioresistance. Due to their ability to form DNA adducts leading to double-strand breaks, alkylating agents are particularly used in combination with RT as a radiosensitive chemotherapy. For a long time, RT combined with nitrosourea compounds such as carmustine has been the standard treatment against astrocytic tumors. The same kind of radiosensitive chemotherapy was then applied to medulloblastoma, leading to an increase in the 5-year survival of patients of up to

70%. RT was also reported to increase the toxicity profile of ifosfamide when used concomitantly in the treatment of sarcoma (Anderson et al. 2008). Moreover, patient overall survival resulting from radiochemotherapy with ifosfamide demonstrated the best outcome compared to RT alone or RT combined to other radiosensitizers (Eckert et al. 2010). Platinum compounds also constitute material of choice for effective radiosensitizing chemotherapy thanks to the heavy platinum atom that locally enhances the effect of external beam radiation (Benzina et al. 2006; Wilson et al. 2006; Hoebers et al. 2008). Basically, absorption of X-rays of a given frequency increases with higher Z atomic number of the penetrated material. In clinical practice, cisplatin is conventionally used in combination with RT in the treatment of various solid tumors (Wilson et al. 2006; Hoebers et al. 2008; Martel-Lafay 2016). For instance, close temporal administration of cisplatin and RT is required in non-small cell lung cancer to enable a better locoregional control of the pathology and thus enhance the antitumor efficiency of RT (Reboul 2004). A metaanalysis on concurrent chemoradiotherapy in head and neck squamous cell carcinoma reported that combination of cisplatin and RT was of highest efficiency compared to other regimens leading to significant improvement of overall survival (Hoebers et al. 2008). As such, cisplatin administration concomitant to RT constitutes the standard of care in advanced head and neck squamous cell carcinoma.

Even though radiosensitizing therapeutics based on alkylating agents and platinum derivatives already belong to the clinical routine, other formulations are still under investigation *in vitro* or at the preclinical level in order to amplify the benefit of RT. For instance, estramustine consists of a combination of nitrogen mustard and estradiol. As such, it is able to alkylate DNA and other nucleophilic sites within the cell but also to bind more selectively to estrogen receptors. Estramustine achieved sensitization of experimental gliomas and various human renal cancer cell lines to RT (Landy et al. 2004). Interestingly, despite a high resistance to external beam radiation, human renal cancer cell lines A498 and CAKI-2 stopped their growth while treated with estramustine prior to RT (Edgren & Lennernäs 2000). Rousseau and colleagues paved the way for demonstrating that the injection of free carboplatin directly into the brain by convection-enhanced delivery (CED) in combination with either 6-MV or 80-keV photons showed a statistically significant therapeutic efficacy in treating malignant gliomas (Rousseau et al. 2007). The synergistic use of RT with carboplatin has thus been shown to improve the overall survival in F98 glioma-bearing rats compared to a control population or to control groups that underwent only chemotherapy or radiotherapy

respectively (Bobyk et al. 2012). However, despite promising results *in vitro* or in animal models, translation to the clinics can be tough. For instance, cisplatin could enhance the benefit of RT on biopsy spheroids from glioblastoma specimens, exhibiting additive effects (Fehlauer et al. 2000; Fehlauer et al. 2005). Yet, cisplatin-based chemoradiotherapy only achieved low improvement in the survival of glioblastoma patients. This may be inherent to intertumoral heterogeneity, interpatient variation in sensitivity to chemoradiotherapy, but is also related to cisplatin systemic side effects to healthy surrounding tissues, neuro- and nephrotoxicity (Séhédic et al. 2015). Platinum compounds exhibit dose- and time-dependent cytotoxicity. As such, the time schedule between drug administration and RT is a key point for effective combination leading to synergism or at least to an additive effect of chemotherapy and RT on tumor cells (Tippayamontri et al. 2012). In this way, optimization of the use of alkylating agents and platinum derivatives concurrent to RT is necessary to offer a promising option in the management of solid tumors. Another common alternative to take full advantage of the therapeutic benefit of these antineoplastic agents consists of combining them to other drugs whose mechanism of action or targets differ in order to overcome drug resistance and potentiate anticancer efficiency by additive or synergetic effects while addressing different pathways involved in tumorigenesis.

#### **1.4. Polychemotherapy**

As already highlighted in Table 2.1, alkylating agents and platinum derivatives are often used in combination with other chemotherapeutics in the treatment of several solid tumors with the aim of overcoming intrinsic and acquired drug resistance mechanisms but also to address the issue of high systemic toxicity. Indeed, combination of drugs that exert their anticancer activity through various mechanisms induces cell damage and metabolism dysfunction by altering several molecular targets involved in different signaling pathways (De Felice et al. 2015). As a result, this option is commonly considered in clinical practice to potentiate drug efficiency, leading to a huge number of drug combinations and synergetic strategies.

According to the National Cancer Institute, platinum-based drugs are prescribed for an estimated 10 to 20 percent of all cancer patients. They are commonly used concurrently with other drugs because of a common trend observed in several solid tumor types such as ovarian, biliary tract, lung, breast and prostate cancer that primary respond to cisplatin but ultimately relapse with acquired resistance. When considering the breakthrough in the mid-1970s that

enabled to dramatically improve the prognosis of testis cancer, combinatory treatment with cisplatin, bleomycin and vinblastine increased complete response rates from 5% to 60%. Substitution of vinblastine with etoposide further enabled to reach up to 80% of cure rates (Kelland 2007). Combination of cisplatin and gemcitabine allowed for a significant survival advantage without additional toxicity compared to gemcitabine alone in the treatment of advanced biliary cancer as well (Dasari & Tchounwou 2014). In case of non-small cell lung cancer, several associations based on platinum compounds have been investigated: cisplatin-etoposide, cisplatin-vinorelbine, cisplatin-pemetrexed, cisplatin-S1 (derived from 5-fluorouracil, 5FU) and carboplatin-paclitaxel (Martel-Lafay 2016). Treatment of advanced ovarian cancer also resort to platinum / taxanes polychemotherapy. Because of common relapse in cancer patients after primary efficient first-line treatment based on cisplatin, combinational therapies are of high interest, especially when they target various mechanisms and pathways involved in tumorigenesis (Dasari & Tchounwou 2014). Interestingly, cisplatin was reported to decrease the MGMT activity whose expression counters temozolomide efficiency in glioma treatment. As a result, the synergistic effect between both drugs was investigated in several clinical trials as a relevant strategy in the treatment of refractory and recurrent glioma (Rocha et al. 2014).

Table 2.2 reports associations of other FDA-approved anticancer drugs with cisplatin usually recommended in the treatment of several solid tumors. The authors want to highlight that these combinations were listed based on the clinical practice guidelines provided by Western health institutions, here the Food and Drug Administration (FDA), the National Cancer Institute (NCI), the European Medicines Agency (EMA) and the European Society for Medical Oncology (ESMO) (Chan et al. 2012; Colombo et al. 2012; Früh et al. 2013; Oldenburg et al. 2013; Bellmunt et al. 2014; Baas et al. 2015; Fizazi et al. 2015; Lordick et al. 2016; Novello et al. 2016; Smyth et al. 2016; Marth et al. 2017; Postmus et al. 2017). In addition, Table 2.3 suggests various chemotherapeutics often recommended in combination with cisplatin with the aim either to potentiate its effect or to reduce its systemic side effects.

**Table 2.2:** FDA-approved anticancer drugs often combined with cisplatin in clinical practice and related indication

*ADP, adenosine diphosphate. EGFR, endothelial growth factor receptor. IV, intravenous.*

*VEGF, vascular endothelial growth factor.*

Drug	Target	Action	Route	Indication
<b>Alkylating agents</b>				
Altretamine	DNA	Alkylation	Oral	Palliative treatment of persistent or recurrent ovarian cancer following first-line alkylating agent-based therapy
Cyclophosphamide	DNA	Alkylation	Oral, IV injection	Advanced or metastatic epithelial ovarian cancer Sex cord-stromal tumors in combination with doxorubicin
Ifosfamide	DNA	Alkylation	IV injection	Testicular and ovarian germ cell cancers in combination with vinblastine Advanced testicular cancer in combination with etoposide or paclitaxel Osteosarcoma in combination with doxorubicin and methotrexate
<b>Platinum compounds</b>				
Carboplatin	DNA	Cross-linking	IV injection	Palliative treatment of recurrent ovarian carcinoma following first-line chemotherapy
<b>Antimetabolites</b>				
5-fluorouracil	Thymidylate synthase DNA	Blockage Incorporation and destabilization	IV injection	Advanced or metastatic gastric cancer in combination with docetaxel Local/locoregional thoracic oesophageal cancer
Gemcitabine	DNA	DNA synthesis inhibition	IV injection	Advanced non-small cell lung, advanced cervical, ovarian, pancreatic and biliary tract cancers Advanced unresectable and metastatic bladder with or without paclitaxel Malignant mesothelioma Cancers of unknown primary site
Methotrexate	Dihydrofolate reductase	Inhibition	Oral, Intra-arterial, intramuscular, IV injection	Osteosarcoma in combination with doxorubicin and ifosfamide Advanced unresectable and metastatic bladder cancer in combination with vinblastine and doxorubicin

## Chapter 2: Rethinking alkylating(-like) agents for solid tumor management

---

Drug	Target	Action	Route	Indication
Antimetabolites Pemetrexed	Thymidylate synthase, dihydrofolate reductase and glycinamide ribonucleotide formyltransferase	Inhibition	IV injection	Unresectable malignant pleural mesothelioma in adults Advanced non-small cell lung cancer with or without bevacizumab
Antimitotic agents Docetaxel	$\beta$ -Subunit of tubulin	Complexation	IV injection	Advanced non-small cell lung cancer Advanced or metastatic gastric cancer and head and neck squamous cell carcinoma in combination with 5-fluorouracil As a single agent in the treatment of locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer after failure of prior platinum-based chemotherapy
Paclitaxel	$\beta$ -Subunit of tubulin	Complexation	IV injection	Advanced epithelial ovarian cancer Advanced non-small cell lung cancer Persistent, recurrent or metastatic cervical cancer in combination with bevacizumab Advanced unresectable and metastatic bladder in combination with gemcitabine Advanced testicular cancer in combination with ifosfamide
Vinblastine	Microtubular proteins	Adducts	IV injection	Testicular and ovarian germ cell cancers in combination with ifosfamide Advanced unresectable and metastatic bladder cancer in combination with methotrexate and doxorubicin
Vinorelbine tartrate	Microtubular proteins	Adducts	IV injection	Advanced non-small cell lung cancer
Intercalating agents Doxorubicin	DNA DNA topoisomerase II	Intercalation Inhibitino	IV injection	Osteosarcoma in combination with methotrexate and ifosfamide Sex cord-stromal tumors in combination with cyclophosphamide Advanced unreseactable and metastatic bladder cancer in combination with methotrexate and vinblastine

## Chapter 2: Rethinking alkylating(-like) agents for solid tumor management

Drug	Target	Action	Route	Indication
Topoisomerase inhibitors				
Etoposide	DNA topoisomerase II	Inhibition	Oral, IV injection	Testicular and ovarian germ cell cancers with or without bleomycin Advanced testicular cancer in combination with ifosfamide Non-small cell lung cancer Metastatic small cell lung cancer Cancers of unknown primary site
Irinotecan	DNA topoisomerase I	Inhibition	IV injection	Extensive small cell lung cancer
Topotecan	DNA topoisomerase I	Inhibition	Oral, IV injection	Advanced, persistent or recurrent cervical cancer Metastatic small cell lung cancer
DNA	Intercalation			
Antibiotics				
Bevacizumab	VEGF	Binding	IV injection	Advanced non-small cell lung cancer with or without pemetrexed Metastatic or recurrent cervical cancer in combination with paclitaxel
Bleomycin	DNA	Cleavage	Intramuscular, intrapleural, subcutaneous, IV injection	Testicular and ovarian germ cell cancers in combination with etoposide
Antibodies				
Durvalumab	Programmed cell death 1 ligand 1 T-Lymphocyte activation antigen CD80	Binding	IV injection	Urothelial carcinomas after failure of platinum-based chemotherapy
Necitumumab	EGFR	Antagonist	IV injection	First-line treatment in combination with gemcitabine for metastatic squamous non-small cell lung cancer
Proteasome inhibitors				
Bortezomib	26S Proteasome	Inhibition	Subcutaneous or IV injection	Increase in the sensitivity of cancer cells to traditional anticancer agents
Others				
Mifamurtide	Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) 2 receptor Toll-like receptor (TLR)	Ligand	IV injection	Osteosarcoma in combination with multi-agent chemotherapy (typically doxorubicin, methotrexate and ifosfamide)
Olaparib	Poly(ADP-ribose) polymerase enzymes	Inhibition	Oral	Maintenance treatment of recurrent epithelial ovarian, fallopian tube or primary peritoneal cancer, following complete or partial response to platinum-based treatment

**Table 2.3: Other chemotherapeutics commonly used with cisplatin and related indication***IV, intravenous.*

Drug	Target	Action	Route	Indication
<b>Antineoplastic adjunct agents</b>				
Gimeracil	Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) enzyme	Inhibition	Oral	Reduction of toxicity associated with cisplatin and 5-fluorouracil treatment of advanced gastric cancer in adults
Thiosulfuric acid	Cisplatin	Reduction of cisplatin delivery to the kidneys and cisplatin neutralization in the kidneys	IV injection	Protection from nephrotoxicity caused by cisplatin
Oteracil	Orotate phosphoribosyl-transferase enzyme	Inhibitor	Oral	Reduction of gastrointestinal toxicity associated with cisplatin and 5-fluorouracil treatment of advanced gastric cancer in adults
Amifostine	Reactive metabolites of platinum and alkylating agents	Detoxification	IV injection	Reduction of the cumulative renal toxicity associated with repeated administration of cisplatin in patients with advanced ovarian cancer or non-small cell lung cancer
<b>Antiemetics</b>				
Aprepitant	Substance P / Neurokinin 1 receptors	Antagonist	Oral IV injection	
Fosaprepitant	Neurokinin 1 receptors	Antagonist	IV injection	
Granisetron	5-Hydroxytryptamine receptor 3A	Antagonist	Oral, Transdermal, Subcutaneous or IV injection	Prevention of acute and delayed nausea and vomiting associated with initial and repeat courses of highly emetogenic cancer chemotherapy
Ondansetron	5-Hydroxytryptamine receptor 3A	Antagonist	Oral IV injection	
Rolapitant	Neurokinin-1 receptor (NK1R)	Antagonist	Oral	

Alkylating agents and platinum compounds have been successfully used for decades as effective anticancer drugs in the treatment of various solid tumors, either alone or in combination with other chemotherapeutics. They exhibit highly interesting radiosensitizing properties that enable to potentiate the effects of radiotherapy. However, dramatic side effects related to systemic administration limit their therapeutic benefit. Multiple drug resistance also

remains a challenge to be addressed. A better understanding in the mechanisms underlying tumorigenesis, research for reaching synergistic effects between various strategies, latest technological advances in resorting to other routes of administration and the rise of innovative nanomedicines constitute all promising alternatives to the conventional use of alkylating agents and platinum derivatives in clinical practice. Various strategies will be addressed in the following that pave the way for reflection on a redefinition of the field of action of alkylating agents and platinum derivatives in anticancer therapy. A finer optimization will raise the prospect of bringing these old molecules back on the stage again for tackling new major challenges.

## **2. Optimization of the use of alkylating agents and platinum derivatives**

As many antineoplastic drugs, alkylating agents and platinum derivatives are dramatically limited by their lack of specificity that results in high systemic toxicity. As a result, the time has come to intensify efforts to investigate on the feasibility of potentiating drug efficiency by resorting to innovative more targeted strategies rather than to discover plenty of new drugs that would quickly be limited again in the way they are administered and further metabolized by the organism. Tailored drug delivery systems (DDS) may enhance the efficiency of alkylating agents and platinum compounds by bypassing physiological barriers such as the blood brain barrier and directly delivering the drug to its target. Combination with a locoregional administration could also help for reducing systemic toxicity and enhancing the therapeutic index (Exner et al. 2005). In this chapter, we will describe alternatives for a better drug bioavailability, distribution and thus efficacy. Alternative or neglected targets will be pointed out, as well as potent innovative synergies. The resort to various drug delivery systems that are able to encapsulate and convey alkylating agents or platinum derivatives in order to further improve the therapeutic efficiency of the free drug while limiting its side effects will be reported. Ultimately, complex theranostic systems that show great promise for further clinical application in the treatment of solid tumors in human will be highlighted, a strategy in line with Ehrlich's "magic bullet" concept (Ehrlich 1906).

## 2.1. Drug administration and dosage

Chemotherapy is often limited by systemic injection which is responsible for severe side effects, especially on highly proliferative cells such as bone-marrow cells, and acquired mechanisms of drug resistance. In this context, drug efficacy can be optimized by resorting to loco-regional injection in order to avoid drug dilution within the organism, but also by finding out the right regimen depending on the dosage and treatment schedule.

High systemic toxicity of conventional anticancer agents can be overcome by using the most suited route of administration depending on the tumor type. Glioblastoma is the most frequent and aggressive primary brain tumor. Standard treatment consists of safe surgical resection of the tumor burden – when possible – followed by combined radiotherapy and chemotherapy with temozolomide (Stupp et al. 2005). Thanks to its lipophilic properties, temozolomide easily crosses the blood brain barrier and is therefore the drug of choice in the management of brain tumors. When the patient is operable, an alternative to temozolomide consists of the implantation of carmustine wafers (Gliadel®) within the resection cavity at the end of the surgery (Wilson et al. 2014). These wafers consist of a polymeric matrix based on biodegradable polyanhydride that enables controlled and sustained release of the drug they contain. As temozolomide, carmustine (BCNU) belongs to the alkylating agent class. One to eight 3.85%-carmustine-loaded wafers can be put inside the resection bed. Within this aqueous environment, anhydride bonds of the polymer get hydrolyzed: the drug can then diffuse within the surrounding parenchyma. After degradation, the active metabolite can alkylate DNA, cross-link with DNA and RNA and entail proteins carbamylation, ultimately leading to cell apoptosis (Lombardi & Assem 2017). Such wafers provide carmustine sustained release during several weeks. They got FDA-approval in 2002 for the first-line treatment of newly diagnosed glioblastoma patients (Gallego 2015). Despite a significant therapeutic benefit with an increased overall survival, the use of that kind of wafers remains controversial due to side effects, including impaired healing and infections (Laquintana et al. 2009; Fernandes et al. 2017; Hanif et al. 2017). Nevertheless, Gliadel® demonstrated high therapeutic efficacy in animal models thanks to the release of high concentrations of carmustine in the vicinity of the wafer. Clinical translation is limited by poor diffusion within the damaged parenchyma since concentration gradient may not be strong enough to allow carmustine for penetrating deep into the brain tissue and for reaching the tumor margins

(Zhou et al. 2012). As mentioned above, alkylating agents have already provided therapeutic efficacy and improved patient outcomes in the management of brain tumors. However, alternative strategies are required to reach therapeutic doses in close vicinity of the tumor area in order to maximize their anticancer activity.

In the context of brain cancer, locoregional administration of chemotherapy directly within the brain enables both to bypass the blood brain barrier that prevents most macromolecules and therapeutic drugs from reaching the central nervous system and to locally increase drug concentration. Local drug delivery aims at targeting the tumor mass and invaded peritumoral sites of recurrence (Arshad et al. 2015). Convection-enhanced delivery (CED) was first proposed by Bobo *et al.* in 1994. It consists of infusing the drug at high concentration directly within the brain or the tumor *via* one or several intraparenchymal microcatheters (Bobo et al. 1994; Laquintana et al. 2009). A constant hydrostatic positive pressure gradient is established by an infusion pump that forces convection of the therapeutic solution at a rate of 0.1 to 10  $\mu\text{l min}^{-1}$ . As such, CED achieves homogeneous elliptical to spherical distribution of molecules of various molar masses over large distances compared to suboptimal therapeutic doses reached by passive diffusion from concentration gradient as in the case of Gliadel® (Zhou et al. 2012; Oberg et al. 2014; Arshad et al. 2015; Barua et al. 2015; Garg et al. 2015; Vogelbaum & Aghi 2015; Zhou et al. 2017). CED of antineoplastic agents has been validated in various animal studies with promising outcomes (Degen et al. 2003). Translation to the clinic is still under investigation although safety and feasibility has been demonstrated in phase I clinical trials (Vogelbaum 2007; Vogelbaum et al. 2007). In the 2000s, Elleaume and collaborators studied CED of platinum derivatives in glioma bearing rats. A significant increase in survival of F98-glioma bearing rats was achieved after intracerebral convection-enhanced delivery of cisplatin or carboplatin in combination with photon irradiation (Rousseau et al. 2007; Rousseau et al. 2009; Rousseau et al. 2010). Because they cannot easily cross the blood brain barrier, platinum derivatives do not reach brain tumors in optimal therapeutic concentrations when administered intravenously. Besides, studies have shown that carboplatin can be infused directly into the brain at a concentration that is highly toxic to tumor cells, but not to normal brain tissue. Shi and collaborators compared the therapeutic index of platinum derivatives after CED and after intravenous or intraarterial injection in glioblastoma bearing rats. CED was shown to dramatically increase the concentration of cisplatin and carboplatin within the brain tumor in regard with traditional administration routes while reducing systemic toxicity

(Shi et al. 2015). However, despite promising results on murine glioma models, translation to the clinics failed so far especially because of surgical complications including hemorrhage, infections, or even neurologic disorders related to catheter positioning inside the brain parenchyma (Siegal 2013; Zhang et al. 2016). In addition, increased interstitial fluid pressure within brain tumors can prevent the drug from an optimal diffusion (Yang et al. 2011). Free drugs are quickly eliminated into cerebrospinal fluid or blood because of short half-life in the brain (Zhou et al. 2012). Thus, the gap has to be filled between the view of CED as a promising strategy to bypass the blood brain barrier and deliver therapeutic agents *in situ* to large and clinically-relevant brain volumes while limiting systemic side effects and the current state of an invasive technique in which repeated or continuous administration is at risk due to infection and with possible leakage into the cerebrospinal fluid that drastically reduces drug concentration at the targeted site and can even induce neurotoxicity (Siegal 2013). Technical advances are therefore expected to improve CED in clinical practice and reach significant outcomes in patients with brain tumors, although a phase I clinical trial reported safety and feasibility of CED of carboplatin in the treatment of glioblastoma (White et al. 2012).

In case of localized cancers, other more suited and clinically-relevant routes of administration have been investigated. A meta-analysis conducted on nine clinical trials and gathering data from 2,119 women with ovarian cancer demonstrated the therapeutic benefit in terms of overall survival and progression-free survival from intraperitoneal chemotherapy over standard intravenous treatment (Jaaback et al. 2016). Cyclophosphamide and platinum compounds are broadly used in the management of advanced epithelial ovarian cancer (Table 2.2). Several preclinical studies reported an improved therapeutic efficacy of continuous intraperitoneal delivery of platinum compounds in both platinum-sensitive and resistant murine ovarian cancer models compared to weekly bolus injections (Zhidkov et al. 2013; Ye et al. 2015). Drug administration by intermittent bolus generally results in high peak plasma concentrations that are further responsible for high systemic toxicity, whereas a slow sustained low-dose infusion could entail the same activity against tumor cells while sparing normal cells (Erdlenbruch et al. 2001). After its intravenous injection, cisplatin quickly binds to plasma proteins. It exhibits a short circulation time with a plasma half-life less than 30 minutes and a second phase half-life of several days. Renal clearance, which is non-linear and depends on the dose, accounts for one-fourth of the total body clearance and occurs through

glomerular filtration, tubular secretion and reabsorption. Cisplatin activity is limited by its high nephrotoxicity that is managed in clinical practice by extensive hydration. Therefore, clinical studies have demonstrated a therapeutic benefit of continuous low-dose injections of cisplatin over several days (Siddik 2002).

Maximum tolerated dose (MTD) of a drug is determined during phase I clinical trials that aim at evaluating its efficiency, assessing its toxicity profile and optimizing the best dose and schedule regimen. The use of drugs at MTD requires drug-free periods between two cycles of chemotherapy that should allow the patient for recovering from acute toxicities. However, during that resting time, tumor cells can regenerate, grow again, and among them selected clones that have become resistant to the chemotherapy appear (Scharovsky et al. 2009; Zhidkov et al. 2013). As a result, the traditional rationale according to which cure would occur from higher doses with the view of an ultimate eradication of the tumor is currently shifting to the concept that “less is more”. This latter aims at tumor dormancy, i.e. a stabilization of the disease over time, as expected from treatments of chronic diseases, and consequently maintenance of quality of life (Alagkiozidis et al. 2015). In line with this concept, a new modality of drug administration called metronomic chemotherapy has arisen for the last decades that consists in the chronic and equally-spaced administration of a single or combined drugs at low dose (1/10<sup>th</sup> to 1/3<sup>rd</sup> of the maximum tolerated dose) without extended rest periods. It can be noticed that hyperfractionated radiotherapy relies on the same principle that a continuous low-dose schedule may be more efficient in killing highly-proliferative cells than standard radiotherapy, avoiding reparation of tumor cells that accumulate anomalies that would promote apoptosis (Su et al. 2012). Even though metronomic chemotherapy compels a constantly low drug level in the blood over time, the same or even a higher total amount of drug is ultimately administered compared to traditional regimens (Su et al. 2012; De Felice et al. 2015). This “dose-dense” strategy showed encouraging results with evidence of disease stabilization and improved outcomes associated with a low toxicity profile in adult and child patients with solid tumors (Pasquier et al. 2010; Alagkiozidis et al. 2015; Kubota et al. 2017). Interestingly, this alternative regimen also acts on cancer endothelial cells, providing traditional drugs such as cyclophosphamide with additional anti-angiogenic features. This new ability of traditional chemotherapeutics results from their frequent low-dose administration that makes them able to target the dividing vascular endothelial cells. Immunity restoration can also be achieved instead of the severe

myelosuppression commonly observed in the MTD strategy because of the high proliferation rate of bone-marrow cells. Further stimulation of the anticancer immune response may contribute to force tumor dormancy (Scharovsky et al. 2009; Pasquier et al. 2010; Su et al. 2012; De Felice et al. 2015). Metronomic chemotherapy broadly resorted to alkylating agents such as cyclophosphamide in the treatment of breast, ovarian, uterine and prostate cancer or temozolomide in the treatment of glioblastoma and pediatric solid tumor, and especially to platinum derivatives in the treatment of non-small cell lung cancer (Garcia et al. 2008; Scharovsky et al. 2009; Correale et al. 2010; Correale et al. 2011; Alagkiozidis et al. 2015; Kubota et al. 2017). Nowadays, metronomic chemotherapy offers several advantages, not only in terms of anticancer efficacy and low toxicity, but also in more convenient treatment administration and maintenance of patient quality of life, especially in elderly men with prostate cancer (Kubota et al. 2017). Economic reasons can also favor oral metronomic chemotherapy as a minimal cost but still compelling alternative to current standard-of-care, particularly in developing countries. At their outreach center in Mumbai, India, Patil and coworkers promote the resort to a cheap oral metronomic chemotherapy based on daily celecoxib and weekly methotrexate in patients with metastatic, recurrent or unresectable squamous cell head-and-neck carcinoma, instead of the costly but still standard-of-care 3-weekly cisplatin intravenous injection for a maximum of six cycles. As they point it out, oral administration enables homecare in a country where health infrastructures are scarce, geographically heterogeneously scattered, and therefore hardly accessible, especially for rural or poor population. Moreover, a better tolerance of drugs administered at low-dose reduces the requirement for supportive care and limit the use of adjuvant agents that aims at countering side effects (Patil et al. 2015). Although some pilot studies and clinical trials demonstrated a therapeutic benefit of metronomic chemotherapy in patient outcome with several solid tumors, large-scale studies and controlled randomized trials that compare conventional MTD to the same metronomic administration regimen are necessary to define the optimal drug dosage and schedule to achieve maximum anti-tumor efficacy while reducing systemic toxicity. The potentiating effect of the combination of traditional antineoplastic drugs with antiangiogenic targeted agents has also to be evaluated. Relevant biomarkers to prospectively assess tumor responsiveness to metronomic chemotherapy are still under investigation (Su et al. 2012). What appears obvious today is that the initiation of a metronomic chemotherapy regimen should arise as early as possible in the course of the

disease, while the patient still demonstrates a good performance status (Alagkiozidis et al. 2015).

Since chromosomal aberrations in dividing cells were an outstanding feature of mustard intoxication, most of the mechanism of action hypotheses postulated that the target site in the cell was the genetic material – i.e. the nucleic acids. But it has also been suggested that targets other than nucleic acids are attacked and responsible for the biological effects produced. A study on DNA fraction of regenerating liver and of various mouse ascites lymphomas showed that attack on DNA itself may not be the critical event by which platinum compounds exert their cytostatic or cytotoxic effect. Therefore, other cellular or molecular sites must be involved with various degrees of specificity and severity (Trams et al. 1961; Hoebers et al. 2008; Mezencev 2015).

## 2.2. Alternative and neglected targets

For decades, nuclear DNA has been considered as the most critical pharmacological target for alkylating agents' and platinum derivatives' cytotoxicity (Shen et al. 2012; Dasari & Tchounwou 2014). However, the level of Pt-DNA adducts do not necessarily correlates with neither intracellular drug accumulation nor cytotoxicity (Garrido et al. 2008; Tippayamontri et al. 2011). For the last decade, growing evidence has suggested the role of mitochondria in cisplatin anticancer activity (Yang et al. 2006; Cullen et al. 2007; Shen et al. 2012; Galluzzi et al. 2014; Van Gisbergen et al. 2015). Indeed, cisplatin was reported to accumulate in mitochondria due to electrostatic interactions between positively charged platinum activated species and this negatively charged subcellular organelle. There, it produces a significantly higher amount of adducts with mitochondrial than with nuclear DNA, up to 500-fold in the case of head and neck squamous carcinoma cell lines (Garrido et al. 2008; Van Gisbergen et al. 2015). Mitochondria are involved among others in the apoptotic pathway through the release of cytochrome c into the cytosol and subsequent activation of caspases 8 and 9, thus constituting a critical target for cytotoxic drugs. As such, mitochondrial DNA (mtDNA) alterations were reported to alter the response and clinical outcome of patients diagnosed with cancer (Van Gisbergen et al. 2015). Cisplatin is able to strongly impair the synthesis of mitochondrial nucleic acids (mtDNA and mtRNA), thus putting mtDNA maintenance in jeopardy (Garrido et al. 2008; Van Gisbergen et al. 2015). Interestingly, mtDNA mutations could also cause exhaustion of the cell antioxidant activity due to an increased production of

mitochondrial ROS, ultimately leading to cell apoptosis (Choi et al. 2015; Van Gisbergen et al. 2015).

Furthermore, since cisplatin demonstrates high affinity for nucleophilic sites, various studies have investigated its ability to trigger interactions at the molecular level by binding to various intracellular – non DNA – components that constitute so many potential targets of its anticancer activity and side toxicity, but that may also be responsible for cell resistance mechanisms (Shen et al. 2012; Galluzzi et al. 2014; Mezencev 2015). Indeed, the DNA fraction of Pt(II) complexes accounts for only about 10% of the whole amount of cisplatin covalently bound to biomolecules within the cells. Among these targets, nucleotides and nucleosides, on which the synthesis of nucleic acids relies, are characterized by a lower steric hindrance compared to their analogs involved in DNA that may result in easier interactions with Pt(II) complexes. Therefore, platinated deoxyguanosine triphosphate (dGTP) can be introduced into nucleic acid sequences, taking part to cisplatin cytotoxicity (Benedetti et al. 2008; Benedetti et al. 2009). RNA also constitutes a target of choice for cisplatin due to its high relative abundance within cells and kinetics consideration that have shown faster and higher rate complexation of cisplatin with RNA than DNA *in vitro* (Mezencev 2015). This high affinity for RNA, even though resulting in less stable adducts than with DNA, could be explained by an easier access to the targeted nucleophilic sites. Cross-linking of cisplatin with mRNA was also reported to inhibit translation *in vitro* and may further interfere with several processes in which various RNA molecules are involved. For instance, alteration of RNA splicing would be of paramount importance in the anticancer activity of cisplatin towards quiescent cells that are indifferent to DNA damage but exhibit sensitivity to protein synthesis inhibition. Interactions with non-coding RNA such as microRNA (miRNA) that mediate the regulation of gene expression and subsequent protein function or small interfering RNA (siRNA) that are involved in post-transcriptional gene silencing through RNA interferences (RNAi) may be responsible for impairment of various cellular and molecular processes (Mezencev 2015). Besides, cisplatin exhibits high affinity for sulfur-containing nucleophiles such as amino acids, peptides and proteins, whose high reactivity enables the spontaneous substitution of chloride ligands without prior activation of cisplatin by aquation as required for amino acids or nucleotides cross-linking. Ultimately, cisplatin interactions with proteins account for most adducts within cells due to high reactivity of thiol and thioether protein constitutive residues and their high abundance within the cytoplasm (Mezencev 2015). As

previously mentioned, glutathione, methionine and metallothioneins have been reported to play an important role in cell resistance to cisplatin through a detoxification process (Kelland 2007; Stewart 2007; Rocha et al. 2014). Beyond its deactivation by complexation to various cytosolic components, cisplatin can interfere with protein functions by inducing structural changes. For instance, impaired conformation of cytochrome c through a local unfolding where cross-linking with cisplatin occurred could result in a deficiency of its participation in the apoptotic pathway (N. Zhang et al. 2012). Another example relies on the stiffening of the cell membrane entailed by cisplatin binding to negatively charged phospholipids that compose it, which in turn may impair cell functions and sensitize cells to apoptotic stimuli (Mezencev 2015). Even while considering extracellular components, it is worth highlighting that the amount of Pt(II) complexes with hemoglobin that persist even following an oxaliplatin-based treatment was correlated with an increased risk of disease progression in patients with colorectal cancer (Mandal et al. 2006). The impact of cisplatin-hemoglobin interactions have not been reported yet.

As a result of this panel of observations, the old paradigm stating nuclear DNA as the crucial target for cisplatin anticancer activity should obviously be revisited. This review aims at shedding light upon subcellular alternative and neglected targets that participate in triggering molecular mechanisms of cytotoxicity or resistance. Their proper significance should be reconsidered, since cisplatin anticancer activity may arise from multifactorial mechanisms that occur both at the cellular and molecular levels, most probably in a highly concerted way. Therefore, a better understanding of the various interactions of cisplatin with subcellular components could help for giving this drug a new impetus and potentiating its clinical efficacy by taking into account possible relevant synergism in the development and implementation of future therapeutic strategies.

### **2.3. Innovative synergies**

Although unquestionable, the clinical benefit of alkylating agents and platinum derivatives remains limited due to innate or acquired resistance mechanisms. A better understanding of the cellular and molecular processes behind drug resistance would enable to potentiate the anticancer activity of alkylating agents and platinum compounds by combining them to complementary chemotherapeutics in order to reach a synergistic cytotoxicity and therefore to overcome drug resistance. The abundance within the cytosol of thiol- and thioether-containing

amino acids and proteins for which platinum complexes exhibit high affinity has been identified as a critical factor for drug resistance (Mezencev 2015). Glutathione depletion by preincubation of glioblastoma cell lines with a GSH inhibitor, buthionine sulfoximine (BSO), was reported to highly sensitize cells both to temozolomide alone, but also in combination with cisplatin, by increasing DNA damage and subsequent apoptosis. Subsequent preclinical studies resulted in a significant inhibition of the tumor growth in the animal groups treated with BSO in combination with either temozolomide or cisplatin compared to the animal groups treated with each of these drugs independently. The combination of the three drugs further led to a significant 3-fold increase in animal survival. Thanks to a putative synergistic effect, even low doses of alkylating agents were sufficient to achieve substantial outcomes while preventing from severe side effects. According to these promising results, the authors suggest that the combination of GSH inhibitors with both cisplatin and temozolomide may improve the clinical outcome in patients diagnosed with glioma (Rocha et al. 2014). Furthermore, intracellular GSH concentration could constitute a predictive biomarker of cisplatin resistance in glioma that should be taken into account for management of brain tumors with the view of more accurate protocols dedicated to personalized medicine. For more than 20 years, the anticancer activity of the alkylating agent melphalan concomitant to GSH depletion by BSO has been widely investigated in various cell lines and preclinical models. The promising results achieved through these studies led to the implementation of three phase I clinical trials in high risk neuroblastoma patients, in children with resistant or recurrent neuroblastoma, but also in patients with locally advanced malignant melanoma. Supportive therapy of melphalan with BSO demonstrated clinical activity against high risk neuroblastoma in children, but outcomes were limited due to sub-efficient doses yet causing high nephro- and neurotoxicity (Anderson et al. 2015). These severe side effects were not observed in adult trials where the combination of melphalan and BSO has been reported to be active in recurrent or refractory neuroblastoma patients and tolerable with the support of autologous hematopoietic stem cell transplantation (Villablanca et al. 2016).

An alternative to reverse resistance induced by drug detoxification processes that occur within the cytosol consists in taking advantage of the elevated levels of GSH in resistant cancer cells to specifically damage them. This can be achieved by using a GSH-metabolizing enzyme (GSTP1) that is overexpressed in platinum-resistant cancer cells to selectively activate a modified glutathione analog prodrug, namely canfosfamide (TLK286), into a nitrogen

mustard alkylating metabolite (Kelland 2007). As a result, TLK286 has shown promising results in cisplatin-resistant ovarian carcinoma cell lines and in preclinical models. A phase II clinical trial demonstrated tolerability and objective response following second-line therapy using TLK286 in patients with platinum- and paclitaxel-refractory or resistant ovarian carcinoma (Kavanagh et al. 2005). A phase III randomized study focusing on third-line therapy of platinum-refractory or resistant ovarian carcinoma demonstrated that a substantial survival improvement was achieved in this population thanks to the administration of canfosfamide in combination with other chemotherapeutics, including platinum derivatives (Vergote et al. 2009).

Furthermore, drug resistance mechanisms may be deluded thanks to synthetic manufactured bio-mimicking molecules that are able to supersede their bio-analogs within the organism. One key example relies on the development of O6-benzylguanine, a structural analog of O6-methylguanine, the temozolomide preferred target (Pourquier 2011). As previously emphasized, the unmethylation of the gene's promoter of MGMT is of bad prognosis for newly diagnosed patients with glioblastoma since temozolomide cytotoxicity is directly correlated with the capacity of MGMT to repair DNA adducts (Hegi et al. 2005). Therefore, O6-benzylguanine is able to divert and ultimately irreversibly inactivate MGMT, therefore preventing it from repairing DNA adducts concomitantly induced by temozolomide. As a result, the synergistic combination of O6-benzylguanine that is “mistakenly” targeted by the MGMT DNA repair enzyme and temozolomide may result in the restoration of the tumor sensitivity to the alkylating agent and the maximization of its cytotoxic effect. Although preliminary results obtained on cell lines and preclinical studies indeed showed an increase in the therapeutic efficacy of temozolomide when combined with O6-benzylguanine, a phase II clinical trial in pediatric patients with recurrent or progressive high grade gliomas did not display a significant improvement compared to temozolomide alone (Warren et al. 2012). The limited efficacy in clinical practice has been attributed to the inactivation of MGMT also in normal tissues, thus resulting in severe side effects of alkylating agents that require to be used at lower doses (Quinn et al. 2009; Kaina et al. 2010; Pourquier 2011). As previously pointed out, the resort to alternative delivery routes, and especially to locoregional administration, as well as the design of tumor-targeted MGMT inactivators may improve the therapeutic benefit of alkylating agents. Combination of temozolomide and O6-benzylguanine could further be

complemented by inhibition of other molecular pathways involved in DNA reparation and drug resistance.

Circumvention of drug resistance can also be achieved by epigenetic modulations that may alter the DNA repair machinery (Kelland 2007; Wang et al. 2009; Shen et al. 2012; O’Grady et al. 2014; Zhou et al. 2014). DNA demethylating agents are able to reverse hypermethylation of genes involved in the DNA mismatch repair (MMR) pathway whose alteration participates in cell resistance to platinum compounds and is of bad prognosis for patients with ovarian carcinoma. Following the demonstration of the proof-of-concept of this synergistic effect in preclinical models using MMR deficient platinum-resistant human ovarian or colon carcinoma cells, a phase II clinical trial in patients with platinum-resistant ovarian carcinoma supported impairment of gene methylation by low-dose decitabine administration and subsequent alteration of the MMR pathway to restore sensitivity to carboplatin, resulting in high response rates and extended progression-free survival (Matei et al. 2012). Furthermore, the authors emphasize that a panel of various genes involved in cell sensitivity or resistance mechanisms may require respective reactivation or deactivation to achieve a high anticancer efficacy and subsequent clinical outcome of platinum-based therapy as managed in the case of testis cancer. Five clinical trials are currently ongoing with the aim of investigating the therapeutic benefit of epigenetic modulation strategies by genes hypomethylation using decitabine prior carboplatin treatment in leukemia, metastatic triple negative breast cancer and ovarian cancer. Gene expression and the molecular pathways below may also be modulated through miRNAs that play a key role in the development, from cell differentiation to apoptosis. The involvement of miRNAs in oncogenesis and cancer progression is now acknowledged (Garzon et al. 2009; Visone & Croce 2009). Correlations between miRNA expression and clinical outcome in cancer patients have been investigated retrospectively with the perspective of bringing predictive biomarkers of solid tumors prognosis into the clinic. Indeed, profiling enables to assess the changes that miRNAs undergo through amplification, depletion, mutation or epigenetic silencing in a specific pathology in comparison to normal tissue (Croce 2009). Growing evidence suggests that various miRNAs are involved in the mechanisms of drug resistance in glioma (Chen et al. 2015). In high-grade glioma patients, miR-873 level was reported to be inversely correlated with Bcl-2 level, an anti-apoptotic protein. Whereas miR-873 was down-regulated in cisplatin-resistant glioma cells, its overexpression restored cell sensitivity to cisplatin by

decreasing the level of Bcl-2, resulting in limited cell proliferation, migration and invasion capacity while increasing apoptosis. As a result, miR-873 could allow for predicting cell resistance and sensitizing cells to cisplatin treatment (Chen et al. 2015). The down-regulation of miR-136 in patients with glioma was associated with aggressive tumor progression and poor prognosis. Conversely, up-regulation of miR-136 expression was reported to significantly inhibit drug resistance mechanisms through depletion of the E2F transcription factor 1 (E2F1) and Bcl-2 oncogenes. As a result, expression of the tumor suppressor miR136 could be able to reverse cell resistance to platinum compounds, thus potentiating their cytotoxicity (Yang et al. 2012; Chen et al. 2014). Therefore, modulation of miRNA expression could reverse drug resistance and maximize the cytotoxicity of alkylating agents and platinum derivatives with the view of using them through innovative synergetic strategies.

For the last two decades, therapeutic developments in oncology have focused on targeting specific molecular alterations defined as hallmarks of tumor initiation and progression (Hanahan & Weinberg 2000; Kelland 2007; Hanahan & Weinberg 2011). Although the therapeutic efficacy of such chemotherapeutics might be limited as a monotherapy, their combination with other antineoplastic agents have shown great promise. Bevacizumab, a humanized monoclonal antibody that targets vascular endothelial growth factor (VEGF), is a key example as its capacity to inhibit angiogenesis alone did not significantly improve clinical outcome in patients. However, its use in combination with carboplatin and paclitaxel regimen has significantly improved the survival of patients with non-small cell lung cancer and has thus been defined since 2006 as the standard-of-care for unresectable, locally advanced, recurrent or metastatic non-small cell lung cancer by the FDA (Kelland 2007). Another example of the synergetic combination of platinum compounds with molecularly targeted drugs relies on the anti-HER2 humanized antibody trastuzumab. After preclinical studies have shown that a mouse antibody directed against the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) was able to inhibit DNA repair following exposure to cisplatin, three phase II clinical trials in patients with HER2-positive breast cancer have investigated a potential synergetic effect between trastuzumab, docetaxel and cisplatin or carboplatin. This combination led to an improved clinical outcome characterized by higher overall response rates and an extended median time to progression (Pegram et al. 2004; Hurley et al. 2006). Further investigations are required to accurately assess the therapeutic benefit of trastuzumab in combination with platinum derivatives.

Molecular targeting can also reroute alkylating agents and platinum compounds towards alternative and neglected targets of their cytotoxic potential, including mitochondria. The dense and highly hydrophobic structure constituting the inner mitochondrial membrane makes it barely accessible to chemotherapeutics. Fonseca and collaborators report the first successful delivery of an alkylating agent, namely chlorambucil, to mitochondria through engineered mitochondria-penetrating peptides (MPPs) that are able to cross both the plasma and the mitochondrial membranes. Mitochondrial targeting of chlorambucil demonstrated a dramatic potentiation of its anticancer activity in various cancer cell lines by promoting apoptosis and evading deactivation processes that commonly occur within the cytosol (Fonseca et al. 2011). Another study based on the use of MPP reports the development of a cisplatin analog that specifically targets mitochondria (mtPt). Interestingly, mtDNA damage was sufficient to induce cytotoxicity and promote apoptotic cell death without impairing nuclear DNA or entailing cell cycle arrest (Wisnovsky et al. 2013). Therefore, mitochondria-specific targeting should be reconsidered for implementing innovative and efficient anticancer strategies. Translation to the clinic could further allow for circumventing drug resistance mechanisms related to DNA reparation and drug detoxification in order to reach an unmatched anticancer activity, a huge challenge that alkylating agents and platinum derivatives are ready to take up since they remain crucial in current oncology practice.

Ongoing efforts to overcome drug resistance have led to the development of new alkylating agents (see Table 2.1). Among them, trabectedin, a natural-derived compound that binds the DNA minor groove, has shown promising results in the treatment of soft tissue sarcoma, breast cancer and platinum-resistant ovarian carcinoma, both as a single agent or in combination with various chemotherapeutics (Cassier et al. 2010; Ferrandina et al. 2013). Since trabectedin directly interacts with proteins involved in the homologous recombination repair machinery, its anticancer activity could further be maximized by specifically inhibiting these molecular pathways in cancer cells, an alternative that shows great promise in preclinical models (Pourquier 2011). In that way, a better understanding of the processes induced by alkylating agents that occur both at the cellular and molecular levels could allow for finding out new effective combinations with other chemotherapeutics either to restore cell sensitivity to the drug by epigenetic modulations, to bypass drug resistance mechanisms, or to target specific organelles that can mediate cytotoxicity, and therefore reach a synergy of action and potentiate anticancer activity in order to improve the response rate and overall

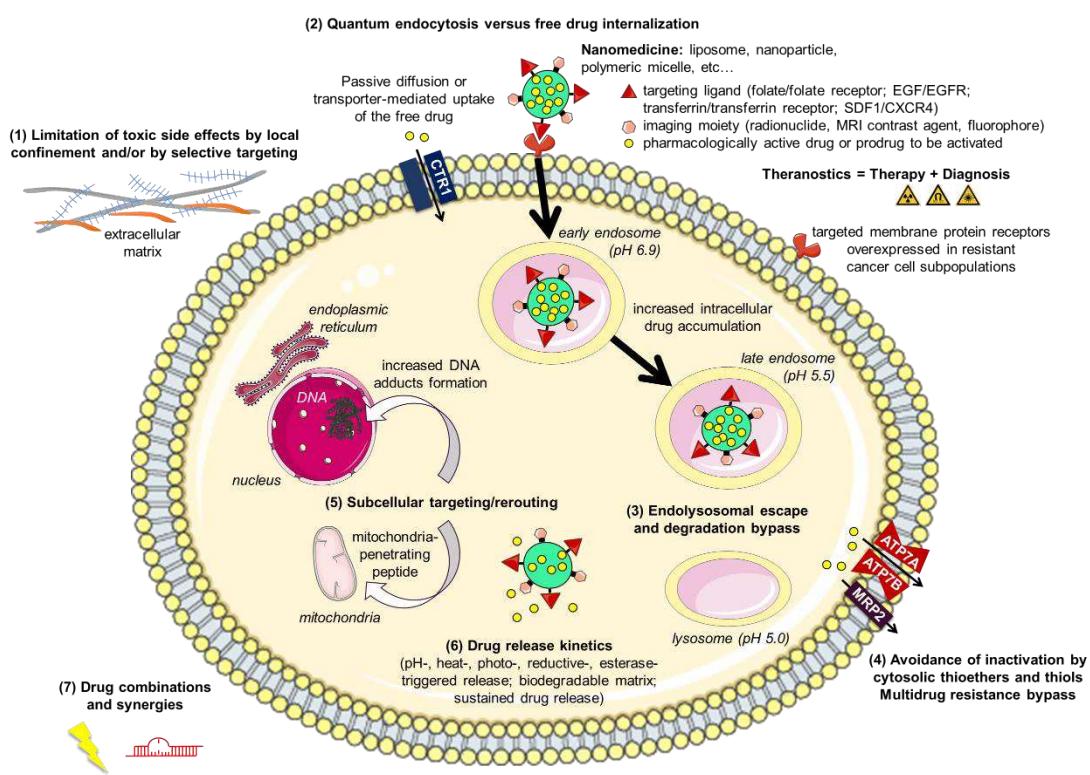
clinical outcome. In a further effort to develop innovative therapeutic systems that allow for a specific targeting of cancer cells or organelles and/or for the monitoring of the drug biodistribution within the organism, we will now address the keen interest of designing efficient drug delivery systems intended for encapsulating alkylating agents or platinum derivatives.

## 2.4. Development of smart nanocarriers

Nanotechnologies may offer tremendous opportunities due to their size (less than 1 µm at least in one direction) and versatility of structure. Biodegradable drug delivery systems including liposomes, nanocapsules, dendrimers, polymeric nanoparticles or micelles are able to release their bioactive cargo in a highly confined and localized manner at the tumor site, thus concentrating drug efficacy on its target and preventing from systemic adverse toxicity. Owing to their broad anticancer spectrum, alkylating agents and platinum derivatives have become a mainstay of cancer chemotherapy; this, despite their systemic toxicity and refractory tumor types. Therefore, DDS have been widely investigated with the view of potentiating their efficacy. Figure 2.4 summarizes the advantages of the vectorization of alkylating agents and platinum derivatives over traditional regimens.

DDS have been described to substantially improve the therapeutic benefit of drugs by passively targeting the tumor through the enhanced permeability and retention effect (EPR) (Matsumura & Maeda 1986; Maeda et al. 2013; Maeda 2015; Maeda et al. 2016). Whereas free drugs diffuse in a non-specific way to reach every cell, macromolecular nanocarriers could escape from the leaky endothelial tissue of blood vessels that surround the tumor due to anarchic and impaired angiogenesis. In addition, defective lymphatic drainage may be responsible for retention of DDS within the tumor tissue, thus promoting accumulation of drugs in close vicinity of their target (Peer et al. 2007; Harper et al. 2010). Based on this paradigm, several works report the encapsulation of alkylating agents or platinum derivatives into various systems in order to prevent from systemic toxicity (Nishiyama et al. 2003; Cabral et al. 2005; Nishiyama & Kataoka 2006; Ye et al. 2006; Matsumura & Kataoka 2009; Harper et al. 2010; Ding et al. 2011; Kowalcuk et al. 2011; Huynh et al. 2012; Cabral & Kataoka 2014; Li et al. 2014; Duan et al. 2015; Johnstone et al. 2016; Parhizkar et al. 2016). Polymeric micelle formulations of cisplatin were reported to reduce peripheral neurotoxicity, nephrotoxicity and ototoxicity that are of particular concern in clinical practice in comparison

with the free drug following intravenous injection in preclinical models (Baba et al. 2012). Another key advantage of DDS relies on their ability to release the drug in a controlled manner after administration, thus modulating the pharmacokinetic profile of the free drug for an optimized treatment (Nishiyama & Kataoka 2006; Zhou et al. 2012; Filippoussi et al. 2016). For instance, poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles encapsulating cisplatin exhibited an extended release over time in phosphate buffered saline characterized by an initial burst release followed by a sustained low-dose release for twelve days that could be highly beneficial (Parhizkar et al. 2016). In addition, a controlled release of the drug over time enables to reduce systemic side effects (Uchino et al. 2005; Matsumura 2008; Harper et al. 2010; Oerlemans et al. 2010; Stathopoulos & Boulikas 2012; Patra & Turner 2014; Li et al. 2017; Xu et al. 2017).



**Figure 2.4:** Advantages of nanovectorization of alkylating agents or platinum derivatives over traditional regimens

Besides, with the rationale that the tumor microenvironment is more acid than normal tissue, pH-responsive DDS can be designed to deliver their cargo only under certain conditions of pH, thus aiming at concentrating its therapeutic efficiency in close vicinity of the tumor while sparing other tissues. A yolk-like nanoplatform formed by a ferric oxide core and a mesoporous gadolinium oxide layer shell coated with poly(ethylene glycol) (PEG) and folic acid, with a large cavity in between where cisplatin could be efficiently loaded, has recently been tested in preclinical model as a pH-responsive DDS. Indeed, the nanosystem demonstrated a pH-dependent release of cisplatin that could barely be released at physiological pH but whose release rate was inversely correlated with the pH of the medium. This effect was assumed to be related to the easy protonation in acidic environment of amino groups ( $-\text{NH}_2$ ) within the DDS structure to which cisplatin was initially coordinated. As a result, the more the pH decreases, the more hydrogen protons are available and the more they substitute platinum complexes conjugated to amino groups, thus releasing cisplatin (Sun et al. 2017). Other adaptive systems have been designed based on polymeric amphiphilic micelles (Van Butsele, Fustin, et al. 2009; Van Butsele, Cajot, et al. 2009; Cajot et al. 2012). Functionalization of block copolymer micelles by azido groups allowed the micellar system for cross-linking *via* redox-sensitive disulfide bridges by click chemistry. Thus, reversible cross-linking that can be modulated by reductive conditions was achieved with the aim of preventing micelles from dissociation upon systemic intravenous injection due to high dilution and of triggering the drug release in a reductive environment, namely the lysosome and endosome (Cajot et al. 2011).

DDS are of high interest to extend the drug lifetime in the general circulation and protect it from deactivation until it reaches its target. First generation liposomes relied on their recognition by the immune system through plasma proteins and subsequent phagocytosis by Kupffer cells, a process called opsonization, with the aim of handling hepatic pathologies (Peer et al. 2007). Conversely, second-generation liposomes were coated with water-soluble poly(ethylene glycol) (PEG) polymers in order to further sterically stabilize their structure and to decrease immunogenicity to prevent from quick premature clearance (Moses et al. 2003). As a result, stealth PEGylated liposomes displayed a circulation half-life that could exceed forty hours with less than 15% of the injected amount of liposomes facing liver filtration (Harper et al. 2010). The PEG corona surrounding the nanosystem has also been reported to improve the solubility of the drug, its uptake and retention within the tumor tissue, thus

allowing for potentiating the therapeutic benefit of the free drug in the treatment of various tumor types (Harper et al. 2010). Alternative routes have also been investigated to convey drugs to their target, especially in glioma where brain penetration is hampered by the blood-brain barrier. Local infusion of liposomes (Saito et al. 2004; Krauze et al. 2007; Yamashita et al. 2007), nanoparticles (Zhang et al. 2017) or polymeric micelles (Zhang et al. 2016) by convection-enhanced delivery within the brain parenchyma has been evaluated in rat brain tumor xenografts, in canine spontaneous brain tumors (Dickinson et al. 2010) as well as in the normal brain of non-human primates (Krauze et al. 2005; Saito et al. 2005). CED of DDS was reported to substantially enhance the distribution volume of the system in comparison with the free drug, as well as to reduce toxicity and prolong half-life (Zhou et al. 2012). As a result, CED of DDS loaded with alkylating agents or platinum compounds could maximize their therapeutic efficacy in the treatment of glioma by promoting an increased accumulation of the drug within the tumor tissue while sparing the healthy brain.

Engineering of DDS could also allow for overcoming drug resistance, which is especially attributed to a reduced intracellular accumulation. In particular, cellular uptake of Lipoplatin, a liposomal formulation of cisplatin, is assumed to occur by direct fusion with the cell membrane, thus bypassing the CTR1 transporters required by free cisplatin molecules to enter the cells (Boulikas 2009). This allowed for a substantial therapeutic benefit in phase II and III clinical trials in patients with non-small cell lung cancer, even after the development of resistance to platinum-based therapy (Xue et al. 2013). An impaired influx can go along with an increased efflux to substantially reduce intracellular accumulation of the drug. Poloxamers, which consist of amphiphilic block copolymers able to self-assemble into micelles, and among them the Pluronic triblock copolymers P85 ( $\text{EO}_{26}\text{-PO}_{40}\text{-EO}_{26}$ ), have been reported to accumulate within resistant cancer cells and intracellular organelles from where they alter metabolic processes involved in drug efflux and detoxification processes, thus resulting in a markedly higher cell sensitivity to various chemotherapeutics (Batrakova, Li, Vinogradov, et al. 2001; Batrakova, Li, Elmquist, et al. 2001; Exner et al. 2005). P85 especially inhibits the P-glycoprotein (Pgp) drug efflux system through an increased fluidization of the cell membrane that may decrease fixation of ATP to Pgp, yet mandatory for ATP hydrolysis, and further impair the ATPase activity (Batrakova, Li, Vinogradov, et al. 2001). As a result of the substantial defect in ATP, Pgp requires even more energy to carry out its normal functions, resulting in a reduced drug efflux (Batrakova, Li, Vinogradov, et al. 2001; Batrakova, Li,

Elmquist, et al. 2001). Therefore, P85 may allow for circumventing multidrug resistance (MDR) (Xue et al. 2013). Besides, poloxamers have also been reported to interfere in the glutathione pathway. Thus, using poloxamers to convey cytotoxic drugs could offer promising alternatives to improve anticancer therapy (Amiji et al. 2002; Exner et al. 2005). Overexpression of glutathione S-transferase (GST) is a common feature of cells resistant to cisplatin. These enzymes catalyze drug detoxification process by conjugation with GSH. Inhibition of GST by ethacrynic acid (EA) may therefore improve the cytotoxic effect of cisplatin by circumventing its deactivation once within the cytosol. Nanovectorization through polymeric micelles of ethacraplatin, a Pt(IV) prodrug based on an EA backbone, was reported to enable a sustained release of its cargo of EA and active Pt(II) complexes within the lysosome and endosome of cisplatin resistant cells, resulting in a significant inhibition of the GST activity and an improved anticancer activity in BEL7404 hepatocellular carcinoma cell lines compared to both free cisplatin and EA-Pt conjugates. Interestingly, the resistance factor of such bifunctional micelles was estimated at 1, indicating a substantial reversal of cisplatin resistance owed to effective GST inhibition. The markedly higher uptake of micelles compared to free ethacraplatin resulted in a more effective inhibition of GST, hence an increased cytotoxicity. *In vivo*, ethacraplatin micelles significantly contained tumor growth compared to control groups treated with cisplatin or EA-Pt conjugates. Histological analysis further confirmed that ethacraplatin micelles were able to induce necrosis within the tumor tissue without damaging the kidneys, contrary to free cisplatin whose clinical benefit remains limited by a high nephrotoxicity (Li et al. 2017). Another way to reverse drug resistance could rely on the ability of histone deacetylases inhibitors, and among them the FDA-approved vorinostat, to impair gene transcription in cancer cells, thus resulting in apoptotic cell death. Combination of alkylating agents or platinum derivatives and vorinostat could be of great interest since hyperacetylation prevents histones from binding to DNA, leaving it more accessible to alkylation. Engineering of micelles based on a conjugate of cisplatin coordinated to vorinostat was reported to dramatically improve the anticancer potential of the combined free drugs on non-small cell lung cancer both *in vitro* and *in vivo*, especially through reversal of drug resistance mechanisms (Xu et al. 2017). Indeed, after its cellular uptake, the cisplatin-vorinostat conjugate forming the micelles gets hydrolyzed, which makes it release both drugs simultaneously for a synergistic effect. Vorinostat inhibits histone deacetylase and may concomitantly increase the production of reactive oxygen species within cells that causes

GSH depletion. Meanwhile, cisplatin binding to DNA thanks to the slackening of the chromatin structure entails a down-regulation of the expression of anti-apoptotic protein BCL-2. Compared to the combination of the free drugs, the nanoconjugate exhibited an extended half-life in the blood and an increased accumulation within the tumor, thus resulting in a defective intracellular concentration of GSH and higher amounts of Pt-DNA adducts that were closely associated with the down-regulation of MRP1 and BCL-2 proteins. Furthermore, it is worth emphasizing that nanovectorization enabled to achieve a markedly improved synergistic effect after concomitant release of both drugs compared to the administration of their free analogs whose different pharmacokinetic profiles hamper synergism (Xu et al. 2017). Besides, the mechanism behind cellular uptake of DDS, extensively defined in the literature to occur by endocytosis, limits the major hurdle of drug resistance by bypassing membrane transporters and subsequent intracellular trafficking (Xue et al. 2013).

Endocytosis controls the composition of the plasma membrane and therefore determines subsequent cellular interactions with the environment, including nutrients, therapeutic nucleic acids and proteins uptake (Doherty & McMahon 2009; Lehner et al. 2013). Phagocytosis, clathrin-mediated or caveolar endocytosis and macropinocytosis constitute some of the main endocytic pathways widely detailed in the literature (Khalil et al. 2006; Doherty & McMahon 2009; Ziello et al. 2010). Briefly, endocytosis consists of the deformation of the plasma membrane that invaginates and forms endocytic vesicles that further break away from the initial membrane and are routed within the cell. Endocytosis has been extensively described as the key mechanism of DDS uptake within cells (Qian et al. 2002; Moses et al. 2003; Hillaireau & Couvreur 2009; Lehner et al. 2013; Cabral & Kataoka 2014; Nazir et al. 2014; Patra & Turner 2014; Bregoli et al. 2016; Cai et al. 2017; Sun et al. 2017; Zabielska-Koczywąs & Lechowski 2017). As illustrated by Figure 2.4, cargoes conveyed to the cell through various endocytic pathways remind of the Trojan horse since they bypass channel or protein membrane transporters that commonly handle and regulate cellular uptake (Xue et al. 2013; Cai et al. 2017). Advantage is widely taken from this process to dramatically increase the drug accumulation within cells. Indeed, whereas free molecules of drug enter the intracellular space one by one either by passive diffusion through the membrane or by active transport, endocytosis of DDS, although slower, enables the entry of quanta of active molecules, thus resulting in a significant increase in cellular uptake. The high intracellular accumulation of drugs is associated with the formation of even more DNA adducts that

further supports a markedly enhanced antitumor activity of alkylating agents and platinum derivatives loaded into nanocarriers whatever the resistance status of the cells (Charest et al. 2010; Tippayamontri et al. 2011; Duan et al. 2015; Li et al. 2017; Sun et al. 2017; Xu et al. 2017). Accumulation of platinum from DDS in the tumor tissue has been further confirmed in preclinical models (Matsumura & Kataoka 2009). Furthermore, fluorescent labeling of polymeric micelles suggested that they were preferentially localized within acidic organelles (Duan et al. 2015). As a result, endocytic pathways may convey active molecules protected from deactivation by the plasma membrane vesicle from early endosomes to the late endosomes and lysosomes, thus favoring the release of the drug in close vicinity of the nuclear and further promoting interactions with DNA (Lehner et al. 2013). It is worth noticing that the clathrin-mediated endocytosis mainly leads to degradation of the DDS into the lysosomes whereas caveolin-mediated endocytosis prevents the drug from enzymatic degradation or deactivation (Bregoli et al. 2016). Uptake of DDS can also be mediated through surface-functionalization with various ligands such as folate or transferrin that actively target the corresponding membrane protein receptors, over-expressed in cancer cells, which promote endocytic pathways (Lehner et al. 2013).

DDS can specifically target cancer cells through ligands that bind to receptors over-expressed on their surface, such as folate and epidermal growth factor receptors, while sparing normal cells (Peer et al. 2007; Lehner et al. 2013; Xue et al. 2013). They can also be designed to target a specific organelle within the cell whose alteration would trigger a cell signaling cascade to ultimately induce apoptotic cell death. Since resistance to cisplatin is partly linked to an extensive repair of Pt-DNA adducts by the nucleotide excision repair (NER) machinery, rerouting the drug towards mitochondria whose DNA lacks such repair mechanisms may overcome resistance and enhance therapeutic efficiency. In this view, polymeric micelles encapsulating a Pt(IV) prodrug (Platin-M) were functionalized with a terminal triphenylphosphonium cation with the aim of specifically targeting mitochondria of cancer cells that are commonly characterized by an increased mitochondrial membrane potential compared to normal cells (Marrache et al. 2014). Due to the highly anionic components of the brain endothelium and basement membrane, cationic lipophilic nanoparticles could be selectively uptaken by brain cells. Cytotoxic effect of mitochondria-targeting micelles encapsulating Platin-M was 17-fold higher compared to free cisplatin in neuroblastoma cells. This markedly enhanced anticancer activity was attributed to the sustained release of active

Pt(II) complexes from Platin-M locally within the mitochondrial matrix and subsequent mtDNA damage leading to apoptotic cell death. Further investigations in cisplatin-resistant ovarian cancer cell lines demonstrated substantial accumulation of Platin-M within hyperpolarized mitochondria (Marrache et al. 2014). These results support the aforementioned strategy that aims at specifically addressing alternative targets of cisplatin anticancer activity in order to improve the clinical outcome, especially in resistant advanced cancers.

Smart tunable DDS can also be designed by using other therapeutic agents or strategies for reaching a synergistic effect, or imaging moieties for the purpose of multifunctional applications. Nanovectorization of drugs whose mechanisms of action complement each other or even reach a synergistic effect may further amplify this therapeutic benefit, as it was proposed in the case of a combination of taxanes with Lipoplatin rather than free cisplatin (Boulikas 2009). Furthermore, new effective drug combinations may be considered thanks to the reduced systemic toxicity that go along with the resort to nanocarriers. Co-delivery of alkylating agents or platinum derivatives and microRNA whose involvement in the tumorigenesis has been identified could enable to impede cell proliferation and invasiveness. MiR-375 up-regulation has been reported to significantly hamper tumor progression in hepatocellular carcinoma both *in vitro* and *in vivo*. Therefore, lipid-coated nanoparticles loaded with cisplatin and miR-375 were developed with the aim of reversing resistance in hepatocellular carcinoma. Multiple injections of this dual DDS in a rodent model of primary hepatocarcinoma significantly inhibited tumor progression and extended the progression free survival of animals compared to control groups treated with PBS, free cisplatin or even lipid-coated nanoparticles loaded with cisplatin only (Yang et al. 2016). The synergistic effect of the co-delivery of cisplatin and miR-375 made it possible to get rid of cisplatin-resistant hepatocarcinoma cells within the tumor tissue, thus limiting tumor relapse that commonly occurs following the treatment. Therefore, the nanovectorization of a microRNA that modulates gene expression and subsequently alters the cell signaling cascades below, together with an alkylating agent or platinum complex that exhibits high anticancer activity, opens up new avenues for synergistic combinations that could revolutionize the clinical management of cancer patients.

Combinatorial alternatives that combine nanomedicine and other key therapeutic strategies may also have great potential in the clinic. One example relies on the investigation of the

radiosensitizing effect of gold nanoparticles due to high X-ray absorption (Hainfeld et al. 2004; Hainfeld et al. 2008; Hainfeld et al. 2010; Hainfeld et al. 2013). Alkylating agents and especially high-Z platinum compounds are commonly used as radiosensitizers. Their incorporation into various DDS could therefore potentiate their therapeutic benefit in synergy with radiation therapy (Miladi et al. 2015). For instance, mesoporous silica nanoparticles encapsulating topotecan has enabled to significantly increase the anticancer activity of the free drug in doxorubicin-resistant breast cancer cell lines, but also to achieve a strong synergistic effect with high-energy X-ray irradiations, thus overcoming drug resistance mechanisms (Shen et al. 2015). Surface-functionalization of DDS with radiopharmaceutics could also allow for targeted nuclear medicine, providing the nanosystem with an additional modality based on medical imaging. This way towards theranostics – merger between the words “therapy” and “diagnosis” – may be a promising application of DDS in the near future.

For about ten years, various multifunctional nanoplatforms have been engineered based on different architectures, including doped hybrid silicas, quantum dots or iron oxides, with the aim of combining therapy through an effective targeted transport of drugs or sensitizer agents and diagnostic thanks to the functionalization of DDS with several contrast agents depending on the imaging modality. However, such nanocarriers have to be small enough to be excreted from the organism, which may seem incompatible with their multifunctional goals and the high payload required for effective activity (Miladi et al. 2015). From the perspective of personalized medicine, multifunctional nanodevices may enable to gather large amount of information relevant to patient care (McCarthy & Weissleder 2008). Therefore, combinatorial systems have been developed to allow for real-time monitoring of the treatment efficiency. Some of these nanodevices further require a specific stimulus, either physical, i.e. light or heat, or chemical, i.e. hypoxic conditions or oxidative stress, to release their pharmaceutically active payload (Nishiyama & Kataoka 2006; Cao et al. 2015). The therapeutic benefit of such DDS can be potentiated by real-time monitoring of their biodistribution within the organism. In the following, we will focus on three representative examples of complex theranostic nanoplatforms that carry drugs – alkylating agents or platinum derivatives –, display imaging properties and take advantage of potential synergies previously discussed. Yoo and collaborators developed targeted nanoparticles based on superparamagnetic iron oxides that have shown high potential for theranostic applications, both as nanocarriers and as magnetic resonance imaging (MRI) negative contrast agents. The nanoparticle was conjugated with

small interference RNA (siRNA) to MGMT intended to sensitize glioblastoma cells to temozolomide, and chlorotoxin, a peptide that specifically targets glioblastoma but also exerts an intrinsic cytotoxic activity against glioma. The high cellular uptake of the nanoparticles was associated with a significant decrease in MGMT gene expression. Locoregional administration of the targeted nanoprobes within the tumor tissue of glioblastoma bearing mice was followed by intraperitoneal injection of temozolomide for the next five consecutive days, for three cycles, followed by injection of temozolomide alone the fourth week. MRI scans were successfully performed to assess the biodistribution of the theranostic tool within the tumor tissue and the tumor margins. The combination of MGMT silencing, glioblastoma cells targeting and the anticancer activity of both temozolomide and chlorotoxin achieved a significant tumor growth inhibition compared to control groups that can be attributed to the synergistic effects of reversal of resistance mechanisms to temozolomide and further potentiation of its anticancer activity (Yoo et al. 2014). Another possible theranostic systems relies on the development of hybrid temperature-responsive polymeric nanogels made of poly(vinyl alcohol) and immobilizing quantum dots. Temozolomide was loaded within the gel by complexation. Drug release was regulated by temperature, with a high releasing rate at 40 °C corresponding to the volume phase transition the nanogel would undergo in pathological conditions with enhanced metabolic activity, compared to a low fraction of drug released at 37 °C in healthy tissues. Concurrently with drug release, strong fluorescent signals were recorded from the quantum dots previously immobilized within the gel, allowing for monitoring the drug release progress and biodistribution within the tumor tissue. The proof-of-concept of the potential theranostic application of such nanoplatforms was further validated by both a high uptake and anticancer activity in mouse melanoma cells (Zhu et al. 2012). A last example is based on the synthesis of a Pt(IV) prodrug functionalized with a tripeptide for active targeting of the  $\alpha_v\beta_3$  integrin commonly overexpressed in cancer cells and an apoptosis sensor composed of a fluorophore and a caspase-3 enzyme specific peptide. After binding to  $\alpha_v\beta_3$  integrins at the cell surface promoted its uptake, the Pt(IV) prodrug was reduced to active Pt(II) complexes within the cytosol and concomitantly released the apoptosis sensor. The apoptotic cell death signaling cascade triggered by cisplatin activity further activated the caspase-3 enzyme that cleaved the peptide sequence of the apoptosis sensor, resulting in fluorescence emission. Such nanosystems are of high interest for the real-time monitoring of the early therapeutic efficiency of a drug and of patient response to the treatment since they

enable the non-invasive quantification of drug-induced apoptosis directly *in situ* (Yuan et al. 2014). Interestingly, high Z platinum atoms could further enhance beam radiation efficiency in a synergistic radiosensitizing approach and therefore increase DNA damage. In conclusion, the rise of various nanosystems with integrated smart functions has already pushed the frontiers of science by making it possible to develop complex systems that are able not only to drive the chemotherapeutic drug to its target but also to monitor its impact, or even amplify it.

## Concluding remarks

In conclusion, although they display a broad spectrum of anticancer activity in solid tumors, alkylating agents and platinum derivatives still suffer from huge limitations due to resistance mechanisms and sub-optimal routing both within the tumor tissue and cells. This review aimed at addressing the key question on how to envision the future of alkylating agents and platinum compounds in the clinic. Indeed, despite the innovative development of a huge arsenal of smart nanoplatforms that combine cancer cells' targeting and imaging moieties in order to improve the therapeutic index of the free drug, we should keep in mind that therapeutic strategies have to stay simple enough and relevant with the needs and daily clinical practice for a fast translation into the clinic. Although cisplatin has revolutionized the prognosis of testis cancer, it only marginally improves the clinical outcome of glioblastoma patients. Protection and isolation of the central nervous system from the rest of the organism by the blood brain barrier, drug resistance mechanisms and sub-optimal treatment schedule constitute as many issues that were partly addressed through the development of locoregional strategies, the synergistic delivery of various non-coding RNAs with the purpose of modulating the expression of genes and the cellular and molecular signaling cascades below to restore cell sensitivity to the drug, or synergistic combinations with other chemotherapeutics or conventional strategies through radiosensitive chemotherapy. Growing evidence supports the reality of alternative and by now neglected targets, and therefore the necessity to think back cisplatin addressing and trafficking towards cancer cells. Far from Ehrlich's magic bullet, current therapeutic strategies remain focused on broad treatments upon organs and tissues that address symptoms rather than a causal entity of cancer. Still, we do believe that alkylating agents and platinum derivatives have a pivotal role to play in the near future and great promise for further applications in the treatment of solid tumors.

## OUTSTANDING QUESTIONS

Are strategies to circumvent drug resistance mechanisms faced by alkylating agents and platinum derivatives the key for an improved clinical outcome in cancer patients?

Which alternative molecular pathways and organelles in cancer cells, yet neglected in current clinical practice, could constitute prime targets of the therapeutic efficiency of alkylating agents and platinum compounds?

How to achieve a successful treatment schedule combined with an efficient topographic delivery of alkylating agents and platinum derivatives in cancer cells?

Would the therapeutic arsenal offered by alkylating agents and platinum derivatives benefit from nanomedicines in the management of solid tumors?



---

## Chapitre 3 : Genèse du Projet

---



## Genèse du projet

### Table des matières :

1. MATERIEL	94
2. TECHNIQUES DE CARACTERISATION	95
3. SYNTHESE, FONCTIONNALISATION ET CARACTERISATION DES COPOLYMERES	100
3.1. Synthèse d'un macroagent de contraste IRM	100
3.2. Synthèse d'un copolymère amphiphile fonctionnalisable en vue d'une réticulation sur le cisplatine	109
4. FORMULATION ET CARACTERISATION DE NANOPARTICULES POLYMERES	119
4.1. Formulation de nanoparticules DTPA( $Gd^{3+}$ )PEO- <i>b</i> -PCL dédiées à l'imagerie par résonance magnétique	120
4.2. Formulation de nanoparticules PEO- <i>b</i> -poly[(carbonate-CO <sub>2</sub> PhF <sub>5</sub> )-co-(ε-CL)] réticulées sur le cisplatine	132
4.3. Préparation de nanoparticules mixtes	135
5. DISCUSSION	135



De nombreux travaux se sont intéressés aux copolymères séquencés dans la perspective de développer des nanovecteurs de drogues innovants (Osada et al. 2009; Van Butsele et al. 2009; Huynh et al. 2012; Mai & Eisenberg 2012; Cabral & Kataoka 2014). L'idée initiale du projet était de partir de deux copolymères amphiphiles biocompatibles, l'un avec des propriétés d'imagerie, l'autre avec des propriétés thérapeutiques, et de les associer lors de l'étape de formulation autour du cisplatine de façon à former des nanoparticules hybrides réticulées sur le cisplatine.

(i) La synthèse du premier copolymère, à base de poly(oxyde d'éthylène) (PEO) et de polycaprolactone (PCL), reprend les travaux menés par M. Grogna et collaborateurs sur la conception de macroagents de contraste IRM (Grogna et al. 2010). Celle-ci est illustrée en Figure 3.1. L'amorçage de la réaction de polymérisation par ouverture de cycle de l'oxyde d'éthylène à partir de l'alcool amorceur, le 3,3-diethoxypropan-1-ol, permet l'obtention d'un PEO fonctionnalisé par un acétal en bout de chaîne  $\alpha$ . Le groupement acétal peut aisément être déprotégé, en milieu aqueux à pH acide, en fonction aldéhyde, rendant ainsi possible le greffage par une réaction d'amination réductrice d'un complexe de gadolinium préalablement synthétisé à partir d'un ligand d'acide S-2-(4-aminobenzyl)-diéthylénetriamine pentaacétique (NH<sub>2</sub>-Bn-DTPA) et d'un sel de gadolinium. Un macroagent de contraste est ainsi obtenu, dont l'efficacité relaxométrique sera comparée à celle du Gd-DTPA, agent de contraste T<sub>1</sub> traditionnellement utilisé en routine clinique.

(ii) Le second copolymère, innovant et à visée thérapeutique, est formé par polymérisation par ouverture de cycle à partir d'un PEO méthyl éther commercial, d' $\epsilon$ -caprolactone et d'un carbonate cyclique, comme illustré par la Figure 3.2. Le monomère carbonaté a été synthétisé à partir d'acide 2,2-bis(hydroxyméthyl)propionique et de bis-(pentafluorophényl)carbonate dans le tétrahydrofurane anhydre, par catalyse avec le fluorure de césum (Sanders et al. 2010). La polymérisation par ouverture de cycle des deux monomères à partir du bout de chaîne hydroxyle terminal du PEO, catalysée par l'acide triflique dans le dichlorométhane anhydre, ainsi que la fonctionnalisation finale en deux étapes du copolymère obtenu, s'inspirent des travaux de l'équipe de Hedrick au centre de recherche IBM Almaden (San José, Californie) (Sanders et al. 2010; Engler et al. 2013; Engler et al. 2015). Les groupements pentafluorophényle pendant le long des séquences polycarbonate sont éliminés quantitativement par réaction d'acylation de l'aminopropan-1-ol sur l'acide carboxylique en solution dans le DMF. L'alcool résultant réagit ensuite avec l'anhydride succinique en

solution dans le DMF anhydre par une réaction d'estérification, générant ainsi des fonctions acide carboxylique réparties le long de la chaîne polycarbonate, nécessaires à la réticulation ultérieure du copolymère sur le cisplatine hydraté.

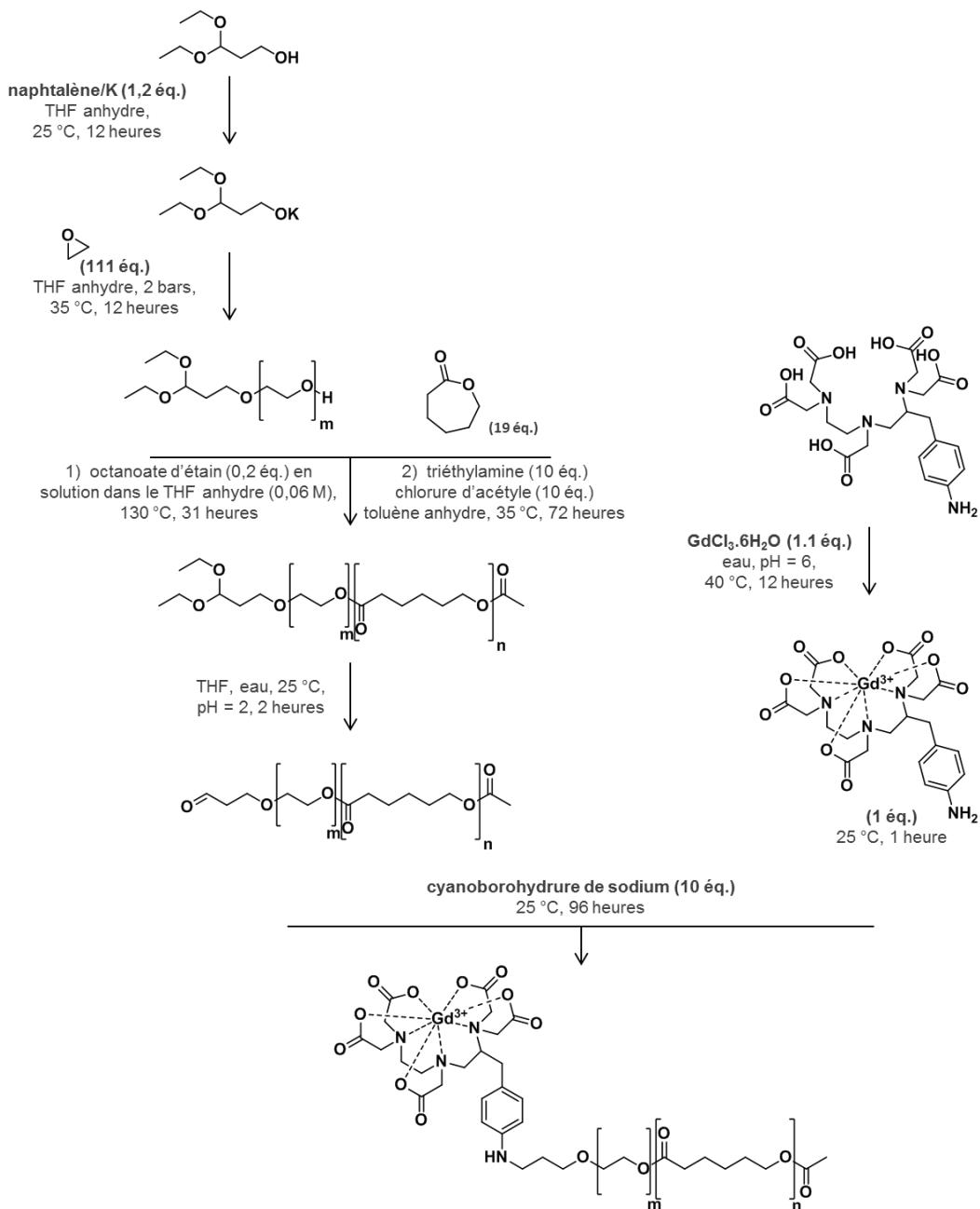


Figure 3.1 : Etapes de synthèse d'un macroagent de contraste IRM

sur la base d'un copolymère biséquéncé amphiphile  $\alpha$ -acétal-PEO-*b*-PCL

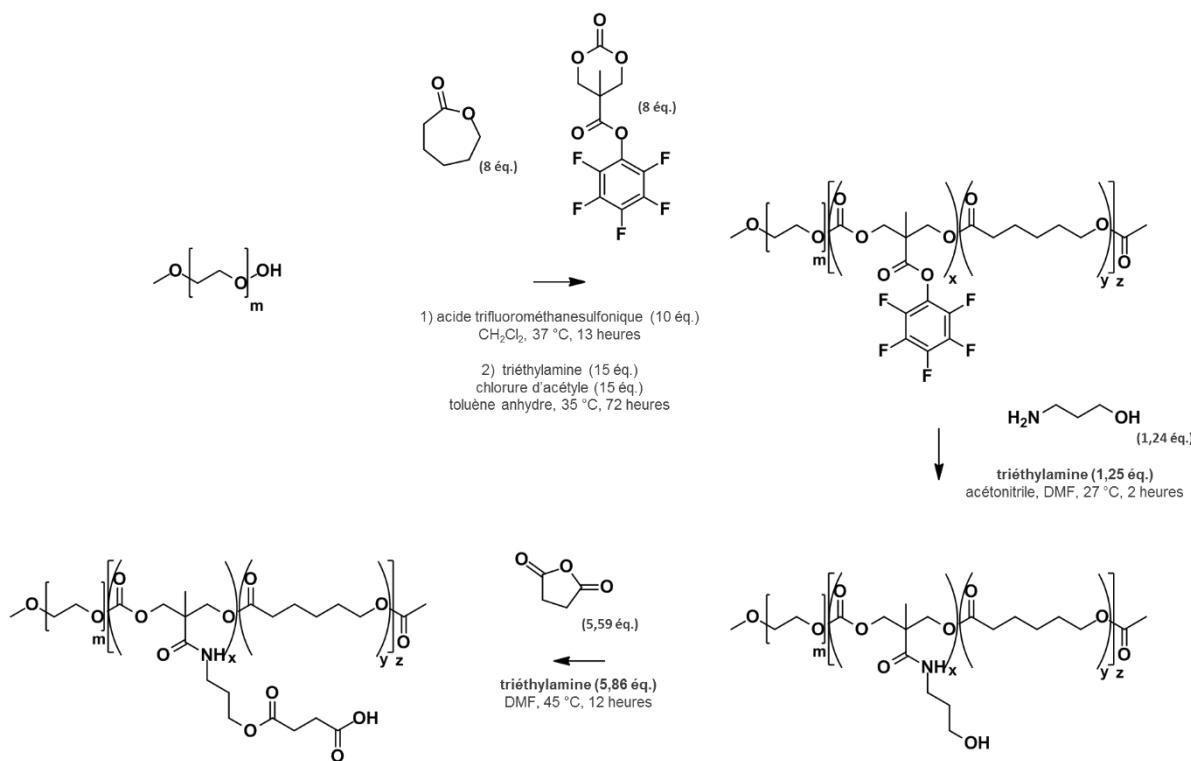


Figure 3.2 : Synthèse et fonctionnalisation d'un copolymère

PEO-*b*-poly[(carbonate- $\text{CO}_2\text{PhF}_5$ )-co-( $\epsilon$ -CL)]

L'autoassemblage spontané dans l'eau de ces deux copolymères aux propriétés amphiphiles devrait permettre la formation de nanosystèmes multifonctionnels réticulés sur le cisplatin et décorés de gadolinium en surface, comme schématisé par la Figure 3.3.

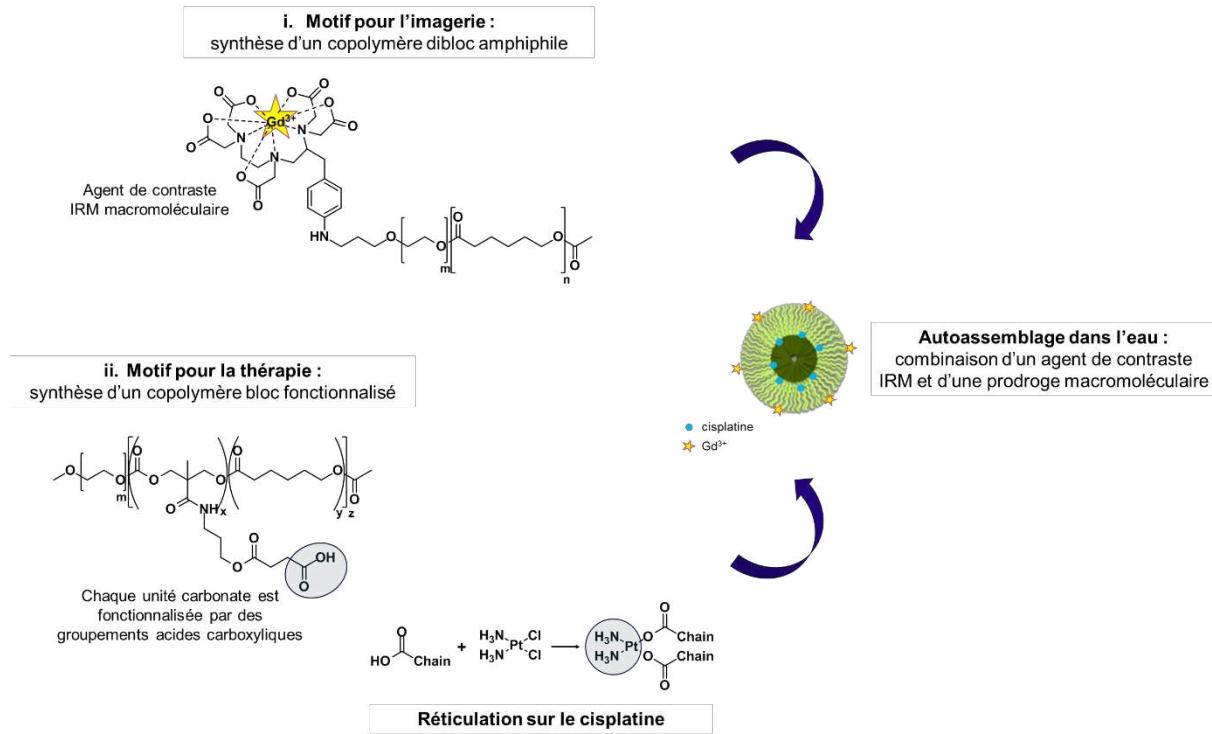


Figure 3.3 : Conception de nanoparticules hybrides à base de copolymères amphiphiles

## 1. Matériel

Le réacteur d'oxyde d'éthylène (99,9 %, Chemogas), le bis-(pentafluorophényl) carbonate (bis-PFC) (97 %, ABCR), le ligand d'acide S-2-(4-aminobenzyl)-diéthylènetriamine pentaacétique (*p*-NH<sub>2</sub>-Bn-DTPA) ( $\geq$  94 %, Macrocylics), le sulfate de magnésium (99 %, VWR), l'hydroxyde de potassium ( $\geq$  85 %, Acros Organics), l'hydroxyde de sodium (98 %, Acros Organics), le nitrate d'argent (> 99 %, Alfa Aesar) et la poudre de cisplatine (99 %, Strem Chemicals) ont été utilisés tels que reçus. Le potassium (99,9 %), le bis(2-éthylhexanoate) d'étain (95 %), le 3-aminopropan-1-ol ( $\geq$  99 %), l'acide 2,2-bis(hydroxymethyl)propionique (bis-MPA) (98 %), le fluorure de césum (99 %), l'acide trifluorométhanesulfonique ( $\geq$  99 %), l'acide chlorhydrique (fumant, 37 %) ou en solution à 1 M, l'anhydride succinique ( $\geq$  99 %), le Gd-DTPA (97 %), le chlorure de gadolinium hexahydraté (99,999 %), le cyanoborohydrure de sodium en solution dans le THF (1,0 M) ( $\geq$  95 %), l'hydrogénocarbonate de sodium ( $\geq$  99,5 %) et le bicarbonate de sodium ( $\geq$  99,5 %) ont été achetés chez Sigma-Aldrich et utilisés tels que reçus. Les deux poly(oxyde d'éthylène) méthyl éther, de masses molaires moyennes en nombre 5.300 g.mol<sup>-1</sup> et 10.650 g.mol<sup>-1</sup>

respectivement, le 3,3-diethoxypropan-1-ol (98 %) et la naphtalène (99 %) ont été achetés chez Sigma-Aldrich et purifiés par trois azéotropes successifs dans le toluène anhydre avant utilisation. L' $\epsilon$ -caprolactone ( $\epsilon$ -CL) (99 %, Alfa Aesar), la triéthylamine ( $\geq$  99 %, Sigma-Aldrich) et le chlorure d'acétyle (98 %, Sigma-Aldrich) ont été séchés sur hydrure de calcium durant une nuit à température ambiante puis distillés sous vide et conservés à 6 °C pour l' $\epsilon$ -CL et à température ambiante pour la triéthylamine et le chlorure d'acétyle respectivement. Les solvants pour analyse, tétrahydrofurane (THF), toluène, méthanol, *N,N*-diméthylformamide (DMF), dichlorométhane, éther diéthylique, acétate d'éthyle, hexane et acétonitrile, ont été achetés chez Chem-Lab. Tétrahydrofurane, toluène, méthanol et *N,N*-diméthylformamide ont été séchés sur tamis moléculaire et conservés sous atmosphère inerte. Les solvants deutérés, chloroforme ( $\text{CDCl}_3$ ), *N,N*-diméthylformamide ( $\text{C}_3\text{D}_7\text{NO}$ ), toluène ( $\text{C}_7\text{D}_8$ ) et l'eau ( $\text{D}_2\text{O}$ ), utilisés pour les analyses RMN ont été fournis par Eurisotop. Les membranes de dialyse prétraitées (Spectra/Por® 7) de seuils de coupure 1 et 3,5 kD ont été achetées aux laboratoires Spectrum. La résine de Chélex 100 sous forme sodium a été fournie par Bio-Rad. La kétamine (Imalgène® 1000, Mérial) et la médétomidine (Domitor® 0,85 mg.mL<sup>-1</sup>, Vétoquinol) ont été gracieusement fournies par le service commun d'animalerie hospitalo-universitaire (SCAHU) d'Angers.

## 2. Techniques de caractérisation

Chromatographie d'Exclusion Stérique (SEC). La masse molaire moyenne en nombre ( $\bar{M}_n$ ) et la dispersité ( $D$ ) des différents polymères ont été déterminées par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) dans le THF ou le DMF suivant la solubilité du polymère dans ces solvants. La chromatographie d'exclusion stérique dans le THF a été réalisée à 45 °C à un débit de 1 mL.min<sup>-1</sup> par un chromatographe liquide (Viscotek 305 TDA) équipé de 2 colonnes (PSS SDV linéaires M). La chromatographie d'exclusion stérique dans le DMF contenant du bromure de lithium (0,025 M) a été réalisée à 55 °C à un débit de 1 mL.min<sup>-1</sup> par un chromatographe (Waters) équipé de trois colonnes (Waters Styragel PSS gram1000 Å ( $\times 2$ ), 30 Å), d'un détecteur d'absorbance à deux longueurs d'onde (Waters 2487) et d'un détecteur d'indice de réfraction (Waters 2414). Des standards de poly(oxyde d'éthylène) ou de polystyrène ont été utilisés pour la calibration, selon le polymère analysé.

Résonance Magnétique Nucléaire (RMN). Les spectres, en RMN du proton (<sup>1</sup>H), du carbone (<sup>13</sup>C) et du fluor (<sup>19</sup>F), des différents produits mis en solution dans des solvants

deutérés (chloroforme, DMF, toluène, eau) ont été acquis à 250 MHz ou 400 MHz en mode FT par un spectromètre Bruker Advance 400 équilibré à 25 °C. Les spectres ont été analysés à l'aide du logiciel MestReNova.

**Spectrométrie de Masse (MS).** Les spectres de masse par électronébulisation (ESI) ont été obtenus par un spectromètre Bruker Daltonics micrOTOF (TOF-ESI-MS). Les spectres de masse obtenus par couplage d'une source d'ionisation MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation) à un analyseur à temps de vol (Time Of Flight) ont été acquis à l'aide d'un spectromètre Bruker Daltonics UltrafleXtreme en utilisant une matrice d'acide 2,5-dihydroxybenzoïque sans ajout d'agent de cationisation.

**Taille (DLS).** Le diamètre moyen en intensité ainsi que la distribution en taille (ou indice de polydispersité) des nanoparticules formulées ont été déterminés par diffusion dynamique de la lumière (DLS) avec une détection par rétrodiffusion à un angle de 173 ° sur un nanosizer Nano-S ZEN 1600 (Malvern Instruments S.A.). Les mesures ont été réalisées à 25 °C, *a minima* en triplicat. Les résultats, exprimés comme la taille moyenne pondérée par l'écart-type (SD) traduisant la dispersion d'une population, ont été analysés à l'aide du logiciel Zetasizer v7.12 développé en interne par Malvern.

**Taille et Concentration - Analyse du Suivi Individuel de Nanoparticules (NTA).** La concentration, le diamètre moyen en nombre et la distribution en taille des nanoparticules formulées ont été déterminés par analyse du suivi individuel de ces nanoparticules (NTA) sur un NanoSight NS300 muni d'un laser à 405 nm (Malvern Instruments S.A.). Après filtration sur 0,22 µm sous atmosphère stérile, les suspensions de nanoparticules ont été diluées à un facteur 12,5 (v/v) dans de l'eau ultrapure de façon à obtenir des concentrations dans une gamme comprise entre  $1.10^8$  et  $1.10^9$  particules.mL<sup>-1</sup>. L'eau ultrapure a elle-même été injectée d'abord dans le système de façon à éviter toute contamination par des particules résiduelles. Les suspensions de nanoparticules ont été injectées dans la cellule à un débit contrôlé à l'aide d'une seringue de 1 mL contrôlée par une pompe. Le débit d'infusion, compris entre 10 et 30 µL.s<sup>-1</sup>, a été adapté en fonction de chaque échantillon pour une analyse optimale. Les acquisitions ont été traitées à l'aide du logiciel d'analyses du suivi individuel de nanoparticules, NanoSight NTA software v3.2 (Malvern Instruments S.A.). Les mesures ont été réalisées à température ambiante. L'infusion d'un échantillon a été enregistrée sous la forme de cinq films successifs d'une minute chacun après ajustement du gain. La taille moyenne allouée à une population de nanoparticules correspond à la moyenne arithmétique de

toutes les tailles de particules mesurées au sein d'un même échantillon au cours des cinq films successifs. La déviation standard (SD) de la distribution de tailles d'une population de nanoparticules traduit la dispersion de taille sur les cinq acquisitions successives.

Quantification de Métaux, Spectrométrie de Masse par Plasma à Couplage Inductif (ICP-MS). La quantification du gadolinium ( $^{157}\text{Gd}$ ) en bout de chaîne  $\alpha$  du copolymère triséquencé et du platine ( $^{195}\text{Pt}$ ) contenu dans les nanoparticules a été réalisée par ICP-MS sur les appareils 7500A (Agilent) et Elan DRC-e (Perkin Elmer). La pureté de la torche à plasma d'argon était supérieure à 99,999 % (Linde gas). Les solutions standards pour les différents éléments (Certiprep spex) ont été achetées chez Horiba. La gamme de calibration était comprise entre 0,5 et 40  $\mu\text{g.L}^{-1}$  pour le gadolinium et entre 2,5 et 4.000  $\mu\text{g.L}^{-1}$  pour le platine dans l'eau ultrapure. Les échantillons ont été dilués au 1:70 dans une solution à 0,5 % d'acide nitrique contenant l'europium ( $^{153}\text{Eu}$ ) comme standard interne. Des contrôles de qualité ont été préparés en interne en utilisant des solutions standards (Gd : 1  $\text{g.L}^{-1}$  dans une solution à 2 % d'acide nitrique ; Pt : 1  $\text{g.L}^{-1}$  dans une solution à 10 % d'acide chlorhydrique) : 2,5 ; 12,5 et 35  $\mu\text{g.L}^{-1}$  pour le gadolinium, 2,5 ; 10 ; 250 et 3.000  $\mu\text{g.L}^{-1}$  pour le platine. Le critère d'acceptation retenu pour les contrôles internes de qualité relevait d'une déviation standard relative (RSD) inférieure à 20 % dans le cas de concentrations à la limite du seuil de détection, à 15 % pour des concentrations faibles ou intermédiaires et à 10 % pour des concentrations élevées.

Microscopie Electronique en Transmission (MET). Les images de microscopie électronique en transmission révélatrices de la morphologie des nanoparticules formulées ont été réalisées à l'aide d'un microscope JEOL JEM 1400 sur la plateforme du SCIAM (Université d'Angers). Les échantillons ont préalablement été préparés par dépôt délicat d'une goutte de la suspension de nanoparticules sur une grille de cuivre dédiée recouverte d'un fin film de formvar sans ajout d'agent de contraste, et ensuite incubée à 37 °C pour quelques heures. Après totale évaporation de l'eau, les nanoparticules ont été observées en MET avec une tension d'accélération de 120 kV. L'identification de platine dans l'échantillon a pu être confirmée de façon semi-quantitative par microanalyse par énergie dispersive de rayons X (EDX) grâce à un microscope EVO LS10 (Zeiss) équipé d'un système INCA (Oxford Instruments).

Relaxométrie. Les acquisitions ont été réalisées sur un imageur Bruker Biospec 70/20 Advance III à un champ magnétique de 7 T (Bruker Biospin) à l'aide d'une antenne de 35 mm

de diamètre. Le logiciel d'IRM préclinique ParaVision 6.0.1 (Bruker) a permis de paramétriser les séquences d'acquisition et de traiter les images obtenues. Les relaxivités longitudinale ( $r_1$ ) et transversale ( $r_2$ ) des nanoparticules décorées de gadolinium ont été déterminées dans le plasma à 7 T, 25 °C, et comparées à celles du Gd-DTPA, utilisé en routine clinique sous le nom de Magnevist® (Bayer). Des dilutions en cascade ont été réalisées dans l'eau ultrapure de façon à obtenir une gamme de concentrations en gadolinium entre 0 et 0,714 mM dans le cas des nanoparticules, et entre 0 et 0,576 mM dans le cas du Gd-DTPA. Les échantillons étudiés ont été disposés dans un contenant plus grand rempli d'eau dopée ( $\text{NiCl}_2$  et  $\text{MnCl}_2$  à 0,1 mM) de façon à éviter des zones de transition où des intensités de signal trop différentes empêcheraient de corriger les inhomogénéités de champ magnétique, engendrant ainsi des artefacts. Des images pondérées  $T_2$  ont été acquises à l'aide d'une séquence rapide de type Turbo-RARE (TE / TR = 33 / 2.500 ms ; angle de bascule : 90 ° ; facteur RARE : 8 ; moyennage : 2) sur neuf coupes (épaisseur de coupe : 1 mm ; distance inter-coupes : 0,20 mm) afin de vérifier le bon positionnement de l'échantillon au cœur de l'aimant et de sélectionner la coupe d'intérêt sur laquelle se placer pour réaliser les images quantitatives. Une attention toute particulière a été prêtée à éviter le voisinage des bulles d'air de façon à s'affranchir d'effets de susceptibilité magnétique. Des cartographies  $T_1$  et  $T_2$  ont alors été réalisées sur une coupe de 2 mm d'épaisseur à l'aide d'une séquence à temps de répétition (TR) variable (RARE-vtr : TR = 200 ; 400 ; 800 ; 1.500 ; 3.000 ; 5.500 ms ; TE = 7 ms ; facteur RARE : 2) et d'une séquence multi-coupes multi-échos (MSME : TR = 5.000 ms ; nombre d'échos : 40 ; premier temps d'écho : 8 ms ; intervalle entre deux échos : 8 ms) respectivement. Le champ de vue et la résolution spatiale ont été fixés à 30 x 30 mm<sup>2</sup> et 0,234 x 0,234 mm<sup>2</sup> respectivement.

Suivi par Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) d'une Infusion Convective (CED) de Nanoparticules Décorées de Gadolinium. Une étude préliminaire de suivi non invasif par IRM de l'infusion de nanoparticules décorées de gadolinium par CED dans le parenchyme cérébral a été réalisée sur deux rats Fischer de 10 semaines, en accord avec la réglementation imposée par le Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation et par le Comité d'Ethique n°6 des Pays de la Loire (référence dossier : 2015.20). Les animaux ont été placés dans des cages en polycarbonate disposées dans des salles à atmosphère contrôlée. Eau et nourriture ont été mises à leur disposition *ad libitum*.

Les rats ont été anesthésiés par injection intramusculaire d'un mélange de kétamine ( $45,45 \text{ mg}.\text{kg}^{-1}$ ) et de médétomidine ( $0,0385 \text{ mg}.\text{kg}^{-1}$ ) avant d'être positionnés sur un cadre de chirurgie stéréotaxique (Stoelting, Wood Dale). Après mise en évidence du bregma comme point de repère, les coordonnées d'injection ont été déterminées comme suit : 0,8 mm antérieur au bregma, 2,5 mm à droite de la suture sagittale et 5 mm sous la *dura*. Un volume de  $10 \mu\text{L}$  d'une suspension de nanoparticules DTPA( $\text{Gd}^{3+}$ )PEO-*b*-PCL resuspendues dans du PBS et filtrées stérilement sur  $0,22 \mu\text{m}$ , soit une concentration en gadolinium de  $1,51 \text{ mM}$ , a été injecté par infusion convective dans le striatum à un débit contrôlé de  $0,5 \mu\text{L}.\text{min}^{-1}$  à l'aide d'une seringue en verre (Hamilton® 1.700) terminée par une aiguille de 32 G et montée sur une pompe CED (Harvard apparatus Pump II Elite). A l'issue de l'injection, l'aiguille a été maintenue en place pendant cinq minutes supplémentaires afin d'éviter le reflux de la suspension, avant de remonter la seringue à une vitesse de  $1 \text{ mm}.\text{min}^{-1}$ . La plaie a été suturée à l'aide de trois points. Les animaux ont été particulièrement surveillés durant les phases d'anesthésie et de réveil. De façon à limiter le nombre d'anesthésies dans le temps, la première ratte a été imagée 30 minutes puis trois jours après injection, et la seconde 17 heures puis quatre jours après injection. Les acquisitions ont été réalisées sur un imageur préclinique Bruker Biospec 70/20 Advance III à un champ magnétique de 7 T (Bruker Biospin) équipé d'une antenne de surface en quadrature de phase et d'une antenne en réception de 87 mm de diamètre. Les animaux ont été anesthésiés sous isoflurane ( $1.0 \%$ ,  $\text{O}_2 0.7 \text{ L}.\text{min}^{-1}$ ) et leur température corporelle a été maintenue à  $37^\circ\text{C}$  à l'aide d'un régulateur de température pendant toute la durée du protocole d'imagerie. Des images axiales pondérées  $T_2$  morphologiques du cerveau ont été acquises à l'aide d'une séquence d'acquisition rapide de type Turbo-RARE ( $\text{TE/TR} = 33/2.500 \text{ ms}$  ; angle de bascule :  $90^\circ$  ; facteur RARE : 8 ; moyennage : 2) sur neuf coupes de 0,8 mm d'épaisseur séparées de 0,3 mm. Le champ de vue et la résolution spatiale ont été fixés à  $35 \times 35 \text{ mm}^2$  et  $0,137 \times 0,137 \text{ mm}^2$  respectivement. Des cartes paramétriques ont également été réalisées de façon à calculer les temps de relaxation  $T_1$  et  $T_2$  moyens dans la zone d'infusion de l'agent de contraste, à comparer aux temps de relaxation  $T_1$  et  $T_2$  d'une région équivalente en contra-latérale, de façon à estimer l'efficacité des nanoparticules décorées de gadolinium à raccourcir les temps de relaxation des tissus avoisinants. Une séquence à temps de répétition variable (RARE-vtr :  $\text{TR} = 200 ; 400 ; 800 ; 1.500 ; 3.000 ; 5.500 \text{ ms}$  ;  $\text{TE} = 7 \text{ ms}$  ; facteur RARE : 2), avec un champ de vue de  $35 \times 35 \text{ mm}^2$  et une résolution spatiale de  $0,137 \times 0,182 \text{ mm}^2$ , et une séquence multi-coupes multi-échos (MSME :  $\text{TR} = 2.000 \text{ ms}$  ; nombre d'échos : 25 ; premier temps d'écho : 8 ms ;

intervalle entre deux échos : 8 ms) avec un champ de vue de 35 x 35 mm<sup>2</sup> et une résolution spatiale de 0,137 x 0,137 mm<sup>2</sup>, ont ainsi été réalisées sur des coupes de 1 mm d'épaisseur séparées de 0,3 mm. Une série d'images pondérées T<sub>1</sub> a également été réalisée dans l'orientation coronale afin de mieux visualiser et de quantifier le volume de distribution de l'agent de contraste dans le parenchyme cérébral (Flash 3D : TE/TR = 8/50 ms ; angle de bascule : 60 ° ; facteur RARE : 8). Le champ de vue a été fixé à 30 x 30 x 15 mm<sup>3</sup> et la résolution spatiale à 0,171 x 0,171 x 0,188 mm<sup>3</sup>.

### **3. Synthèse, fonctionnalisation et caractérisation des copolymères**

#### **3.1. Synthèse d'un macroagent de contraste IRM**

Un copolymère amphiphile PEO-*b*-PCL a été synthétisé suivant une procédure décrite dans la littérature et dont les étapes sont détaillées dans la Figure 3.1 (Grogna et al. 2010). Plutôt que d'utiliser un PEO asymétrique, commercial mais avec un bout de chaîne  $\alpha$  inerte, la polymérisation par ouverture de cycle d'oxyde d'éthylène amorcée par le 3,3-diéthoxypropan-1-ol a conduit à l'obtention d'un  $\alpha$ -acétal-PEO-OH facilement fonctionnalisable après conversion du groupement acétal en aldéhyde. La polymérisation par ouverture de cycle de l' $\epsilon$ -caprolactone à partir du groupement hydroxyle terminal du PEO précédemment synthétisé a été catalysée par une solution de bis(2-éthylhexanoate) d'étain, un additif alimentaire autorisé dans de nombreux pays (Qi et al. 2013). Les longueurs des deux séquences de ce copolymère ont été choisies de façon à respecter une balance hydrophile-lipophile (HLB) lui conférant des propriétés amphiphiles. Les chaînes copolymères ont ainsi pu s'auto-assembler spontanément dans l'eau sous forme de nanoparticules avec un cœur de PCL hydrophobe et une couronne de PEO fortement hydrophile. L'acétal en bout de chaîne  $\alpha$  du copolymère a en outre offert la possibilité de greffer aux nanoparticules un complexe de gadolinium conférant au système des propriétés intéressantes à une exploration par IRM.

##### **3.1.1. Synthèse d'un $\alpha$ -acétal-PEO-OH**

Un PEO fonctionnalisé par un groupement acétal en bout de chaîne  $\alpha$  a été synthétisé par polymérisation par ouverture de cycle d'oxyde d'éthylène après amorçage par le 3,3-diéthoxypropan-1-ol. Le 3,3-diéthoxypropan-1-ol (1,48 g ; 9,99 mmol) et la naphtalène (1,54 g ; 12,0 mmol) ont été séchés par trois azéotropes successifs dans le toluène anhydre. Le

potassium (0,468 g ; 12,0 mmol) a été ajouté au réacteur contenant le naphtalène anhydre et l'ensemble a été repris dans 500 mL de THF anhydre et laissé sous agitation durant une nuit à température ambiante. Le mélange a pris une coloration verte, confirmant la formation du radical anion, et a alors été ajouté à la solution d'amorceur dissous dans 5 mL de THF anhydre. La coloration du mélange réactionnel devient progressivement jaune à mesure que le radical anion déprotone les fonctions alcool. Après 10 minutes sous agitation, la solution a été transférée dans un réacteur en acier inoxydable d'1 litre. L'oxyde d'éthylène (50 g ; 1,14 mol), dont la quantité a été calculée afin d'atteindre une masse molaire théorique de 5.000 g.mol<sup>-1</sup>, a alors été injecté dans le réacteur laissé sous agitation pour la nuit, à une température de 35 °C et une pression de 2 bars. Le lendemain, un large excès de méthanol (100 mL) a été introduit dans le réacteur afin d'arrêter la réaction. Une fois le solvant évaporé, le PEO synthétisé a été repris dans un minimum de THF en vue de le purifier par double précipitation dans de l'éther diéthylique froid. Il a ensuite été dialysé contre de l'eau distillée (seuil de coupure : 3,5 kD) durant 24 heures. L' $\alpha$ -acétal-PEO-OH ainsi purifié a alors été lyophilisé pour être caractérisé par RMN <sup>1</sup>H dans le toluène deutéré et par chromatographie d'exclusion stérique dans le THF après calibration par un standard de PEO. Le degré de polymérisation théorique ( $\overline{DP}_{n,\text{PEO,th}}$ ) a été calculé à partir de la formule suivante :

$$\overline{DP}_{n,\text{PEO,th}} = \frac{[\text{oxyde d'éthylène}]_0}{[3,3-\text{diéthoxypropan-1-ol}]_0} = 114.$$

Rendement : 48 g, 93 %. RMN <sup>1</sup>H (250 MHz, TMS, C<sub>7</sub>D<sub>8</sub>) :  $\delta = 1,12$  ppm (t, 6H, CH<sub>3</sub>—CH<sub>2</sub>—),  $\delta = 1,92$  ppm (m, 2H, —CH—CH<sub>2</sub>—CH<sub>2</sub>—O—),  $\delta = 3,49$  ppm (m, 470H, —O—CH<sub>2</sub>—CH<sub>2</sub>—O— ; —CH—CH<sub>2</sub>—CH<sub>2</sub>—O— ; CH<sub>3</sub>—CH<sub>2</sub>—O—),  $\delta = 4,70$  ppm (t, 1H, —CH—CH<sub>2</sub>—CH<sub>2</sub>—O—).  $\bar{M}_{n,\text{PEO,SEC}_{\text{THF}}} = 5.100$  g.mol<sup>-1</sup>,  $\overline{DP}_{n,\text{PEO,SEC}_{\text{THF}}} = 116$ ,  $D = 1,05$ .

L'analyse par chromatographie d'exclusion stérique dans le THF a confirmé la synthèse par polymérisation par ouverture de cycle contrôlée d'un PEO de faible dispersité et de masse molaire de 5.100 g.mol<sup>-1</sup>, en accord avec la valeur théorique visée de 5.000 g.mol<sup>-1</sup>. Dans l'optique d'une fonctionnalisation ultérieure en  $\alpha$  du copolymère, l'identification et l'étude précise de la nature des bouts de chaîne par RMN <sup>1</sup>H et spectrométrie de masse s'est avérée être primordiale. Le spectre RMN <sup>1</sup>H de l' $\alpha$ -acétal-PEO-OH dans le toluène deutéré est présenté en Figure 3.4-(A). Le rapport entre l'intégrale du pic correspondant aux quatre protons de l'unité répétitive du PEO à 3,49 ppm et l'intégrale du pic correspondant au signal du proton de l'acétal en bout de chaîne  $\alpha$  à 4,70 ppm conduit à une surestimation de la masse

molaire moyenne du PEO synthétisé ( $\bar{M}_{n,\text{PEO,RMN}} = 7,000 \text{ g.mol}^{-1}$ ) comparativement à la masse molaire moyenne déterminée par chromatographie d'exclusion stérique ( $\bar{M}_{n,\text{PEO,SEC}_{\text{THF}}} = 5,100 \text{ g.mol}^{-1}$ ). Une telle différence pourrait s'expliquer par une contamination par un sous-produit. Dans ce contexte, une analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF a été réalisé sur le PEO synthétisé de façon à en identifier précisément les bouts de chaîne. Il a ainsi pu être établi que le lot d' $\alpha$ -acétal-PEO-OH synthétisé était contaminé par un PEO téléchérique, la polymérisation par ouverture de cycle de l'oxyde d'éthylène ayant sûrement été amorcé en partie par des traces d'eau résiduelles à l'intérieur du réacteur. La proportion relative de PEO téléchérique par rapport au PEO asymétrique  $\alpha$ -acétal-PEO-OH a été déterminée par addition d'une très faible quantité d'isocyanate de trichloroacétyle au PEO synthétisé qui, après condensation avec les bouts de chaîne hydroxyles, conduit à la formation d'un uréthane. Comme le montre la Figure 3.4-(B), l'analyse RMN  $^1\text{H}$  dans le toluène deutéré du produit ainsi obtenu a révélé l'apparition d'un nouveau pic à un déplacement chimique de 4,12 ppm, correspondant à la superposition des signaux des protons en bout de chaîne de l' $\alpha$ -acétal-PEO-CH<sub>2</sub>-O-C(=O)-N- et du -N-C(=O)-O-CH<sub>2</sub>-PEO-CH<sub>2</sub>-O-C(=O)-N-. L'intensité du signal du proton (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O)<sub>2</sub>-CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O- du groupement acétal à 4,69 ppm a été utilisée comme référence pour quantifier l'intensité relative aux deux protons de l' $\alpha$ -acétal-PEO-CH<sub>2</sub>-O-C(=O)-N- du pic à 4,12 ppm et en déduire l'intensité relative aux quatre protons en bouts de chaîne du PEO téléchérique. La présence d'un PEO téléchérique a ainsi été estimée à hauteur de 17 mol% du lot de PEO-OH synthétisé.

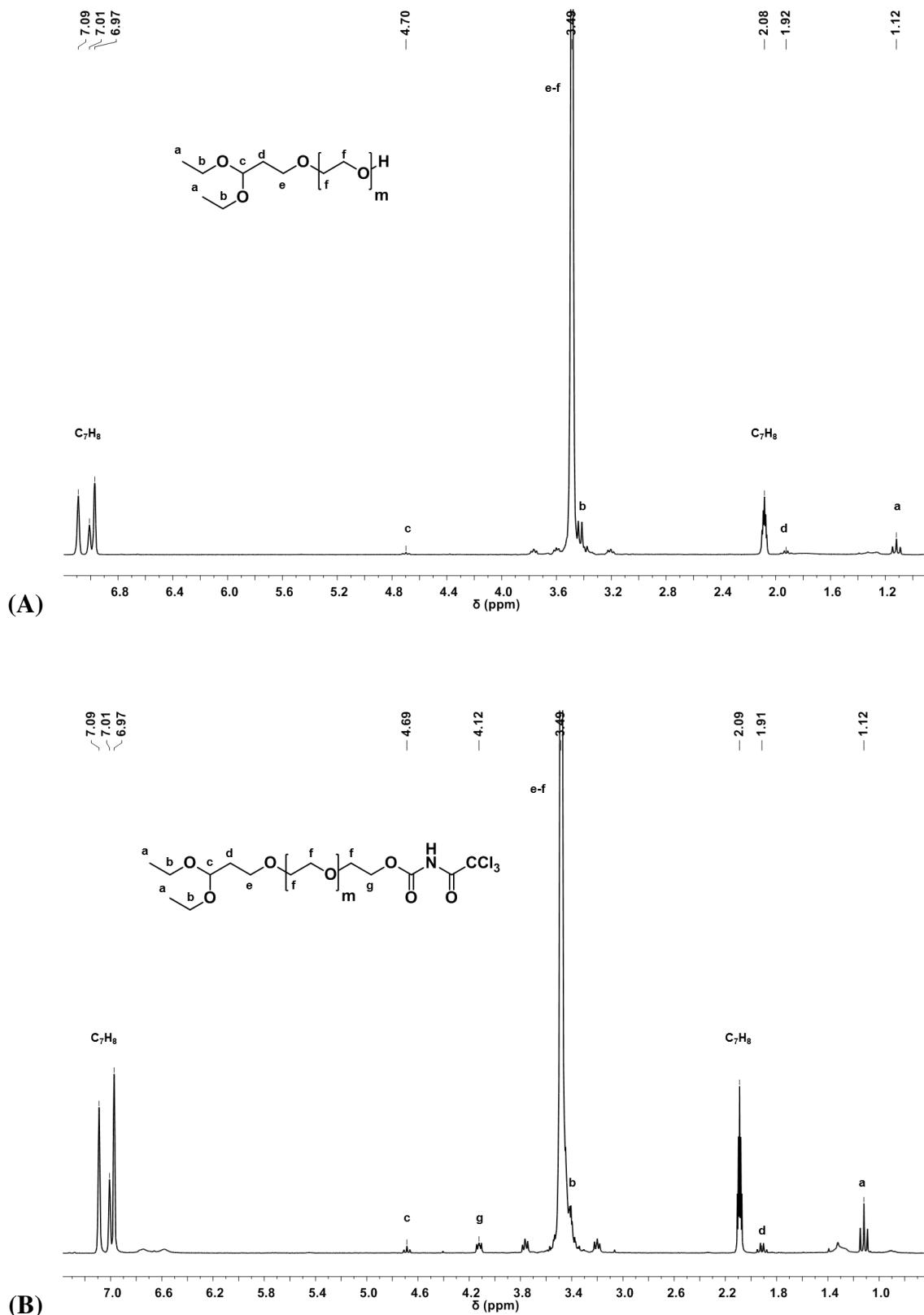


Figure 3.4 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  dans le toluène deutéré de l' $\alpha$ -acétal-PEO-OH synthétisé (A) avant et (B) après addition d'isocyanate de trichloroacétyl à 250 MHz

### 3.1.2. Synthèse d'un copolymère biséquencé $\alpha$ -acétal-PEO-*b*-PCL

La polymérisation par ouverture de cycle de l' $\epsilon$ -caprolactone ( $\epsilon$ -CL) amorcée par l' $\alpha$ -acétal-PEO-OH synthétisé précédemment a été catalysée par une solution de bis(2-éthylhexanoate) d'étain à 0,06 M dans le toluène anhydre. Le protocole ici mis en place a été adapté de la littérature (Gaucher et al. 2005; Meier et al. 2005; Van Butsele et al. 2009; Grogna et al. 2010; Qi et al. 2013). L' $\alpha$ -acétal-PEO-OH synthétisé (5 g ; 0,979 mmol) a d'abord été déshydraté par trois azéotropes successifs dans le toluène anhydre de façon à éliminer toute trace d'eau qui risquerait d'amorcer de façon non contrôlée la polymérisation de l' $\epsilon$ -caprolactone. L' $\epsilon$ -caprolactone (2,10 mL ; 19,0 mmol ; 19,4 équivalents) a alors été injectée dans le réacteur préalablement plongé dans un bain d'huile porté à 130 °C. Une fois la température stabilisée au sein du réacteur, la solution de bis(2-éthylhexanoate) d'étain (3,30 mL ; 0,198 mmol ; 0,2 équivalents du PEO-OH amorceur) a été ajoutée pour catalyser la polymérisation de l' $\epsilon$ -caprolactone à partir du bout de chaîne hydroxyle en  $\omega$  du PEO, et le mélange réactionnel a été placé sous agitation vigoureuse. La cinétique de polymérisation a été suivie par RMN du proton dans le chloroforme deutéré par prélèvements réguliers sous azote d'échantillons du mélange réactionnel. Après 31 heures sous agitation, une conversion supérieure à 95 % a été atteinte. Le copolymère a alors été dilué dans du toluène anhydre sous forte agitation jusqu'à atteindre une solution à 20 % en masse. Une fois le copolymère en solution revenu à 35 °C, la triéthylamine distillée (1,40 mL ; 10,0 mmol ; 10,2 équivalents d'alcool amorceur) et le chlorure d'acétyle (0,700 mL ; 9,84 mmol ; 10,1 équivalents d'alcool amorceur) ont été ajoutés afin d'estérifier les bouts de chaîne  $\omega$  du copolymère biséquencé synthétisé. Le mélange a ainsi été laissé sous agitation pendant 72 heures supplémentaires, puis le copolymère purifié par précipitation dans l'éther diéthylique froid. Après filtration et séchage, le copolymère a été repris dans un minimum de toluène et précipité à nouveau dans l'éther diéthylique par fractions, en éliminant la partie insoluble au fond du bêcher identifiée comme un sel de triéthylamine. Le copolymère ainsi précipité de façon quantitative dans l'éther a alors été filtré et séché pour être caractérisé par RMN  $^1\text{H}$  dans le chloroforme deutéré, comme rapporté en Figure 3.5-(A), et par chromatographie d'exclusion stérique dans le THF après calibration par un standard de PEO.

Rendement : 6,244 g, 87 %. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, TMS,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta = 1,20$  ppm (t, 6H,  $\text{CH}_3-\text{CH}_2-$ ),  $\delta = 1,38$  ppm (m, 32H,  $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-\text{O}-$ ),  $\delta = 1,65$  ppm (m, 64H,  $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-\text{O}-$ ),  $\delta = 2,00$  ppm (m, 2H,  $-\text{CH}-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-\text{O}-$ ),  $\delta = 2,31$  ppm (t, 32H,  $-\text{C}(\text{O})-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ ),  $\delta = 3,64$  ppm (m, 470H,  $-\text{O}-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-\text{O}-$  ;  $-\text{CH}-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_2}-\text{O}-$  ;  $\text{CH}_3-\underline{\text{CH}_2}-\text{O}-$ ),  $\delta = 4,06$  ppm (t, 32H,  $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_2}-\text{O}-$ ),  $\delta = 4,64$  ppm (t, 1H,  $-\underline{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ ).  $\bar{M}_{n,\text{PCL,RMN}} = 1.850 \text{ g mol}^{-1}$ ,  $\overline{DP}_{n,\text{PCL,RMN}} = 16$ .  $\bar{M}_{n,\text{PEO}-b-\text{PCL,SEC}_{\text{THF}}} = 7.400 \text{ g.mol}^{-1}$ ,  $D = 1,11$ .

Bien qu’abondamment référencée dans la littérature (Vangeyte et al. 2004; Meier et al. 2005; Cajot, Lautram, et al. 2011; Cajot et al. 2012), la polymérisation par ouverture de cycle de l’ $\epsilon$ -caprolactone initiée par le groupement hydroxyle terminal de l’ $\alpha$ -acétal-PEO-OH dépend fortement de la masse molaire visée pour la seconde séquence. Les conditions de synthèse ont donc dû être optimisées de façon à rester dans le cadre d’une polymérisation contrôlée avec une faible dispersité du copolymère final. Dans le cas présent, nous avons choisi, sur la base de travaux antérieurs, de synthétiser des copolymères amphiphiles tels que la masse molaire de la partie hydrophile soit de  $5.000 \text{ g.mol}^{-1}$  et celle de la partie hydrophobe de  $2.000 \text{ g.mol}^{-1}$ , de façon à obtenir une balance hydrophile-lipophile propice à un auto-assemblage spontané dans l’eau des chaînes de polymère sous la forme de nanoparticules (Grogna et al. 2010; Cajot, Lautram, et al. 2011; Cajot et al. 2013). La cinétique de copolymérisation a été analysée à l’aide de prélèvements effectués sous atmosphère inerte après 4 heures, 22 heures, 30 heures et 31 heures par chromatographie d’exclusion stérique dans le THF et par RMN  $^1\text{H}$  dans le chloroforme deutéré. La superposition des chromatogrammes de SEC obtenus lors des différents prélèvements mis en regard avec le chromatogramme de l’ $\alpha$ -acétal-PEO-OH de départ montre un décalage de la masse molaire du copolymère vers les plus hautes masses molaires, attestant de l’avancée de la réaction de copolymérisation. Le chromatogramme garde la même allure, globalement symétrique, malgré un léger épaulement probablement dû à la présence de PEO téléchérique. On peut donc en conclure qu’il n’y a pas eu de réactions secondaires de transestérification. La RMN  $^1\text{H}$  dans le chloroforme deutéré permet de déterminer, avec une sensibilité d’environ 5 %, le degré de polymérisation moyen de chaque séquence. On obtient finalement un copolymère  $\alpha$ -acétal- $\text{PEO}_{116}-b-\text{PCL}_{16}$ . Notons enfin que les bouts de chaîne  $\omega$  ont été estérifiés en fin de polymérisation de façon à éviter des interactions entre les différentes chaînes via des ponts hydrogène qui viendraient interférer au cours des étapes de fonctionnalisation suivantes.

### 3.1.3. Conversion de la fonction acétal en bout de chaîne $\alpha$ du copolymère PEO-*b*-PCL en aldéhyde

La déprotection de la fonction acétal en bout de chaîne  $\alpha$  du copolymère PEO-*b*-PCL a été réalisée en milieu aqueux et catalysée à pH acide. L' $\alpha$ -acétal-PEO-*b*-PCL-OH (3,00 g ; 0,433 mmol) a été mis en solution dans 12 mL d'eau milliQ ultrafiltrée. Le pH de la solution, initialement évalué à 4,24 à l'aide d'une microsonde pH, a été diminué à 1,96 par ajout goutte-à-goutte d'une solution d'acide chlorhydrique à 0,1 M. Après fermeture du réacteur, le mélange réactionnel a été laissé sous agitation vigoureuse pendant deux heures. Le pH de la solution de copolymère a alors été remonté à 6,80 par ajout goutte-à-goutte d'une solution d'hydroxyde de sodium à 0,1 M. Finalement, la solution a été dialysée contre de l'eau distillée (seuil de coupure : 1 kD) avant d'être lyophilisée. Le copolymère issu de cette réaction de déprotection de la fonction acétal en aldéhyde a été analysé par RMN  $^1\text{H}$  dans le chloroforme deutéré de façon à vérifier que la conversion était bien quantitative, et par chromatographie d'exclusion stérique dans le THF après calibration par un standard de PEO.

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, TMS,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta = 1,38$  ppm (m, 32H,  $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-$   
 $\text{CH}_2-\text{O}-$ ),  $\delta = 1,65$  ppm (m, 64H,  $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-\text{O}-$ ),  $\delta = 2,04$  ppm (m,  
2H,  $-\text{CH}-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-$ ),  $\delta = 2,31$  ppm (t, 32H,  $-\text{C}-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ ),  
 $\delta = 3,65$  ppm (m, 470H,  $-\text{O}-\underline{\text{CH}_2}-\underline{\text{CH}_2}-\text{O}-$ ;  $-\text{CH}-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_2}-\text{O}-$ ;  $\text{CH}_3-\underline{\text{CH}_2}-\text{O}-$ ),  
 $\delta = 4,06$  ppm (t, 32H,  $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_2}-\text{O}-$ ),  $\delta = 9,80$  ppm (t, 1H,  $\text{O}=\underline{\text{CH}}-\text{CH}_2-$ ).  $\bar{M}_{n,\text{PEO-}b\text{-PCL,SEC}_{\text{THF}}} = 7.900 \text{ g.mol}^{-1}$ ,  $D = 1,10$ .

Les chromatogrammes de SEC du copolymère  $\alpha$ -acétal-PEO-*b*-PCL-OH initial et du copolymère  $\alpha$ -aldéhyde-PEO-*b*-PCL-OH obtenu se superposent, ce qui confirme que le copolymère n'a pas été dégradé au cours de la réaction de conversion malgré l'acidité du milieu réactionnel. La RMN  $^1\text{H}$  dans le chloroforme deutéré permet de suivre la réaction. Comme le montre la Figure 3.5-(B), un nouveau singulet apparaît à 9,80 ppm, caractéristique du proton  $\text{O}=\underline{\text{CH}}-$  d'une fonction aldéhyde, à l'issue de la réaction, tandis que les pics correspondant aux protons de l'acétal du copolymère initial (Figure 3.4-(A)) à 1,20 ppm ( $\text{CH}_3-\text{CH}_2-$ ) et à 4,64 ppm ( $(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_2-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ ) ont disparu. En outre, l'intégrale du signal apparu à 9,80 ppm est égale à l'intégrale du signal disparu à 4,64 ppm, ce qui confirme que la réaction de déprotection de la fonction aldéhyde a bien été quantitative.

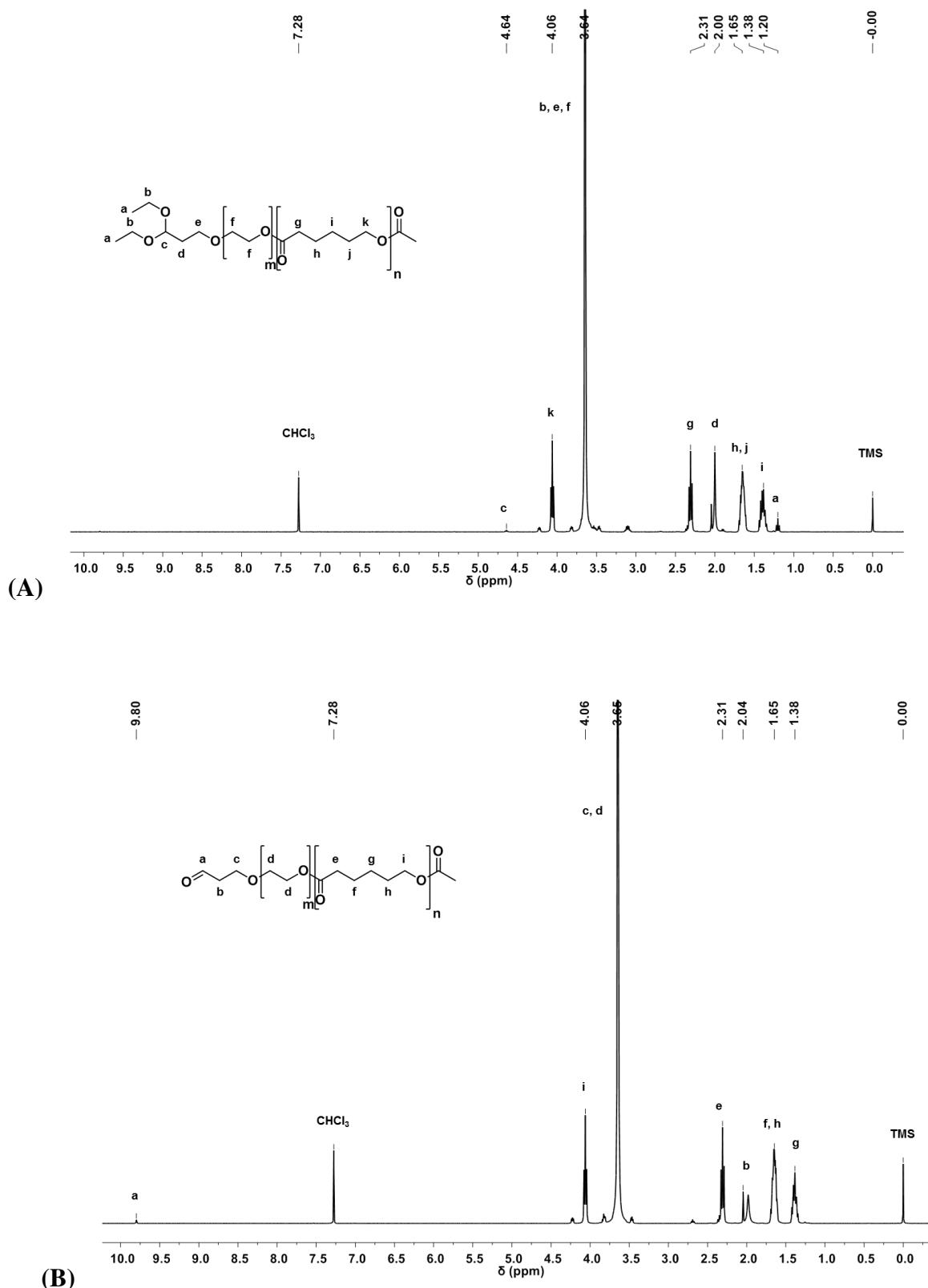


Figure 3.5 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  du copolymère (A)  $\alpha$ -acétal- $\text{PEO}_{116}$ -*b*- $\text{PCL}_{16}$  et (B)  $\alpha$ -aldehyde- $\text{PEO}_{116}$ -*b*- $\text{PCL}_{16}$  (TMS, 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

### **3.1.4. Synthèse d'un complexe de gadolinium**

Un complexe de gadolinium a été synthétisé à partir d'un ligand d'acide S-2-(4-aminobenzyl)-diéthylènetriamine pentaacétique (*p*-NH<sub>2</sub>-Bn-DTPA). Le *p*-NH<sub>2</sub>-Bn-DTPA (450 mg ; 0,698 mmol) a été mis en solution dans 3,5 mL d'eau mQ. Le chlorure de gadolinium hexahydraté a été ajouté en léger excès (285 mg ; 0,767 mmol ; 1,10 équivalent par rapport au ligand) à cette solution. Le pH du mélange réactionnel, initialement estimé à 1 à l'aide d'un papier pH, a été ajusté à 6 (mesures sur papier pH) par ajout d'une solution aqueuse d'hydroxyde de potassium à une concentration de 1 M. Le réacteur a été laissé sous agitation pour la nuit à une température de 40 °C. A l'issue de la réaction de complexation, les ions Gd<sup>3+</sup> libres résiduels ont été éliminés par élution de la solution à l'eau mQ à travers une résine de Chélex 100 sous forme sodium. Le complexe de gadolinium NH<sub>2</sub>-Bn-DTPA(Gd<sup>3+</sup>) ainsi purifié a ensuite été lyophilisé et récupéré sous la forme d'un solide de couleur pourpre. Ce produit a été caractérisé par spectrométrie de masse et le rendement de complexation du gadolinium au ligand a été évalué par ICP-MS.

Rendement : 98 %. Pureté : 50 %, l'hydroxyde de potassium ajouté afin de remonter le pH du mélange réactionnel à 6 étant présent dans le produit final à hauteur de 50 % en masse. MS(ESI) : m/z: 652,09.

### **3.1.5. Greffage du complexe de gadolinium en $\alpha$ des nanoparticules PEO-*b*-PCL par réaction d'amination réductrice**

Le complexe de gadolinium précédemment synthétisé a été greffé en  $\alpha$  du copolymère biséquéncé  $\alpha$ -acétal-PEO-*b*-PCL par une réaction d'amination réductrice. Le copolymère  $\alpha$ -aldéhyde-PEO-*b*-PCL (2,44 g ; 292 µmol de fonctions aldéhyde en prenant en compte la contamination du PEO synthétisé par 17 % de PEO téléchérique) a été dissous dans 25 mL de THF. La formation de nanoparticules a été induite par ajout goutte-à-goutte du copolymère en solution organique à un volume de 475 mL de solution tampon de bicarbonate de sodium / hydrogénocarbonate de sodium (0,1 M) à pH 8,5. Le complexe de gadolinium NH<sub>2</sub>-Bn-DTPA(Gd<sup>3+</sup>) (343 mg ; 263 µmol de gadolinium ; 0,901 équivalent en regard des bouts de chaîne  $\alpha$ -aldéhyde) a alors été ajouté à la suspension de nanoparticules. Le mélange a été laissé sous agitation pendant une heure à 25 °C. Une solution de cyanoborohydrure de sodium à 1 M dans le THF (3 mL ; 3,00 mmol ; 11,4 équivalents en regard du complexe NH<sub>2</sub>-Bn-DTPA(Gd<sup>3+</sup>)) a alors été ajoutée avant de laisser le mélange réactionnel sous agitation durant

96 heures à 25 °C. A l'issue de la réaction d'amination réductrice, les nanoparticules ont été purifiées par dialyse contre de l'eau distillée (seuil de coupure : 3,5 kD) pendant 48 heures avant d'être lyophilisées. L'ancrage du gadolinium sur les nanoparticules entraînant une chute du temps de relaxation de la molécule, le produit final ne peut pas être analysé par RMN. Le rendement de la réaction d'amination réductrice a donc été déterminé par dosage du gadolinium par ICP-MS.

Efficacité du greffage (ICP-MS) : 49 %.

Bien que plus toxique que le borohydrure de sodium ( $\text{NaBH}_4$ ), le cyanoborohydrure de sodium ( $\text{NaBH}_3\text{CN}$ ) est largement utilisé dans le cadre d'applications biomédicales (Torisawa et al. 2001; Freichels et al. 2012). Il a été choisi ici comme agent réducteur pour assurer le greffage des complexes de gadolinium en  $\alpha$  des copolymères triséquencés. Il est éliminé à l'issue de la réaction d'amination réductrice par dialyse contre de l'eau distillée. La réaction d'amination réductrice présente une efficacité modérée principalement imputée à l'encombrement stérique induit par les complexes de gadolinium déjà greffés à la couronne de PEO des nanoparticules. Toutefois, du fait de la mobilité réduite du complexe de gadolinium une fois ancré à la nanoparticule comparativement au chélate de gadolinium Gd-DTPA de faible masse molaire, l'agent de contraste macromoléculaire ainsi synthétisé est en mesure de présenter des propriétés relaxométriques intéressantes permettant d'intensifier les différences de contraste entre tissus à l'IRM (Artemov 2003; Geraldes & Laurent 2009).

### **3.2. Synthèse d'un copolymère amphiphile fonctionnalisable en vue d'une réticulation sur le cisplatine**

Les conditions de synthèse d'un copolymère amphiphile innovant par ouverture de cycle concomitante de (2,3,4,5,6-pentafluorophényl)-5-méthyl-2-oxo-1,3-dioxane-5-carboxylate, noté carbonate- $\text{CO}_2\text{PhF}_5$  dans la suite, et d' $\epsilon$ -caprolactone à partir du groupement hydroxyle terminal d'un poly(oxyde d'éthylène) méthyl éther commercial ont été mises au point et optimisées sur la base des travaux de l'équipe de J. L. Hedrick menés au centre de recherche IBM d'Almaden (Sanders et al. 2010; Engler et al. 2013; Engler et al. 2015). Les différentes étapes de synthèse et de fonctionnalisation sont illustrées par la Figure 3.2. Les longueurs du PEO, très hydrophile, et de la séquence statistique en poly[(carbonate- $\text{CO}_2\text{PhF}_5)_x\text{-co-(}\epsilon\text{-CL)}_y]_z$ , hydrophobe, ont été choisies afin de permettre l'auto-assemblage spontané dans l'eau des chaînes de copolymère pour former des nanoparticules. Sa

fonctionnalisation ultérieure en deux étapes a consisté à éliminer les groupements pentafluorophényle protégeant une fonction ester le long des segments polycarbonate au profit de fonctions alcool, converties à leur tour en fonctions acide carboxylique, dans l'optique de formuler des nanoparticules réticulées sur le cisplatine.

### **3.2.1. Synthèse du monomère carbonate cyclique (2,3,4,5,6-pentafluorophényl)-5-méthyl-2-oxo-1,3-dioxane-5-carboxylate (noté carbonate-CO<sub>2</sub>PhF<sub>5</sub>)**

Le carbonate-CO<sub>2</sub>PhF<sub>5</sub> a été synthétisé suivant une procédure décrite dans la littérature (Sanders et al. 2010). L'acide 2,2-bis(hydroxyméthyl)propionique (3,40 g ; 25,3 mmol), le bis-(pentafluorophényl)carbonate (25,0 g ; 63,4 mmol ; 2,5 équivalents), le fluorure de césium catalysant la réaction (0,772 g ; 5,08 mmol ; 0,20 équivalent) et le THF anhydre (80 mL) ont été introduits dans un ballon de 250 mL. Le mélange réactionnel a été laissé sous agitation pendant 20 heures à température ambiante. Le solvant a alors été éliminé sous vide avant redissolution du produit dans du dichlorométhane anhydre. Un sous-produit, identifié en RMN du fluor comme le pentafluorophénol, a immédiatement précipité en présence de dichlorométhane et ainsi pu être éliminé par filtration. Le filtrat a alors été lavé à l'aide de bicarbonate de sodium et d'eau distillée, puis séché au sulfate de magnésium. Après évaporation du solvant sous vide, le produit a été recristallisé à deux reprises dans un mélange d'acétate d'éthyle et d'hexane pour finalement former une poudre cristalline blanche, le carbonate-CO<sub>2</sub>PhF<sub>5</sub>. Le monomère ainsi synthétisé a été analysé en RMN <sup>1</sup>H et <sup>19</sup>F dans le chloroforme deutéré. Les caractérisations obtenues, reportées sur la Figure 3.6, étaient en accord avec celles décrites dans la littérature.

Rendement : 6,47 g (78 %). Pureté : 99,5 %. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, TMS, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 1,56 ppm (s, 3H, -CH<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-), δ = 4,35-4,38 ppm (d, 2H, -CH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>-, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 6 Hz), δ = 4,84-4,86 ppm (d, 2H, -CH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>-, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 6 Hz). RMN <sup>19</sup>F (400 MHz, TMS, CDCl<sub>3</sub>) : δ = -152,80 ppm (m, 2F), δ = -156,03 ppm (t, 1F, <sup>3</sup>J<sub>FF</sub> = 24 Hz), δ = -161,16 ppm (m, 2F).

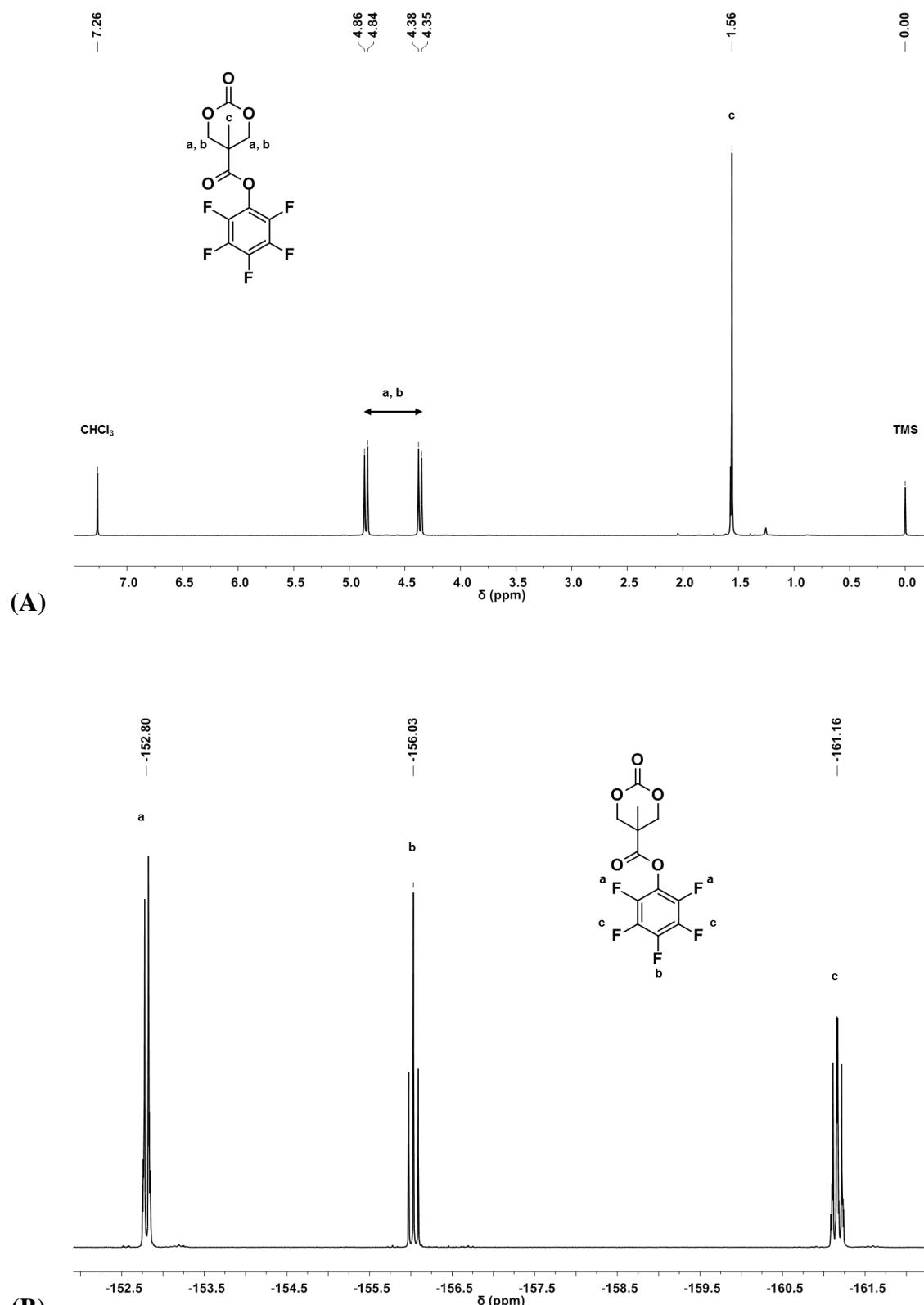


Figure 3.6 : Spectres RMN (A)  $^1\text{H}$  et (B)  $^{19}\text{F}$  du carbonate- $\text{CO}_2\text{PhF}_5$   
(TMS, 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

### 3.2.2. Synthèse d'un copolymère PEO-*b*-poly[(carbonate-CO<sub>2</sub>PhF<sub>5</sub>)-co-(ε-CL)]

Le poly(oxyde d'éthylène) méthyl éther (4,00 g ;  $\overline{DP}_{n,\text{PEO,SEC}_{\text{THF}}} = 120$  ; 0,757 mmol) pesé dans un ballon a été déshydraté par trois azéotropes successifs dans le toluène anhydre. Le carbonate-CO<sub>2</sub>PhF<sub>5</sub> (2,00 g ; 6,13 mmol ; 8,1 équivalents) a alors été introduit dans le ballon contenant le PEO en boîte à gants. Trois cycles vide-azote suivis d'un dernier azéotrope du mélange PEO – carbonate-CO<sub>2</sub>PhF<sub>5</sub> dans le toluène anhydre ont été réalisés de façon à éliminer toute trace d'eau ou d'air résiduelle. Une fois le mélange de produits sec, l'ε-caprolactone distillée (0,67 mL ; 6,05 mmol ; 8,0 équivalents) a été versée dans le réacteur porté à 37 °C. Le dichlorométhane anhydre (25 mL) a alors été ajouté au mélange afin de complètement solubiliser les espèces en présence. Une fois le mélange homogène, l'acide trifluorométhanesulfonique (0,67 mL ; 7,57 mmol ; 10 équivalents), catalyseur de la polymérisation par ouverture de cycle amorcée par le bout de chaîne ω du poly(oxyde d'éthylène) méthyl éther, a été injecté sous flux d'azote dans le réacteur. Le mélange réactionnel a été laissé sous agitation vigoureuse pendant 13 heures, et la cinétique d'avancement de la polymérisation a été suivie par RMN <sup>1</sup>H dans le chloroforme deutéré et par chromatographie d'exclusion stérique dans le THF. Une fois les 95 % de conversion atteints pour le carbonate-CO<sub>2</sub>PhF<sub>5</sub> et l'ε-CL, le bout de chaîne ω du copolymère ainsi synthétisé a été estérifié par réaction avec la triéthylamine et le chlorure d'acétyle. Le copolymère a d'abord été dilué sous forte agitation dans le solvant de la réaction jusqu'à atteindre une solution à 20 % en masse. Une fois la température du ballon stabilisée à 35 °C, la triéthylamine distillée (1,57 mL ; 11,3 mmol ; 15 équivalents par rapport au bout de chaîne ω du copolymère) et le chlorure d'acétyle (0,800 mL ; 11,3 mmol ; 15 équivalents par rapport au bout de chaîne ω du copolymère) ont été introduits. Le mélange réactionnel a ainsi été laissé sous agitation vigoureuse à 35 °C pendant 72 heures avant purification du copolymère par précipitation dans l'éther diéthylique froid puis filtration et séchage. Le solide récupéré sur le filtre a ensuite été repris dans un minimum de dichlorométhane : la fraction du produit soluble dans le dichlorométhane a été précipitée une seconde fois dans l'éther diéthylique froid, filtrée et séchée en chambre froide à 6 °C, tandis que la fraction insoluble dans le dichlorométhane, assimilée à un sel de triéthylamine résiduel, a été éliminée. Après 6 heures de dialyse contre de l'eau distillée (seuil de coupure : 1 kD) puis lyophilisation, le copolymère a été analysé par RMN <sup>1</sup>H, comme rapporté sur la Figure 3.7-(A), et RMN <sup>19</sup>F dans le

chloroforme deutéré, ainsi que par chromatographie d'exclusion stérique dans le THF et le DMF.

Rendement : 3,61 g (54 %). RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, TMS,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta = 1,36$  ppm (m, 12H,  $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ ), 1,48-1,49 ppm (d, 15H,  $-\text{CH}_3$ ),  $\delta = 1,66$  ppm (m, 24H,  $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-\text{O}-$ ),  $\delta = 2,20-2,37$  ppm (m, 12H,  $-\text{C}(\text{O})-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ ),  $\delta = 3,38$  ppm (s, 3H,  $\underline{\text{CH}_3}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ ),  $\delta = 3,64$  ppm (s, 480H,  $-\text{O}-\underline{\text{CH}_2}-\underline{\text{CH}_2}-\text{O}-$ ),  $\delta = 4,06-4,31$  ppm (m, 12H,  $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_2}-\text{O}-$ ),  $\delta = 4,36-4,46$  ppm (m, 20H,  $-\text{O}-\underline{\text{CH}_2}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{CO}_2\text{PhF}_5)-\underline{\text{CH}_2}-\text{O}-$ ).  $\overline{DP}_{n,\text{PC,RMN}} = 5$ ,  $\overline{DP}_{n,\text{PCL,RMN}} = 6$ ,  $D = 1,20$ . RMN  $^{19}\text{F}$  (400 MHz, TMS,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta = -78,41$  ppm (3F,  $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{H}$ ),  $\delta = -153,00$  ppm (m, 2F),  $\delta = -157,10$  ppm (m, 1F),  $\delta = -161,95$  ppm (m, 2F).

Chaque monomère a été introduit de façon à atteindre un degré de polymérisation moyen de 8, soit une masse molaire moyenne de la deuxième séquence de  $3,450 \text{ g.mol}^{-1}$ . Le degré de polymérisation théorique moyen de chaque espèce est déterminé à l'aide des formules suivantes :  $\overline{DP}_{n,\text{PC,th}} = \frac{[\text{carbonate}-\text{CO}_2\text{PhF}_5]_0}{[\text{PEO}-\text{OH}]_0}$ ,  $\overline{DP}_{n,\text{PCL,th}} = \frac{[\varepsilon-\text{CL}]_0}{[\text{PEO}-\text{OH}]_0}$ , où l'acronyme

« PC » désigne les segments polycarbonate et « PCL » la polycaprolactone. Le degré de polymérisation expérimental moyen du PC a été déterminé par RMN  $^1\text{H}$  en se basant sur le rapport entre l'intégrale du signal des 4 protons de l'unité répétitive du polycarbonate à 4,46 ppm normalisée par l'intégrale du signal des 4 protons de l'unité répétitive du PEO à 3,64 ppm suivant la formule :  $\overline{DP}_{n,\text{PC,RMN}} = \overline{DP}_{n,\text{PEO,SEC}_{\text{THF}}} * \frac{\text{Intégrale}_{4,46\text{ppm}}}{\text{Intégrale}_{3,64\text{ppm}}}$ . De manière analogue, le degré de polymérisation expérimental moyen de la PCL a été déterminé par RMN  $^1\text{H}$  en se basant sur le rapport entre l'intégrale du signal des 2 protons de l'unité répétitive de la PCL à 4,06 ppm normalisée par l'intégrale du signal des 4 protons de l'unité répétitive du PEO à 3,64 ppm suivant la formule :  $\overline{DP}_{n,\text{PCL,RMN}} = \overline{DP}_{n,\text{PEO,SEC}_{\text{THF}}} * 2 * \frac{\text{Intégrale}_{4,06\text{ppm}}}{\text{Intégrale}_{3,64\text{ppm}}}$ . La cinétique de la polymérisation a ainsi été suivie par RMN  $^1\text{H}$  dans le

chloroforme deutéré jusqu'à atteindre 95 % de conversion des deux monomères. Après estérification du bout de chaîne  $\omega$  et purification, le copolymère final présente une seconde séquence en polycarbonate et en polycaprolactone avec des degrés de polymérisation moyens de 5 et 6 respectivement.

Ainsi, les conditions de copolymérisation simultanée par ouverture de cycle de l' $\varepsilon$ -CL et du carbonate- $\text{CO}_2\text{PhF}_5$  à partir du groupement hydroxyle en bout de chaîne  $\omega$  d'un poly(oxyde d'éthylène) méthyl éther commercial catalysée par l'acide triflique ont été mises au point. La

cinétique de cette réaction a été suivie par RMN  $^1\text{H}$  et a montré une incorporation préférentielle du carbonate, générant un copolymère à gradient. A l'issue de cette première étape de synthèse, les deux types de copolymères semblent pertinents à l'application finale de par le choix des masses molaires des deux séquences. En effet, une fois en milieu basique, les segments de poly(carbone-spacer-COOH) sont déprotonés et perdent de leur hydrophilie. On retombe alors sur une HLB ( $5.300 \text{ g.mol}^{-1} / 2.200 \text{ g.mol}^{-1}$ ) compatible avec des propriétés amphiphiles du copolymère séquencé.

Un second copolymère biséquencé plus riche en unités carbonate a été synthétisé suivant le même protocole à partir d'un poly(oxyde d'éthylène) méthyl éther de masse molaire moyenne en nombre de  $10.560 \text{ g.mol}^{-1}$  ( $\overline{DP}_{n,\text{PEO,SEC}_{\text{THF}}} = 240$ ).

Rendement :  $2,07 \text{ g}$  (59 %).  $\overline{DP}_{n,\text{PEO,SEC}_{\text{THF}}} = 240$ ,  $\overline{DP}_{n,\text{PC,RMN}} = 14$ ,  $\overline{DP}_{n,\text{PCL,NMR}} = 20$ ,  $D = 1,35$ .

La balance hydrophile-lipophile entre les deux séquences ainsi que le ratio entre unités PC et PCL sur la seconde séquence devaient être préservés afin de comparer les caractéristiques des formulations ultérieures réalisées à partir de ce copolymère à celles obtenues sur le copolymère  $\text{PEO}_{120}\text{-}b\text{-poly}[(\text{carbonate-}\text{CO}_2\text{PhF}_5)_5\text{-co-(}\varepsilon\text{-CL)}_6]$  présenté précédemment. L'idée sous-jacente consiste à démontrer qu'une augmentation du nombre de groupements carboxylate le long des chaînes polycarbonate après fonctionnalisation du copolymère permettrait d'améliorer la charge de complexes de Pt(II) encapsulés dans la nanoparticule par réticulation entre le cisplatine et les fonctions carboxylate.

### 3.2.3. Fonctionnalisation du copolymère $\text{PEO}\text{-}b\text{-poly}[(\text{carbonate-}\text{CO}_2\text{PhF}_5)\text{-co-(}\varepsilon\text{-CL)}]$

Les unités carbonate du copolymère  $\text{PEO}\text{-}b\text{-poly}[(\text{carbonate-}\text{CO}_2\text{PhF}_5)\text{-co-(}\varepsilon\text{-CL)}]$  ainsi synthétisé ont ensuite été fonctionnalisées suivant une procédure en deux étapes adaptée de la littérature (Engler et al. 2015) : (i) les groupements pentafluorophényle le long des segments polycarbonate ont d'abord été éliminés par réaction de la fonction ester avec un amino-alcool, (ii) alcool lui-même estérifié par l'addition d'anhydride succinique qui conduit à sa conversion en fonctions acide carboxylique sur chaque unité carbonate.

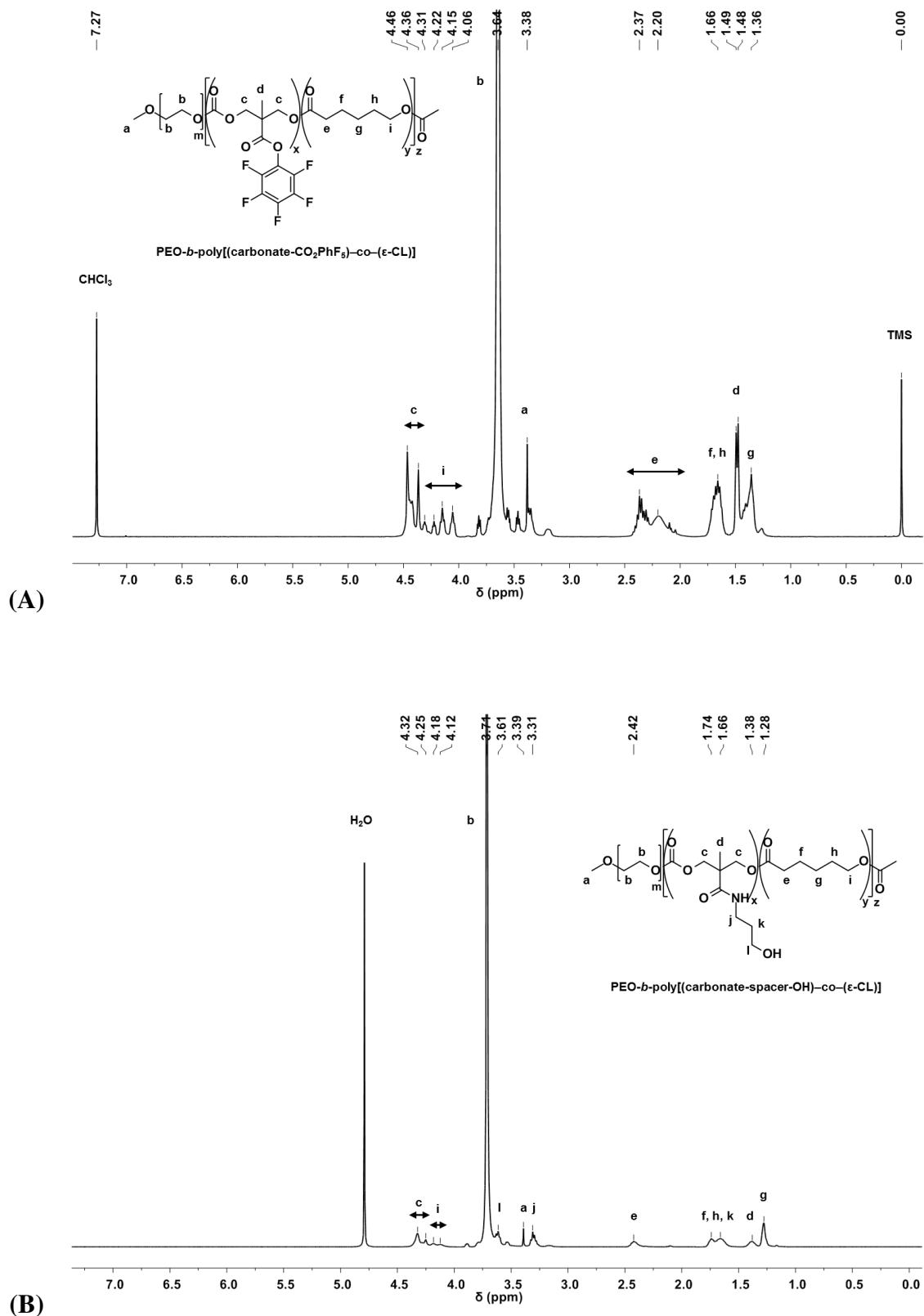
(i) Le copolymère  $\text{PEO}_{120}\text{-}b\text{-poly}[(\text{carbonate-}\text{CO}_2\text{PhF}_5)_5\text{-co-(}\varepsilon\text{-CL)}_6]$  ( $658 \text{ mg}$  ;  $0,433 \text{ mmol}$  de motif carbonate- $\text{CO}_2\text{PhF}_5$ ) a été solubilisé dans  $1 \text{ mL}$  d'acétonitrile. Le 3-aminopropan-1-ol ( $41,5 \mu\text{L}$  ;  $0,543 \text{ mmol}$  ;  $1,24$  équivalents) et la triéthylamine ( $76,5 \mu\text{L}$  ;  $0,549 \text{ mmol}$  ;  $1,25$  équivalents), dissous dans  $1 \text{ mL}$  d'acétonitrile, ont été ajoutés goutte-à-goutte à la

solution de copolymère. Du DMF (1,3 mL) a été ajouté afin de bien solubiliser toutes les espèces en présence, puis le mélange a été laissé sous agitation forte à 27 °C pendant 2 heures. Le copolymère a alors été précipité dans un grand volume d'éther diéthylique froid, filtré et séché. Après auto-assemblage spontané dans l'eau des chaînes de copolymère et diminution du pH à 4 par ajout d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 0,1 M, le produit obtenu, de couleur blanc cassé, a été dialysé (seuil de coupure : 1 kD) durant 20 heures contre de l'eau distillée à pH 4. Le dialysat a finalement été lyophilisé puis analysé par RMN <sup>1</sup>H, comme rapporté en Figure 3.7-(B), et RMN <sup>19</sup>F dans l'eau deutérée, et par chromatographie d'exclusion stérique dans le DMF.

Rendement : 340 mg, 57 %. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, TMS, D<sub>2</sub>O) : δ = 1,28 ppm (m, 12H, –C(O)–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–O–), 1,38 ppm (s, 15H, –O–CH<sub>2</sub>–C(CH<sub>3</sub>)(carbonate-spacer-OH)–CH<sub>2</sub>–O–), δ = 1,66-1,74 ppm (m, PCL : 24H, –C(O)–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–O– ; PC : 10H, –NH–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–OH), δ = 2,42 ppm (m, 12H, –C(O)–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–O–), δ = 3,31 ppm (m, 10H, –NH–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–OH), δ = 3,39 ppm (s, 3H, CH<sub>3</sub>–O–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–O–), δ = 3,61 ppm (m, 12H, –NH–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–OH), δ = 3,71 ppm (s, 480H, –O–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–O–), δ = 4,12-4,18 ppm (m, 12H, –C–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–O–), δ = 4,25-4,32 ppm (m, 20H, –O–CH<sub>2</sub>–C(CH<sub>3</sub>)(carbonate-spacer-OH)–CH<sub>2</sub>–O–). RMN <sup>19</sup>F (400 MHz, TMS, D<sub>2</sub>O) : δ = -78,88 ppm (3F, CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H). *D* = 1,24.

(ii) Le copolymère PEO<sub>120</sub>-*b*-poly[(carbonate-spacer-OH)<sub>5</sub>–co–(ε-CL)<sub>6</sub>] (340 mg ; 0,245 mmol de motif carbonate-spacer-OH) fraîchement obtenu a été séché par trois azéotropes successifs dans le toluène anhydre puis remis en solution dans 1 mL de DMF anhydre à 45 °C. La triéthylamine distillée (200 µL ; 1,43 mmol ; 5,86 équivalents) a été ajoutée sous flux d'azote dans le tube à réaction, puis l'anhydride succinique (137 mg ; 1,37 mmol ; 5,59 équivalents). Le mélange réactionnel a été laissé sous agitation vigoureuse à 45 °C pendant une nuit. Initialement de couleur rose-orangée, il a rapidement pris une coloration mauve avant de devenir noir. Une fois le réacteur revenu à température ambiante, le copolymère a été précipité dans l'éther diéthylique froid, filtré, séché sous vide et analysé par RMN <sup>1</sup>H, comme rapporté en Figure 3.7-(C), et RMN <sup>19</sup>F dans le DMF deutéré, et par chromatographie d'exclusion stérique dans le DMF.

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, TMS, DMF) :  $\delta = 1,29$  ppm (m, 12H,  $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ ),  $1,39$  ppm (s, 15H,  $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(\underline{\text{CH}_3})(\text{carbonate-spacer-COOH})-\text{CH}_2-\text{O}-$ ),  $\delta = 1,65$  ppm (m, 24H,  $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-\text{O}-$ ),  $\delta = 1,84$  ppm (m, 10H,  $-\text{NH}-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-\text{OH}$ ),  $\delta = 2,35$  ppm (m, 12H,  $-\text{C}(\text{O})-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ ),  $\delta = 2,58$  ppm (m, 20H,  $-\text{CO}(\text{O})-\underline{\text{CH}_2}-\underline{\text{CH}_2}-\text{COOH}$ ),  $\delta = 3,31$  ppm (m, 10H,  $-\text{NH}-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ ),  $\delta = 3,38$  ppm (s, 3H,  $\underline{\text{CH}_3}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ ),  $\delta = 3,64$  ppm (s, 480H,  $-\text{O}-\underline{\text{CH}_2}-\underline{\text{CH}_2}-\text{O}-$ ),  $\delta = 4,06-4,14$  ppm (m, PCL : 12H,  $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_2}-\text{O}-$  ; PC : 10H,  $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_2}-\text{O}-\text{C}(\text{O})-$ ),  $\delta = 4,22-4,27$  ppm (m, 20H,  $-\text{O}-\underline{\text{CH}_2}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{carbonate-spacer-COOH})-\underline{\text{CH}_2}-\text{O}-$ ). RMN  $^{19}\text{F}$  (400 MHz, TMS, DMF) :  $\delta = -78,36$  ppm (3F,  $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{H}$ ).  $D = 1,13$ .



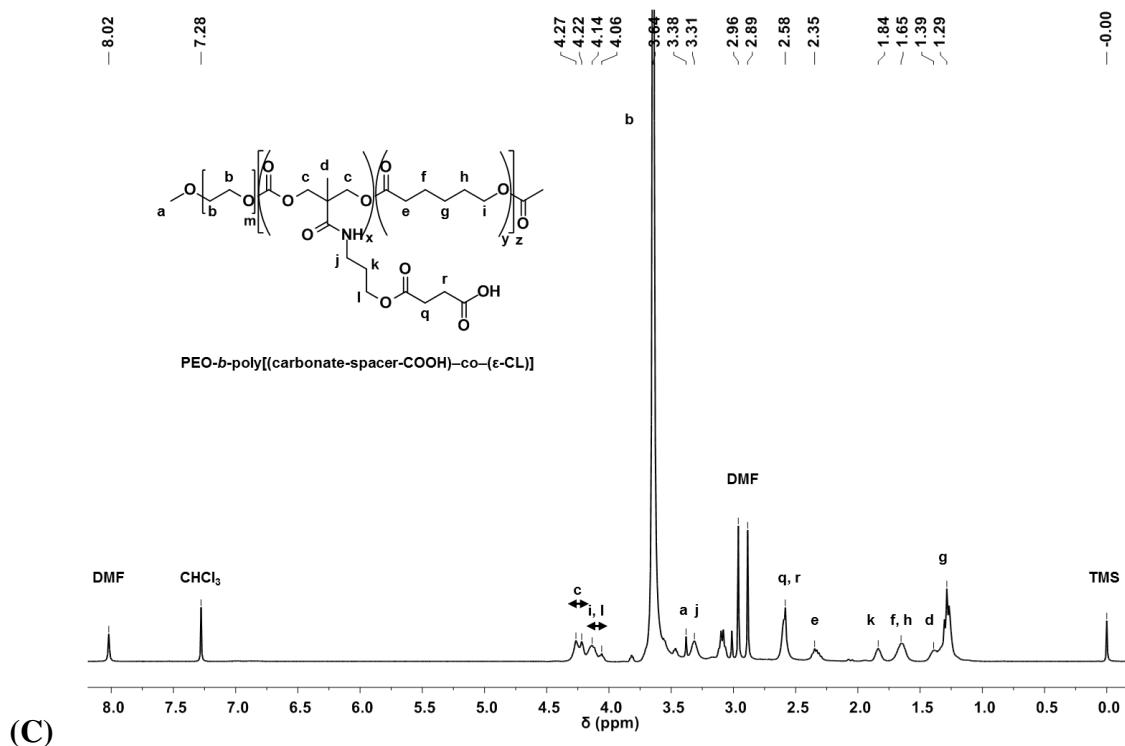


Figure 3.7 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  des copolymères

- (A)  $\text{PEO}_{120}\text{-}*b*\text{-poly}[(\text{carbonate-}\text{CO}_2\text{PhF}_5)_5\text{-co-(}\epsilon\text{-CL)}_6]$  (TMS, 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )
- (B)  $\text{PEO}_{120}\text{-}*b*\text{-poly}[(\text{carbonate-spacer-OH})_5\text{-co-(}\epsilon\text{-CL)}_6]$  (TMS, 400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ),
- (C)  $\text{PEO}_{120}\text{-}*b*\text{-poly}[(\text{carbonate-spacer-COOH})_5\text{-co-(}\epsilon\text{-CL)}_6]$  (TMS, 400 MHz, DMF)

Une fonctionnalisation directe en une seule étape des unités carbonate du copolymère à l'aide d'un acide aminé tel que la  $\beta$ -alanine ou l'acide 6-aminohexanoïque a été testée, conduisant irrémédiablement à une dégradation précoce importante du copolymère. Les amines primaires étant en effet susceptibles, de par leurs propriétés nucléophiles, de dégrader les polyesters électrophiles, la dégradation des unités ester le long des séquences en polycaprolactone et en polycarbonate entre en compétition avec la fonctionnalisation du groupement ester activé pendant. Les résultats expérimentaux suggèrent que la dégradation, plus rapide que la fonctionnalisation, ne peut être évitée dans ces conditions. Il a donc été décidé de procéder en deux étapes, tel que décrit dans le paragraphe précédent, ce qui conduit à une fonctionnalisation effective des unités carbonate du copolymère. La première étape de fonctionnalisation fait appel à un léger excès de 3-aminopropan-1-ol de façon à favoriser une fonctionnalisation quantitative, sans pour autant risquer de dégrader la PCL par un trop large

excès d'amine. Notons par ailleurs que la substitution au niveau de l'ester activé des chaînes polycarbonate est prioritaire sur une éventuelle fonctionnalisation des chaînes PCL du fait de la grande électronégativité des atomes de fluor. La substitution des groupements pentafluorophényle en faveur du 3-aminopropan-1-ol voit l'apparition de trois nouveaux signaux en RMN  $^1\text{H}$  dans l'eau deutérée à des déplacements chimiques de 1,74 ppm ( $-\text{NH}-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-\text{OH}$ ), 3,31 ppm ( $-\text{NH}-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$ ) et 3,61 ppm ( $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_2}-\text{OH}$ ). Le taux de conversion est estimé en calculant l'aire sous la courbe du signal bien défini à 3,31 ppm ou du signal à 1,74 ppm, correspondant chacun à la contribution de deux protons apportés par le 3-aminopropan-1-ol, normalisée par l'aire sous la courbe du pic des quatre protons du PEO à 3,71 ppm. La moyenne de ces deux valeurs donne 5, ce qui va bien en faveur d'une conversion quantitative à l'aide du 3-aminopropan-1-ol. En outre, des acquisitions en RMN  $^{19}\text{F}$  viennent confirmer la substitution des groupements pentafluorophényle. L'apparition en RMN  $^1\text{H}$  dans le DMF deutéré d'un singulet à 2,58 ppm ( $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}-\text{O}-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-\text{COOH}$ ) ainsi que le blindage des deux protons ( $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$ ) au voisinage de la nouvelle fonction ester vers des déplacements chimiques plus élevés démontrent la conversion des fonctions alcool en carboxylate. Le taux de conversion est estimé en calculant le rapport entre l'aire sous la courbe du pic à 2,58 ppm correspondant aux quatre protons centraux apportés par l'anhydride succinique et l'aire sous la courbe du pic des quatre protons du PEO à 3,64 ppm. Le calcul donne 6, ce qui, aux incertitudes de mesures près liées à la sensibilité de la RMN, apporte la preuve d'une fonctionnalisation quantitative du copolymère en deux étapes.

#### 4. Formulation et caractérisation de nanoparticules polymère

Une fois ces deux copolymères synthétisés et dûment caractérisés, nous avons adopté une stratégie consistant à optimiser la formulation de nanoparticules à partir de chacun de ces copolymères considéré indépendamment, dans l'optique de déterminer ensuite des conditions qui seraient applicables à la formulation de nanoparticules mixtes. Plutôt que de travailler sur un seul copolymère complexe, portant à la fois des unités d'imagerie et des fonctions carboxylate permettant la réticulation sur le cisplatine, le recours à deux copolymères différents, chacun riche de ses spécificités, se justifiait de par la grande flexibilité en résultant pour l'application ultérieure. En effet, selon les besoins, des nanoparticules hybrides pourraient être formulées tantôt avec une charge en drogue plus importante *via* la présence

d'un nombre plus élevé de fonctions acide, bénéficiant ainsi d'un fort potentiel thérapeutique, tantôt avec une plus grande densité de complexes de gadolinium à leur surface, leur conférant ainsi une meilleure efficacité en tant qu'agent de contraste IRM. Dans cette optique, nous avons cherché à établir la preuve de concept démontrant la possibilité de formuler des nanoparticules bifonctionnelles aux propriétés versatiles à partir de deux copolymères biséquencés amphiphiles.

#### **4.1. Formulation de nanoparticules DTPA(Gd<sup>3+</sup>)PEO-*b*-PCL dédiées à l'imagerie par résonance magnétique**

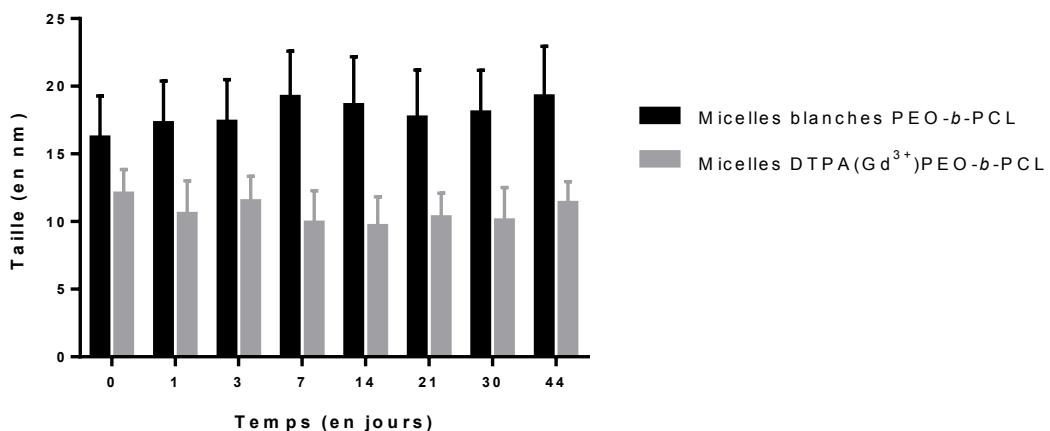
Le protocole de formation des nanoparticules par auto-assemblage spontané dans l'eau des copolymères PEO-*b*-PCL a été adapté de celui décrit par Mathurin Grogna et collaborateurs (Grogna et al. 2010). Le copolymère DTPA(Gd<sup>3+</sup>)PEO<sub>116</sub>-*b*-PCL<sub>16</sub> synthétisé précédemment a été dissous dans du DMF de façon à obtenir une solution à 20 % en masse. Cinq équivalents en volume d'eau ultrapure ont alors été ajoutés pour permettre l'auto-assemblage spontané dans l'eau des chaînes de copolymères biséquencés amphiphiles sous la forme de nanoparticules. Le mélange a été laissé sous agitation durant deux heures, puis dialysé contre de l'eau ultrapure pendant six heures (seuil de coupure : 3,5 kD) afin d'éliminer les traces résiduelles de solvant organique. Les nanoparticules ainsi formées ont alors été caractérisées le plus finement possible en termes de taille, de stabilité dans le temps et de morphologie. Leurs propriétés relaxométriques ont également été étudiées.

##### **4.1.1. Mesures de taille**

Par le choix des masses molaires des deux séquences, 5.100 g mol<sup>-1</sup> pour le PEO hydrophile et 1.850 g mol<sup>-1</sup> pour la PCL hydrophobe, la balance hydrophile-lipophile propice à l'auto-assemblage spontané dans l'eau des chaînes polymère de PEO-*b*-PCL sous forme de nanoparticules est assurée. Le Tableau 3.1 présente la taille moyenne des nanoparticules ainsi obtenues sur six formulations indépendantes. D'après ces résultats, les nanoparticules blanches d' $\alpha$ -acétal-PEO-*b*-PCL sont en moyenne 1,7 fois plus grandes que leurs analogues décorées de gadolinium. Un suivi de la taille moyenne au cours du temps d'une population de nanoparticules blanches et de nanoparticules décorées en leur surface de gadolinium respectivement a permis de mettre en évidence leur stabilité en solution aqueuse sur une durée de six semaines au moins. La Figure 3.8 décrit l'évolution de la distribution de tailles au cours du temps de ces deux formulations.

Tableau 3.1 : Mesure de taille de nanoparticules polymère

Nature	Taille <sup>a</sup> ± SD (nm)
PEO <sub>116</sub> - <i>b</i> -PCL <sub>16</sub>	20,7 ± 2,7
DTPA(Gd <sup>3+</sup> )PEO <sub>116</sub> - <i>b</i> -PCL <sub>16</sub>	12,2 ± 2,6

Détermination par : <sup>a</sup> DLSFigure 3.8 : Suivi de stabilité dans le temps des nanoparticules polymère

#### 4.1.2. Observation par microscopie électronique en transmission

La MET a confirmé l'obtention de nanoparticules d'environ 10 nm dans leur plus grande dimension. Comme le montre la Figure 3.9, les images apparaissent de qualité médiocre car la limite de résolution du microscope est atteinte.

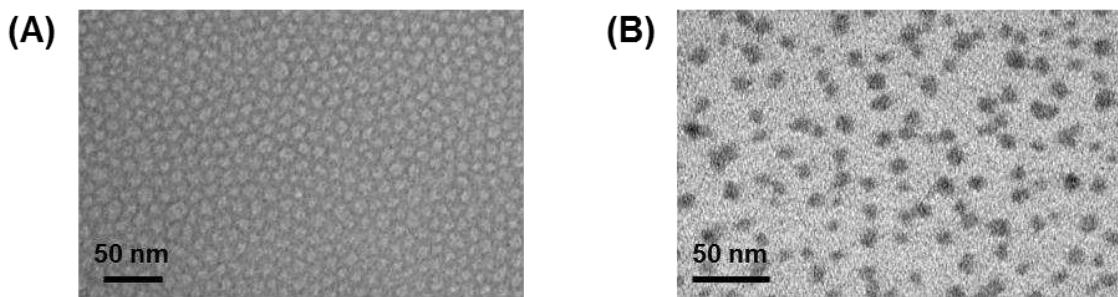


Figure 3.9 : Imagerie par MET de nanoparticules PEO-*b*-PCL : (A) blanches, et (B) décorées en leur surface de gadolinium après dilution au cinquantième

#### 4.1.3. Relaxométrie

Dotée d'une résolution spatiale élevée, l'IRM constitue un puissant outil diagnostique pour la détection des tumeurs. Contrairement à la tomographie à rayons X ou aux méthodes d'imagerie nécessitant l'injection de radio-isotopes, l'IRM est non ionisante et non invasive. Dans le cas de certaines pathologies, un agent de contraste peut être injecté au cours de l'examen de façon à rehausser le contraste entre tissus sains et lésés et ainsi établir un diagnostic fiable par comparaison des imageries avant et après injection. Les agents de contraste permettent de raccourcir les temps de relaxation longitudinale ( $T_1$ ) ou transversale ( $T_2$ ) des protons des molécules d'eau constituant les tissus biologiques environnants de façon à mettre en évidence des régions où le métabolisme est altéré. Divers chélates de gadolinium sont utilisés en routine clinique dans le but de générer un contraste  $T_1$  positif. Leur efficacité est donnée par les valeurs de relaxivité longitudinale ( $r_1$ ) ou transversale ( $r_2$ ) qui traduisent leur capacité à raccourcir les temps de relaxation longitudinale ( $T_1$ ), respectivement transversale ( $T_2$ ), des protons de l'eau en fonction de la concentration locale en gadolinium (Geraldès & Laurent 2009). Elle dépend donc du nombre de molécules d'eau capables d'interagir avec l'ion paramagnétique de  $Gd^{3+}$  et ses sept électrons célibataires. Le contraste  $T_1$  est d'autant meilleur que la surface de contact entre l'agent de contraste et les protons des molécules d'eau environnantes est élevée. Le contraste  $T_2$  est modulé par la distance entre l'agent de contraste et les molécules d'eau (Sun et al. 2017). La relaxivité longitudinale  $r_1$  de quelques-uns de ces agents de contraste dans le sang à 7 T, 37 °C, est reportée dans le Tableau 3.2.

Tableau 3.2 : Relaxivité longitudinale de quelques agents de contraste  
à base de gadolinium utilisés en routine clinique (Shen et al. 2015)

Agent de contraste	Relaxivité longitudinale $r_1$ ( $\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$ )
Gd-DOTA	$2,8 \pm 0,4$
Gd-DTPA	$3,1 \pm 0,4$
Gd-BOPTA	$4,7 \pm 0,1$
Gd-EOB-DTPA	$4,9 \pm 0,1$

Dans le cas des nanoparticules synthétisées au cours de ce travail, les segments de PEO, très hydrophiles, forment une couronne autour du cœur hydrophobe de PCL de la nanoparticule. Des échanges peuvent ainsi se produire entre les complexes de gadolinium ancrés en bout de chaîne  $\alpha$  des copolymères PEO-*b*-PCL, et donc localisés à la surface des nanoparticules, et les protons des molécules d'eau, générant ainsi un contraste sur l'image IRM. Dans l'optique d'une utilisation comme macro-agents de contraste, les propriétés relaxométriques des nanoparticules polymère décorées de gadolinium ont ainsi été étudiées dans le plasma à 7 T, 25 °C, comparativement au chélate de gadolinium associé, le Gd-DTPA. Des dilutions en cascade ont été réalisées à partir d'une solution initiale de nanoparticules dans le plasma afin de constituer un phantom d'étude. Une séquence d'acquisition rapide à temps de répétition (TR) variable a été paramétrée de façon à déterminer le  $T_1$  de chaque échantillon. Le pas d'échantillonnage entre deux valeurs successives de TR a été choisi de façon à rendre compte de la repousse de l'aimantation longitudinale au cours du temps, en présence ou non d'agent de contraste. Une région d'intérêt a été tracée au sein d'une zone homogène de l'image pour chaque échantillon de façon à calculer la valeur moyenne de l'intensité du signal dans cette zone, qui est directement proportionnelle à l'aimantation longitudinale de l'échantillon. Le  $T_1$  de chaque échantillon est déterminé par modélisation de la courbe expérimentale représentant l'évolution de l'aimantation longitudinale au cours du temps par une exponentielle croissante suivant l'équation (1) :

$$M_z(t) = M_0 * (1 - e^{-\frac{t}{T_1}}) \quad (Equation \ 1)$$

où :  $M_z$  représente l'évolution de l'aimantation longitudinale au cours du temps, noté  $t$ , et  $M_0$  l'aimantation longitudinale initiale de l'échantillon placé dans le champ magnétique  $\vec{B}_0$  d'une intensité de 7 T dans notre étude, sans excitation radiofréquence.

De manière analogue, une séquence à échos multiples (MSME) a été paramétrée afin de déterminer le  $T_2$  de chaque échantillon. Plusieurs échos de spin sont générés après sélection d'une coupe du volume à explorer. Chacun des échos consécutifs enregistrés au cours d'un même temps de répétition bénéficie d'un codage de phase spécifique qui lui permet de contribuer à l'encodage d'un espace  $k$  différent. La superposition de toutes les composantes du signal acquises à chaque nouveau passage permet l'encodage de l'espace  $k$  propre à chaque image. Une telle séquence permet ainsi de réaliser des images pondérées  $T_2$

et dépondérées  $T_1$  en choisissant  $TE \approx T_2$  et  $TR > 5 * T_1$ . La mesure de l'amplitude de chaque écho à chaque temps d'écho permet de décrire l'évolution du signal suivant une enveloppe exponentielle décroissante en  $T_2$ . L'intensité moyenne du signal de chaque échantillon, proportionnelle à son aimantation transversale, a été mesurée sur une région d'intérêt homogène de l'image et modélisée par une exponentielle décroissante traduisant l'annulation de l'aimantation transversale des spins des noyaux d'hydrogène de l'échantillon au cours du temps suivant l'équation (2) :

$$M_{xy}(t) = M_0 * e^{-\frac{t}{T_2}} \quad (Equation 2)$$

où :  $M_{xy}$  représente l'évolution de l'aimantation transversale au cours du temps, noté  $t$ , et  $M_0$  l'aimantation longitudinale initiale de l'échantillon placé dans le champ magnétique  $\vec{B}_0$ , sans excitation radiofréquence.

Un exemple d'images pondérées  $T_1$ , respectivement  $T_2$ , obtenues par IRM est présenté sur le panneau de gauche de la Figure 3.10. Les images du panneau de droite correspondent aux cartographies  $T_1$ , respectivement  $T_2$ , associées. Une fois les temps de relaxation  $T_1$  et  $T_2$  propres à chaque échantillon extrapolés, leurs inverses, *i.e.* la vitesse de relaxation longitudinale ( $R_1$ ), respectivement transversale ( $R_2$ ), ont été reportés sur un graphique en fonction de la concentration en gadolinium des différents échantillons. La relaxivité  $r_i$ ,  $i=1,2$  est donnée par l'équation (3) :

$$r_i = \frac{\left(\frac{1}{T_i} - \frac{1}{T_{i,d}}\right)}{[Gd]}; \quad i = 1,2 \quad (Equation 3)$$

où :  $\frac{1}{T_i}$  est la vitesse de relaxation longitudinale ( $i = 1$ ), respectivement transversale ( $i = 2$ ), des protons des molécules d'eau pour une concentration en agent de contraste  $[Gd]$ , et  $\frac{1}{T_{i,d}}$  la vitesse de relaxation longitudinale, respectivement transversale, des protons des molécules d'eau en l'absence d'agent paramagnétique.

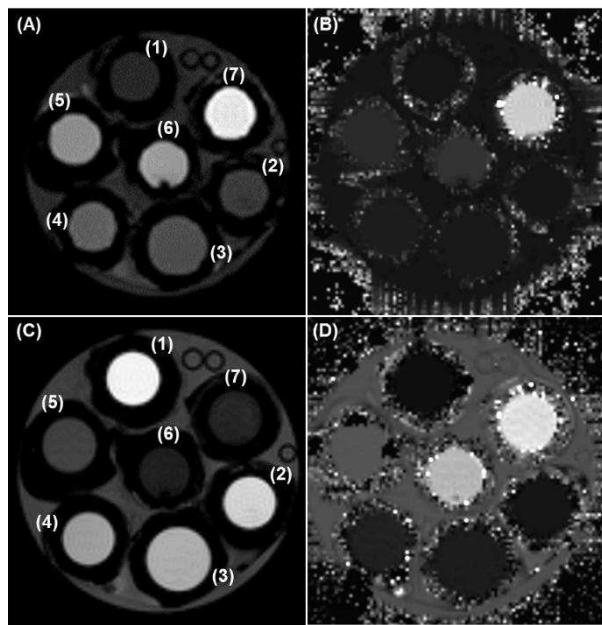


Figure 3.10 : Images d'un phantom constitué de nanoparticules de DTPA( $\text{Gd}^{3+}$ )PEO-*b*-PCL en solution à différentes concentrations dans le plasma obtenues par IRM à 7 T, 25 °C

(A) image pondérée T<sub>2</sub> (TE = 104 ms) et (B) cartographie T<sub>2</sub> correspondante ;

(C) image pondérée T<sub>1</sub> (TR = 3.000 ms) et (D) cartographie T<sub>1</sub> correspondante

Les différents échantillons contiennent du gadolinium à hauteur de :

(1) 0,714 mM, (2) 0,476 mM, (3) 0,357 mM, (4) 0,286 mM, (5) 0,0714 mM, (6) 0 mM (plasma), (7) 0 mM (eau)

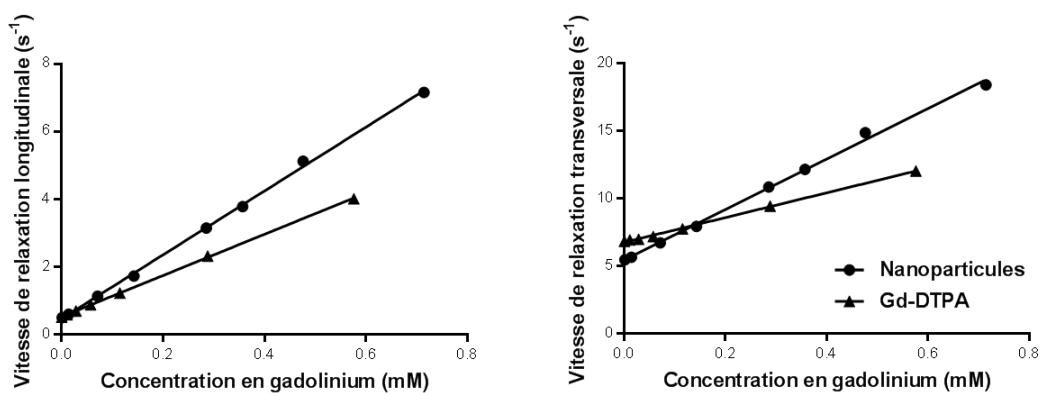


Figure 3.11 : Etude de relaxométrie des nanoparticules DTPA( $\text{Gd}^{3+}$ )PEO-*b*-PCL dans le plasma

Les données expérimentales ont alors été modélisées par régression linéaire sous GraphPad, comme illustré par la Figure 3.11. Deux droites sont ainsi obtenues ( $R^2 > 0,997$ ) dont la pente correspond à la relaxivité longitudinale, respectivement transversale, de l'agent de contraste étudié. Ces valeurs sont reportées dans le Tableau 3.3.

**Tableau 3.3 :** Comparatif entre relaxivités des nanoparticules de DTPA( $\text{Gd}^{3+}$ )PEO-*b*-PCL et relaxivités du chélate de gadolinium associé (Gd-DTPA) dans le plasma à 7 T, 25 °C

	Relaxivité longitudinale $r_1 (\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1})$	Relaxivité transversale $r_2 (\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1})$	$r_2/r_1$
Gd-DTPA	$6,093 \pm 0,044$	$9,163 \pm 0,146$	1,504
DTPA( $\text{Gd}^{3+}$ )PEO- <i>b</i> -PCL	$9,440 \pm 0,109$	$18,669 \pm 0,368$	1,978

L'ancrage des complexes  $\text{NH}_2\text{-Bn-DTPA}(\text{Gd}^{3+})$  en surface des nanoparticules polymère permet d'obtenir des relaxivités supérieures du macroagent de contraste ainsi synthétisé comparativement au chélate de gadolinium de faible masse molaire, en ralentissant le mouvement rotationnel à l'échelle moléculaire (Artemov 2003; Geraldès & Laurent 2009; Karfeld-Sulzer et al. 2010; Grogna et al. 2011). Ainsi, les relaxivités longitudinale et transversale des nanoparticules sont plus de une fois et demie, respectivement deux fois, supérieures à celles du Gd-DTPA dans le plasma à 7T, 25 °C. Par conséquent, la vitesse de relaxation des molécules d'eau excitées dans le voisinage du macroagent de contraste sera plus rapide qu'au contact du chélate de gadolinium. Toutefois, le rapport de relaxivités  $r_2/r_1$  correspondant reste du même ordre de grandeur. Il est important ici de noter que ces mesures ont été réalisées à un champ magnétique relativement intense de 7 T. Or, la relaxivité longitudinale est inversement corrélée à l'intensité du champ magnétique. Tandis que les chélates de gadolinium de faible masse molaire voient leur relaxivité longitudinale légèrement diminuer lorsque l'intensité du champ magnétique augmente, les macroagents de contraste  $T_1$  subissent une chute d'efficacité bien plus importante pour la même variation d'intensité du champ magnétique. Leur valeur la plus élevée de  $r_1$  culmine en effet pour des intensités du champ magnétique externe couramment comprises entre 0,5 et 1,0 T (Caravan et al. 2009; Mi et al. 2013). Par conséquent, le fait d'immobiliser des chélates de gadolinium sur des macromolécules présente un fort intérêt à des intensités de champ magnétique

compatibles avec la pratique clinique, qui devient rapidement limité sur des instruments de recherche à plus haut champ. La relaxivité  $r_1$  des nanoparticules formulées est donc probablement plus élevée à des champs magnétiques d'intensité comprise entre 1,5 T et 3 T. Cependant, du fait d'une accessibilité restreinte à des IRM d'intensités de champ magnétique différentes, le profil NMRD de ces nanoparticules n'a pas pu être établi. Une étude portant sur des micelles polymère de structure proche des nanoparticules synthétisées au travers de ce projet de doctorat s'est intéressée à la détermination du profil NMRD des macroagents de contraste obtenus par greffage du même complexe de Gd-DTPA à plusieurs copolymères séquencés de type  $\text{PEO}_x\text{-}b\text{-PCL}_y$ , de degrés de polymérisation différents, comparativement au chélate de gadolinium initial, à des intensités de champ magnétique comprises entre 0,0002 T et 1,88 T (Grogna et al. 2010). A basses fréquences (inférieures à 10 MHz), dans l'eau et à 25 °C, la relaxivité longitudinale du macroagent de contraste correspond environ au double de celle du chélate de gadolinium, pour atteindre le triple à une fréquence de 40 MHz avant de diminuer à nouveau. Rappelons ici que l'intensité du champ magnétique et la fréquence de précession des spins des noyaux d'hydrogène sont reliées par l'équation de Larmor (4) :

$$f = \frac{\gamma * B_0}{2\pi} \quad (\text{Equation 4})$$

où :  $f$  désigne la fréquence de précession des spins des protons de l'eau dans un champ magnétique externe  $B_0$ , et  $\gamma$  le rapport gyromagnétique du noyau d'hydrogène ( $\gamma = 42,57 \text{ MHz.T}^{-1}$ ).

Cette étude vient donc étayer l'argument avancé précédemment selon lequel le pic d'efficacité de ces agents de contraste macromoléculaires se situerait à des champs magnétiques de faible intensité. Il serait donc intéressant de tester le potentiel de tels agents de contraste à des champs cliniques. Par ailleurs, l'ancrage de complexes de gadolinium à la surface de nanoparticules polymère permet, outre une immobilisation du complexe, d'augmenter la densité d'ions paramagnétiques par particule pour un effet encore plus intense. L'agent de contraste ainsi synthétisé présente donc un potentiel intéressant dans l'optique d'un suivi par IRM de son infusion dans le parenchyme cérébral et de sa biodistribution au cours du temps.

Notons enfin que l'intérêt des agents de contraste  $T_1$ , contrairement aux agents  $T_2$  tels que les nanoparticules d'oxyde de fer par exemple, réside dans leur capacité d'induire un

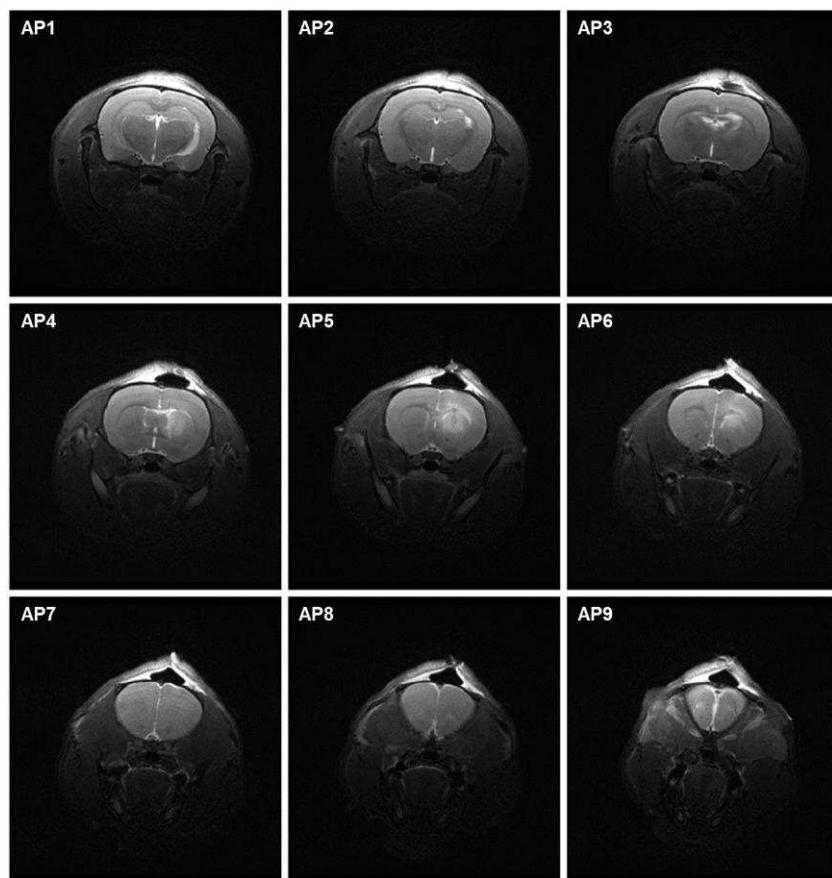
contraste positif sur l'image. En outre, ils sont stables dans le temps et permettent de raccourcir les durées d'acquisition, un facteur non négligeable en routine clinique face au nombre considérable d'exams prescrits comparativement au parc d'imagerie national. La recherche sur le développement d'agents de contraste de relaxivités élevées a un avenir très prometteur en clinique puisque de tels agents pourraient être injectés à des doses beaucoup plus faibles pour les exams de routine et offrirait également des perspectives intéressantes pour l'imagerie moléculaire (Caravan et al. 2009). Il reste maintenant à déterminer la concentration en nanoparticules décorées de gadolinium rendant possible un suivi par IRM au cours du temps de leur infusion au sein du tissu cérébral.

#### **4.1.4. Suivi *in vivo* par IRM de l'infusion convective de nanoparticules polymère décorées de gadolinium dans le striatum de rats**

Afin de démontrer la faisabilité du suivi *in vivo* par IRM de l'infusion des nanoparticules formulées et d'établir la preuve de concept de leur utilisation comme agents de contraste IRM en per- ou post-opératoire, une étude préliminaire a été réalisée chez le rat de façon à être moins limité par la taille de l'animal et la sensibilité des antennes pour l'imagerie que chez la souris. Un volume de 10 µL d'une suspension de nanoparticules à 1,51 mM de gadolinium a été injecté par CED dans le striatum gauche de deux ratten. La Figure 3.12 illustre l'effet observé sur une série d'images axiales pondérées T<sub>2</sub> 30 minutes après injection des nanoparticules dans le striatum de l'animal. La Figure 3.13 présente une série d'images coronales pondérées T<sub>1</sub> réalisées au même temps post-infusion. L'hypersignal généré par les macroagents de contraste T<sub>1</sub> est très intense. Enfin, la Figure 3.14 compare les cartographies T<sub>1</sub> obtenues 30 minutes, 17 heures, 72 heures et 96 heures après la CED. Le Tableau 3.4 synthétise les valeurs moyennes de T<sub>1</sub> et de T<sub>2</sub> mesurées dans la zone d'infusion de l'agent de contraste, mises en regard de celles mesurées dans l'hémisphère contra-latérale contrôle, au cours du temps. Quatre jours après injection, la distribution des nanoparticules décorées de gadolinium peut encore être suivie qualitativement au sein du striatum de l'animal. Cette étude préliminaire démontre l'intérêt et valide la preuve de concept d'utiliser les agents de contraste macromoléculaires formulés, et destinés à intégrer une modalité thérapeutique supplémentaire, pour un suivi par IRM de l'infusion et de la biodistribution de nanoparticules hybrides au sein du parenchyme cérébral, et plus particulièrement du tissu tumoral.

**Tableau 3.4 :** Temps de relaxation moyens mesurés sur une région d'intérêt de la zone d'infusion de l'agent de contraste comparativement à une zone contrôle délimitée en contra-latérale

Temps après injection (en heures)	Hémisphère	$T_1 \pm SD$ (en ms)	$T_2 \pm SD$ (en ms)
0,5	Injectée	$558 \pm 27$	$44 \pm 1$
	Contra-latérale	$1.760 \pm 31$	$56 \pm 2$
17	Injectée	$1.123 \pm 20$	$57 \pm 2$
	Contra-latérale	$1.812 \pm 35$	$62 \pm 3$
72	Injectée	$1.103 \pm 16$	$52 \pm 1$
	Contra-latérale	$1.855 \pm 75$	$58 \pm 2$
96	Injectée	$1.429 \pm 23$	$55 \pm 2$
	Contra-latérale	$1.795 \pm 44$	$59 \pm 2$



**Figure 3.12 :** Images axiales pondérées  $T_2$  du cerveau d'un rat 30 minutes après injection par CED de nanoparticules polymère décorées de Gd-DTPA

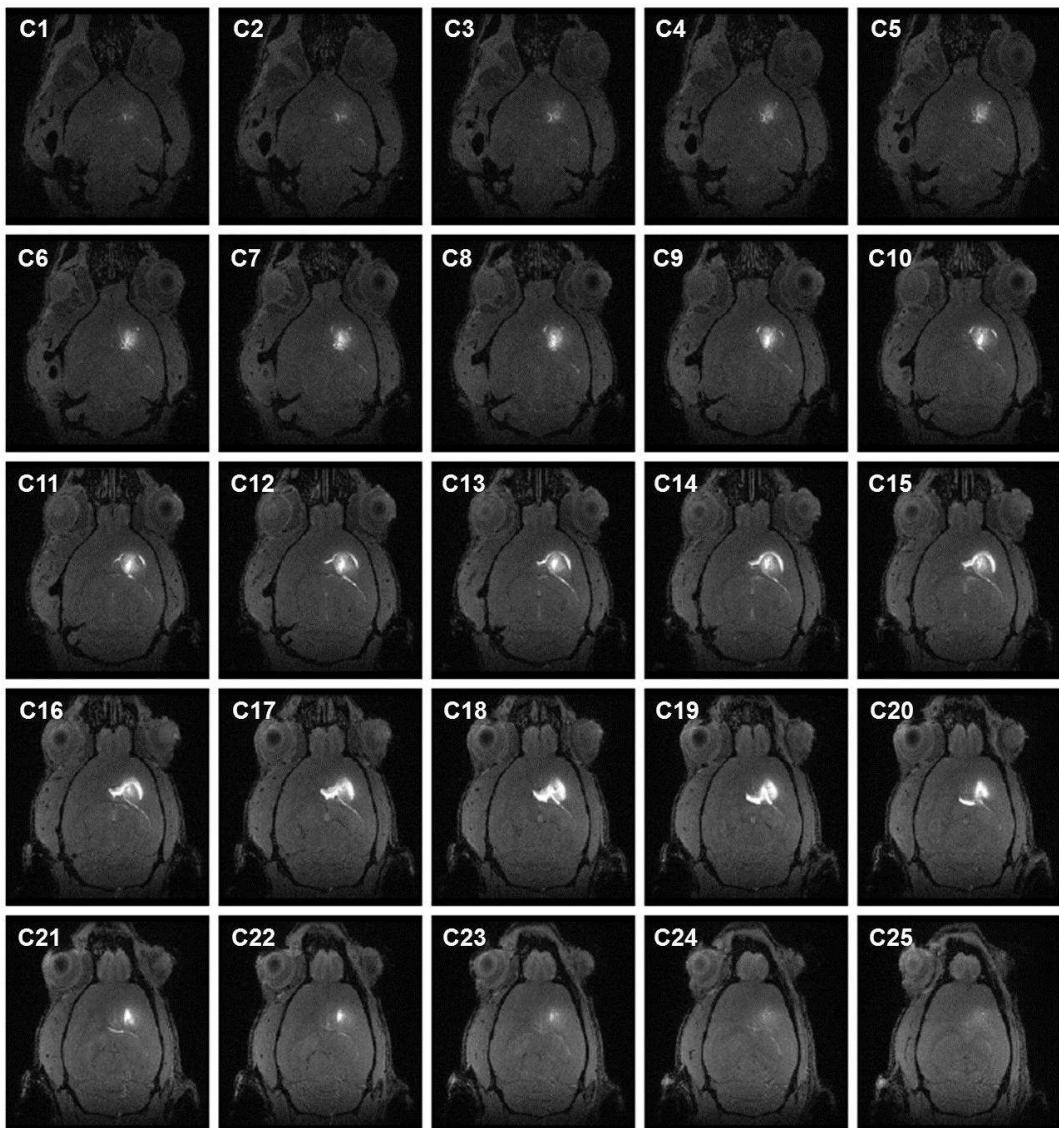


Figure 3.13 : Images coronales pondérées T<sub>1</sub> du cerveau d'un rat 30 minutes après injection par CED de nanoparticules polymère décorées de Gd-DTPA

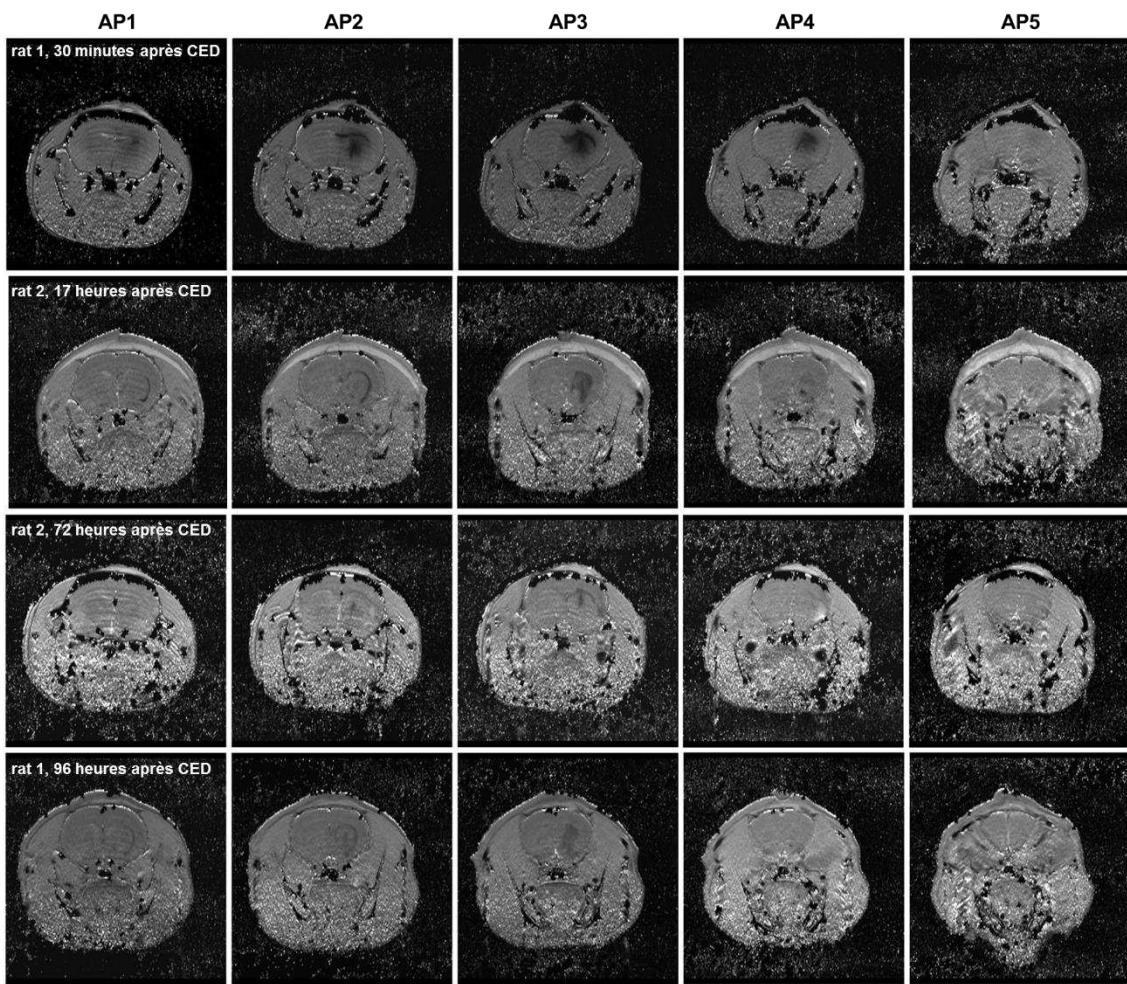


Figure 3.14 : Cartographies T<sub>1</sub> de cerveaux de rats en axiale 30 minutes, 17 heures, 72 heures et 96 heures après injection de nanoparticules polymère décorées de Gd-DTPA

L'amélioration des propriétés relaxométriques du macroagent de contraste synthétisé par rapport au chélate de gadolinium associé va dans le sens d'une réduction des doses nécessaires à l'acquisition d'images exploitables. Malgré une efficacité modérée de la réaction d'amination réductrice pour greffer les complexes de NH<sub>2</sub>-Bn-DTPA(Gd<sup>3+</sup>) en  $\alpha$  des copolymères séquencés, les nanoparticules ainsi formulées présentent un potentiel prometteur en tant qu'agent de contraste IRM.

## **4.2. Formulation de nanoparticules PEO-*b*-poly[(carbonate-CO<sub>2</sub>PhF<sub>5</sub>)-co-(ε-CL)] réticulées sur le cisplatine**

Le copolymère séquencé PEO-*b*-poly[(carbonate-CO<sub>2</sub>PhF<sub>5</sub>)-co-(ε-CL)] a été synthétisé et fonctionnalisé dans l'optique de permettre la réticulation des fonctions carboxylate pendant le long des motifs carbonate sur le cisplatine. Les essais de formulation ont été inspirés de la littérature (Ye et al. 2006; Huynh et al. 2012; Li et al. 2014; Duan et al. 2015).

### **4.2.1. Aquation du cisplatine**

Pour exercer son activité anticancéreuse, le cisplatine doit préalablement être activé par aquation (Miller & House 1989; Kelland 2007). Ce phénomène, qui consiste en la substitution des ligands chlore par des molécules d'eau, advient naturellement en milieu intracellulaire du fait de la faible concentration en chlore par rapport au milieu extracellulaire. L'activation du cisplatine est nécessaire à une réticulation ultérieure sur les fonctions carboxylate du copolymère. Cette réaction d'aquation du cisplatine a été adaptée de la littérature (Ye et al. 2006; Huynh et al. 2012; Li et al. 2014; Duan et al. 2015). Le cisplatine (66,3 mg ; 0,221 mmol) a été pesé sous boîte à gants et partiellement solubilisé dans 22 mL d'eau ultrapure. Une solution aqueuse de nitrate d'argent à 0,06 M (7,37 mL ; 0,442 mmol ; 2 équivalents) a été ajoutée au cisplatine, et le mélange a été laissé sous agitation vigoureuse, à l'abri de la lumière et à température ambiante, durant une nuit. Un précipité blanc de chlorure d'argent est progressivement apparu, qui a été éliminé à l'issue de la réaction par centrifugation de la solution à 10.000 rpm pendant 20 minutes. Le surnageant a été filtré sur 0,22 µm puis la quantité de platine a été dosée par ICP-MS.

Efficacité de la réaction d'activation du cisplatine : 93 %.

### **4.2.2. Réaction de coordination du cisplatine aux fonctions carboxylate**

La réaction de coordination du cisplatine aux fonctions carboxylate le long des motifs carbonate du copolymère séquencé a été adaptée de la littérature (Ye et al. 2006; Huynh et al. 2012; Li et al. 2014; Duan et al. 2015). Le copolymère PEO<sub>120</sub>-*b*-poly[(carbonate-CO<sub>2</sub>PhF<sub>5</sub>)<sub>5</sub>-co-(ε-CL)<sub>6</sub>] (86,0 mg ; 0,0569 mmol de motifs carbonate-spacer-COOH) a été dissous dans 1,4 mL d'eau mQ et laissé sous agitation pendant 30 minutes à température ambiante. Du carbonate de sodium (17,7 mg ; 0,167 mmol ; 2,9 équivalents) a été ajouté de façon à déprotoner les fonctions acide carboxylique et ainsi permettre la réticulation sur le cisplatine.

La solution de copolymère a été laissée sous agitation 30 minutes supplémentaires. La solution de cisplatine (20 mL ; 0,150 mmol ; 2,6 équivalents) préparée comme décrit dans le paragraphe précédent a alors été ajoutée goutte-à-goutte au milieu du vortex imposé à la solution de copolymère. Le mélange a été laissé sous agitation vigoureuse pendant 24 heures dans un bain de glace. A l'issue de la réaction, la solution a été dialysée contre de l'eau mQ (seuil de coupure : 1 kD) pendant 24 heures de façon à éliminer l'excès de cisplatine n'ayant pas été complexé avec les groupements fonctionnels carboxylate du copolymère. Le bain de dialyse a été régulièrement changé et remplacé par de l'eau mQ fraîchement tirée au cours de la dialyse. La quantité de platine ainsi éliminée a été suivie par ICP-MS au cours du temps de façon à s'assurer de la pureté de la suspension de nanoparticules récupérée à l'issue de la dialyse, mais également dans un souci de gestion des déchets toxiques. La quantité de platine présente dans le dialysat à l'issue de cette étape de purification a été dosée par ICP-MS. Après lyophilisation, une masse précise du produit obtenu a été remise en solution dans 1 mL d'eau et la concentration en platine de cette suspension a été à nouveau dosée par ICP-MS de façon à déterminer la charge en drogue (ou DLC pour "Drug-Loading Content") de chaque formulation. Notons que la drogue ici considérée est le complexe  $(NH_3)_2Pt(II)$ , forme active du cisplatine capable de réticuler sur l'ADN. Le DLC est défini comme le pourcentage en poids de la forme active du cisplatine rapporté à la masse du conjugué copolymère-Pt(II), comme formalisé par l'équation (5) :

$$DLC \text{ (wt\%)} = \frac{\text{Masse de } (NH_3)_2Pt(II)}{\text{Masse de micelles} - \text{Pt}} * 100 \quad (\text{Equation 5})$$

La technique de préparation détaillée ci-dessus a ainsi conduit à la formation de nanoparticules réticulées sur le cisplatine dont la charge moyenne en drogue a été estimée à  $3,57 \pm 1,37$  wt%.

Cette faible efficacité de réticulation des complexes Pt(II) aux fonctions carboxylate du copolymère peut être attribuée à une faible accessibilité des fonctions carboxylate le long des segments polycarbonate du copolymère supposé s'auto-assembler spontanément dans l'eau sous forme de nanoparticules. La PCL forcerait alors à la constitution d'un cœur fortement hydrophobe. La seconde séquence étant supposé à gradient avec une polymérisation plus rapide du carbonate-CO<sub>2</sub>PhF<sub>5</sub> par rapport à l' $\epsilon$ -CL, le polycarbonate serait ainsi localisé autour du cœur hydrophobe imposé par la PCL. Les complexes hydratés du cisplatine étant

hydrophiles, il est possible qu'ils ne traversent pas facilement la couronne de PEO entourant la nanoparticule. Cependant, bien que la taille de la seconde séquence soit en accord, relativement à celle du PEO amorceur, avec une balance HLB conférant des propriétés amphiphiles au copolymère et lui permettant ainsi de s'auto-assembler dans l'eau sous forme de nanoparticules, le pH légèrement basique du milieu réactionnel rend les chaînes polycarbonate plus hydrophiles et pourrait ainsi interférer dans le processus de formation de nanoparticules. Dans cette configuration, même si les fonctions carboxylate restent relativement accessibles, une compétition avec les ions carbonate issus de la mise en solution du carbonate de sodium peut s'instaurer. Ceux-ci, de par leur concentration en solution et leur accessibilité, seraient alors capables de facilement se complexer au cisplatine, au détriment des fonctions carboxylate du copolymère. Notons par ailleurs que la réticulation des fonctions carboxylate avec le cisplatine redonne de son caractère hydrophobe aux chaînes polycarbonate, permettant ainsi à nouveau l'auto-assemblage dans l'eau des chaînes de copolymère pour former des nanoparticules tout en rendant l'accès aux fonctions carboxylate plus contraint.

L'observation par MET révèle la formation de nanostructures, puisque de taille inférieure à 100 nm dans au moins une des trois dimensions de l'espace. Une telle morphologie, anisotrope dans les différentes dimensions de l'espace comme illustré par la Figure 3.15, compromet une analyse fine de la distribution de tailles de l'échantillon par diffusion dynamique de la lumière (DLS), cette technique reposant sur l'étude de la diffraction de la lumière par des particules sphériques en solution, i.e. animées d'un mouvement brownien.

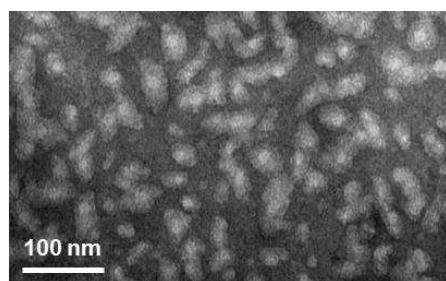


Figure 3.15 : Imagerie par MET de nanoparticules  
PEO-*b*-poly[(carbonate-spacer-COOH)-co-(ε-CL)] réticulées sur le cisplatine

### 4.3. Préparation de nanoparticules mixtes

L’auto-assemblage des chaînes de copolymères biséquencés DTPA( $\text{Gd}^{3+}$ )PEO-*b*-PCL sur le cisplatine dans l’eau a conduit, après 24 heures de réaction à 0 °C, à la formation de nanoparticules mixtes avec une charge en drogue inférieure à 0,5 wt%. Ce résultat n’est pas surprenant étant donnée l’hydrophilie des complexes hydratés du cisplatine qui ne se laissent donc pas emprisonner dans le cœur hydrophobe de PCL et n’ont aucune possibilité d’attaché au niveau de la couronne de PEO. Un essai de formulation de nanoparticules mixtes combinant les deux copolymères séquencés DTPA( $\text{Gd}^{3+}$ )PEO-*b*-PCL et PEO<sub>120</sub>-*b*-poly[(carbonate-CO<sub>2</sub>PhF<sub>5</sub>)<sub>5</sub>–co–(ε-CL)<sub>6</sub>] introduits dans des proportions 1,5 pour 1 (mol:mol) a également été réalisé, conduisant à la formation d’une population de nanoparticules hybrides *a priori* bien définies, de taille moyenne 23,86 ± 2,013 nm, mais avec une charge en drogue et en gadolinium inférieure à 1,2 wt% et 0,20 wt% respectivement.

## 5. Discussion

Les résultats préliminaires obtenus sur des formulations de nanoparticules réticulées sur le cisplatine à partir du copolymère PEO<sub>120</sub>-*b*-poly[(carbonate-CO<sub>2</sub>PhF<sub>5</sub>)<sub>5</sub>–co–(ε-CL)<sub>6</sub>] se sont révélés insatisfaisants, avec une charge en drogue beaucoup trop faible et des particules difficilement caractérisables de par leur morphologie aléatoire. Des alternatives ont donc été proposées dans le but d’améliorer la réticulation du système copolymère sur le cisplatine. Ainsi, comme la complexation du cisplatine au copolymère repose sur la présence de groupements fonctionnels carboxylate le long des chaînes polycarbonate, une augmentation du nombre de ces fonctions chimiques devrait permettre d’augmenter la charge en drogue. L’auto-assemblage spontané dans l’eau des chaînes copolymère étant rendu possible par leurs propriétés amphiphiles, il pourrait être envisagé de s’affranchir du segment hydrophobe de PCL puisque le polycarbonate lui-même devient hydrophobe dès lors qu’il se conjugue au cisplatine, devenant alors susceptible de former le cœur de la nanoparticule. La synthèse d’un copolymère séquencé PEO<sub>5.000</sub>-*b*-PC<sub>2.000</sub> a ainsi été envisagée. De manière analogue, une autre possibilité permettant d’augmenter le nombre de groupements carboxylate consisterait à synthétiser un copolymère séquencé de masse molaire plus élevée tout en gardant la même HLB, à partir d’un poly(oxyde d’éthylène) méthyl éther de degré de polymérisation moyen double de celui utilisé précédemment comme amorceur de la polymérisation par ouverture de cycle du carbonate-CO<sub>2</sub>PhF<sub>5</sub> et de l’ε-CL. En parallèle de ces copolymères séquencés, la

synthèse d'un homopolycarbonate de masse molaire élevée pourrait permettre, après sa fonctionnalisation par des groupements carboxylate comme décrit précédemment, de davantage stabiliser la nanoparticule *via* un nombre accru de sites de réticulation avec le cisplatine (Engler et al. 2015). Une purification par ultrafiltration de la solution nanoparticulaire a également été envisagée, sans succès du fait de pertes considérables du produit. Le recours à un procédé de nanoprecipitation constituerait une autre alternative à l'obtention de nanoparticules présentant une charge en drogue plus élevée (Cajot, Riva, et al. 2011; Lepeltier et al. 2014).

Par ailleurs, des nanoparticules dédiées à l'imagerie ont été formulées avec succès à partir du copolymère biséquencé DTPA( $\text{Gd}^{3+}$ )PEO-*b*-PCL. Toutefois, la dissolution préalable du copolymère dans le DMF avant ajout de cinq équivalents en volume d'eau est nécessaire à l'obtention de nanoparticules bien définies. Bien que la formulation soit suivie d'une dialyse contre de l'eau distillée de six heures durant laquelle les traces résiduelles de DMF sont éliminées, le recours à un solvant organique toxique pour le développement d'un outil à visée biomédicale demeure discutable.

Les limitations rencontrées au cours de ces travaux préliminaires et formalisées à travers ce chapitre de préambule nous ont amenés à revenir sur la stratégie initiale du projet, basée sur l'utilisation de deux copolymères séquencés distincts, intéressants de par leurs spécificités et propriétés à visée soit d'imagerie soit de thérapie. Les limites inhérentes à la flexibilité souhaitée dans le procédé de formulation s'expliquent notamment par le fait que les deux systèmes, étudiés indépendamment l'un de l'autre, sont très différents dans leur façon même de s'auto-assembler en solution. En effet, les copolymères biséquencés DTPA( $\text{Gd}^{3+}$ )PEO<sub>120</sub>-*b*-PCL<sub>16</sub> s'auto-assemblent spontanément dans l'eau pour former des nanoparticules de par leurs propriétés amphiphiles. Le copolymère PEO<sub>120</sub>-*b*-poly[(carbonate-spacer-COOH)<sub>5</sub>-co-(ε-CL)<sub>6</sub>], bien que capable d'un tel comportement en milieu acide, a été conçu pour permettre une réticulation sur le cisplatine, en milieu neutre voire légèrement basique, qui devient un lien chimique structurant propre à la nanoparticule. Les liaisons de coordination avec le complexe de platine stabilisent ainsi la particule.

Par conséquent, le concept initial de ce projet a évolué vers l'élaboration d'un système finalement plus simple, sur la base d'un seul copolymère triséquencé amphiphile de DTPA( $\text{Gd}^{3+}$ )PEO-*b*-(PC-spacer-COOH)-*b*-PCL combinant des propriétés d'imagerie, de par l'ancrage du complexe de gadolinium en  $\alpha$ , et la capacité de réticuler sur le cisplatine par le

biais de fonctions carboxylate le long de la chaîne polycarbonate. L'auto-assemblage spontané dans l'eau des chaînes copolymère permettrait ainsi l'obtention de nanoparticules mixtes stabilisées par des liaisons chimiques de coordination, outrepassant ainsi la limite de la concentration d'agrégation critique (CAC) rencontrée dans un contexte d'administration *in vivo* dans l'organisme.

L'article qui suit, soumis au journal Biomaterials Science en mars 2018, présente ainsi la synthèse et la fonctionnalisation d'un nouveau copolymère triséquencé combinant des propriétés d'imagerie et la capacité de former une prodrogue macromoléculaire par réticulation sur le cisplatine. Un PEO-*b*-poly(carbonate-CO<sub>2</sub>PhF<sub>5</sub>)-*b*-PCL a été synthétisé par polymérisation par ouverture de cycle successive du carbonate-CO<sub>2</sub>PhF<sub>5</sub> à partir du groupement hydroxyle terminal de l' $\alpha$ -acétal-PEO-OH, puis de l' $\epsilon$ -CL. La conversion des groupements pentafluorophényle le long des chaînes polycarbonate par une réaction en deux étapes avec le 3-aminopropan-1-ol puis l'anhydride succinique a été réalisée comme détaillé dans le paragraphe 3.2.3. afin de les fonctionnaliser *via* des groupements carboxylate capable de réticuler avec le cisplatine. Le protocole de greffage du complexe de gadolinium en  $\alpha$  du copolymère triséquencé a été adapté de la procédure décrite au paragraphe 3.1.5.. Sur la base des premières observations détaillées à travers ce chapitre et des limitations ainsi mises en évidence, nous avons décidé d'adapter certains paramètres du procédé de formulation ultérieur afin d'optimiser l'obtention de nanoparticules polymère réticulées sur le cisplatine et leur caractérisation physicochimique. Ces éléments sont passés en revue dans le paragraphe suivant, de façon à poser le cadre d'étude de l'article constituant le chapitre 4 de ce manuscrit.

Afin d'éviter la présence dans le milieu de toute espèce potentiellement concurrente des fonctions carboxylate dans leur réticulation avec le cisplatine, une solution de soude à 0,1 M sera désormais utilisée dans la suite du projet pour augmenter le pH des mélanges réactionnels de formulation. La température du mélange réactionnel, maintenue au cours de ces essais préliminaires à 0 °C par un bain de glace, sera fixée dans la suite à 37 °C, dans l'optique de favoriser la réaction de coordination du platine aux fonctions carboxylate (Gryparis et al. 2007). Comme souligné précédemment, la balance hydrophile-lipophile du copolymère triséquencé dépend du pH puisque les fonctions acide carboxylique seront protonées à pH acide et exhiberont donc des propriétés plutôt lipophiles, tandis qu'elles seront déprotonées en milieu neutre à basique ( $pK_{ACOOH/COO^-} \approx 4,9$ ), rendant alors la chaîne polycarbonate hydrophile. Dans la suite, les nanoparticules formées seront qualifiées de

prodrogues macromoléculaires puisque le cisplatine réticulé est inactivé jusqu'à être libéré dans le milieu intracellulaire où il retrouvera son intégrité. Différents paramètres expérimentaux ont été rapportés dans la littérature comme jouant un rôle clé dans le processus de formulation de nanoparticules polymère (Mai & Eisenberg 2012). La concentration du copolymère en solution, le ratio molaire entre cisplatine et fonctions carboxylate et la durée de la réaction de coordination constituent les principaux paramètres d'intérêt considérés dans la suite de cette étude pour l'obtention de nanoparticules polymère réticulées sur le cisplatine. L'impact de ces variables sur la charge en drogue des nanoparticules, ainsi que sur leur taille et leur stabilité au cours du temps, sera étudié dans le but de déterminer les paramètres optimaux à la formulation de nanosystèmes hybrides adaptés au traitement locorégional du glioblastome. Chaque expérience sera considérée indépendante de la température, du pH et de la vitesse d'agitation, fixés à 37 °C, 7,4 et 240 rpm respectivement.

La caractérisation des nanoparticules passe nécessairement par une mesure de leur taille, élément fondamental notamment dans la perspective d'une future administration *in vivo*. La taille et la distribution de tailles conditionnent en effet les interactions avec le vivant, notamment les mécanismes de prise en charge intracellulaire ou à l'inverse d'élimination (Montes-Burgos et al. 2010). Toutefois, une telle caractérisation requiert une définition préalable du concept de taille. Comme nous l'avons évoqué précédemment dans le cas des nanoparticules PEO-*b*-poly[(carbonate-spacer-COOH)-co-(ε-CL) réticulées sur le cisplatine, la définition de taille dépend intrinsèquement de la géométrie de l'objet (sphérique, cylindrique, ...). Il est donc nécessaire d'atteindre un consensus en définissant une dimension caractéristique de l'objet, accessible par l'expérience. Le rayon hydrodynamique, ou rayon équivalent d'une sphère de même comportement hydrodynamique que la particule analysée, est communément utilisé en granulométrie. Il se mesure par le recours à des techniques de diffusion dynamique de la lumière, sur la base de la théorie de Mie qui décrit la diffraction d'une onde électromagnétique par une particule sphérique en mouvement aléatoire dans un liquide. La technique conventionnelle de détermination de la taille moyenne et de la distribution de tailles d'une population repose sur le principe de diffusion dynamique de la lumière. La mesure est couramment réalisée sur un appareil de DLS. L'algorithme développé en interne par la société Malvern commercialisant ces instruments extrapole du faisceau de lumière diffracté reçu par les capteurs une distribution de taille de la population de nanoparticules. Alors que la théorie de Mie formalise la diffusion de la lumière aux petits

angles, des mesures à angle nul dans les conditions expérimentales masqueraient les petites particules au profit des plus grosses, induisant ainsi un biais sur la distribution de tailles, non représentative de l'échantillon analysé. Par conséquent, les systèmes de DLS Malvern utilisés au laboratoire permettent une mesure de diffusion de la lumière soit à un angle de 12,8 °, avec un risque de perte de sensibilité pour la détection des petites particules, soit par rétrodiffusion à un angle de 173 °. Cette seconde configuration est généralement privilégiée puisqu'elle rend possible la visualisation des différentes classes granulométriques d'une population. Toutefois, une variabilité sur les mesures de tailles moyennes de certaines formulations préliminaires et un défaut de reproductibilité d'une expérience à l'autre ont engendré une remise en question de la fiabilité des mesures de tailles par DLS. En effet, la mise en place expérimentale de la mesure par rétrodiffusion à 173 ° ne respecte pas fondamentalement la théorie de Mie qui formalise la diffusion de la lumière aux petits angles. Il a ainsi été décidé de mettre en œuvre une méthode orthogonale à la DLS de façon à vérifier la qualité et la pertinence des résultats obtenus précédemment. Contrairement aux méthodes ensemblistes auxquelles appartient la DLS, une analyse individuelle du suivi du mouvement brownien des particules en solution a été réalisée par NTA. Le principe de fonctionnement du NTA est explicité par la Figure 3.16. Un faible volume (300 µL) d'une suspension de nanoparticules à une concentration comprise entre  $10^7$  et  $10^9$  particules.mL<sup>-1</sup> est introduit dans une cellule dite de diffraction que traverse un faisceau laser à 405 nm. Le couplage d'un microscope à ce système permet de visualiser en temps réel la lumière diffractée par les nanoparticules en mouvement. Une caméra permet d'enregistrer le mouvement des nanoparticules dans un champ de vue déterminé d'approximativement 100 x 100 µm<sup>2</sup>. L'analyse de ces acquisitions permet de suivre la trajectoire de chaque particule, simultanément, dans l'espace et dans le temps, image après image.

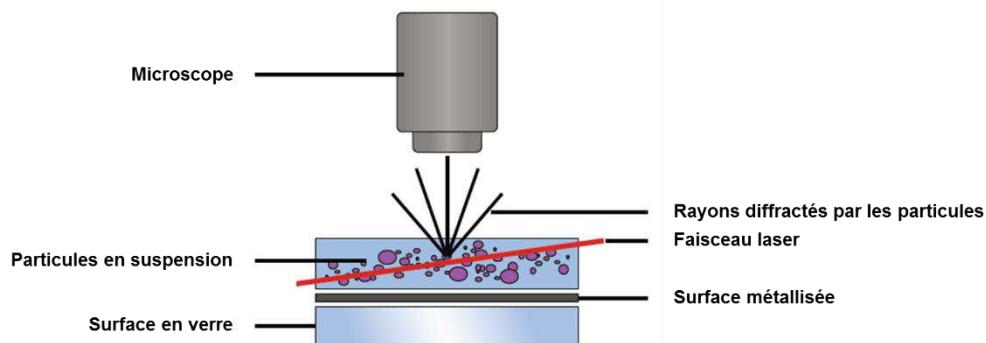


Figure 3.16 : Principe de l'analyse du suivi individuel de particules (NTA)  
(adapté de la documentation technique de Malvern)

Le logiciel d'analyse associé à l'appareil considère comme une particule un élément diffractant de la lumière dont il est capable de suivre la trajectoire sur au moins cinq images consécutives. La loi de Stokes-Einstein, rappelée par l'équation (6), formalise le mouvement brownien dans l'espace d'une particule de forme sphérique en régime laminaire (Gallego-Urrea et al. 2011) :

$$D_T = \frac{K_B * T}{6 * \pi * \vartheta * r_h} \quad (\text{Equation 6})$$

où :  $D_T$  représente le coefficient de diffusion de la particule,  $K_B$  la constante de Boltzmann,  $T$  la température absolue,  $\vartheta$  la viscosité du milieu et  $r_h$  le rayon hydrodynamique.

Si l'on considère un mouvement plan tel que celui des nanoparticules enregistré par la caméra, le déplacement quadratique moyen d'une particule dans un milieu donné est relié au coefficient de diffusion par l'équation (7) (Gallego-Urrea et al. 2011) :

$$\bar{x^2} + \bar{y^2} = L^2 = 4 * D * t \quad (\text{Equation 7})$$

où :  $\bar{x}$  et  $\bar{y}$  représentent les déplacements absous de la particule dans la direction x et y respectivement pendant un temps  $t$ , et  $L$  le libre parcours moyen, c'est-à-dire la distance entre deux positions successives de la particule.

L'équation (8), adaptée de la loi de Stokes-Einstein, permet de remonter de la vitesse quadratique moyenne d'une particule à sa taille (Domingos et al. 2009; Filipe et al. 2010; Gallego-Urrea et al. 2011; Gross et al. 2016) :

$$\overline{(x,y)^2} = \frac{2 * K_B * T}{3 * \pi * \vartheta * r_h} \quad (Equation\ 8)$$

où :  $\overline{(x,y)^2}$  représente la vitesse quadratique moyenne de la particule.

Le NTA constitue une méthode d'analyse absolue puisqu'elle ne nécessite aucune calibration préalable de l'appareil ; le coefficient de diffusion des nanoparticules dans le milieu d'analyse est mesuré à partir de la température du liquide injecté et de la viscosité du milieu, conduisant à la détermination du rayon hydrodynamique équivalent de chaque particule, et finalement à une distribution de tailles de la population analysée (Montes-Burgos et al. 2010). Une telle analyse moyenne en nombre d'une population permet de s'affranchir des risques de surestimation de la distribution en tailles associés à une analyse classique de DLS pour laquelle l'intensité de la lumière diffractée est proportionnelle au diamètre de la particule à la puissance six. Cette technique est par conséquent très sensible à la présence de grosses particules et ne rend pas fidèlement compte de la distribution réelle de tailles d'un échantillon lorsque celui-ci est complexe ou polydisperse comme c'est le cas de nombreux échantillons biologiques (Filipe et al. 2010). A l'inverse, la capacité du NTA à mesurer simultanément des tailles pondérées en nombre ainsi que l'intensité diffractée par les particules offre une excellente résolution pour l'étude de solutions particulières hétérogènes, sans hypothèse préalable quant à la nature de la distribution (Boyd et al. 2011). En outre, l'analyse individuelle de chaque particule permet de remonter directement à la concentration globale en nombre de l'échantillon, ce qui apporte une information quantitative supplémentaire à la simple mesure de taille. Par conséquent, la caractérisation des nanoparticules polymère réticulées sur le cisplatine formulées par la suite sera réalisée par NTA.



---

Chapitre 4 : Article Scientifique

“Hybrid Gd<sup>3+</sup>/cisplatin cross-linked  
polymer nanoparticles  
enhance platinum accumulation and  
formation of DNA adducts in  
glioblastoma cell lines”

publié dans Biomaterials Science

Lajous *et al.*, *Biomater. Sci.*, 2018, **6**, 2386

---



Table of Contents:

ABSTRACT	148
GRAPHICAL ABSTRACT	149
INTRODUCTION	150
EXPERIMENTAL SECTION	152
1. Materials	152
2. Characterization	154
3. Polymer synthesis and functionalization	157
4. Formulation of multifunctional cisplatin cross-linked polymeric nanoparticles	160
5. <i>In vitro</i> drug release	161
6. Cell culture	161
7. Biocompatibility assay	162
8. Cell viability assay	162
9. Intracellular platinum accumulation	163
10. Binding of platinum to DNA	163
11. <i>In vivo</i> MRI monitoring of the infusion of Gd-DTPA nanoparticles within the brain after convection-enhanced delivery	164
12. Statistical analysis	165
RESULTS AND DISCUSSION	166
1. Polymer synthesis and functionalization	166
2. Formulation and characterization of multifunctional cisplatin cross-linked polymeric nanoparticles	174
3. <i>In vitro</i> drug release from the nanoparticles	184
4. Copolymer biocompatibility	186
5. Time course of platinum accumulation in glioblastoma cells and subsequent formation of DNA adducts	187
CONCLUSION	196



## **Hybrid Gd<sup>3+</sup>/cisplatin cross-linked polymer nanoparticles enhance platinum accumulation and formation of DNA adducts in glioblastoma cell lines**

Hélène Lajous,<sup>a,b</sup> Raphaël Riva,<sup>b,#</sup> Bénédicte Lelièvre,<sup>c,#</sup> Clément Téaud,<sup>a,d</sup> Sylvie Avril,<sup>a</sup> François Hindré,<sup>a,d</sup> Frank Boury,<sup>a</sup> Christine Jérôme,<sup>b</sup> Philippe Lecomte,<sup>b,\*</sup> and Emmanuel Garcion<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> CRCINA, INSERM, Université de Nantes, Université d'Angers, Angers, France

<sup>b</sup> Center for Education and Research on Macromolecules (CERM), CESAM Research Unit, University of Liège, B6a Sart-Tilman, B-4000 Liège, Belgium

<sup>c</sup> Centre régional de pharmacovigilance, Laboratoire de pharmacologie-toxicologie, CHU Angers, 4 rue Larrey, F-49100 Angers, France

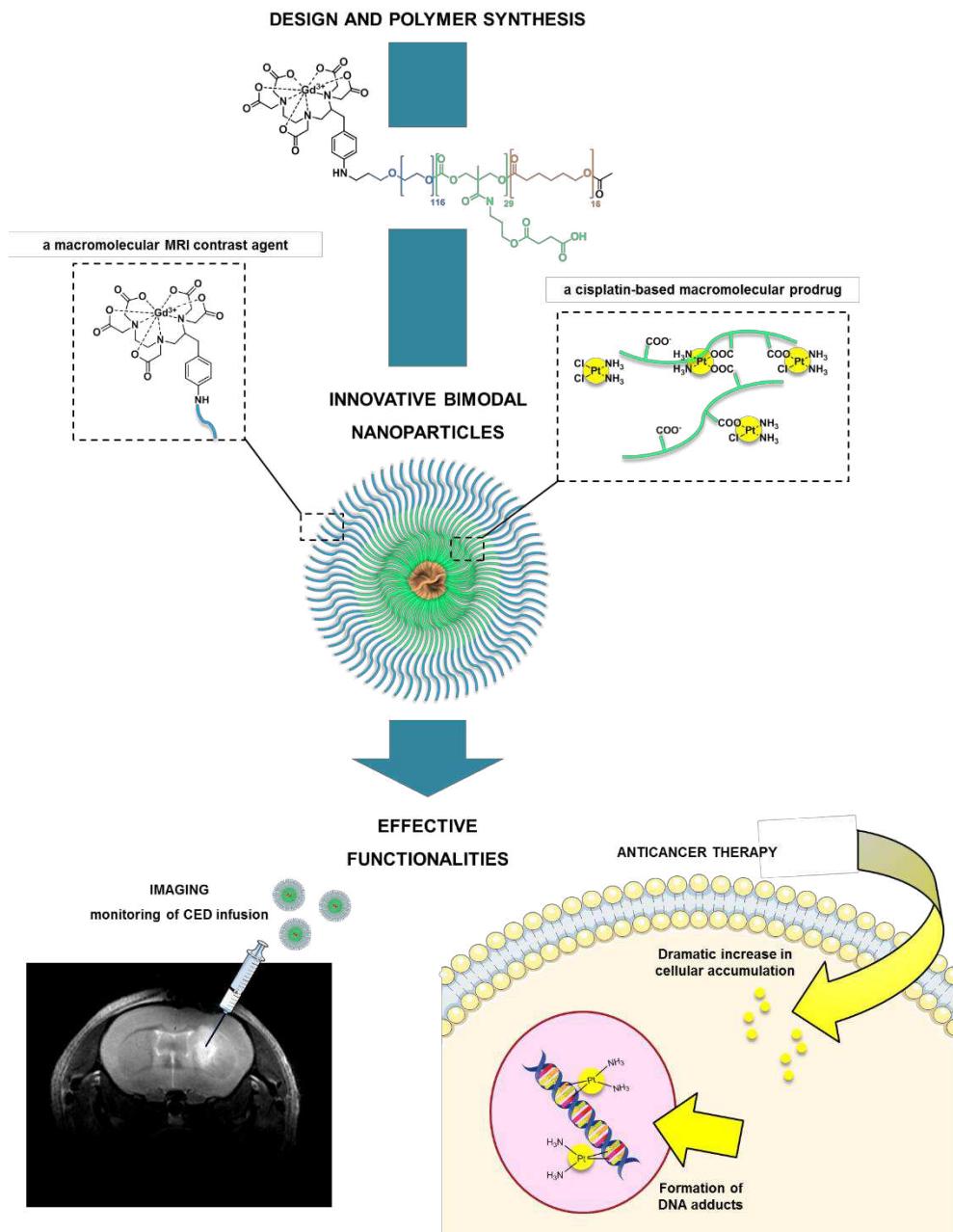
<sup>d</sup> Plateforme de Radiobiologie et d'Imageries Expérimentales (PRIMEX), Institut de recherche et d'ingénierie de la santé, 4 rue Larrey, F-49100 Angers, France

#,\* Equivalent contribution

## Abstract

Glioblastoma is the most frequent and aggressive primary malignant tumor of the central nervous system with a gloomy prognosis. Platinum derivatives and one among them, cisplatin, exhibited promising results when locally administered into the brain of glioblastoma bearing rats. Nanovectorization of anticancer agents through polymeric nanoparticles may even promote drug accumulation within cells, thus concentrating the drug efficiently at its target. Anchorage of gadolinium complexes on the corona of such smart drug delivery systems could further allow magnetic resonance imaging (MRI) monitoring of the nanoplatform biodistribution in the damaged parenchyma and its therapeutic benefit. For this purpose, a biocompatible amphiphilic triblock copolymer, made of degradable polyester and polycarbonate and bioeliminable polyethylene oxide (PEO), was synthesized by successive ring-opening polymerizations. After micellization in water, gadolinium complexes were grafted onto the PEO micelle corona and the carboxylate functions, located at the surface of the micelle’s core, were able to cross-link with Pt(II) complexes. A macromolecular prodrug was therefore recovered in which more than one third of the carboxylate functions were linked to a platinum atom. By this strategy, stable cisplatin cross-linked nanoparticles were formulated with a mean size in the range of  $100.63 \pm 12.04$  nm consistent with biological investigations. Relaxometry measurements both in water and in plasma at 7 T, 25 °C, confirmed the intrinsic potential of these hybrid nanoparticles as alternative MRI contrast agents with a substantial increase in the  $r_2/r_1$  ratio by a factor of 3.3 and 2.7, respectively, compared to the conventional low molar mass Gd-DTPA. As a result, their infusion within the striatum of glioblastoma-bearing mice resulted in a hypersignal on T<sub>2</sub>-weighted MR images that persisted over time. Ultimately, the formulated prodrug exhibited up to 50-fold increased accumulation in human glioblastoma cell lines and up to 32-fold enhanced subsequent Pt-DNA adduct formation in comparison with free cisplatin, thus supporting the potential of this innovative bimodal tool for further applications.

## Graphical abstract



**Key words:** nanoparticle, polyethylene oxide, polyester, cisplatin, gadolinium contrast agent, cancer, local treatment.

## Introduction

Since the serendipitous discovery of its antineoplastic potential by Rosenberg in 1965 and its FDA approval in 1972, cisplatin (or cis-diamminedichloroplatinum(II)) has strongly changed the worldwide clinical landscape of cancer therapy. It has especially enabled dramatic improvement in the prognosis of germinal cancer cells (Kelland 2007). Cisplatin is a square-planar coordination complex with the central platinum atom in a divalent state (Siddik 2002). It has a rigid structure with two stable amine ligands located in a cis-configuration and two labile chlorine groups that can be substituted by nucleophilic substrates present in proteins and nucleic acids. Thus, cisplatin is reported to induce DNA intrastrand cross-linking that further leads to aberrant repair mechanism or cell apoptosis. Nowadays, it remains widely used as a standard-of-care in the treatment of several solid tumors including testis, ovarian, lung and head and neck cancers. Indeed, cisplatin exhibits an intrinsic broad-spectrum anticancer activity and also radiosensitizing properties (Reboul 2004; Hoebers et al. 2008). However, its efficacy is substantially limited by a high toxicity profile. Therefore, several platinum derivatives have been developed in the last few decades to overcome systemic toxicity (Kelland 2007; Cabral et al. 2005; Wang & Lippard 2005; Nishiyama & Kataoka 2006; Yang et al. 2016; Ndagi et al. 2017). Besides, several solid tumors that primarily respond to platinum treatment often relapse with an acquired resistance (Dasari & Tchounwou 2014). Such drug resistance is commonly attributed to a reduced accumulation of the drug within cells (Shen et al. 2012).

In this framework, nanomedicines are of paramount interest since they precisely aim at concentrating their efficacy in the close vicinity of the tumor site while reducing the side effects that arise from systemic injection (Lehner et al. 2013; Nazir et al. 2014; Bregoli et al. 2016). Nanocarriers offer great opportunities due to their size, versatility of structure and easy functionalization with targeting ligands or imaging moieties (Peer et al. 2007; Freichels et al. 2011; Freichels et al. 2012; Ling et al. 2012). Several types of nanoparticles encapsulating cisplatin have demonstrated efficacy in animal models (Nishiyama & Kataoka 2006; Mattheolabakis et al. 2009; Moreno et al. 2010; Guo et al. 2013). Lipoplatin™, a liposomal formulation of cisplatin, is currently under phase III evaluation for systemic administration (Boulikas 2009). Resorting to FDA-approved and highly controlled polymers for the design of drug delivery systems is in line with the sustainable development of new therapeutics from the perspective of a simplified translation to the clinics. In this context, the design of

functionalized amphiphilic copolymers based on poly(ethylene oxide) (PEO) as the hydrophilic segment and aliphatic polyesters including poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL), poly(lactic acid) (PLA) or poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) as the hydrophobic backbone has been extensively investigated (Shen et al. 2015; Shen et al. 2017). Indeed, self-assembly of amphiphilic block copolymers in water results in safe, easy to design and pharmaceutically acceptable polymeric micelles suited for biological evaluation (Cabral & Kataoka 2014). Further functionalization of the constitutive block copolymers by the anchorage of targeting or imaging ligands enables one to broaden their potential to treat cancer as well as infectious diseases, but also for applications in regenerative medicine (Oerlemans et al. 2010; Xu et al. 2014; Grossen et al. 2017; Sarkar et al. 2018). Another alternative to avoid the side effects caused by systemic administration of a drug relies on its locoregional infusion directly into the damaged tissue by stereotactic infusion, a process called convection-enhanced delivery (CED) (Zhou et al. 2012; Arshad et al. 2015; Vogelbaum & Aghi 2015; Li et al. 2015; Zhang et al. 2016). Such confined strategies are of great interest in the management of some cancers whose prognosis remains inexorably poor, especially in the case of glioblastoma.

Glioblastoma is the most frequent and aggressive primary malignant tumor of the central nervous system with a median of survival of less than 15 months (Dresemann 2010; Dolecek et al. 2012). Standard-of-care consists in maximum safe resection of the tumor mass followed by a radiochemotherapy that combines stereotactic beam radiation with concomitant temozolomide (Stupp et al. 2005). Temozolomide is an oral alkylating agent that demonstrates a moderate toxicity profile and can penetrate the intact blood-brain barrier. Its cytotoxic action consists in the delivery of a methyl group to purine bases of DNA, preferentially to O<sub>6</sub>- and N<sub>7</sub>-guanine, but also to a less extent to N<sub>3</sub>-adenine, which further leads to cells apoptosis (Roos et al. 2007). However, its efficiency is limited by wild-type O<sub>6</sub>-methylguaninemethyltransferase (MGMT), an enzyme that repairs DNA methyl-adducts commonly induced by alkylating agents (Hegi et al. 2005). Therefore, new strategies are urgently required to improve patients' prognosis and quality of life.

Since systematic relapse mainly occurs within the 3 cm peritumoral area, local control of the pathology is essential in the management of the disease. As such, intracerebral delivery of cisplatin and carboplatin in combination with an external beam – either synchrotron X-ray or photon irradiation – enabled a dramatic increase in the overall survival of F98 glioma-bearing rats (Rousseau et al. 2007; Rousseau et al. 2009; Rousseau et al. 2010; Bobyk et al. 2012).

Therefore, by focusing on locoregional treatment of glioblastoma, new developments of nanoscale cisplatin delivery systems may potentiate the abovementioned benefits due to their versatility of structure and behavioral dynamics. As magnetic resonance imaging (MRI) constitutes the standard imaging technique for diagnosis and follow-up of brain tumors, a combination of a gadolinium complex moiety on the surface of cisplatin cross-linked polymeric nanoparticles was expected to allow non-invasive monitoring of the drug infusion within the brain parenchyma over time while enabling therapy. The present work reports: (i) the synthesis of a biocompatible amphiphilic triblock copolymer by successive ring-opening polymerization of a carbonate monomer and  $\epsilon$ -caprolactone from the terminal hydroxyl group of an  $\alpha$ -acetal-PEO-OH; (ii) its functionalization both by carboxylate groups along the polycarbonate block and by a gadolinium complex anchored on the  $\alpha$  chain-end of the triblock copolymer with the aim of enabling coordination bonds with platinum complexes and conferring MRI properties to the resulting macrocontrast agent, respectively; (iii) the spontaneous self-assembly of the amphiphilic triblock copolymer chains in water and the stabilizing cisplatin cross-linking thanks to lateral carboxylate groups; (iv) the physicochemical characterization of the resulting multifunctional nanoplatforms as both an MRI macromolecular contrast agent and a macromolecular prodrug; (v) subsequent evaluation of the formulated nanoparticles on human glioblastoma cell lines. A close look was taken at cellular accumulation of platinum compounds within cells and the subsequent DNA damage induced by cisplatin cross-linked nanoparticles compared to the free drug.

## Experimental section

### 1. Materials

Ethylene oxide (EO) (99.9%, Chemogas), bis-(pentafluorophenyl) carbonate (bis-PFC) (97%, ABCR), [S-2-(4-aminobenzyl)-diethylenetriamine pentaacetic acid] (NH<sub>2</sub>-Bn-DTPA) ( $\geq$ 94%, Macrocylics), magnesium sulfate (99%, VWR), potassium hydroxide ( $\geq$ 85%, Acros Organics), sodium hydroxide (98%, Acros Organics), silver nitrate (>99%, Alfa Aesar) and cisplatin powder (99%, Strem Chemicals) were used as received. Potassium (99.9%), 3-amino-1-propanol ( $\geq$ 99%), 2,2-bis(hydroxymethyl)propionic acid (bis-MPA) (98%), cesium fluoride (99%), trifluoromethanesulfonic acid (ReagentPlus®,  $\geq$ 99%), fuming (37%) and 1 M hydrochloric acid, succinic anhydride ( $\geq$ 99%), gadolinium(III) chloride hexahydrate

(99.999%), D-glucose ( $\geq$ 99.5%), Gd-DTPA (97%), sodium cyanoborohydride ( $\geq$ 95.0%) and sodium bicarbonate ( $\geq$ 99.5%) were purchased from Sigma-Aldrich and used as received. Naphthalene (99%, Sigma-Aldrich) and 3,3-diethoxypropan-1-ol (98%, Sigma-Aldrich) were purified by three successive azeotropes in anhydrous toluene.  $\epsilon$ -Caprolactone ( $\epsilon$ -CL) (99%, Alfa Aesar), triethylamine ( $\geq$ 99%, Sigma-Aldrich) and acetyl chloride (98%, Sigma-Aldrich) were dried over calcium hydride overnight at room temperature before being distilled under reduced pressure and, respectively, stored at 6 °C for  $\epsilon$ -CL and at room temperature for triethylamine and acetyl chloride. Tetrahydrofuran (THF) (p.a.), toluene (p.a.), methanol (p.a.), *N,N*-dimethylformamide (DMF) (p.a.), dichloromethane (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) (p.a.), diethyl ether (p.a.), ethyl acetate (p.a.), hexane ( p.a.) and acetonitrile ( p.a.) were purchased from Chem-Lab. Tetrahydrofuran, toluene, methanol and *N,N*-dimethylformamide were dried on molecular sieves and kept under an inert atmosphere. (2,3,4,5,6-Pentafluorophenyl)-5-methyl-2-oxo-1,3-dioxane-5-carboxylate (carbonate-CO<sub>2</sub>PhF<sub>5</sub>) was synthesized as described in the literature with a yield of 78% and a purity of 99.5% (Sanders et al. 2010). The NH<sub>2</sub>-Bn-DTPA(Gd<sup>3+</sup>) complex was synthesized as described in the literature with a yield of 98% (Grogna et al. 2010). After purification through a chelex resin to remove uncomplexed Gd<sup>3+</sup> ions, the NH<sub>2</sub>-Bn-DTPA(Gd<sup>3+</sup>) complex was recovered as a violet solid. 50% in mass of the final product was composed of potassium hydroxide. The deuterated chloroform (CDCl<sub>3</sub>), deuterated *N,N*-dimethylformamide (C<sub>3</sub>D<sub>7</sub>NO), deuterated toluene (C<sub>7</sub>D<sub>8</sub>) and deuterated water (D<sub>2</sub>O) used for NMR characterization were ordered from Eurisotop. Pretreated dialysis membrane tubings of 1 and 3.5 kDa molecular weight cutoff were purchased from Spectrum Labs (Spectra/Por® 7). Ultrapure water was obtained from a Milli-Q Plus system (Millipore). Culture media included Dulbecco's Modified Eagle's Medium with 4.5 g.L<sup>-1</sup> glucose (DMEM; Lonza) and Dulbecco's Modified Eagle's Medium supplemented with F12 (DMEM/F-12; Gibco). Fetal Calf Serum (FCS; Gibco), antibiotics (Sigma-Aldrich), N1 (100x; Sigma-Aldrich), Trypsin (Sigma-Aldrich), Trypan blue (Sigma-Aldrich) and Phosphate-Buffered Saline (PBS; Lonza) were routinely used for cell culture. A pharmaceutical solution of cisplatin for intravenous infusion (concentrate for infusion solution, 1 mg.mL<sup>-1</sup>, Mylan) was kindly provided by the Department of Pharmacy of the University-affiliated Hospital of Angers (CHU, Angers). Every cisplatin solution was freshly prepared before use in N1-supplemented DMEM/F-12. MTS solution was prepared from the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium

(MTS) reagent powder supplied by Promega (CellTiter 96® AQ<sub>ueous</sub> non-radioactive cell proliferation assay) as described in their technical bulletin. DNA was extracted from cell pellets using a dedicated kit (NucleoSpin® Tissue; Macherey Nagel). The amount of double strand DNA was then quantified using the QuantiFluor® dsDNA kit suited for measurement with the Quantus™ fluorometer (Promega).

Ketamine (Imalgène 1000, Mérial) and xylazine (Rompun 2%, Bayer) were kindly provided by the Animal Hosting Service of the University Hospital of Angers (SCAHU).

## 2. Characterization

Size exclusion chromatography (SEC). The number average molar mass ( $\bar{M}_n$ ) and dispersity ( $D$ ) of the different (co)polymers were determined by Size Exclusion Chromatography. SEC was carried out either in THF or in DMF depending on polymer solubility in these solvents. SEC in THF was performed at 45 °C at a flow rate of 1 mL·min<sup>-1</sup> with a Viscotek 305 TDA liquid chromatograph equipped with 2 PSS SDV linear M columns calibrated with either polyethylene oxide or polystyrene standards. SEC in DMF containing LiBr (0.025 M) was performed at 55 °C at a flow rate of 1 mL·min<sup>-1</sup> with a Waters chromatograph equipped with three columns (Waters Styragel PSS Gram1000 Å (x2), 30 Å), a dual λ absorbance detector (Waters 2487) and a refractive index detector (Waters 2414). Polyethylene oxide or polystyrene calibrations were used to evaluate the molar mass and the molar mass distribution of the different (co)polymers.

Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C and <sup>19</sup>F NMR spectra were recorded in deuterated chloroform, deuterated *N,N*-dimethylformamide, deuterated toluene or deuterated water at 250 MHz or 400 MHz in the FT mode with a Bruker Advance apparatus equilibrated at 25 °C. Spectra were analyzed using MestReNova software.

Mass spectrometry (MS). Electrospray mass spectra were obtained on a Bruker Daltonics micrOTOF (TOF-ESI-MS) spectrometer. Matrix-assisted laser-desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) spectra were recorded by using a Bruker Daltonics UltrafleXtreme spectrometer using 2,5-dihydroxybenzoic acid as a matrix and no additional cationating agent.

Nanoparticle tracking analysis (NTA). The concentration, the mean diameter in number and the size distribution of the formulated nanoparticles were determined by Nanoparticle Tracking Analysis measurements using an NS300 NanoSight (Malvern

Instrument, Worcestershire, UK) with a low-volume flow cell plate and a 405 nm laser at 25 °C. After filtration through 0.22 µm under a sterile atmosphere, nanoparticle suspensions were diluted in ultrapure water by a factor of 12.5 (v/v) in order to achieve a work concentration ranging between 1.10<sup>8</sup> and 1.10<sup>9</sup> particles per mL. Ultrapure water itself was first injected into the system to ensure no particle contamination. Nanoparticle suspensions were led to the cell by a 1 mL syringe controlled by a syringe pump. The infusion rate was adjusted according to the sample. NTA analytical software v3.2 allowed for processing of the data. Measurements were conducted at room temperature. Every sample was captured five more times over 60 seconds after gain adjustment. The arithmetic average of all particle sizes measured within the sample was given as the mean size of the population. The standard deviation (SD) of the distribution was computed based on the merged data obtained from subsequent replicate runs.

Zeta potential. Zeta potential measurements were performed at 25 °C on a Zetasizer Nano-ZS 3600 fitted with a 633 nm laser (Malvern Instruments S.A., Worcestershire, UK) at native concentration of the formulated nanoparticles in water. The electrophoretic mobility of the nanoparticles could be easily measured based on the electric field between both the electrodes of the cell in which the nanoparticle suspension was placed and converted to zeta potential using the Smoluchowski equation with respect to the dispersant features. Readings were taken at least 10 times for each batch. The average value of three batches was considered a relevant indication of the apparent surface charge of the nanoparticles. Data were analyzed using the in-house Malvern Zetasizer software 7.12.

Inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS). Quantification of gadolinium (<sup>157</sup>Gd) at the α chain-end of the triblock copolymer and of platinum (<sup>195</sup>Pt) loaded inside the nanoparticles was performed using ICP-MS (7500A, Agilent and Elan DRC-e, PerkinElmer). Plasma torch argon purity was higher than 99.999% (Linde gas). Water was purified using a MilliQ reference A+ system (Millipore). All element standard solutions (Certiprep spex) were purchased from Horiba. The calibration ranged from 0.5 to 40 µg.L<sup>-1</sup> for gadolinium in water and from 2.5 to 4,000 µg.L<sup>-1</sup> for platinum in cell culture medium. For the determination of platinum in DNA, the calibration range was lower (from 0.5 to 400 µg.L<sup>-1</sup>). The sample was diluted 1:70 in a 0.5% nitric acid solution containing the internal standard: europium (<sup>153</sup>Eu). Internal quality controls were prepared using standard solutions (Gd: 1 g.L<sup>-1</sup> in 2% HNO<sub>3</sub>; Pt: 1 g.L<sup>-1</sup> in 10% HCl): 2.5, 12.5 and 35 µg.L<sup>-1</sup> for gadolinium and 2.5, 10, 250 and 3,000 µg.L<sup>-1</sup> for platinum, and were regularly checked throughout the

measurements. The criteria of acceptance for internal quality controls were relative standard deviation (RSD) values less than 20% for the limit of quantification, less than 15% for low or medium concentrations and less than 10% for high concentrations.

Transmission electron microscopy (TEM). The morphology of the nanoparticles was revealed by Transmission Electron Microscopy using a JEOL JEM 1400 microscope. Suspensions of the formulated cisplatin cross-linked nanoparticles were diluted in ultrapure water by a factor of 12.5 (v/v) as required for the preparation of NTA measurements. A drop of each aqueous suspension was put on a copper grid covered by a thin formvar film without an additional contrast agent and incubated at 37 °C for a few hours. After evaporation of water, samples were observed by TEM with an acceleration voltage of 120 kV. The presence of components of interest was further brought out by Energy Dispersive X-ray analysis (EDX) using an EVO LS10 (Zeiss) equipped with an INCA system (Oxford Instruments).

Relaxometry. Relaxometry experiments were performed on a Bruker Biospec 70/20 Advance III device operating at a magnetic field of 7 T (Bruker Biospin) with a 35 mm antenna. The preclinical MRI software ParaVision 6.0.1 (Bruker) was used for data acquisition and MR image analysis. Longitudinal ( $r_1$ ) and transverse ( $r_2$ ) relaxivities of the nanoparticles decorated with gadolinium (referred to as Gd-DTPA nanoparticles in the following) were determined both in water and in plasma at 7 T, 25 °C, and were compared to those of the Gd-DTPA chelate, an MRI contrast agent known as Magnevist® (Bayer) that is still commonly used in the clinics. Dilutions were prepared, in water or in plasma, respectively, with gadolinium concentration ranges of 0 to 0.076 mM in the case of Gd-DTPA nanoparticles and 0 to 0.62 mM for Gd-DTPA.  $T_2$ -Weighted images were acquired using a rapid acquisition with relaxation enhancement (Turbo-RARE) sequence (TE/TR = 33/2,500 ms; flip angle: 90 °; RARE factor: 8; averages: 2) of nine slices (slice thickness: 1 mm; slice gap: 0.20 mm) in order to check for the right location of the sample within the magnet and to choose an appropriate slice where to perform the measurements. Then, quantitative  $T_1$  and  $T_2$  maps were obtained on a 1 mm thick slice using a RARE-vtr (RARE sequence with varying repetition time: TR = 200; 400; 800; 1,500; 3,000; 5,500 ms; TE = 7 ms; RARE factor: 2) and a multi-slice multi-echo (MSME: TR = 5,000 ms; echo images: 40; first echo time: 8 ms; echo spacing: 8 ms; flip angle: 90 °) sequence, respectively. The field of view (FOV) and the spatial resolution were set at 30x30 mm<sup>2</sup> and 0.234x0.234 mm<sup>2</sup>, respectively. For every sample, the longitudinal ( $R_1$ ) and transverse ( $R_2$ ) relaxation speeds were deduced from the signal mean intensity measured within regions of interest on  $T_1$ , respectively  $T_2$  maps, and

plotted versus the gadolinium concentration. The respective slopes of the straight lines obtained by a linear regression fit of these data enabled determination of the longitudinal ( $r_1$ ) and transverse ( $r_2$ ) relaxivities of the contrast agent studied.

### 3. Polymer synthesis and functionalization

#### 3.1. Synthesis of an $\alpha$ -acetal-PEO-OH

$\alpha$ -Acetal-PEO-OH was synthesized by ring-opening polymerization of ethylene oxide according to the procedure reported by Grogna and co-workers (Grogna et al. 2010). Briefly, 3,3-diethoxypropan-1-ol (1.48 g, 10.0 mmol) and ethylene oxide (50 g, 1.14 mol) were used to obtain the desired  $\alpha$ -acetal-PEO-OH of a targeted molar mass of 5,000 g.mol<sup>-1</sup>. Theoretical polymerization degree ( $\overline{DP}_{n,\text{PEO,th}}$ ) was computed according to the formula:  $\overline{DP}_{n,\text{PEO,th}} = \frac{[\text{ethylene oxide}]_0}{[\text{alcohol}]_0} = 114$ . The polymer was analyzed by size exclusion chromatography, <sup>1</sup>H NMR and mass spectrometry.

Yield: 48 g, 93%. <sup>1</sup>H NMR (250 MHz, TMS, C<sub>7</sub>D<sub>8</sub>):  $\delta = 1.13$  ppm (t, 6H, CH<sub>3</sub>–CH<sub>2</sub>–),  $\delta = 1.92$  ppm (m, 2H, –CH–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–O–),  $\delta = 3.50$  ppm (m, 470H, –O–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–O–; –CH–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–O–; CH<sub>3</sub>–CH<sub>2</sub>–O–),  $\delta = 4.71$  ppm (t, <sup>1</sup>H, –O–CH–CH<sub>2</sub>–).  $\bar{M}_{n,\text{PEO,SEC}_{\text{THF}}} = 5,100$  g.mol<sup>-1</sup>,  $\overline{DP}_{n,\text{PEO,SEC}_{\text{THF}}} = 116$ ,  $D = 1.05$ .

#### 3.2. Synthesis of $\alpha$ -acetal-PEO-*b*-poly(carbonate-CO<sub>2</sub>PhF<sub>5</sub>)-*b*-PCL

The synthesis of the triblock PEO-*b*-poly(carbonate-CO<sub>2</sub>PhF<sub>5</sub>)-*b*-PCL by triflic acid-catalyzed ring-opening polymerization of a functionalized cyclic carbonate was adapted from procedures described in the literature (Sanders et al. 2010; Engler et al. 2013).  $\alpha$ -Acetal-PEO<sub>116</sub>-OH (2.00 g, 0.392 mmol) was dried by two successive azeotropes in anhydrous toluene. The vial containing the dried PEO-OH initiator was charged with the carbonate-CO<sub>2</sub>PhF<sub>5</sub> monomer (3.06 g, 9.38 mmol) in a nitrogen-purged glovebox. A last azeotrope was performed on the mixture in anhydrous toluene. The mixture was then dissolved in 20 mL of anhydrous dichloromethane before adding triflic acid (0.500 mL, 3.30 mmol, 8.7 equivalents compared to the initiator). The mixture was allowed to stir overnight at 35 °C. Distilled ε-caprolactone (0.650 mL, 5.87 mmol) was added to the reactor under nitrogen flow. The mixture was allowed to stir for 3 more hours at 35 °C. The polymerization was monitored by <sup>1</sup>H NMR in deuterated chloroform. Once the reaction completed, distilled triethylamine (1.20 mL, 8.61 mmol, 22 equivalents compared to the chain-end) and acetyl chloride

(0.50 mL, 7.03 mmol, 18 equivalents compared to the chain-end) were added with the purpose of esterifying the hydroxyl chain-ends. After 48 hours, the triblock copolymer was quantitatively recovered by two precipitations in a large volume of cold diethyl ether. The synthesized copolymer was analyzed by <sup>1</sup>H NMR in deuterated chloroform and by size exclusion chromatography.

Yield: 5 g, 87%. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, TMS, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.26 ppm (t, 6H, CH<sub>3</sub>–CH<sub>2</sub>–), δ = 1.41 ppm (m, 32H, –C(=O)–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–O–), δ = 1.49 ppm (s, 87H, –CH<sub>3</sub>), δ = 1.65 ppm (m, 64H, –C(=O)–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–O–), δ = 1.80 ppm (m, 2H, (EtO)<sub>2</sub>–CH–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–O–), δ = 2.35 ppm (t, 32H, –C(=O)–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–O–), δ = 3.72-3.73 ppm (m, 470H, –O–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–O–; –CH–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–O–; CH<sub>3</sub>–CH<sub>2</sub>–O–), δ = 4.07-4.31 ppm (s, 32H, –C(=O)–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–O–), δ = 4.37-4.46 ppm (s, 116H, –O–CH<sub>2</sub>–CMe(CO<sub>2</sub>–PhF<sub>5</sub>)–CH<sub>2</sub>–O–), δ = 4.78 ppm (t, <sup>1</sup>H, –O–CH–CH<sub>2</sub>–).  $\overline{DP}_{n,\text{PEO,SEC}_{\text{THF}}} = 116$ ,  $\overline{DP}_{n,\text{poly(carbonate-CO}_2\text{PhF}_5),\text{NMR}} = 29$ ,  $\overline{DP}_{n,\text{PCL,NMR}} = 16$ ,  $\bar{M}_{n,\text{PEO-}b\text{-poly(carbonate-CO}_2\text{PhF}_5)\text{-}b\text{-PCL,NMR}} = 16,400 \text{ g.mol}^{-1}$ ,  $D = 1.75$ .

### 3.3. Postpolymerization functionalization

Postpolymerization functionalization of carbonate moieties of the triblock PEO-*b*-poly(carbonate-CO<sub>2</sub>PhF<sub>5</sub>)-*b*-PCL was adapted from the literature (Engler et al. 2015). This modification was performed in two steps: (i) elimination of pentafluorophenyl groups by a reaction of the ester function with an amino-alcohol and (ii) addition of succinic anhydride to form carboxylic acids from the alcohol groups by esterification.

(i) α-Acetal-PEO<sub>116</sub>-*b*-poly(carbonate-CO<sub>2</sub>PhF<sub>5</sub>)<sub>29</sub>-*b*-PCL<sub>16</sub> (5.00 g, 8.84 mmol of carbonate-CO<sub>2</sub>PhF<sub>5</sub>) was dissolved in 40 mL of DMF. In parallel, aminopropanol (0.783 mL, 10.0 mmol, 1.13 equivalents) and distilled triethylamine (1.37 mL, 9.83 mmol, 1.11 equivalents) were dissolved in 10 mL of DMF and added dropwise to the copolymer solution. The reaction was allowed to proceed for 3 hours at 30 °C. The functionalized copolymer was then precipitated into a large volume of cold diethyl ether before being allowed to rest at -35 °C overnight. The copolymer was isolated by centrifugation and dried *in vacuo*. In order to be further purified, the copolymer was dissolved in 20 mL of DMF. Double-distilled water (100 mL) was then added under vigorous stirring and the pH was decreased to 4 by adding a 0.1 M aqueous solution of hydrochloric acid. After two hours, the micellar solution was dialyzed against water for 4 hours (pH 4, molecular weight cut-off 1 kDa) and freeze-dried.

Yield: 1.50 g, 37.2%.

(ii) Then, freshly obtained  $\alpha$ -acetal-PEO<sub>116</sub>-*b*-poly(carbonate-spacer-OH)<sub>29</sub>-*b*-PCL<sub>16</sub> (1.5 g, 3.29 mmol carbonate-spacer-OH) was dried by three successive azeotropes in anhydrous toluene. The copolymer was then dissolved in 20 mL of anhydrous DMF before adding succinic anhydride (1.79 g, 17.9 mmol, 5.46 equivalents) and distilled triethylamine (2.55 mL, 18.3 mmol, 5.57 equivalents). The mixture was allowed to stir overnight at 45 °C. Then, 80 mL of double-distilled water were added to the solution under vigorous stirring. After two hours, the micellar solution was dialyzed against water for 4 hours (pH 4, molecular weight cut-off 1 kDa) and freeze-dried. The final functionalized copolymer was analyzed by <sup>1</sup>H NMR in deuterated chloroform. The molar mass distribution of the functionalized triblock copolymer was determined by SEC in DMF.

Yield: 0.900 g, 49.2%. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, TMS, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.26 ppm (t, 6H, CH<sub>3</sub>—CH<sub>2</sub>—), δ = 1.39 ppm (m, 119H, —C(=O)—CH<sub>2</sub>—CH<sub>2</sub>—CH<sub>2</sub>—CH<sub>2</sub>—O—; —CH<sub>3</sub>), δ = 1.64 ppm (m, 66H, —C(=O)—CH<sub>2</sub>—CH<sub>2</sub>—CH<sub>2</sub>—CH<sub>2</sub>—O—; (EtO)<sub>2</sub>—CH—CH<sub>2</sub>—CH<sub>2</sub>—O—), δ = 1.85 (m, 58H, —C(=O)—NH—CH<sub>2</sub>—CH<sub>2</sub>—CH<sub>2</sub>—O—C(=O)—), 2.31 ppm (t, 32H, —C(=O)—CH<sub>2</sub>—CH<sub>2</sub>—CH<sub>2</sub>—CH<sub>2</sub>—CH<sub>2</sub>—O—), δ = 2.64 ppm (m, 116H, —O—C(=O)—CH<sub>2</sub>—CH<sub>2</sub>—C(=O)—OH), δ = 2.89–2.96 ppm (m, 58H, —C(=O)—NH—CH<sub>2</sub>—CH<sub>2</sub>—CH<sub>2</sub>—O—C(=O)—; DMF), δ = 3.64 ppm (m, 470H, —O—CH<sub>2</sub>—CH<sub>2</sub>—O—; —CH—CH<sub>2</sub>—CH<sub>2</sub>—O—; CH<sub>3</sub>—CH<sub>2</sub>—O—), δ = 4.06 ppm (m, 32H, —C(=O)—CH<sub>2</sub>—CH<sub>2</sub>—CH<sub>2</sub>—CH<sub>2</sub>—CH<sub>2</sub>—O—), δ = 4.23 ppm (m, 174H, —O—CH<sub>2</sub>—CMe(CO<sub>2</sub>—PhF<sub>5</sub>)—CH<sub>2</sub>—O—; —C(=O)—NH—CH<sub>2</sub>—CH<sub>2</sub>—CH<sub>2</sub>—O—C(=O)—), δ = 4.78 ppm (t, <sup>1</sup>H, —O—CH—CH<sub>2</sub>—, signal of too low intensity to be detected).  $D = 1.25$ .

Deprotection of the  $\alpha$ -acetal chain-end and further grafting of the gadolinium complex were adapted from the literature (Grogna et al. 2010).

$\alpha$ -Acetal-PEO-*b*-poly(carbonate-spacer-COOH)-*b*-PCL (0.900 g, 0.0463 mmol of  $\alpha$ -acetal) was dissolved in 10 mL of THF. Five volume equivalents of double-distilled water were added dropwise to the polymer solution under vigorous stirring. The pH of the micellar solution was adjusted to 2 by the addition of a 1 M aqueous hydrochloric acid solution. After two hours of stirring at room temperature, the pH was increased to 7 by the addition of a 0.35 M aqueous sodium hydroxide solution. Aldehyde conversion was assessed by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR in deuterated chloroform. The NH<sub>2</sub>-Bn-DTPA(Gd<sup>3+</sup>) complex (30 mg, 0.0230 mmol, 0.50 equivalent compared to  $\alpha$ -acetal chain-ends) was added to the micellar solution. After one hour at room temperature, sodium cyanoborohydride (30.0 mg, 0.477 mmol,

20.7 equivalents compared to NH<sub>2</sub>-Bn-DTPA(Gd<sup>3+</sup>) complex) was introduced into the reactor and the reaction was allowed to proceed for 92 hours. Unreacted reagents were removed by dialysis against distilled water for 48 hours (molecular weight cut-off 3.5 kDa). The DTPA(Gd<sup>3+</sup>)-grafted copolymer was finally recovered after freeze-drying. The grafting yield of the reductive amination was assessed by ICP-MS.

Grafting yield: 13.1%.

#### **4. Formulation of multifunctional cisplatin cross-linked polymeric nanoparticles**

##### **4.1. Cisplatin aquation**

Cisplatin aquation was adapted from the literature (Ye et al. 2006; Huynh et al. 2012; Li et al. 2014; Duan et al. 2015). Cisplatin (66.3 mg, 0.221 mmol) was weighted under a glove-box and partially dissolved in 22 mL of ultrapure water. A 0.06 M aqueous solution of silver nitrate (7.37 mL, 0.442 mmol, 2 equivalents) was added to the cisplatin solution to form an aqueous complex. This mixture was allowed to stir overnight protected from light at room temperature: a white precipitate progressively appeared. The solution was centrifuged (20 minutes, 10,000 rpm) in order to remove the silver chloride precipitate. [(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Pt-(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] supernatant was filtered through 0.22 µm for further purification and the final amount of platinum in solution was quantified by ICP-MS.

Cisplatin activation efficiency: 93%.

##### **4.2. Cisplatin conjugation to carboxylate functional groups**

Conjugation of cisplatin to carboxylate functional groups of a polymer was adapted from various procedures reported in the literature (Ye et al. 2006; Huynh et al. 2012; Li et al. 2014; Duan et al. 2015). The DTPA(Gd<sup>3+</sup>)-PEO<sub>116</sub>-*b*-poly(carbonate-spacer-COOH)<sub>29</sub>-*b*-PCL<sub>16</sub> copolymer (22.1 mg, 0.0397 mmol of carbonate-spacer-COOH) was dissolved in ultrapure water. The pH of both the copolymer and cisplatin solutions was increased to 7.4 by the addition of a 0.1 M aqueous solution of sodium hydroxide. Cisplatin solution at physiological pH (26.5 mL, 5 equivalents to carboxylate functions) was then added to the copolymer solution. This mixture was complemented with ultrapure water in order to adjust the polymer concentration to 0.25 mg.mL<sup>-1</sup> and was allowed to stir protected from light for 38 hours at 37 °C. The solution turned from an initial pale yellow to dark grey. After reaction, the conjugate was dialyzed against ultrapure water (molecular weight cut-off 1 kDa) for 24 hours in order to remove the excess of uncomplexed cisplatin. The platinum amount of the

formulated cisplatin cross-linked nanoparticles was quantified by ICP-MS, leading to a drug-loading content of  $12.6 \pm 2.44$  wt% (mean  $\pm$  standard deviation). The nanoparticle suspension was sterile-filtered through 0.22  $\mu\text{m}$  for further characterization and biological applications, resulting in an  $8.78 \pm 0.35$  wt% drug payload.

## 5. *In vitro* drug release

For consistency with subsequent *in vitro* biological assays, release of cisplatin from sterile-filtered  $8.66 \pm 1.1$  wt% cisplatin-loaded cross-linked nanoparticles was studied in triplicate at 37 °C in DMEM/F-12 cell culture medium supplemented with 1% N1 (100x) and 1% antibiotics. The release profile of cisplatin from cisplatin cross-linked nanoparticles was determined by the dialysis method depending on the pH of the medium, either at 7.4 or at 5.5, at physiological pH or at an acidic pH mimicking the late lysosome, respectively. The nanoparticle solution was first diluted at  $\frac{1}{4}$  in the biological medium in which the release was studied. 1 mL of the final solution was placed in pretreated dialysis tubing (MWCO 1 kDa). Three dialysis bags were respectively immersed in 225 mL of culture medium at physiological pH, and three other dialysis bags in 225 mL of culture medium at pH 5.5 after the addition of 37% fuming HCl. These solutions were incubated at 37 °C under moderate stirring. The released cisplatin was sampled at defined time periods by withdrawal of a volume of 450  $\mu\text{L}$  from the incubation medium. An equal volume of fresh medium at the right pH was immediately added to the incubation medium. Platinum concentrations of the samples were measured by ICP-MS. The platinum amount released from the nanoparticles was expressed as the percentage of cumulative platinum outside the dialysis bag relative to the initial total platinum amount in 1 mL of the nanoparticle solution in biological medium. A fit of the fraction of drug released from  $8.66 \pm 1.1$  wt% cisplatin-loaded cross-linked polymeric nanoparticles at time  $t$  was performed based on the Ritger and Peppas model. The quality of the fit was assessed by using the R<sup>2</sup> determination coefficient.

## 6. Cell culture

Human glioblastoma U-87 MG cells (ATCC® HTB-14™) were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC). Human glioblastoma U-251 MG cells were kindly given by Dr C. Griguer and were originally obtained from Dr D. D. Bigner (Duke University, Durham, NC). U-87MG and U-251MG cells were routinely cultured in

Dulbecco’s modified Eagle’s medium containing 4.5 g.L<sup>-1</sup> glucose and L-glutamine supplemented with 10% (v/v) FCS and 1% of a combination of 100 units per mL penicillin and 100 µg.mL<sup>-1</sup> streptomycin. Cells were grown at 37 °C under a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere with 21% of oxygen. The medium was changed twice a week.

## 7. Biocompatibility assay

Cells (20,000 cells per cm<sup>2</sup>) were seeded in a 96-well plate. After 24 hours, culture medium was removed and replaced by DMEM/F-12 supplemented with 1% N1 (100x) and 1% antibiotics in order to perform serum depletion. After 6 hours, cells were treated with various concentrations of the synthesized copolymer. The copolymer was dissolved in a 5% glucose aqueous solution and the pH was adjusted to 7.4. The copolymer solution was filtered through 0.22 µm under a sterile environment and diluted in N1-supplemented DMEM/F-12 to match the copolymer concentrations used in the formulation of cisplatin cross-linked nanoparticles. Typically, the polymer concentrations ranged up to 0.250 mg.mL<sup>-1</sup>. Although low, these copolymer concentrations were expected to allow for a therapeutic efficacy of cisplatin cross-linked nanoparticles. The medium of control cells was removed in the same way as for treated cells and replaced by fresh N1-supplemented DMEM/F-12. After 18 hours, the medium was removed from all wells and replaced by fresh N1-supplemented DMEM/F-12. Cells were incubated for 48 additional hours before performing an MTS cell viability assay. Absorbance values at 492 nm were recorded using a CLARIOstar microplate reader (BMG LABTECH). Relative cell viability was expressed as the absorbance value of cells exposed to the copolymer solutions divided by the absorbance value of control cells, both corrected by using a blank MTS-reactant, x100 (%). This assay aimed at checking for the biological safety of the synthesized copolymer.

## 8. Cell viability assay

Cells (20,000 cells per cm<sup>2</sup>) were seeded in 96-well plates. After 24 hours, culture medium was removed and replaced by DMEM/F-12 supplemented with 1% N1 (100x) and 1% antibiotics in order to perform serum depletion. After 6 hours, cells were treated at various cisplatin concentrations in the range of 0.25 to 10 µg.mL<sup>-1</sup> in N1-supplemented DMEM/F-12.

After 18 hours of pretreatment, the medium was removed and replaced by fresh N1-supplemented DMEM/F-12. Cells were incubated for 48 additional hours before

performing an MTS cell viability assay. Absorbance values were recorded using a CLARIOstar microplate reader. Relative cell viability was expressed as the absorbance value of treated cells at 492 nm divided by the absorbance value of control cells, both corrected by using a blank MTS-reactant, x100 (%) on the basis of three independent experiments (n = 4 for each condition). The IC<sub>50</sub> value characteristic of every cell line was determined as the drug concentration required to inhibit cell viability by 50%.

## **9. Intracellular platinum accumulation**

Cells (25,000 cells per cm<sup>2</sup>) were seeded in 6-well plates and incubated for 48 hours. Culture medium was then removed and replaced by DMEM/F-12 supplemented with 1% N1 (100x) and 1% antibiotics in order to perform serum depletion. After 6 hours, cells were treated either with a pharmaceutical solution of cisplatin or with a suspension of 8.51 ± 0.4 wt% cisplatin-loaded cross-linked nanoparticles both diluted in N1-supplemented DMEM/F-12 culture medium. Attention was paid to work with treatment solutions of the same platinum content, at a sub-lethal cisplatin concentration of 4.05 µM. After 4, 18 and 48 hours, respectively, the supernatant was collected in Eppendorf tubes, and cells were rinsed twice with PBS and harvested by trypsinization before being counted using Trypan blue. Cellular uptake of platinum compounds was further quantified by ICP-MS and expressed as nanograms of platinum per 1.10<sup>6</sup> cells. No platinum was detected in untreated control cells.

## **10. Binding of platinum to DNA**

As for the uptake study, cells (25,000 cells per cm<sup>2</sup>) were seeded in 6-well plates and incubated for 48 hours. Culture medium was then removed and replaced by DMEM/F-12 supplemented with 1% N1 (100x) and 1% antibiotics in order to perform serum depletion. After 6 hours, cells were treated either with a pharmaceutical solution of cisplatin or with a suspension of 8.51 ± 0.4 wt% cisplatin-loaded cross-linked nanoparticles both diluted in N1-supplemented DMEM/F-12 culture medium. Attention was paid to work with treatment solutions of the same platinum content, at a sub-lethal cisplatin concentration of 4.05 µM. After 4, 18 and 48 hours, respectively, cells were rinsed twice with PBS, harvested by trypsinization and centrifuged at 1,300 g for 5 minutes at 4 °C. Cell pellets were cleaned once in PBS before being centrifuged at 2,000 g for 5 minutes at 4 °C, recovered and immediately placed in ice before being frozen for conservation at -20 °C. Genomic DNA was extracted

using a dedicated kit (NucleoSpin® Tissue; Macherey Nagel). Briefly, after lysis of the cells by incubation at 70 °C for 15 minutes in a proteinase K/SDS solution and DNA binding to the silica membrane of the columns by the addition of chaotropic salts and ethanol, pure genomic DNA was finally eluted in a slightly alkaline elution buffer. A UV-visible NanoDrop™ 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher) was used to assess the purity of the DNA extracts by measurements at 260 nm, 280 nm and 230 nm. The ratio of the sample optical densities measured at 260 nm and 280 nm was indicative of the amount of pure DNA possibly contaminated by proteins and phenols. Similarly, the ratio of the sample optical densities measured at 260 nm and 230 nm showed possible contamination by salts, alcohol or other solvents. Measurements were in agreement with a high quality of DNA extraction. Double strand DNA was further quantified using the QuantiFluor® dsDNA kit suited for measurement with the Quantus™ fluorometer. Platinum binding to DNA was quantified by ICP-MS and expressed as nanograms of platinum per microgram of DNA. No platinum was detected in the DNA extracted from untreated control conditions.

## **11. *In vivo* MRI monitoring of the infusion of Gd-DTPA nanoparticles within the brain after convection-enhanced delivery**

A preclinical study for the non-invasive MRI monitoring of CED infusion of Gd-DTPA nanoparticles within the brain parenchyma of mice was approved by the French “Ministère de l’Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l’Innovation” and by the French Committee for Ethics of Animal Experiments, No. 6 (Permit No. APAFIS#2096). NMRI-Foxn1 nu/nu nude female mice were obtained from Janvier Labs. The animals were kept in polycarbonate cages in a room with a controlled temperature (20-22 °C), humidity (50-70%) and light (12-hour light/dark cycles). Tap water and food were provided *ad libitum*.

U-87MG cells for intracerebral implantation were trypsinized, counted and checked for viability by Trypan blue exclusion. Cells were washed twice with PBS before being resuspended in DMEM at a final concentration of 1.10<sup>7</sup> cells per mL.

9 week-old mice were anesthetized by an intraperitoneal (IP) injection of ketamine (100 mg per kg body weight) and xylazine (13 mg per kg body weight). Animals were immobilized on a stereotactic head frame (Stoelting, Wood Dale). The coordinates for injection were determined after visualization of the bregma: 0.5 mm anterior to the bregma, 2.1 mm on the right side of the sagittal suture and 3 mm under the dura. An additional dose of 50 mg per kg

body weight of ketamine was injected (IP) before drilling the skull. A volume of 5 µL of the U-87MG cells suspension ( $5.10^4$  cells) was injected into the right striatum by a 10 µL Hamilton syringe (Hamilton® glass syringe 700 series RN) with a 26-G needle (Hamilton®) at a speed of 1 µL·min<sup>-1</sup>. After the injection, the needle was left in place for 5 additional minutes to prevent cell reflux while removing the syringe at a speed of 1 mm·min<sup>-1</sup>. The wound was sutured by three surgical points. Mice were monitored until their awakening. Twelve days following the tumor inoculation, a 10-µL-Hamilton syringe (Hamilton® glass syringe 700 series RN) with a 32-G needle (Hamilton®) was charged with 10 µL of nanoparticles in suspension in a 5% glucose aqueous solution. The needle was inserted 3.5 mm under the dura, left in place for 5 minutes before being pulled 0.5 mm up again. The nanoparticle suspension was infused into the striatum by CED at a flow rate of 0.5 µl·min<sup>-1</sup> monitored by a pump (Harvard apparatus Pump II Elite). After the injection, the needle was left in place for 5 additional minutes to prevent from suspension reflux from the brain while removing the syringe at a speed of 1 mm·min<sup>-1</sup>. The wound was sutured by three surgical points. Mice were monitored until their awakening. Control mice were injected in the same way a volume of 5 µL of 5% glucose aqueous solution.

MRI monitoring of the tumor growth was performed on a Bruker Biospec 70/20 Advance III device operated at a magnetic field of 7 T (Bruker Biospin) with a <sup>1</sup>H cryoprobe the day before or one hour following the CED. Mice were anesthetized under isoflurane (1.0%, O<sub>2</sub> 0.5 L·min<sup>-1</sup>) and their body temperature was maintained at 37 °C by a feedback-regulated heating pad throughout the imaging protocol. Axial T<sub>2</sub>-weighted images of the brain were acquired using a rapid acquisition with relaxation enhancement (Turbo-RARE) sequence (TE/TR = 33.0/2500 ms; flip angle: 90 °; RARE factor: 8; averages: 2) of nine slices (slice thickness: 0.5 mm; slice gap: 0.05 mm).

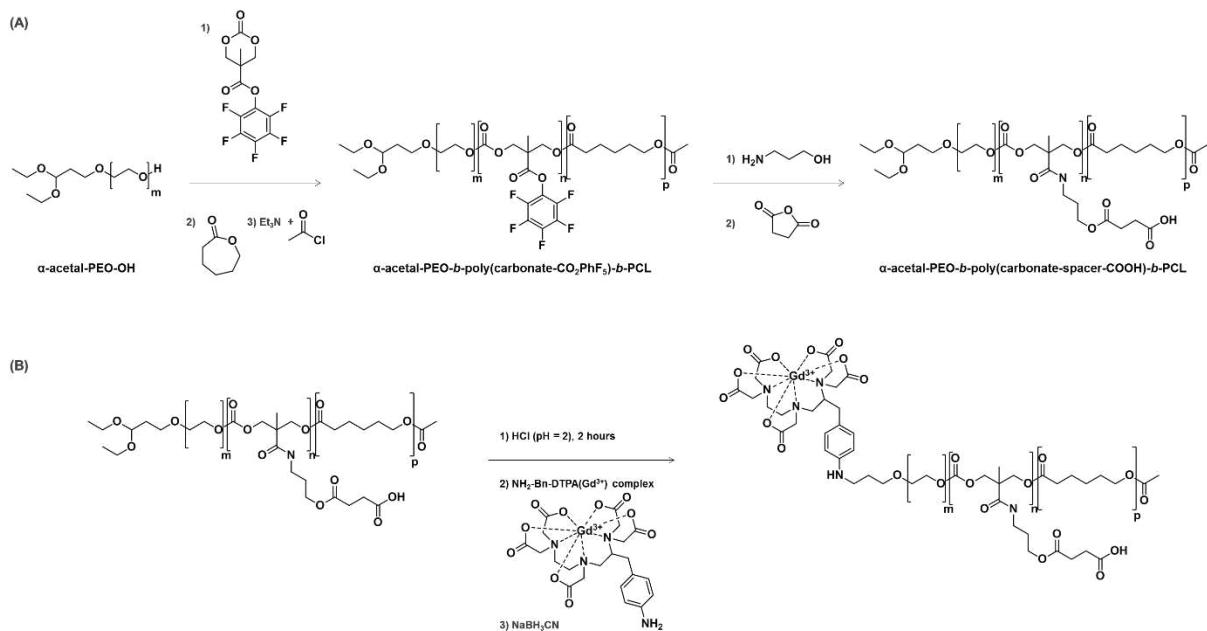
## 12. Statistical analysis

Results of biological assays were reported as the mean ± standard deviation (SD). Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software. A two-way ANOVA after correction of multiple comparisons with a post hoc Sidak test was implemented in order to identify significant differences among the conditions being investigated. Differences were considered statistically significant at *p*-values less than 0.05 (\*), 0.01 (\*\*\*) and 0.001 (\*\*\*\*).

## Results and Discussion

### 1. Polymer synthesis and functionalization

Block copolymers have been widely investigated for the development of innovative drug delivery systems (Osada et al. 2009; Xu et al. 2013; Mouffouk et al. 2015). The synthesis of an amphiphilic triblock copolymer by successive ring-opening polymerization of (2,3,4,5,6-pentafluorophenyl)-5-methyl-2-oxo-1,3-dioxane-5-carboxylate (denoted in the following as carbonate-CO<sub>2</sub>PhF<sub>5</sub>) and  $\epsilon$ -caprolactone ( $\epsilon$ -CL) from the terminal hydroxyl group of  $\alpha$ -acetal-PEO-OH is illustrated in Figure 4.1. Further functionalization of the PEO-*b*-poly(carbonate-CO<sub>2</sub>PhF<sub>5</sub>)-*b*-poly( $\epsilon$ -caprolactone) by the conversion of pentafluorophenyl pendant groups of the polycarbonate (PC) block into carboxylic acid functions according to a two-step strategy (Figure 4.1-(A)) and by the grafting of an NH<sub>2</sub>-Bn-DTPA(Gd<sup>3+</sup>) complex at the  $\alpha$  chain-ends of the triblock copolymer (Figure 4.1-(B)) was performed with the view of a subsequent cross-linking over cisplatin for therapeutic purposes and the use of this system as a macromolecular contrast agent, respectively. The design of such a multifunctional copolymer will be discussed in this section.

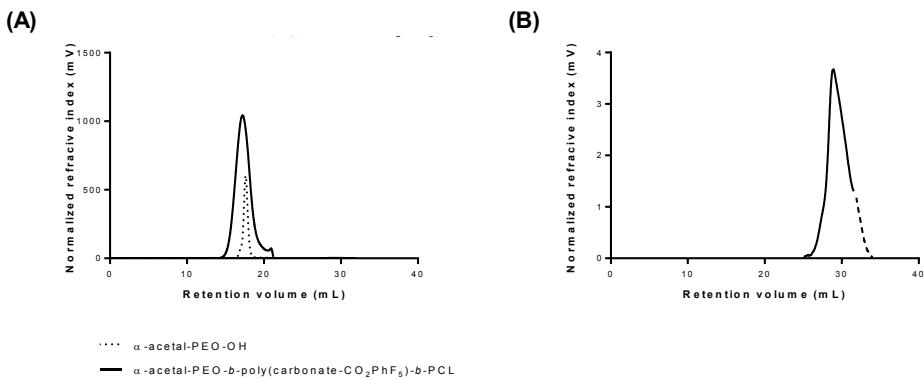
**Figure 4.1:** Scheme of the synthesis process:

- (A) Successive ring-opening polymerization of carbonate-CO<sub>2</sub>PhF<sub>5</sub> and  $\epsilon$ -CL from the terminal hydroxyl group of  $\alpha$ -acetal-PEO-OH and further functionalization
- (B) Anchorage of the NH<sub>2</sub>-Bn-DTPA(Gd<sup>3+</sup>) complex on the  $\alpha$  chain-end of the copolymer

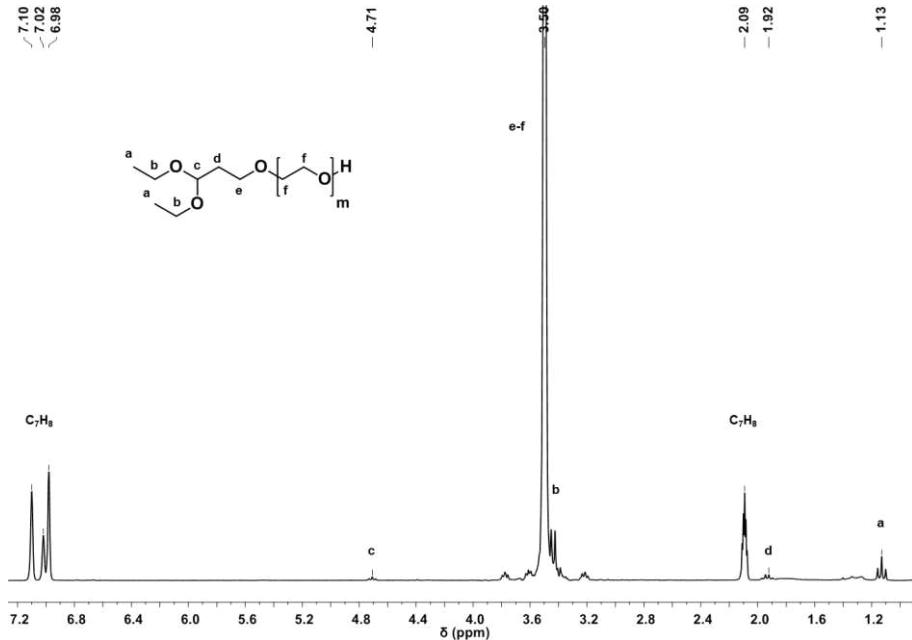
### 1.1. Synthesis of $\alpha$ -acetal-PEO-OH

An acetal functionalized poly(ethylene oxide) was synthesized by ring-opening polymerization of ethylene oxide using potassium 3,3-diethoxypropan-1-ol as an initiator as described in the literature (Grogna et al. 2010). SEC analysis in THF using a PEO standard calibration confirmed that the polymer recovered was of low dispersity ( $D = 1.05$ ) with a controlled molar mass of 5,100 g.mol<sup>-1</sup> in line with the theoretical targeted value of 5,000 g.mol<sup>-1</sup>. The corresponding SEC chromatogram is provided in Figure 4.2-(A). Since chain-end groups are of paramount importance for the grafting of a gadolinium complex on the deprotected  $\alpha$ -acetal PEO, their composition was further investigated by <sup>1</sup>H NMR and mass spectrometry. <sup>1</sup>H NMR analysis of PEO in deuterated toluene is reported in Figure 4.3. The ratio between the integral of the peak accounting for the signal of the four protons of the ethylene oxide repeating unit ( $\delta = 3.50$  ppm) and the integral of the peak accounting for the signal of the –CH acetal proton at the  $\alpha$  chain-end of PEO ( $\delta = 4.71$  ppm) led to an overestimation of the effective molar mass ( $\bar{M}_{n,PEO,RMN} = 7,000$  g.mol<sup>-1</sup>) compared to the one

determined by SEC ( $\bar{M}_{n,\text{PEO,SEC}_{\text{THF}}} = 5,100 \text{ g.mol}^{-1}$ ). As such, contamination by a byproduct had to be considered. MALDI mass spectrometry analysis was therefore performed on the synthesized PEO to especially screen its chain-end groups. It revealed the presence of a telechelic PEO assumed to be initiated by residual water present inside the reactor. Therefore, the resulting PEO-diol should be able to initiate copolymerization from both of its chain-end groups, leading to a triblock copolymer HO–A–PEO–A–OH, where A denotes any cyclic monomer whose ring-opening polymerization could be initiated by the terminal hydroxyl groups of the telechelic PEO. A second ring-opening polymerization would generate a pentablock copolymer HO–B–A–PEO–A–B–OH, where B denotes any cyclic monomer whose ring-opening polymerization could be initiated by the terminal hydroxyl groups of the telechelic triblock copolymer HO–A–PEO–A–OH, and so on. Since such copolymers are still able to spontaneously self-assemble into micelles in water if the molar masses of each block are in compliance with a hydrophilic-lipophilic balance that allows for amphiphilic properties, this contamination is not detrimental to the ultimate goal of this study. Nevertheless, it is worth noting that the morphology of the resulting objects could be influenced by the formation of flower-like instead of star-like micelles (Hamley 2005; Van Butsele et al. 2009). Ultimately, the relative amount of telechelic PEO was determined after the addition of a very low amount – i.e. two drops – of trichloroacetyl isocyanate on the synthesized PEO, which resulted in a condensation reaction with –OH chain-end groups, leading to the formation of a urethane. Subsequent <sup>1</sup>H NMR analysis in deuterated toluene revealed the appearance of a new peak at 4.12 ppm made up of the overlap of the signals of two protons of the  $\alpha$ -acetal-PEO–CH<sub>2</sub>–OC(=O)–N– and four protons of the telechelic –N–C(=O)–O–CH<sub>2</sub>–PEO–CH<sub>2</sub>–OC(=O)–N–. The signal intensity of the single proton of the acetal group ((C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O)<sub>2</sub>–CH–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–O–) at 4.71 ppm was used to quantify the relative intensity corresponding to the two protons of the  $\alpha$ -acetal-PEO–CH<sub>2</sub>–OC(=O)–N– that partly contributed to the global intensity of the signal at 4.12 ppm. From this, the relative intensity corresponding to the four chain-end protons of the telechelic PEO that also contributed to the global intensity of the signal at 4.12 ppm was further deduced. This analysis enabled quantification of the presence of telechelic PEO of up to 17 mol% of the whole batch. As a result of this thorough analysis, the molar mass determined by SEC using a PEO standard calibration was considered to be the most relevant for further characterization of the block copolymers initiated by  $\alpha$ -acetal-PEO-OH and was therefore used as a reference.



**Figure 4.2:** SEC chromatograms of: (A) the synthesized  $\alpha$ -acetal-PEO-OH and the triblock copolymer  $\alpha$ -acetal-PEO-*b*-poly(carbonate-CO<sub>2</sub>PhF<sub>5</sub>)-*b*-PCL in THF, and (B) the functionalized triblock copolymer  $\alpha$ -acetal-PEO-*b*-poly(carbonate-spacer-COOH)-*b*-PCL in DMF



**Figure 4.3:** <sup>1</sup>H NMR spectrum of  $\alpha$ -acetal-PEO-OH in deuterated toluene at 250 MHz

## 1.2. Synthesis of $\alpha$ -acetal-PEO-*b*-poly(carbonate-CO<sub>2</sub>PhF<sub>5</sub>)-*b*-PCL

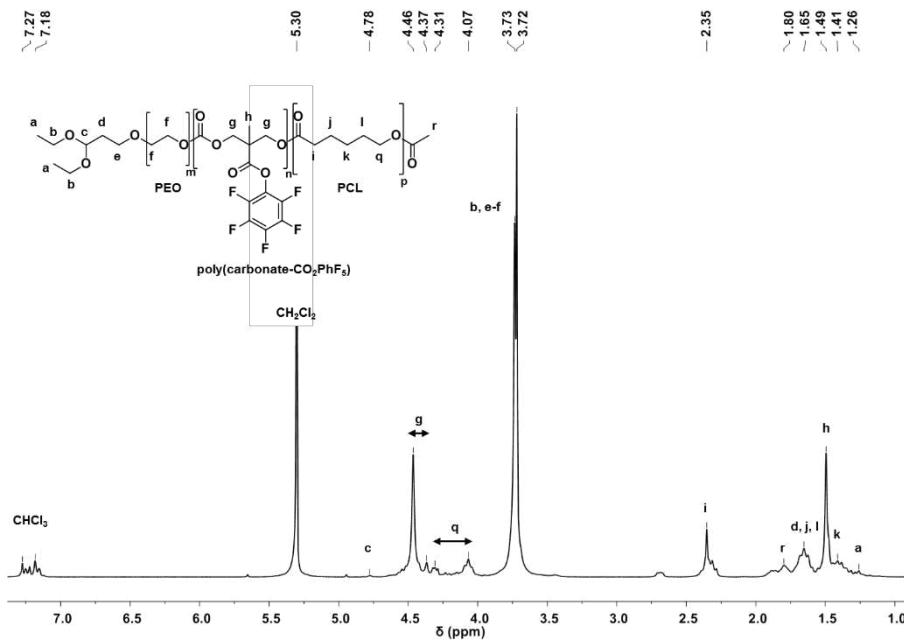
An amphiphilic triblock copolymer was synthesized by the successive ring-opening polymerization of carbonate-CO<sub>2</sub>PhF<sub>5</sub> and ε-CL initiated from the terminal hydroxyl group of  $\alpha$ -acetal-PEO-OH and catalyzed by triflic acid. Amounts of carbonate-CO<sub>2</sub>PhF<sub>5</sub> and ε-CL

monomers were added in order to obtain a degree of polymerization of 24 and 15, respectively, knowing that:  $\overline{DP}_{n,PC,th} = \frac{[\text{carbonate}-\text{CO}_2\text{PhF}_5]_0}{[\text{PEO}-\text{OH}]_0}$  and  $\overline{DP}_{n,PCL,th} = \frac{[\varepsilon-\text{CL}]_0}{[\text{PEO}-\text{PC}-\text{OH}]_0}$ .

The kinetics of the polymerization was monitored by <sup>1</sup>H NMR in deuterated chloroform at each stage. After confirmation of the complete conversion of the carbonate monomer by <sup>1</sup>H NMR in deuterated chloroform,  $\varepsilon$ -caprolactone was added to the mixture. The  $\omega$  chain-end group of the  $\alpha$ -acetal-PEO-*b*-poly(carbonate-CO<sub>2</sub>PhF<sub>5</sub>)-OH diblock copolymer enabled initiation of the ring-opening polymerization of  $\varepsilon$ -caprolactone. After 3 hours, the conversion of  $\varepsilon$ -caprolactone was estimated to be higher than 99% by <sup>1</sup>H NMR in deuterated chloroform. Full characterization of the subsequent copolymer based only on  $\alpha$  chain-end groups was tricky due to the contamination of  $\alpha$ -acetal-PEO-OH by a telechelic PEO previously described. Besides, the signal intensity of the protons from the  $\alpha$  chain-ends was very weak in comparison to that of protons belonging to the repeating units, thus reaching the limitations of NMR in terms of sensitivity. Therefore, the degree of polymerization and the molar mass of both the polycarbonate and polycaprolactone blocks were assessed by <sup>1</sup>H NMR based on the number-average molar mass of the  $\alpha$ -acetal-PEO-OH previously determined by SEC ( $\bar{M}_{n,\text{PEO,SEC}_{\text{THF}}} = 5,100 \text{ g.mol}^{-1}$ ). As a result, the mean polymerization degree of the polycarbonate block ( $\overline{DP}_{n,\text{PC,NMR}}$ ) was computed based on the integral at 4.46 ppm standing for the 4 protons (-O-CH<sub>2</sub>-CMe(CO<sub>2</sub>-PhF<sub>5</sub>)-CH<sub>2</sub>-O-) of the PC block and normalized by the integral of the repeating unit of PEO at 3.72 ppm standing for  $4 * \overline{DP}_{n,\text{PEO,SEC}_{\text{THF}}}$  protons:

$\overline{DP}_{n,\text{PC,NMR}} = \overline{DP}_{n,\text{PEO,SEC}_{\text{THF}}} * \frac{\text{Area}_{4.46\text{ppm}}}{\text{Area}_{3.72\text{ppm}}}$ . The mean polymerization degree of the polycaprolactone block ( $\overline{DP}_{n,\text{PCL,NMR}}$ ) was determined based on the integral at 4.07 ppm standing for 2 protons (-C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-) of the PCL block and normalized by the integral at 4.46 ppm of the  $4 * \overline{DP}_{n,\text{PC,NMR}}$  protons (-O-CH<sub>2</sub>-CMe(CO<sub>2</sub>-PhF<sub>5</sub>)-CH<sub>2</sub>-O-) of the PC block:  $\overline{DP}_{n,\text{PCL,NMR}} = \overline{DP}_{n,\text{PC,NMR}} * 2 * \frac{\text{Area}_{4.07\text{ppm}}}{\text{Area}_{4.46\text{ppm}}}$ . Thus, <sup>1</sup>H NMR enabled assessment of the complete conversion of first the carbonate monomer with a mean polymerization degree of the polycarbonate block of 29 ( $\overline{DP}_{n,\text{PC,NMR}} = 29$ ) and then  $\varepsilon$ -caprolactone with a mean polymerization degree of the polycaprolactone block of 16 ( $\overline{DP}_{n,\text{PCL,NMR}} = 16$ ). The <sup>1</sup>H NMR spectrum of the purified triblock copolymer in deuterated chloroform is presented in Figure 4.4. A dispersity of 1.75 was determined by SEC in THF, probably due to the above-mentioned presence of a telechelic PEO that was able to initiate

ring-opening polymerizations from its both hydroxyl chain-ends, thus resulting in a pentablock after successive ring-opening polymerizations of the carbonate-CO<sub>2</sub>PhF<sub>5</sub> and ε-CL. The SEC chromatogram of the synthesized triblock copolymer from the initial α-acetal-PEO-OH is provided in Figure 4.2-(A). As already emphasized, this molar mass distribution of the polymer chains should not be detrimental to the subsequent formation of micelles.



**Figure 4.4:** <sup>1</sup>H NMR spectrum of α-acetal-PEO-*b*-poly(carbonate-CO<sub>2</sub>PhF<sub>5</sub>)-*b*-PCL  
(TMS, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

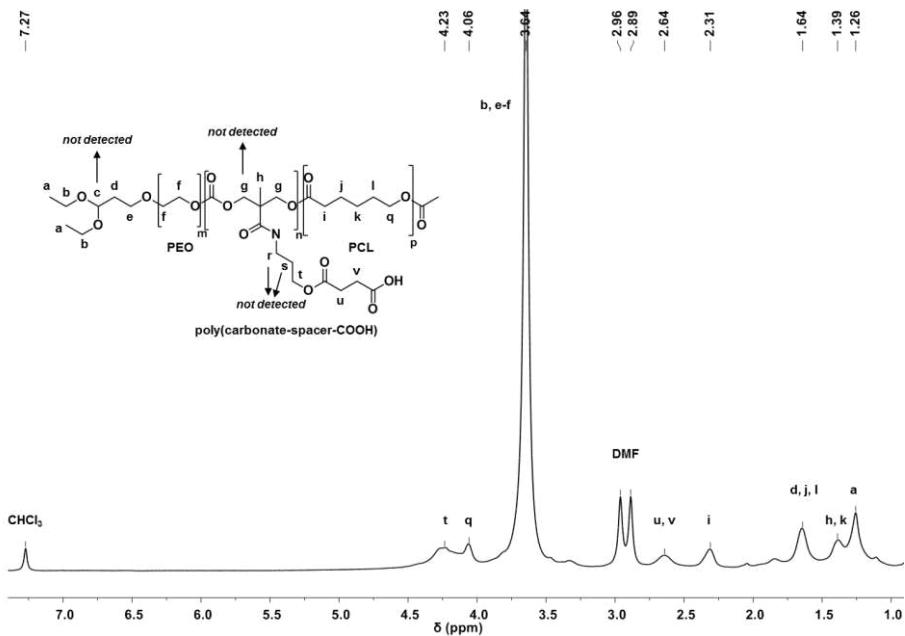
### 1.3. Postpolymerization functionalization

With the aim of cross-linking polymeric nanoparticles over platinum(II) derivatives, the synthesized triblock copolymer had to be functionalized with carboxyl groups that once deprotonated would coordinate over the platinum atom. Chemical modification was performed in two steps: (i) conversion of pentafluorophenyl groups into a primary amine by a reaction of the ester function with 3-amino-1-propanol before (ii) esterification of the resulting alcohol groups with succinic anhydride. This functionalization of the synthesized triblock copolymer was adapted from procedures described in the literature (Engler et al. 2015; Defize et al. 2012). <sup>19</sup>F NMR was first used in order to confirm the quantitative elimination of pentafluorophenyl groups. Chemical modifications were further demonstrated

by <sup>1</sup>H NMR: (i) the grafting of 3-amino-1-propanol to ester functions of the polycarbonate chains was assessed by the appearance of new peaks at  $\delta$  = 3.10, 1.85, and 3.75 ppm, standing for the respective six protons of the NH–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–OH subunit; (ii) the conversion of alcohol functions (–CH<sub>2</sub>–OH) to carboxylic acids (–CH<sub>2</sub>–O–C(=O)–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–COOH) was supported by both the appearance of a new singlet at 2.64 ppm corresponding to the grafting of succinic anhydride and the shift from 3.75 ppm to 4.25 ppm of the peak corresponding to the two protons in the close vicinity of the alcohol function thus converted into an ester function. The <sup>1</sup>H NMR spectrum of the purified functionalized triblock copolymer recorded at 400 MHz in deuterated chloroform is presented in Figure 4.5. Nevertheless, the assessment of the functionalization content turned out to be impossible by <sup>1</sup>H NMR due to the overlap of signals and to the difficulty of finding a common good solvent for both blocks. A separate experiment was achieved on a homo-polycarbonate rather than on a block copolymer. The homopolymer obtained by the same procedure was dissolved in deuterated DMF and analyzed by <sup>1</sup>H NMR (spectrum not shown). The analysis was facilitated, and the functionalization content was assessed by the comparison of the areas under the peaks akin to the g and t protons, in the absence of any overlap with the peaks akin to other blocks (PCL). The functionalization was estimated to be higher than 95% and was therefore considered quantitative. SEC analysis in DMF of the synthesized triblock copolymer confirmed that its chemical functionalization resulted in a monomodal distribution of molar masses with a relatively low dispersity ( $D = 1.25$ ). The corresponding chromatogram is provided in Figure 4.2-(B).

Self-assembly of the  $\alpha$ -acetal-PEO-*b*-poly(carbonate-spacer-COOH)-*b*-PCL copolymer chains in water was carried out to afford nanoparticles. Chemical modifications were directly performed on these particles by deprotection of the acetal function at the  $\alpha$  chain-end of the triblock copolymer and the reductive amination reaction between the resulting aldehyde chain-end group and the NH<sub>2</sub>-Bn-DTPA(Gd<sup>3+</sup>) complex in the presence of a large excess of sodium cyanoborohydride. An NH<sub>2</sub>-Bn-DTPA(Gd<sup>3+</sup>) complex was synthesized from NH<sub>2</sub>-Bn-DTPA ligand as described in the literature (Grogna et al. 2010). Conditions for its grafting on the  $\alpha$  chain-end of the triblock copolymer were adapted from the literature (Grogna et al. 2010). Briefly, quantitative deprotection of the acetal function was assessed by <sup>1</sup>H NMR in deuterated chloroform after 2 hours in aqueous solution at pH 2. Indeed, the peak of the proton of the acetal group at 4.64 ppm completely disappeared in favor of a singlet of the same intensity at 9.80 ppm standing for the proton of an aldehyde function. Amino groups

of the NH<sub>2</sub>-Bn-DTPA(Gd<sup>3+</sup>) complex were then allowed to react with aldehyde  $\alpha$  chain-ends of PEO to form an imine. After one hour, sodium cyanoborohydride was added to the mixture in order to reduce imine into amine and thus obtain a stable contrast macroagent. The yield of the reductive amination was assessed by ICP-MS after removal of ungrafted NH<sub>2</sub>-Bn-DTPA(Gd<sup>3+</sup>) by dialysis against a large volume of water. Even though the gadolinium complex was introduced in default compared to the  $\alpha$  chain-ends (1:2 mol), the very low and limited grafting efficiency could be mainly attributed to the highly reduced reactivity of chain-end groups at the micelle surface due to the difficulty for organic co-reactants to diffuse and reach their target. This slower diffusion especially depends on PEO chain lengths, block conformation and micelle size. Such parameters could dramatically impact the yield of the reductive amination depending on the system. Indeed, the same procedure was formerly tested on synthesized  $\alpha$ -acetal-PEO<sub>116</sub>-*b*-PCL<sub>16</sub> micelles with a grafting efficiency of 49% as assessed by ICP-MS. Steric hindrance of both the NH<sub>2</sub>-Bn-DTPA(Gd<sup>3+</sup>) complexes and the PEO micelle corona has already been assumed to be responsible for this moderate efficiency. The addition of an intermediate polycarbonate block between the PEO and PCL blocks, respectively, may have resulted in tougher interactions between co-reactants. However, it has to be highlighted that even a moderate grafting yield of the NH<sub>2</sub>-Bn-DTPA(Gd<sup>3+</sup>) complex to the triblock copolymer could lead to a high efficiency of the synthesized macromolecular contrast agent. Indeed, the reduced mobility caused by the attachment of the gadolinium complex to a high molar mass copolymer compared to the small gadolinium chelate Gd-DTPA commonly results in an improved ability to enhance the contrast while performing MRI scanning (Artemov 2003; Geraldès & Laurent 2009). As a result, the functionalized triblock copolymer was expected to exhibit relaxometric features consistent with its intended use as an MRI macromolecular contrast agent. The proof-of-concept will be detailed in the following through a subsection dedicated to relaxometry measurements. Preliminary *in vivo* experiments further demonstrated the feasibility of using the formulated hybrid nanoparticles for MRI monitoring of their infusion and biodistribution within the brain parenchyma.



**Figure 4.5:**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of  $\alpha$ -acetal-PEO-*b*-poly(carbonate-spacer-COOH)-*b*-PCL  
(TMS, 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

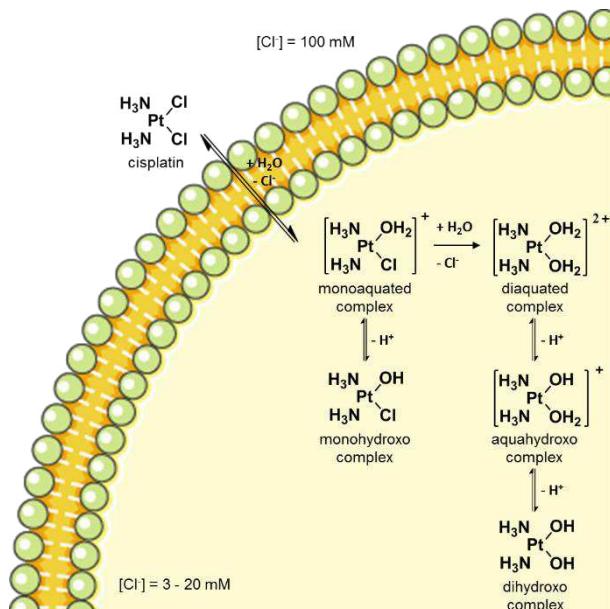
## 2. Formulation and characterization of multifunctional cisplatin cross-linked polymeric nanoparticles

Various experimental parameters have been reported to play a key role in the formulation process of polymeric nanoparticles (Mai & Eisenberg 2012). Based on preliminary assays, the polymer concentration in aqueous solution, the cisplatin to carboxylate ratio and the duration of the conjugation reaction were considered key parameters that affect the formation of cisplatin cross-linked nanoparticles. The impact of these parameters on the drug-loading content, mean size and size distribution of the resulting macromolecular prodrug will be addressed in the following subsections.

### 2.1. Preparation of cisplatin cross-linked polymeric nanoparticles

Cisplatin requires primary activation before exerting its cytotoxic activity. Therefore, it requires the substitution of at least one chloride group by water through a process called aquation that is illustrated in Figure 4.6. Leading to monoqua- or diaqua-species, this hydrolysis automatically occurs *in vivo* once cisplatin passively diffuses inside cells because of the low chloride concentration within the cytosol compared to its 5- to 30-fold equivalents in the extracellular space (Miller & House 1989; Kelland 2007). *In vitro*, this reaction was

triggered by the addition of an aqueous solution of silver nitrate to cisplatin in water that caused chloride ion displacement, resulting in the hydrolysis of the Pt(II) complex and formation of a silver chloride precipitate. In the following, the (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Pt(II) complex, the active form of cisplatin able to cross-link with DNA, was considered for the computation of the nanoparticle payload. The payload, also denoted as drug-loading content, was defined as the weight percentage of the active complex to the triblock copolymer implied in the nanoparticle.



**Figure 4.6:** Cisplatin activation by aquation within cells and resulting hydrated forms

Nanoparticles were prepared by coordination of aquated cisplatin with lateral carboxylate groups of the polycarbonate segment concomitantly with the self-assembly in water of the amphiphilic DTPA(Gd<sup>3+</sup>)-PEO-*b*-poly(carbonate-spacer-COO<sup>-</sup>)-*b*-PCL triblock copolymer chains as illustrated in Figure 4.7. The pH of the copolymer solution was increased to 7.4 by the addition of a 0.1 M aqueous solution of sodium hydroxide in order to deprotonate carboxyl functional groups. A large excess of cisplatin was added in order to improve the conjugation efficiency. Polymer chains spontaneously self-assembled into water while pendant carboxylate functions located at the surface of the micelles' core enabled structural cross-linking with cisplatin (Nishiyama et al. 2003; Ye et al. 2006; Huynh et al. 2012; Li et al.

2014; Duan et al. 2015). Cisplatin hydrated complexes were able to coordinate with either one or two carboxylate groups from the same or from different polymer chains. Such cross-linking is of great interest to increase the nanoparticle stability. After purification by dialysis against water to remove the unconjugated cisplatin complexes, the payload of the resulting cisplatin cross-linked polymeric nanoparticles was assessed to be  $12.6 \pm 2.44$  wt% by ICP-MS. Abnormally bigger nanoparticles or aggregates were excluded by filtration through  $0.22\text{ }\mu\text{m}$  that led to a final sterilized population of  $8.78 \pm 0.35$  wt% payload. Since cisplatin was initially introduced in large excess to the copolymer solution, there is no sense here determining a yield of the complexation reaction. However, conjugation efficiency can be defined as the percentage of carboxylate involved in the formation of  $(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{II})$  complexes. As already emphasized, cross-linking with a platinum complex can arise from one or two carboxylate functions. If cross-linking with a Pt(II) complex involves only one carboxylate, then the conjugation efficiency can be estimated to be  $30.6 \pm 5.93\%$ . This rate is obviously doubled in the case where two carboxylates cross-link with a single Pt(II) complex. This limited loading could result from space constraints and from the difficulty of the drug to access and diffuse into a more and more hydrophobic environment after the first several cross-links around the micelle core have been formed.

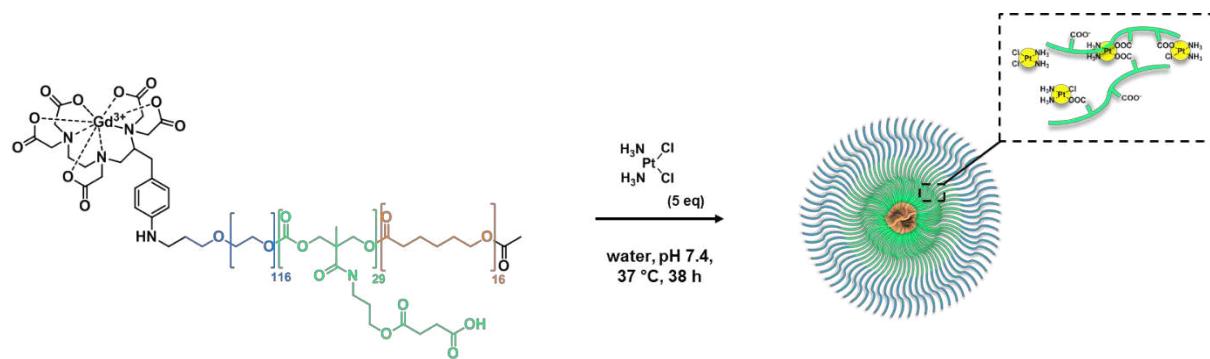


Figure 4.7: Cross-linking of activated cisplatin with carboxylate functional groups of DTPA(Gd<sup>3+</sup>)-PEO-*b*-poly(carbonate-spacer-COO<sup>-</sup>)-*b*-PCL copolymer

## 2.2. Characterization

In the same way as conventional Dynamic Light Scattering (DLS) measurements, Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) relies on the general principle of scattering of light

when a beam encounters particles under Brownian motion. However, NTA offers a substantial benefit over DLS since it consists in tracking individual particle trajectories. As a result, accurate size distribution in the number of the nanoparticle population can be provided without any assumptions on the type of distribution (Boyd et al. 2011; Domingos et al. 2009). Therefore, NTA was used for the determination of the mean size in number, the size distribution and the concentration of the nanoparticle population. It also enabled monitoring of the stability of the formulated polymeric nanoparticles over time. Sample concentration was adjusted to be within the range of 1.10<sup>8</sup> - 1.10<sup>9</sup> particles per mL to allow the analysis software to track the movement of a single particle across the low-volume flow cell plate during injection. Table 4.1 reports the main features of 8.78 ± 0.35 wt% cisplatin-loaded cross-linked nanoparticles obtained after a 38 hour-conjugation reaction, removal of uncomplexed cisplatin by dialysis against a large volume of water and filtration through 0.22 µm. Experiments were performed in triplicate. Size (nm), concentration (particles per mL), and the number of Pt(II) and Gd-DTPA complexes per nanoparticle are expressed as the mean ± SD.

**Table 4.1:** Features of 8.78 ± 0.35 wt% cisplatin-loaded cross-linked nanoparticles  
(measures in triplicates are expressed as mean ± SD)

Size (nm)	Concentration (particles.mL <sup>-1</sup> )	Number of Pt(II) complexes per nanoparticle	Number of Gd-DTPA complexes per nanoparticle
100.63 ± 12.04	8.13 10 <sup>9</sup> ± 2.41 10 <sup>9</sup>	7.48 10 <sup>6</sup> ± 1.96 10 <sup>6</sup>	6.61 10 <sup>7</sup> ± 2.42 10 <sup>7</sup>

The mean size and concentration of the nanoparticle population were directly measured by NTA. The nanoparticle concentration of the suspension was obtained after correction by the dilution factor required for an appropriate analysis. The mean number of Pt(II) complexes ( $N_{Pt-NP}$ ) and Gd-DTPA complexes ( $N_{Gd-NP}$ ) per nanoparticle was deduced from the ICP-MS quantification of Pt and Gd, respectively, in the nanoparticle suspension as indicated by equations (9) and (10).

$$N_{\text{Pt-NP}} = N_A * \frac{1}{M_{\text{Pt}}} * \frac{Cm_{\text{Pt}}}{C_{\text{NP}}} \quad (\text{Equation 9})$$

where  $N_A$  is the Avogadro number,  $M_{\text{Pt}}$  is the molar mass of platinum,  $Cm_{\text{Pt}}$  is the mean mass concentration of platinum per volume unit quantified by ICP-MS, and  $C_{\text{NP}}$  is the mean concentration of nanoparticles in solution measured by NTA.

$$N_{\text{Gd-NP}} = N_A * \frac{1}{M_{\text{Gd}}} * \frac{Cm_{\text{Gd}}}{C_{\text{NP}}} \quad (\text{Equation 10})$$

where  $N_A$  is the Avogadro number,  $M_{\text{Gd}}$  is the molar mass of gadolinium,  $Cm_{\text{Gd}}$  is the mean mass concentration of gadolinium per volume unit quantified by ICP-MS, and  $C_{\text{NP}}$  is the mean concentration of nanoparticles in solution measured by NTA.

Besides, the stability of the formulated nanoparticles in aqueous solution at 4 °C was assessed by monitoring the mean size and size distribution of every population over time. As reported in Table 4.2 based on the results of one representative experiment, cisplatin cross-linked nanoparticles exhibited remarkable stability in aqueous solution for at least one month. Besides, they showed no dissociation upon dilution. Obviously, coordination bonds between Pt(II) complexes and carboxylates of the copolymer ensured a high stability of the nanoparticles. However, destabilization of this cross-linking, which helps in constituting the nanoparticle, would leave the copolymer with its intrinsic amphiphilic properties. The critical micellar concentration (CMC) was estimated to be less than  $1.445 \cdot 10^{-6}$  M, suggesting a high stability of the system, a key point from the perspective of a translation to further biological applications. Moreover, a low CMC reveals weak repulsions between the hydrophobic polycaprolactone heads, thus resulting in rather larger micelles. This may explain the 100 nm mean size measured for the different cisplatin cross-linked polymeric nanoparticles formulated throughout this work. Although consistent with *in vivo* applications, the formulated nanoparticles remained bigger than the 20 nm-sized “NC-6004” that consists of 39 wt% cisplatin-loaded micellar nanoparticles currently in a phase II clinical trial (Matsumura & Kataoka 2009). Nevertheless, they are smaller than various polymeric micelles also described in the literature (Huynh et al. 2012). In addition, in accordance with other nanocarriers coated with polyethylene glycol (PEG), the negative zeta potential of  $-9.95 \pm 3.95$  mV supports the presence of a PEO corona surrounding the nanoparticle and

stabilizing it, which would further ensure stealthiness of the drug delivery system once administered *in vivo* (Lemarchand et al. 2006).

**Table 4.2:** Stability of 9.90 ± 1.6 wt% cisplatin-loaded cross-linked nanoparticles over time

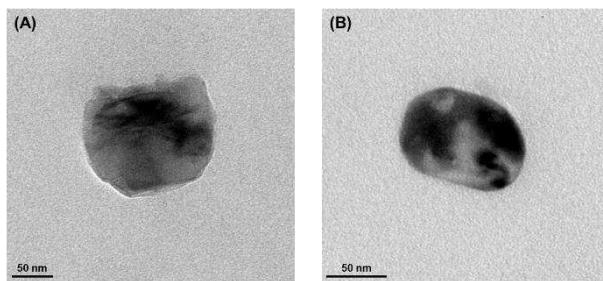
Age of the nanoparticle suspension (days)	Particle mean size <sup>a</sup> ± SD (nm)
1	116.8 ± 53.0
4	116.3 ± 51.4
6	116.3 ± 50.1
11	117.4 ± 53.6
14	119.4 ± 50.3
21	124.0 ± 54.9
28	110.0 ± 46.4

Determination by: <sup>a</sup> NTA.

The addition of Pt(II) complexes in a large excess may lead to their encapsulation within the nanosystem without cross-linking with the carboxylate groups. This could further result in a more complex drug release kinetics between cross-linked and unbound cisplatin. With the perspective of a possible translation to the pharmaceutical industry, additional experiments were carried out using an equimolar ratio of cisplatin with regard to carboxylate functional groups in order to reduce the initial amount of drug required for every formulation, knowing that a single Pt(II) complex could theoretically be able to coordinate with two carboxylate groups. Even though the resulting reduction in drug payload could be counterbalanced by enhancing the duration of the coordination reaction (data not shown), special care had to be taken to prevent the copolymer from being degraded by hydrolysis of ester functions, even though smooth conditions were selected.

The morphology of the formulated nanoparticles in solution and the distribution of cisplatin within them were further investigated by TEM. As illustrated in Figure 4.8, electron micrographs of the cisplatin cross-linked nanoparticles show dense areas within their structure that confirm the presence of high atomic number nuclei. Density appears to be correlated with the drug-loading content of the nanoparticles, with highly darker areas within 20.0 ± 2.5 wt%

compared to  $4.12 \pm 0.5$  wt% cisplatin-loaded cross-linked nanoparticles. These dark areas are presumably located at the surface of the PCL core while a thin PEO corona should surround the formulated nanoparticles. Energy dispersive X-ray spectroscopy analysis further allowed for accurately identifying platinum within the nanoparticles.



**Figure 4.8:** TEM micrographs of (A)  $4.12 \pm 0.5$  wt% and (B)  $20.0 \pm 2.5$  wt% cisplatin-loaded cross-linked polymeric nanoparticles

In conclusion, a balance between the drug-loading content, the mean size of the nanoparticles, their stability over time and the duration of the whole formulation process can be reached depending on the requirements appropriate to their future application. Interestingly, an increase in the duration of the coordination reaction was associated with the formulation of nanoparticles of higher drug-loading contents while only slightly affecting their mean size (data not shown). Although this observation could be of interest for further concentrating the active principle, the formulation of  $12.6 \pm 2.44$  wt% cisplatin-loaded cross-linked nanoparticles resulting from an accurate and reproducible 38-hour formulation procedure, stable over time in aqueous solution at  $4^\circ\text{C}$  prior to administration, was judged to be consistent with subsequent biological applications and was used in the following imaging characterization and biological evaluation.

### 2.3. Relaxometry

Cisplatin cross-linked nanoparticles were formulated as described above from DTPA(Gd<sup>3+</sup>)-PEO-*b*-poly(carbonate-spacer-COOH)-*b*-PCL triblock copolymers. According to the different characterization techniques explored, PEO chains form a corona on the outer

side of the nanoparticles, thus allowing exchanges between the NH<sub>2</sub>-Bn-DTPA(Gd<sup>3+</sup>) complexes anchored on their surface and the surrounding water molecules. Such interactions provide the nanoparticles with an imaging potential that has to be evaluated and compared to conventional Gd-DTPA MRI contrast agents used in the clinics. MRI contrast agents aim at shortening the longitudinal (T<sub>1</sub>) and transverse (T<sub>2</sub>) relaxation times of nuclei within the imaged tissue in order to reveal metabolic abnormalities by achieving a differential contrast between pathological and healthy tissues. The efficacy of an MRI contrast agent is characterized by its longitudinal (r<sub>1</sub>) and transverse (r<sub>2</sub>) relaxivities that reflect its ability to decrease the T<sub>1</sub> and T<sub>2</sub> of the water protons according to its molar concentration (Geraldes & Laurent 2009). Longitudinal and transverse relaxivities of both the polymeric nanoparticles decorated on their corona by NH<sub>2</sub>-Bn-DTPA(Gd<sup>3+</sup>) complexes (referred to as Gd-DTPA nanoparticles in this section) and conventional Gd-DTPA were therefore evaluated at 7 T, 25 °C, in water and in plasma. The results of a representative experiment are presented in Table 4.3.

**Table 4.3:** Measurement of longitudinal and transversal relaxivities respectively of both the Gd-DTPA chelate and Gd-DTPA nanoparticles at 7 T, 25 °C, in water

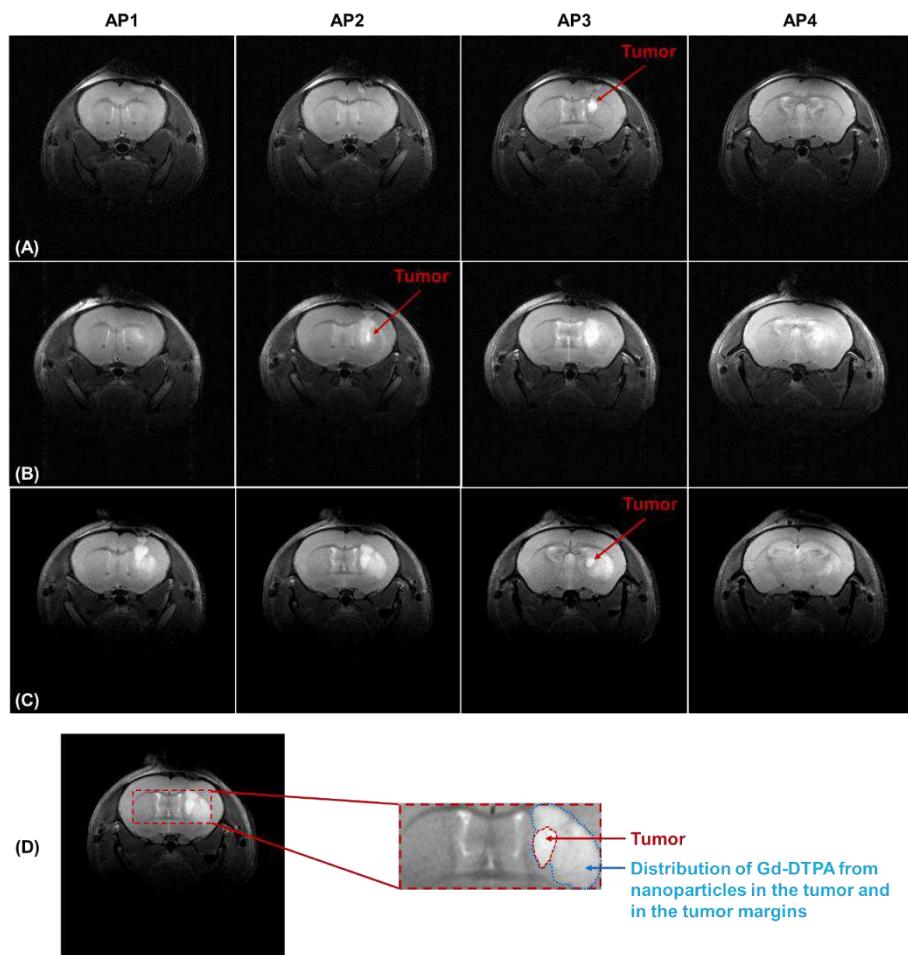
	Longitudinal relaxivity r <sub>1</sub> (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	Transverse relaxivity r <sub>2</sub> (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	r <sub>2</sub> /r <sub>1</sub>
<b>In water</b>			
Gd-DTPA	5.19	6.09	1.17
Gd-DTPA nanoparticles	7.34	28.20	3.84
<b>In plasma</b>			
Gd-DTPA	6.09	9.16	1.50
Gd-DTPA nanoparticles	6.78	27.92	4.12

As expected, immobilizing a low molar mass contrast agent onto polymeric nanoparticles enhances its relaxivity by slowing down its rotational motion at the molecular level (Artemov 2003; Geraldes & Laurent 2009). At 7 T and 25 °C, Gd-DTPA nanoparticles showed a slightly higher longitudinal relaxivity than that of Gd-DTPA chelate both in water and in plasma. As a result, Gd-DTPA nanoparticles enable faster longitudinal relaxation of water

molecules in their neighborhood. Their transverse relaxivity was substantially higher than that of Gd-DTPA with a 4.6-fold and 3.0-fold increase in water and plasma, respectively, which reveals a faster transverse relaxation. The high resulting  $r_2/r_1$  ratio both in water and in plasma of Gd-DTPA nanoparticles makes them more similar to T<sub>2</sub> contrast agents such as superparamagnetic iron oxides (SPIO) or even ultrasmall superparamagnetic iron oxides (USPIO) than traditional T<sub>1</sub> gadolinium based contrast agents (Na et al. 2009). However, it is worth noting that the classification as “T<sub>1</sub>-” or “T<sub>2</sub>-agent” is intrinsically correlated with several factors including the size and the chemical structure of the contrast agent, its gadolinium concentration, its chemical environment, its ability to diffuse through the tissue, the parameterization of the imaging pulse sequence and the strength of the magnetic field (Burtea et al. 2008; Geraldès & Laurent 2009). Resorting to such functionalized block copolymer nanoparticles also allows for increasing the number of gadolinium complexes per nanocarrier (see Table 4.1:  $6.61 \cdot 10^7 \pm 2.42 \cdot 10^7$  Gd-DTPA complexes per nanoparticle), thus enhancing the relaxivity of the resulting macromolecular contrast agent in comparison with a single Gd-DTPA complex (Artemov 2003).

Ultimately, these properties make Gd-DTPA nanoparticles innovative and powerful MRI macrocontrast agents. It is worth noting that the systemic injection in clinical practice of conventional MRI contrast agents is prohibited in patients undergoing a therapy based on platinum salts because of nephrotoxicity issues. From this perspective, multifunctional nanoplatforms could enable both delivery of active Pt(II) complexes and monitoring of the biodistribution of the reservoir concomitant with the therapeutic efficiency on tumor growth without additional toxicity. Preliminary experiments were performed on mice after orthotropic implantation of U-87MG human glioblastoma cells in order to monitor the biodistribution of Gd-DTPA nanoparticles within the damaged parenchyma. Twelve days following the tumor inoculation, 10 µL of a Gd-DTPA nanoparticle suspension were injected into the right striatum by CED infusion. Axial anatomical T<sub>2</sub>-weighted images of the brain are presented in Figure 4.9. Compared to the images of the control mouse presented in the first panel (A), where the observed hypersignal clearly delineates the tumor mass, the CED of Gd-DTPA nanoparticles displays a diffuse hypersignal that has already spread within the striatum one hour following the injection (panel (B)). This signal lasted and further expanded over the next 24 hours as shown in panel (C). The last panel, (D), consists of an enlargement of the striatum in order to better visualize the distribution of the Gd-DTPA nanoparticles within the tumor

and the tumor margins. Despite an already noticeable effect on the contrast of T<sub>2</sub>-weighted images, an increase in the yield of the reductive amination for grafting the NH<sub>2</sub>-Bn-DTPA(Gd<sup>3+</sup>) complex on the α chain-end group of the α-aldehyde-PEO-*b*-poly(carbonate-spacer-COOH)-*b*-PCL would lead to a higher density of gadolinium molecules available at the outer side of the nanoparticle corona and therefore further intensify interactions with protons. This would allow for a longer monitoring of the nanoparticle infusion within the brain parenchyma over time, here demonstrated as a proof-of-concept, and give rise to great perspectives towards the use of this promising tool as a theranostic approach.



**Figure 4.9:** T<sub>2</sub>-TurboRARE axial MRI sequence of serial transections of the brain in the antero-posterior axis showing: (A) the tumor of a control mouse 24 hours after injection of a 5% glucose solution, (B) and (C) the distribution of Gd-DTPA nanoparticles (1.97 μM) in the tumor and in the associated tumor margins respectively one hour and 24 hours following CED infusion, (D) an enlargement of the AP2 slice showing the distribution of the nanoparticles.

### 3. In vitro drug release from the nanoparticles

*In vitro* drug release profiles from 8.66 ± 1.1 wt% cisplatin-loaded cross-linked nanoparticles are presented in Figure 4.10. Exchange reactions between chloride ions in the biological medium and carboxylate groups along the polycarbonate block triggered the release of cisplatin by partially destabilizing the structure of cisplatin cross-linked nanoparticles. Also, ester bonds of both the polycarbonate and the polycaprolactone chains could be more easily hydrolyzed under acidic conditions. Therefore, the release of cisplatin in acidic medium was expected to be faster than in neutral medium, although the difference was not significant. Both release profiles are characterized by an initial burst release of cisplatin with 42% and 35% of cisplatin released, respectively, in acidic and in neutral medium within the first 20 minutes. Sustained release then occurred for the next day, with total release of the initial platinum amount after 24 hours.

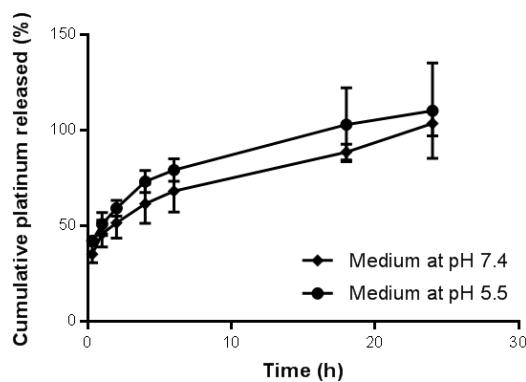


Figure 4.10: Cumulative platinum released profiles from 8.66 ± 1.1 wt% cisplatin-loaded cross-linked nanoparticles according to the medium acidity

The initial burst release could be attributed to physical encapsulation of cisplatin within the nanoparticle core, while the subsequent sustained release could be mainly related to ligand exchange of the platinum complex from carboxylate to chloride ligands, thus leading to the cleavage of the cross-link between the platinum complex and the polymer. Sustained release may improve the efficiency of the encapsulated drug compared to the free drug.

Theoretical models have been investigated to rationalize the mechanisms behind drug release, i.e. the migration of the drug solute from its initial position within the polymeric system to the outer corona and ultimately to the release medium (Parhizkar et al. 2016). Along this way, drug release can be affected by the physicochemical properties of the solute (solubility, stability, charges, and interaction with the polymer matrix), the structural and geometrical properties of the drug delivery system (composition, structure, swelling, and degradation) and the release environment (pH, temperature, ionic strength, and presence of enzymes) (Fu & Kao 2010). Ritger and Peppas' model provides an empirical equation (see Equation (11)) that describes the drug release from polymeric drug delivery systems. It assumes that the fraction of drug released at time  $t$ , referred to as  $\frac{M_t}{M_\infty}$ , is a function of the solute diffusion through the particle and as such can be expressed up to 60% by a power law as follows:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (\text{Equation 11})$$

where  $M_t$  is the cumulative amount of drug released at time  $t$ ,  $M_\infty$  is the maximal amount of drug released,  $n$  is the release exponent, and  $k$  is a kinetic constant (Peppas & Sahlin 1989; Li et al. 2006). The release exponent  $n$  is indicative of the mechanisms of transport that occur within the polymer matrix and that cause drug release. The kinetic constant  $k$  considers the structural and geometric features of the drug delivery system. It can be noticed that the Ritger-Peppas modeled release varies with  $t^n$ , where many other models exhibit a cumulative release directly proportional to time at short times (Parhizkar et al. 2016). Cisplatin release profiles both in acidic and in neutral medium could be fitted to the Ritger and Peppas' model with good correlation with experimental data. Fitting parameters are reported in Table 4.4. As stated by the underlying theory, a release exponent  $n$  less than or equal to 0.5 is characteristic of a Fickian diffusion drug release, a transport process that intrinsically depends mainly on the properties of the polymeric drug delivery system rather than on the solvent diffusion within the polymer matrix (Fu & Kao 2010; Chime Salome et al. 2013). Therefore, platinum released from 8.66 ± 1.1 wt% cisplatin-loaded cross-linked polymeric nanoparticles follows a Fickian diffusion.

**Table 4.4:** Modeling of the release profile of cisplatin from 8.66 ± 1.1 wt% cisplatin-loaded cross-linked nanoparticles according to the Ritger and Peppas’ theory

	pH 5.5	pH 7.4
<i>k</i>	52.508	45.185
<i>n</i>	0.2302	0.2421
R <sup>2</sup>	0.995	0.991

#### 4. Copolymer biocompatibility

The biocompatibility of the triblock copolymer was assessed prior to platinum conjugation on U-87MG and U-251MG glioblastoma cell lines. The polymer concentrations ranged up to 0.250 mg.mL<sup>-1</sup> to match the maximum concentration of the triblock copolymer used in the formulation of 8.78 ± 0.35 wt% cisplatin-loaded cross-linked nanoparticles. Although such a payload enabled us to reach a cisplatin concentration consistent with a therapeutic efficacy, as demonstrated in the case of the free drug (further details will be given in the next section), it is worth noting that higher drug-loading contents could be achieved anyway by extending the duration of the coordination reaction. Therefore, the range of concentrations used for assessing the copolymer biocompatibility was consistent with a subsequent biological application.

A cell viability assay was performed using a tetrazolium salt (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, MTS) that is reduced to formazan by dehydrogenase succinate enzymes of metabolically active cells. This MTS assay was performed after an 18-hour exposure of the cells to various concentrations of the synthesized copolymer and showed no significant modification in cell metabolism, as illustrated in Figure 4.11. Even though the different blocks of the copolymer were expected to be safe, demonstrating biocompatibility of the system remains crucial. Thus, the copolymer was judged to be biocompatible and further *in vitro* studies could be performed with the resulting cisplatin cross-linked polymeric nanoparticles on the basis of this biological innocuousness.

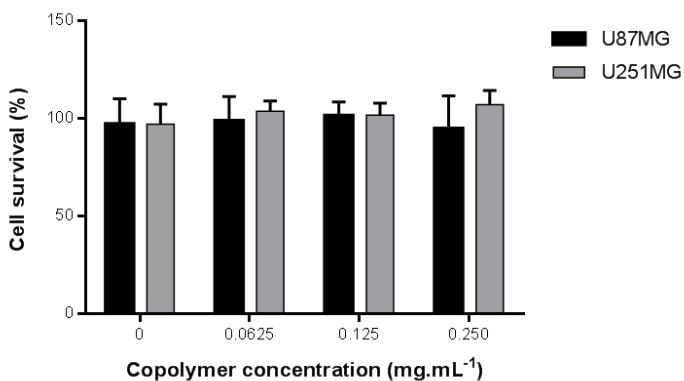


Figure 4.11 : Overall survival of glioblastoma cells after an 18 hour-exposure to different copolymer concentrations

## 5. Time course of platinum accumulation in glioblastoma cells and subsequent formation of DNA adducts

Cisplatin is widely used as a standard-of-care in the treatment of several solid tumors including germ cell tumors and lung cancer, but its therapeutic benefit is limited by a high toxicity profile and drug resistance mechanisms. Indeed, several solid tumors that primarily respond to platinum-based treatment often relapse with an acquired resistance (Dasari & Tchounwou 2014). Drug resistance is commonly characterized by a reduced intracellular accumulation of platinum compounds that was estimated to account for up to 90% of the total resistance in several tumor cells (Li et al. 2012). This implies an impaired influx and/or conversely an increased active efflux of the drug, ultimately resulting in less cytotoxicity (Herraez et al. 2012; Shen et al. 2012). Even though some transporters have been identified individually as playing a key role in the influx or efflux of platinum compounds, the source of drug resistance could be fully explained only by a multifactorial approach that would consider both the individual and collective contributions of sometimes redundant transporters to the pharmacokinetics and -dynamics of cisplatin (Sprowl et al. 2012). Besides, DNA was intensively described in the literature as the main target of cisplatin cytotoxicity resulting in both single- and double-strand breaks (Siddik 2002; Kelland 2007). Several studies reported that the amount of Pt-DNA adducts was highly correlated with the clinical outcome (Chen et al. 2010). Therefore, assessing drug distribution within cancer cells over time could be a highly predictive marker of therapeutic efficiency. Besides, DNA also constitutes the main

target in radiotherapy strategies. As such, efficacy of ionizing radiations can be maximized when performed on previously damaged DNA, leading to a synergistic effect between radio- and chemotherapeutic strategies (Wilson et al. 2006). When dealing with the developed nanosystem, it is worth noting that the presence of both platinum within the nanoparticles and gadolinium atoms anchored on their surface should be able to potentiate the benefits of radiotherapy (Sancey et al. 2014; Delorme et al. 2017). As a result, optimization of the treatment schedule to maximize the efficiency requires a better knowledge and understanding of the appropriate drug distribution within the cell over time. In addition, alleviating drug resistance and systemic toxicity of platinum compounds while potentiating their efficacy could be achieved by vectorizing them directly to their target *via* nanomedicine (Nishiyama et al. 2003; Cabral & Kataoka 2014). Thus, the impact of the method of conveying the drug was investigated through the study of the time course of intracellular accumulation of platinum compounds and subsequent Pt-DNA adduct formation in human U-87MG and U-251MG glioblastoma cell lines after exposure to the formulated macromolecular prodrug in comparison with free cisplatin.

With the aim of studying the time course of platinum accumulation in glioblastoma cells over 48 hours, IC<sub>50</sub> values corresponding to an intermediate 18 hour exposure of U-87MG and U-251MG to free cisplatin were first determined. Based on an MTS cell viability assay, U-251MG exhibited a higher sensitivity to cisplatin than U-87MG with IC<sub>50</sub> related cisplatin concentrations of  $5.13 \pm 1.28 \mu\text{M}$  and  $9.18 \pm 0.408 \mu\text{M}$ , respectively. A treatment at a sub-lethal cisplatin concentration of  $4.05 \mu\text{M}$  for both cell lines was therefore considered to be consistent with a two-day follow-up study.

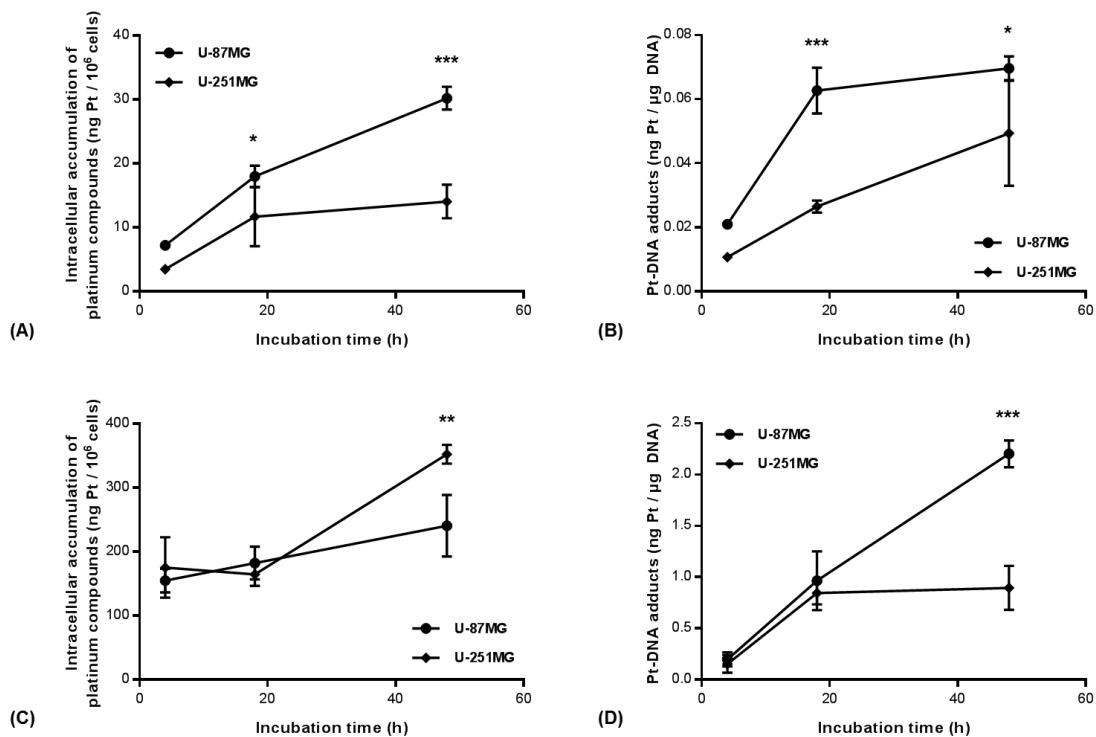
As reported in Figure 4.12-(A), U-251MG cells loaded significantly fewer platinum compounds than U-87MG from 18 hours of exposure to cisplatin. Indeed, uptake of free cisplatin increased in a time-dependent manner in the case of U-87MG with  $30.20 \pm 1.79 \text{ ng Pt per } 10^6 \text{ cells}$  after 48 hours of incubation while it reached a plateau from 18 hours of incubation with  $14.06 \pm 2.62 \text{ ng Pt per } 10^6 \text{ cells}$  for U-251MG. Decreased influx is assumed to occur from altered transporter-mediated uptake, functional or structural modifications in organelles or in membrane potential. Conversely, active efflux is mediated by an increased export of the drug out of the cell. The observed discrepancy between both cell lines in terms of intracellular platinum accumulation could be due to a differential expression of Copper Transporters 1 (CTR1) channels that widely mediate cisplatin cellular uptake

(Galluzzi et al. 2014). However, the expression of CTR1 proteins was assessed similar in both cell lines (Rocha et al. 2014). It is also worth noting that cisplatin itself is responsible for fast degradation of CTR1 resulting in a decreased influx in human cells (Dasari & Tchounwou 2014). Conversely, membrane ABC transporters, which consist of ATP-dependent drug efflux pumps, and among them the ATP-binding cassette transporter Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1), are commonly described in the literature as key agents of cell detoxification and chemoprotection in that they efflux various compounds, including anticancer drugs, thus modulating their pharmacokinetics (Shen et al. 2012). Whereas several studies suggested that MRP1 was not involved in the efflux of cisplatin, several others put forward the role of the Multidrug Resistance Protein 2 (MRP2) in mediating active efflux of cisplatin, especially through the discharge of inactive Pt-GSH complexes formed with the tripeptide glutathione (GSH) (Guminski et al. 2006; Yamasaki et al. 2011; Herraez et al. 2012; Shen et al. 2012). As a result, increased levels of MRP2 mRNA in human carcinoma cell lines were correlated with a decreased intracellular accumulation of cisplatin and a subsequent reduced formation of Pt-DNA adducts (Yamasaki et al. 2011). Ultimately, the broad repertoire of intracellular fixation sites of platinum compounds may differ from one cell line to the other, resulting in modifications in the drug trafficking and accumulation within cells.

Assuming that the amount of Pt-DNA adducts in the nucleus was correlated with cisplatin intracellular accumulation, the time course of Pt-DNA adduct formation was monitored after exposure of glioblastoma cell lines to free cisplatin. As shown in Figure 4.12-(B), the amount of Pt-DNA adducts quickly increased in U-87MG cells before stabilizing from 18 hours of incubation with a total amount of  $0.0697 \pm 0.0037$  ng Pt per  $\mu\text{g}$  DNA after 48 hours. Even though it steadily increased in U-251MG cells, the total Pt-DNA adduct amount remained significantly low with up to 2.4- and 1.4-fold lower adduct amounts after 18 and 48 hours, respectively, than in U-87MG cells. Surprisingly, not only the formation of Pt-DNA adducts differed between both cell lines, but also their relative proportion was not correlated at all with intracellular accumulation (Figure 4.12, panels (A) and (B)). This is obvious from a plateau in the formation of Pt-DNA adducts in U-87MG cells after 18 hours of incubation with free cisplatin while cellular uptake kept on steadily increasing over the 48 hours of the experiment. Conversely, the amount of Pt-DNA adducts linearly increased in U-251MG cells over time while cellular uptake reached a plateau from 18 hours of incubation with the free drug. As illustrated in Figure 4.6, activation of cisplatin requires the substitution of at least

one chloride group by water, an aquation process that automatically occurs once cisplatin enters a cell due to a lower chloride concentration compared to that in the extracellular space. Once in the cell, the activated forms of cisplatin display a high affinity to nucleophilic sites, especially N<sub>7</sub>-sites of purine DNA or RNA bases, mainly guanine and to a lesser extent adenine, but also various proteins (Hall et al. 2008). Pt-DNA adducts are mainly due to guanine intrastrand cross-linking with cisplatin monoaquated species that further impedes DNA replication and transcription (Siddik 2002; Kelland 2007). Damage induced by platinum derivatives was reported to be non-uniformly distributed within the DNA double helix. Indeed, linker DNA is described as a favored site for Pt-DNA adduct formation in comparison with nucleosomes, DNA segments wrapped around a histone octamer that account for roughly 83% of genomic DNA (Bubley et al. 1996). DNA cross-linking with platinum complexes also occurs within the nucleosome core, thus reducing DNA mobility by preventing strands from twisting and looping distortions (Wu & Davey 2008). Besides, although mainly composed of adenine and thymine, DNA anchored on the nuclear matrix (NM) revealed enhanced Pt-DNA adduct formation in human prostate, ovarian and lung cancer cell lines (Bubley et al. 1996). An open conformation of DNA in this region dedicated to transcription and replication could explain its higher accessibility to platinum derivatives. As such, chromatin conformation affects the formation of Pt-DNA adducts in non-random, specific genomic domains.

The fate of platinum compounds that effectively accumulate within cells is further ruled by intracellular trafficking. Since there is a widespread consensus that DNA constitutes the privileged target that mediates anticancer activity of cisplatin, the accumulation of platinum complexes within cells does not necessarily engender cytotoxicity as long as they have not reached the nucleus and cross-linked with DNA. However, the mechanism of drug uptake within the nucleus remains uncertain (Hall et al. 2008). The relative distribution of intracellular platinum to the nucleus is presented in Figure 4.13-(C). After 48 hours, the proportion of platinum compounds distributed to the nucleus of U-251MG cells was two times more than that of U-87MG cells. Interestingly, U-251MG exhibited a significantly lower total amount of Pt-DNA adducts than U-87MG from 18 hours of exposure to cisplatin, but the relative distribution of platinum compounds within the cell showed that they were significantly more efficiently conveyed to the nucleus of U-251MG cells in comparison with U-87MG cells after 48 hours of exposure. This observation correlates with a higher sensitivity of U-251MG cells to cisplatin than U-87MG cells.



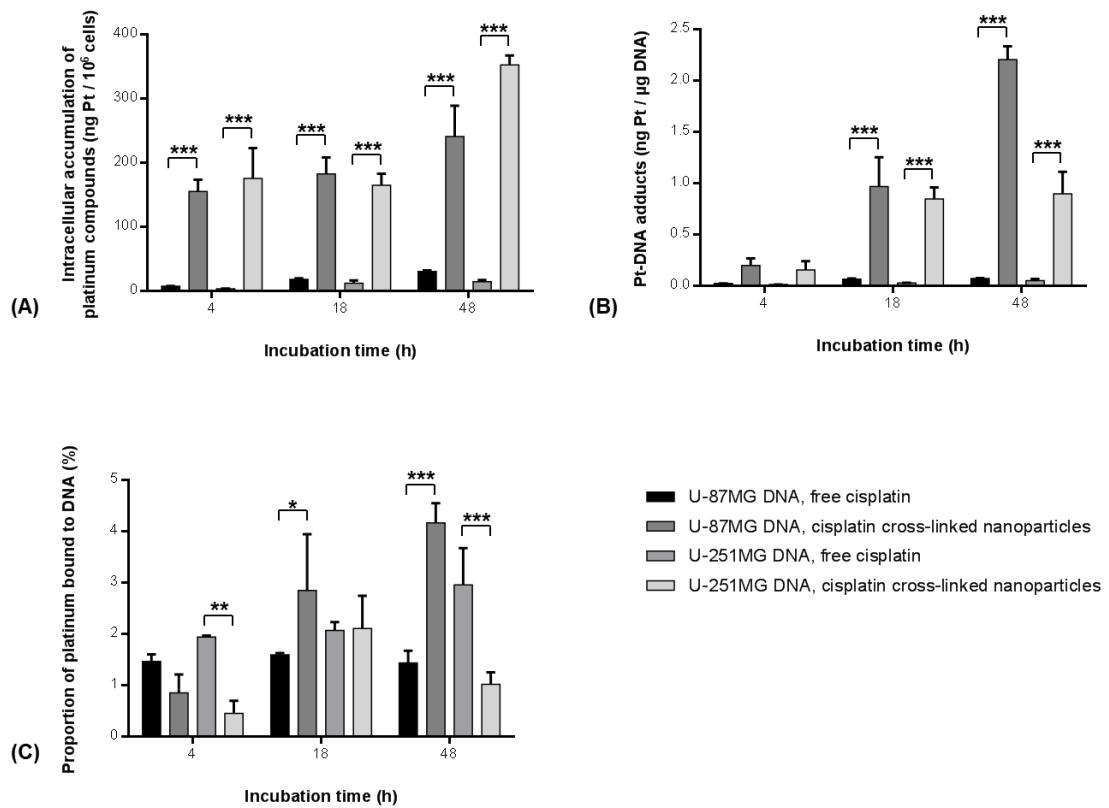
**Figure 4.12:** Time course of: (A) intracellular platinum accumulation from free cisplatin and (B) subsequent formation of Pt-DNA adducts, (C) intracellular platinum accumulation from  $8.51 \pm 0.4$  wt% cisplatin-loaded cross-linked polymeric nanoparticles and (D) subsequent formation of Pt-DNA adducts in human glioblastoma cell lines

As previously put forward, nanomedicines have been widely investigated as a means to maximize drug efficacy while limiting systemic toxicity and drug resistance. Therefore, the benefits of cisplatin vectorization through polymeric nanoparticles were assessed in terms of intracellular accumulation, efficient transport to the nucleus and subsequent Pt-DNA adduct formation. Obviously, cell exposure to cisplatin cross-linked nanoparticles resulted in a significantly (up to 50-fold) enhanced platinum accumulation in both the U-87MG and U-251MG cell lines compared to free cisplatin at the same platinum concentration, as reported in Figure 4.13-(A). The high intracellular accumulation of platinum compounds when conveyed by the formulated macromolecular prodrug can be explained by the endocytosis mechanism that conducts the drug, which is protected from deactivation by its nanovector, in close vicinity to the nucleus. With regard to the large number of Pt(II) complexes previously estimated within one nanoparticle (see Table 4.1), every single

nanoparticle that enters a cell may correspond to the uptake of more than 7 million cisplatin molecules. As such, nanoparticles can be viewed as a quantum that carries many molecules of the active substance, whereas free cisplatin either passively diffuses through the cell membrane or is transported one molecule by one molecule by proteins, and encounters various hurdles on the way to its target. Still, a difference between each glioblastoma cell line remains, but the trend in intracellular platinum accumulation is different compared to that observed in the case of treatment with free cisplatin. Indeed, as shown in Figure 4.13-(A), U-87MG cells showed a much faster linear accumulation of platinum compounds from cross-linked nanoparticles than from free cisplatin over time. Figure 4.12-(C) reports the time course of intracellular accumulation of platinum compounds from cisplatin cross-linked nanoparticles. Platinum accumulation in U-251MG could be modeled by a second-order polynomial function showing a high initial uptake after 4 hours of incubation, stagnation for 14 more hours before a quick increase for the next 30 hours. After 48 hours of incubation, cisplatin accumulation was significantly higher in U-251MG cells compared to U-87MG cells.

As for cellular uptake, the formation of Pt-DNA adducts was significantly improved – up to 32-fold – after incubation with cisplatin cross-linked nanoparticles compared to the free drug at the same platinum concentration (Figure 4.13-(B)). Since nanoparticle transport within the cell is assumed to be mediated by an endocytic mechanism, the drug payload is released in one go once the endosome merges with a lysosome to form an endolysosome, possibly in close vicinity to the nucleus, therefore preventing massive deactivation of cisplatin from nucleophile intracellular components such as GSH that are quickly saturated. Release of the drug from the endolysosome typically takes place between one half and several hours (Tippayamontri et al. 2011). Cisplatin uptake should therefore occur faster when conveyed by nanoparticles compared to the free drug. Contrary to cell exposure to free cisplatin, treatment with cisplatin cross-linked nanoparticles resulted in a linear increase in Pt-DNA adducts over time in U-87MG, while it reached a plateau after 18 hours of incubation in U-251MG, as is illustrated in Figure 4.12-(D), thus resulting in a significantly (2.4-fold) higher amount of Pt-DNA adducts in U-87MG cells after 48 hours of exposure to cisplatin cross-linked nanoparticles than in U-251MG. As previously highlighted, the transport modalities of the drug within the cancer cells and the resulting Pt-DNA adduct formation were shown to be dependent on the cell line. This suggests that every cell line mediates the subcellular

trafficking of drugs through a panel of different transporters but also that various intracellular molecular mechanisms occur to tackle DNA induced damage, leading or not to resistance (Galluzzi et al. 2012). Ultimately, the macromolecular prodrug highly improved the cellular and sub-cellular pathways of retention of cisplatin within the nucleus of glioblastoma cells forming Pt-DNA adducts compared to the free drug. These aspects are also reminiscent of observations arguing that DACHPt-loaded block copolymer micelles were able to overcome the intracellular defense and degradation mechanisms underwent by its free analog, oxaliplatin (Murakami et al. 2011).



**Figure 4.13:** Comparative time course of: (A) intracellular platinum accumulation, (B) subsequent formation of Pt-DNA adducts, and (C) relative intracellular platinum amount distributed to DNA in human glioblastoma cells depending on the drug form

*For the sake of clarity, and since inter-variability between both cell lines has already been discussed previously, statistically significant differences were only mentioned while comparing the impact of the form of the drug*

Again, the proportion of Pt-DNA adducts that arose after exposure of cells to cisplatin cross-linked nanoparticles was not correlated with the initial cell uptake as illustrated in Figure 4.12, panels (C) and (D). Treatment based on cisplatin cross-linked nanoparticles entailed a linear accumulation of platinum over time in U-87MG cells but the formation of Pt-DNA adducts occurred at a slower rate than in intracellular accumulation. In U-251MG cells, the amount of Pt-DNA adducts reached a plateau after 18 hours, while the intracellular platinum accumulation within cells was 2-fold increased between 18 and 48 hours of incubation. The kinetics of the relative distribution of platinum compounds to the nucleus is reported in Figure 4.13-(C). Up to 3% of the total platinum amount internalized by U-251MG cells was distributed to DNA after 48 hours of incubation with the free drug while this rate was reduced to 1% when incubated with cisplatin cross-linked nanoparticles. Conversely, conveying cisplatin by cross-linked polymeric nanoparticles enabled to significantly increase the relative accumulation of platinum compounds to the cell nucleus with a nucleus to cell ratio up to 4% at 48 hours in U87MG cells, while, with the free drug, this rate was 3-fold lower. Therefore, although the formulated nanoparticles demonstrated an initial burst release *in vitro* followed by a sustained and complete release of platinum within 24 hours, the amount of cisplatin released from the endolysosomes to the cytoplasm and further to the nucleus in glioblastoma cells was still significantly higher at 4 and 18 hours compared to the free drug. Furthermore, it is worth noting that between 0.22% and 1.1% of the initial amount of platinum compounds was taken up by cells when treated with free cisplatin with the highest rate in U-87MG cells. This amount was enhanced between 8.9% and 40% in the case of treatment with cisplatin cross-linked nanoparticles with a higher uptake in U-251MG cells that further argues for an improved efficiency in intracellular drug transport.

As a result, endocytic pathways enabled a significantly higher accumulation of platinum compounds within cells after 18 hours of incubation with the macromolecular prodrug. This increased uptake was also related to a significantly higher amount of Pt-DNA adducts. These results suggest that the formulated macromolecular prodrug is able to circumvent the uptake and efflux of transporters required to mediate cisplatin accumulation within cells, and could therefore increase its anticancer activity. Since higher drug payloads within the formulated nanoparticles can be achieved simply by extending the duration of the coordination reaction, intracellular accumulation of platinum compounds and subsequent DNA damage would be further amplified while using larger quanta. However, the relative distribution to DNA of the

amount of cisplatin within cells was not necessarily correlated with the formation of Pt-DNA adducts. Although a significant trend can be outlined by cisplatin vectorization, the relative distribution of platinum to DNA was not as dramatically improved as expected. Indeed, although the amount of Pt-DNA adducts in U-251MG cells was significantly higher after a 48-hour exposure to cisplatin cross-linked nanoparticles compared to the free drug, the relative subcellular distribution of platinum compounds to DNA was significantly lower in the case of the nanoparticle treatment. Conversely, the relative distribution of platinum bound to DNA in U-87MG was significantly higher after 18 hours of exposure to cisplatin cross-linked nanoparticles compared to the free drug. These observations suggest that cisplatin conveyed by polymeric nanoparticles must be released at a faster rate from the endolysosome in U-87MG cells whereas it may remain entrapped within the cytoplasm of U-251MG cells for a longer time. Nishiyama and Kataoka previously highlighted that nanocarriers themselves may interact with intracellular components and affect the subcellular localization of the drugs they convey as well as the time-dependent intracellular concentration of active agents induced by a sustained release. They also demonstrated that cisplatin-loaded polymeric micelles were able to regulate the expression of other genes than those implied in human non-small cell lung cancer cells in response to a treatment with free cisplatin (Nishiyama & Kataoka 2006). Therefore, delivery of cisplatin appeals to various pathways that depend on both the cell type and the drug form.

Besides, several studies have pointed out that an increased cellular uptake of the drug vectorized by nanoparticles does not necessarily lead to an enhanced cytotoxicity compared to the free drug. Indeed, since ligand substitution is required for cisplatin to exert its anticancer activity, the pharmacokinetics of the drug-loaded nanoparticles can slightly differ from the free drug. Therefore, higher concentrations of Lipoplatin™ and Lipoxal™, the liposomal formulations of cisplatin and oxaliplatin, respectively, were required to reduce HCT116 human colorectal carcinoma cell survival by 50% (IC50) compared to the respective free drugs (Tippayamontri et al. 2011). Interestingly, U-251MG cells exhibited higher sensitivity to cisplatin than U-87MG cells even though accumulation of platinum compounds and subsequent formation of Pt-DNA adducts in U-251MG cells were significantly reduced after 18 hours of incubation with free cisplatin. Differences in sensitivity to cisplatin among glioblastoma cells have been widely attributed to the p53 status, i.e. U-87MG (p53 wt) vs. U-251MG (p53 mt). However, Rocha and collaborators recently demonstrated that p53 status

was not sufficient to explain resistance pathways that prevent cells from apoptosis when exposed to cisplatin (Rocha et al. 2014). PKC $\iota$ , an atypical protein kinase C, was reported to protect U-87MG cells from cisplatin-induced apoptosis by down-regulating the gene that expresses the p38 mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) (Baldwin et al. 2006). Conversely, the cell death mechanism triggered by exposure of U-251MG cells to cisplatin mainly relies on necrosis, which could explain their enhanced sensitivity to cisplatin compared to U-87MG cells (Matsumoto et al. 1997). Since every cell line demonstrated a proper subcellular trafficking of drugs, various molecular mechanisms must be triggered that tackle DNA damage and further prevent cell death. Besides, polymer-drug conjugates evaluated in human ovarian carcinoma cell lines and in a solid tumor model of ovarian carcinoma were hypothesized to trigger other molecular signaling pathways of cell death than the free drug (Minko et al. 1999; Minko et al. 2000). These observations raise the question whether other intracellular components may constitute alternative targets to cisplatin cytotoxicity, maybe more critical than DNA, at least in the course of several days considered here.

The nanoplatform developed throughout this work was demonstrated to be well suited for further exploration at the preclinical level in locoregional approaches combining MRI contrast agent properties with DNA adduct production. Although tested on glioblastoma cells for further evaluation after CED infusion directly within the damaged brain parenchyma, such a drug delivery system would also be consistent, thanks to its stealth PEO corona, with a systemic injection in the management of other solid tumors, including ovarian or lung cancer that often develop resistance to the platinum-based standard-of-care, keeping in mind that the accumulation of nanodevices at the tumor site due to an enhanced permeability and retention (EPR) effect is strongly challenged (Nakamura et al. 2016).

## Conclusion

The present work investigated the time course of platinum accumulation and DNA adduct formation after exposure of U-87MG and U-251MG glioblastoma cell lines to cisplatin cross-linked nanoparticles in comparison with free cisplatin. Cisplatin accumulation within cancer cells was significantly higher when conveyed by the macromolecular prodrug compared to free cisplatin. Although not necessarily correlated with the cisplatin cellular uptake time

course, formation of DNA adducts was also substantially increased when cells were treated with cisplatin cross-linked nanoparticles compared to the free drug. This increased accumulation within cells could be of paramount interest to overcome common resistance to platinum-based therapy. So far, the designed nanoplatform has shown promising applications as a multifunctional copolymer drug delivery system for disease therapy and MR imaging. The demonstration of the proof-of-concept of non-invasively monitoring the biodistribution of the infused nanoparticles by MRI further supports the potential of such nanodevices for various applications thanks to the simple functionalization of the synthesized triblock copolymer. In the context of nuclear medicine, assessment of the distribution volume of radiopharmaceutics within the damaged area would be mandatory to adjust the dose and therefore improve the therapeutic index while reducing side effects to healthy tissues. The presence of heavy platinum and gadolinium atoms could also enhance the dose deposit of ionizing radiations to reach a synergistic effect with the chemotherapy. As such, the treatment schedule has to be optimized in order to achieve the best therapeutic outcome in terms of progression-free and overall survival with the view of a possible future translation to the clinic as an innovative locoregional alternative for second-line treatment in recurrent or temozolamide-resistant glioblastoma or other solid tumors that developed resistance to conventional platinum compounds.

## Conflicts of interest

There are no conflicts of interest to declare.

## Acknowledgements

This work was supported by the “Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale” (INSERM), by the University of Angers (Angers, France) and by the University of Liège (Liege, Belgium). H.L. was a Ph.D. student from the European Community in the framework of the Erasmus Mundus Joint Doctorate Program NanoFar and received a fellowship from “La Région Pays-de-la-Loire”. P.L. is Research Associate of the FRS-FNRS. F.H., C.T. and E.G. are members of the LabEx IRON “Innovative Radiopharmaceuticals in Oncology and Neurology” funded by the ANR (French National Research Agency) as part of the French government “Investissements d’Avenir” program. The presented work is also related to the

PL-BIO 2014-2020 INCA (Institut National du Cancer) project MARENKO – “MicroRNA agonist and antagonist Nanomedicines for GliOblastoma treatment: from molecular programmation to preclinical validation” and to the “Réseau Vectorisation and Radiothérapies” and “Réseau Gliome (ReGGO)” of the “Cancéropôle Grand-Ouest”. We would like to acknowledge the Federative Structure of Health Research (SFR 4208 ICAT, Angers, France), as well as Jean Haler, a Ph.D. student from the Mass Spectrometry Laboratory (University of Liege), Romain Mallet from the “Service Commun d’Imagerie et d’Analyses Microscopiques” (SCIAM, Angers), Jérôme Cayon from the “Plateforme d’Analyses Cellulaires et Moléculaires” (PACeM, Angers), Jérôme Roux and Pierre Legras from the “Service Commun d’Animalerie Hospitalo-Universitaire” (SCAHU, Angers), Natacha Galopin from the “Plateforme de Radiobiologie et d’Imageries Expérimentales” (PRIMEX, Angers) and Florence Franconi from the “Plateforme de Recherche en Imagerie et Spectroscopie Multi-modales” (PRISM, Rennes-Angers) for their technical support. We are also grateful to Elise Lepeltier from the UMR INSERM 1066, CNRS6021, Bretagne Loire University, for access to the Nanosight apparatus and further use.





---

Chapitre 5 :

L'exploration de cibles marginalisées  
du cisplatine peut-elle apporter un  
bénéfice thérapeutique ?

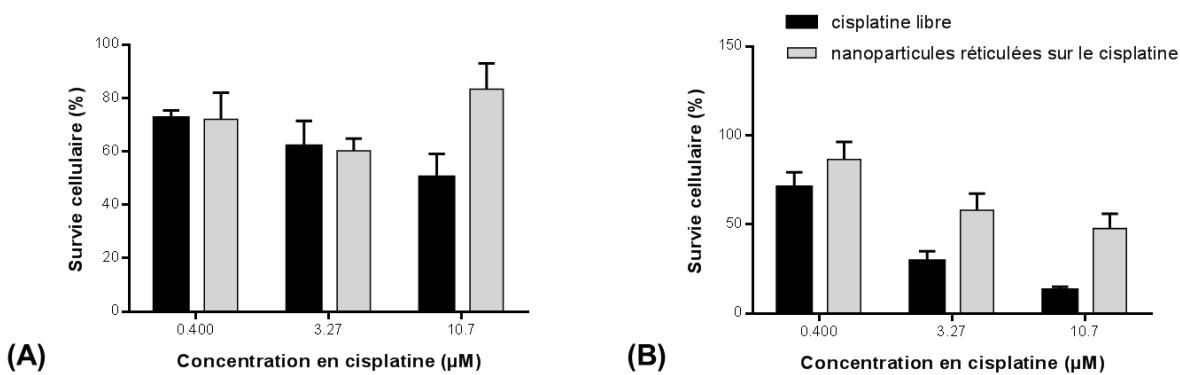
---



Ce chapitre envisage, sur la base de résultats complémentaires, le rôle clé d'autres cibles pivots de l'activité anticancéreuse du cisplatine, pourtant marginalisées dans la pratique clinique, et propose ainsi des pistes de réflexion quant à l'avenir du cisplatine en oncologie dont le pouvoir anticancéreux pourrait être revisité et optimisé.

La cible privilégiée de l'activité cytotoxique du cisplatine est largement décrite dans la littérature comme étant l'ADN, avec les bases puriques duquel il forme majoritairement des liaisons intrabrin ( $> 95\%$ ) et dans une moindre mesure des liaisons interbrin (Wang & Lippard 2005; Todd & Lippard 2010; Pourquier 2011; Johnstone et al. 2015; Johnstone et al. 2016). Les adduits générés interrompent le cycle cellulaire, et donc les processus de transcription et de réPLICATION de l'ADN nécessaires au développement de la cellule. Le système de réparation de la cellule intervient alors pour prendre en charge les dommages causés à l'ADN, s'il en est capable. Dans le cas contraire, des signaux moléculaires activent la mort par apoptose de la cellule (Mandic et al. 2003; Todd & Lippard 2010; Dasari & Tchounwou 2014; Rocha et al. 2014). Des expériences ont démontré une hypersensibilité au cisplatine de cellules procarcyote et eucaryotes dont le système de réparation de l'ADN est défectueux (Dasari & Tchounwou 2014). L'efficacité notable du cisplatine dans le traitement du cancer des testicules est justement expliquée par une faible capacité de réparation de l'ADN *via* la voie de signalisation NER des cellules cancéreuses entraînant une mort importante par apoptose (Kelland 2007). Toutefois, dans le cadre de ce travail, il a été observé que la cytotoxicité induite par le cisplatine sur deux lignées humaines de glioblastome n'était pas directement corrélée à la quantité d'adduits à l'ADN générés, et ce quel que soit le mode de vectorisation de la drogue. La Figure 5.1 présente en effet la viabilité des cellules U-87MG et U-251MG évaluée par un test au MTS après un traitement de 18 heures avec des solutions de cisplatine à différentes concentrations. Les conditions de mise en place du test au MTS sont explicitées dans le chapitre précédent pour le cisplatine libre (cf Chapitre 4, paragraphe 8 de la section Expérimentale) et sont applicables à un traitement à partir d'une suspension de nanoparticules réticulées sur le cisplatine après dialyse pendant deux heures contre une solution aqueuse de glucose à 5 % et ajustement aux concentrations de travail. L'effet de la vectorisation du cisplatine sur la survie cellulaire est mis en regard avec celui du cisplatine libre. Au cours du chapitre précédent, il a ainsi été démontré que la vectorisation du cisplatine par le biais de nanoparticules polymère réticulées permettait d'augmenter significativement l'accumulation intracellulaire de composés platinés ainsi que la quantité d'adduits à l'ADN (cf Chapitre 4, paragraphe 5 de la section Résultats et Discussion,

pour une concentration fixe de copolymère en solution de  $0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). Or, la figure 5.1 démontre qu'à concentration égale en cisplatine, les nanoparticules réticulées n'apportent aucun bénéfice cytotoxique par rapport à la drogue libre. L'IC<sub>50</sub> est en effet plus faible dans le cas d'un traitement au cisplatine libre qu'aux nanoparticules réticulées, et ce pour les deux lignées. Ces résultats rejoignent les conclusions de plusieurs études arguant que la formation d'adduits à l'ADN n'est pas nécessairement corrélée à la cytotoxicité, sous-tendant l'existence de mécanismes sous-jacents plus complexes (Garrido et al. 2008; Corte-Rodríguez et al. 2015; Mezencev 2015). Dans ce cadre, Mandic et collaborateurs ont montré que le cisplatine est capable d'induire la mort par apoptose de cellules pourtant énucléées (cytoplastes) (Mandic et al. 2003). Le cisplatine exerce donc une activité cytotoxique indépendamment des dommages causés à l'ADN nucléaire.



**Figure 5.1 :** Viabilité (A) des cellules U-87MG et (B) des cellules U-251MG en fonction de la concentration en cisplatine et de son mode de vectorisation

*A noter que cette analyse correspond à une seule procédure de traitement *in vitro* et non à un traitement chronique comme c'est le cas dans la pratique clinique.*

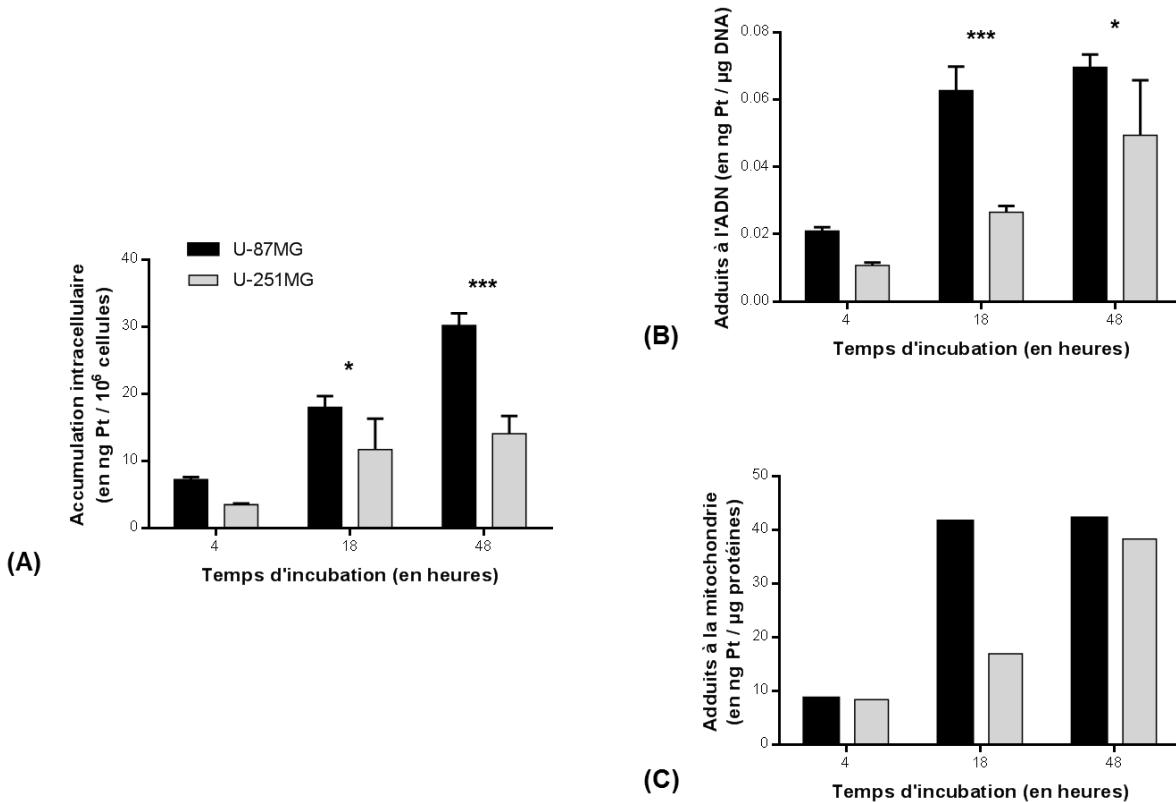
De façon intéressante, la quantité d'adduits à l'ADN associée à une cytotoxicité donnée passe par la formation de davantage d'adduits à l'ADN dans le cas du cisplatine que dans celui de l'oxaliplatine, ce qui, outre un profil pharmacocinétique différent, peut aussi laisser envisager l'existence de cibles alternatives à l'activité anticancéreuse de ces dérivés du platine (Pourquier 2011). En effet, de par ses propriétés électrophiles, le cisplatine est capable

d'interagir avec tout site nucléophile présent dans la cellule, qu'il s'agisse des nucléotides/nucléosides, de protéines ou encore de peptides. Il se lie également à de multiples ARN au sein de la cellule, bloquant ainsi la synthèse de protéines nécessaires au fonctionnement cellulaire et l'épissage alternatif de l'ARN (Mezencev 2015). Tandis que l'aquation préalable du cisplatine conduisant à la formation de complexes de Pt(II) activés est nécessaire à ses interactions avec les acides nucléiques, les composants intracellulaires portant des groupements thiol (glutathion, cystéines des métallothionéines) et thioéther (métallothionéines) hautement réactifs sont capables de se substituer aux ligands chlore sans passer par un intermédiaire activé (Mezencev 2015). Sur la base de facteurs pharmacocinétiques, ces éléments constituent donc des cibles privilégiées du cisplatine. En outre, leur forte abondance en milieu intracellulaire favorise la formation majoritaire d'adduits covalents par rapport aux acides nucléiques de l'ADN (Mezencev 2015). Une explication a été avancée pour tenter de justifier le fait que le cisplatine ne soit pas complètement inactivé par ses interactions avec ces espèces thiol, qui attribue aux intermédiaires formés la capacité de transférer un complexe actif de Pt(II) à l'ADN. De manière analogue, il a été démontré que des bases puriques libres contenues dans le cytosol de la cellule peuvent s'insérer, après avoir formé des adduits avec des complexes de Pt(II), à l'ADN en cours de synthèse (Benedetti et al. 2008; Benedetti et al. 2009). A noter que les interactions avec le cisplatine sont favorisées du fait de la faible répulsion stérique des bases puriques libres par rapport aux acides aminés déjà constitués. Les composants intracellulaires nucléophiles jouent donc certainement un rôle dans les mécanismes moléculaires à l'origine de l'activité anticancéreuse du cisplatine, mais également de sa toxicité systémique et des phénomènes de résistance innée ou acquise mis en place par la cellule.

Depuis une vingtaine d'années, une partie de la communauté scientifique suggère l'existence de cibles alternatives aux agents antinéoplasiques, et pointe notamment du doigt un organite qui, de par ses fonctions essentielles dans le maintien du métabolisme cellulaire, semble largement contribuer à la tumorigénèse (Liang & Ulyatt 1998; Lu et al. 2009; Hung et al. 2010; Van Gisbergen et al. 2015). Des travaux rapportent ainsi l'implication de la mitochondrie dans la résistance des cellules à la chimiothérapie, notamment du fait d'une tolérance accrue de la cellule aux dommages à l'ADN qui lui permet d'échapper à une mort programmée par apoptose (Garrido et al. 2008; Mizutani et al. 2009; Van Gisbergen et al. 2015). La mitochondrie joue en effet un rôle clé dans l'induction de la mort cellulaire par apoptose après libération du cytochrome c dans le cytosol et activation ultérieure des caspases 8 et 9.

Ainsi, par son rôle crucial dans la survie cellulaire, la mitochondrie constitue une cible de choix pour les toxines et les agents anticancéreux. Paradoxalement, il a été observé que des mutations à l'ADN mitochondrial sont également susceptibles de contrer l'activation des voies de signalisation cellulaire initiant l'apoptose (Lu et al. 2009; Mizutani et al. 2009). Des études *in vitro* ont rapporté la capacité du cisplatine à directement interagir avec la mitochondrie au sein de la cellule (Yang et al. 2006; Cullen et al. 2007; Kelland 2007; Shen et al. 2012; Galluzzi et al. 2014). L'affinité du cisplatine électrophile pour la mitochondrie peut s'expliquer par la charge globalement négative de celle-ci induite par un gradient électrochimique traversant sa membrane interne (Garrido et al. 2008). Une accumulation marquée de lésions à l'ADN mitochondrial a été observée après exposition des cellules au cisplatine, pouvant dépasser jusqu'à 500 fois le niveau de dommages à l'ADN nucléaire dans le cas de cellules de tumeurs cervico-faciales (Stewart 2007; Mezencev 2015; Van Gisbergen et al. 2015). Tandis que l'ADN mitochondrial est la cible d'une quantité d'adduits supérieure par rapport à l'ADN nucléaire, leur réparation est bien moindre (Stewart 2007; Marrache et al. 2014). Pour autant, la participation de ces altérations du génome mitochondrial à la cytotoxicité du cisplatine demeure incertaine. Outre leur contribution présumée substantielle à l'activité anticancéreuse du cisplatine, les dommages à la mitochondrie seraient également associés aux effets secondaires indésirables de la chimiothérapie (Cullen et al. 2007; Garrido et al. 2008). Sur la base de ces observations et hypothèses, la question se pose de savoir si la mitochondrie constitue une cible directe *per se* de l'activité anticancéreuse du cisplatine, et donc si la proportion relative de cisplatine à la mitochondrie traduit son pouvoir cytotoxique, ou si elle s'apparente davantage à une cible secondaire dont le métabolisme est perturbé par des altérations amont. La formation d'adduits à la mitochondrie a été analysée dans les cellules de la lignée U-87MG, *a priori* plus résistante au cisplatine que la lignée U-251MG, dans le cadre d'une expérience pilote. Les mitochondries des cellules U-87MG ont été enrichies par la méthode de centrifugation différentielle détaillée en Annexe 1 de ce chapitre, suite à un traitement réalisé dans des conditions identiques à l'étude de la cinétique d'accumulation intracellulaire de composés platinés et de la formation d'adduits à l'ADN (cf Chapitre 4, paragraphes 9 et 10 de la section Expérimentale), i.e. à une concentration à 4,05 µM en cisplatine durant 4 heures, 18 heures et 48 heures. La quantité de platine dans les différents échantillons a été dosée par ICP-MS suivant le même protocole que celui décrit dans le chapitre précédent (cf Chapitre 4, paragraphe 2 de la section Expérimentale) et normalisée par la concentration en protéines mesurée par la méthode BCA dont le protocole est détaillé en Annexe 2. Les résultats de la cinétique

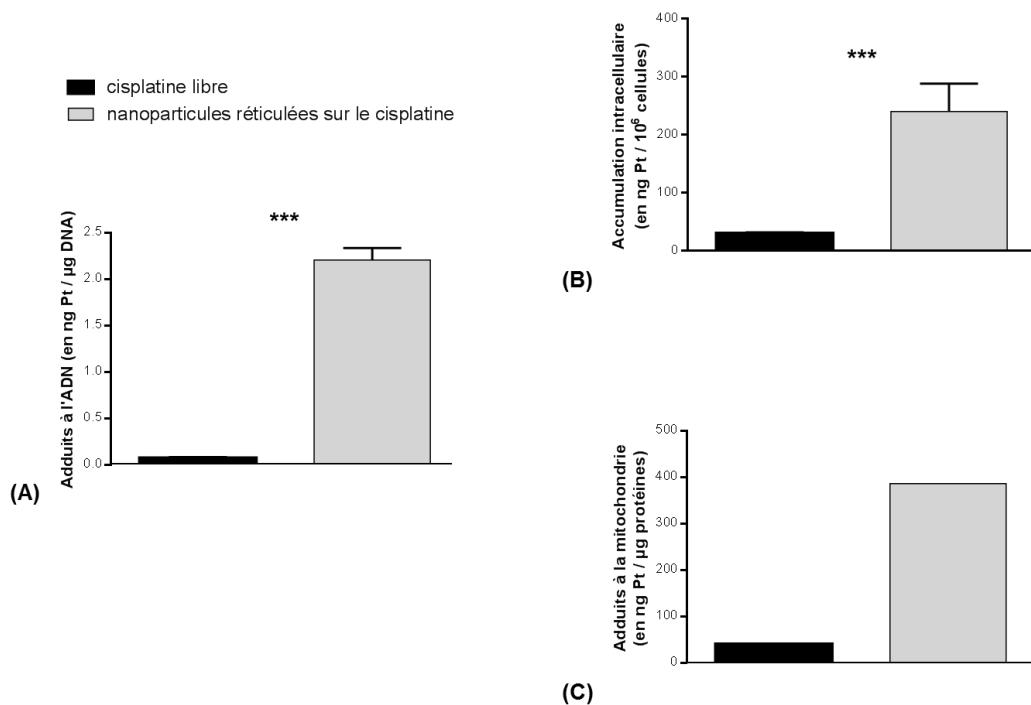
d'incorporation de platine aux protéines issues des enrichissements en mitochondries sont présentés sur la Figure 5.2 en regard avec ceux de l'accumulation intracellulaire de platine et de formation d'adduits à l'ADN. Rappelons que l'accumulation de cisplatine dans les cellules U-251MG atteint rapidement un plateau à partir de 18 heures de traitement tandis que des adduits aux composants intracellulaires continuent de se former au cours des 48 heures de l'expérience. A l'inverse, l'accumulation de cisplatine dans les U-87MG augmente de façon linéaire avec le temps alors que les sites de fixation à l'ADN semblent saturés dès 18 heures de traitement. Ainsi, tandis qu'accumulation intracellulaire de platine et formation d'adduits à l'ADN ne sont pas corrélées dans le temps, l'incorporation de platine à la mitochondrie et à l'ADN suivent une tendance similaire. Les quantités d'adduits à l'ADN comme à la mitochondrie sont en effet multipliées par 4,6 entre 4 heures et 48 heures de traitement pour les cellules U-251MG. Dans le cas des cellules U-87MG, l'incorporation de platine à la mitochondrie à la suite de 4 heures ou 48 heures de traitement est plus rapide qu'à l'ADN, avec des rapports de 4,9 et 3,33 respectivement. Deux hypothèses pourraient expliquer ce phénomène de retardement de la formation d'adduits, tant à l'ADN qu'à la mitochondrie : soit la formation d'adduits est limitée par le profil pharmacocinétique de la drogue, notamment du fait de la nécessité pour le cisplatine d'être activé préalablement à toute interaction avec les acides nucléiques, soit la biodisponibilité des complexes de Pt(II) est restreinte par des processus de détoxification des drogues dans la cellule et de séquestration, notamment *via* le glutathion ou les bases puriques libres dans le cytosol. Bien que les complexes formés par le glutathion et le cisplatine soient éliminés par des pompes d'efflux, les interactions entre espèces activées du cisplatine et bases puriques libres permettraient de contourner les processus de détoxification mis en place par la cellule pour finalement incorporer le platine à l'ADN durant sa synthèse (Benedetti et al. 2008; Garrido et al. 2008; Benedetti et al. 2009; Fonseca et al. 2011; Galluzzi et al. 2014). Rappelons par ailleurs que les résultats obtenus à travers cette étude rendent compte d'une distribution relative du cisplatine à l'ADN et à la mitochondrie limitée, avec moins de 3 % et 8 % de la quantité totale accumulée dans la cellule respectivement.



**Figure 5.2 :** Cinétique (A) de l'accumulation intracellulaire de composés platinés, de la formation (B) d'adduits à l'ADN et (C) d'adduits à la mitochondrie après traitement des cellules U-87MG et U-251MG avec une solution clinique de cisplatine

Du fait de l'impact considérable de la vectorisation du cisplatine *via* des nanoparticules polymère sur son accumulation intracellulaire et la formation d'adduits à l'ADN, les mitochondries ont été isolées de culots contenant  $10^7$  cellules U-87MG après un traitement d'une durée de 48 heures à une concentration de  $4,05 \mu\text{M}$  de cisplatine, sous sa forme clinique libre ou vectorisé par des nanoparticules polymère réticulées, à l'aide d'un aimant QuadroMACS (Miltenyi Biotec) suivant les indications fournies par le fabricant et reportées en Annexe 3. Les données recueillies sont présentées sous la forme d'histogrammes sur la Figure 5.3 de façon à comparer l'accumulation intracellulaire du platine, la formation d'adduits à l'ADN et à la mitochondrie en fonction du mode de vectorisation du cisplatine. A nouveau, les observations effectuées à partir de cette expérience préliminaire sont indicatives. Qualitativement, et comme l'illustre la Figure 5.4, la vectorisation du cisplatine permet de multiplier par 8 l'accumulation de composés platinés dans les cellules U-87MG, qui

s'accompagne d'une augmentation substantielle d'adduits à l'ADN ( $\times 32$ ) et d'une augmentation marquée mais moindre d'adduits à la mitochondrie ( $\times 10$ ). Par conséquent, la vectorisation du cisplatine *via* des nanoparticules polymère réticulées ne semble pas favoriser sa fixation préférentielle à la mitochondrie par rapport à l'ADN. La distribution relative à l'ADN et à la mitochondrie du cisplatine vectorisé par des nanoparticules polymère représente 4,16 % et 9,08 % de la quantité totale accumulée dans la cellule après 48 heures de traitement respectivement.



**Figure 5.3 :** Comparaison, suivant le mode de vectorisation du cisplatine, et après 48 heures de traitement, **(A)** de l'accumulation intracellulaire de composés platinés, de la formation **(B)** d'adduits à l'ADN et **(C)** d'adduits à la mitochondrie

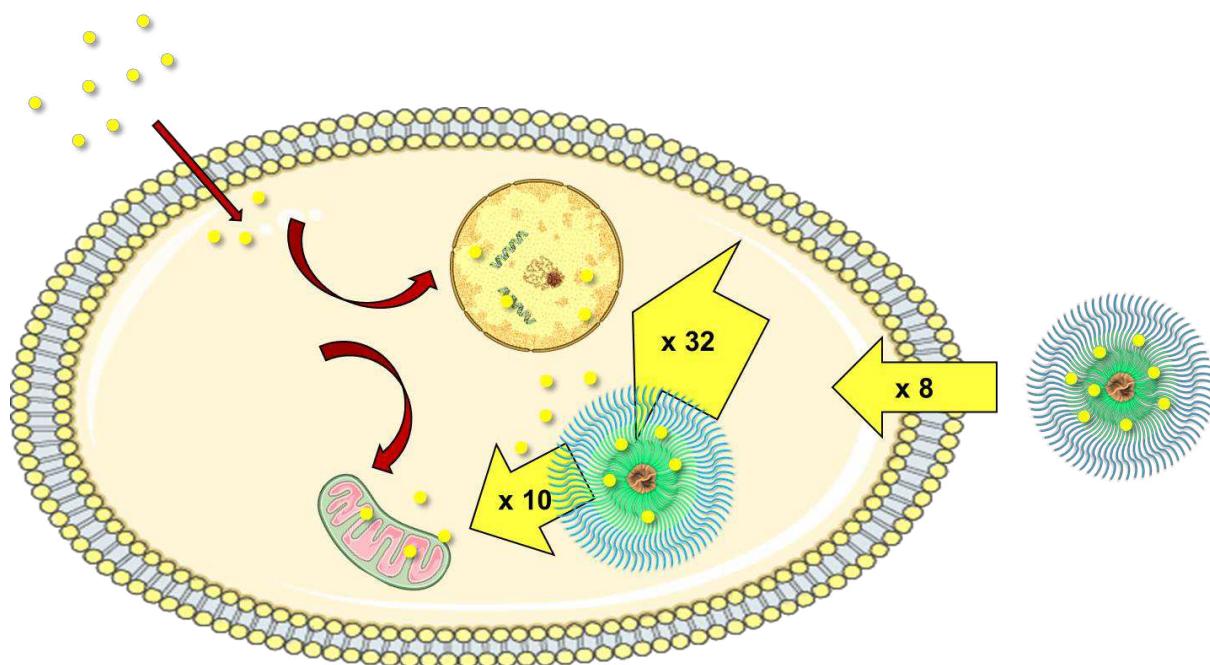


Figure 5.4 : Impact de la vectorisation du cisplatine sur sa distribution au sein de la cellule

Dans ce contexte, les nanomédecines offrent la possibilité de cibler spécifiquement la mitochondrie *via* leur fonctionnalisation par des ligands adaptés. Un exemple de routage du chlorambucil, un agent alkykant, au sein de la cellule vers la mitochondrie, a ainsi conduit à une maximisation de son effet cytotoxique, notamment par induction de l'apoptose dans des cellules de diverses lignées cancéreuses (leucémie, cancer des ovaires et du col de l'utérus), y compris chimiorésistantes, ainsi que dans des échantillons de patients (Fonseca et al. 2011). La synthèse de nanoparticules polymère de PLGA-*b*-PEG encapsulant une prodrogue de cisplatine et ciblant la mitochondrie a conduit à une augmentation significative du potentiel anticancéreux du cisplatine libre, et ce notamment sur des cellules de neuroblastome et des cellules résistantes de cancer des ovaires, déjouant ainsi les multiples mécanismes de résistance mis en œuvre par la cellule cancéreuse qui restreignent le bénéfice thérapeutique des dérivés du platine (Marrache et al. 2014). La synthèse d'une prodrogue par conjugaison du cisplatine à un peptide pénétrant ciblant la mitochondrie a démontré que l'altération du génome mitochondrial pouvait considérablement sensibiliser des lignées humaines de cellules cancéreuses ovariennes au cisplatine (Wisnovsky et al. 2013). Dans ce cas précis, le pouvoir cytotoxique du cisplatine semble résider essentiellement dans sa capacité à engendrer des anomalies de l'ADN mitochondrial, sans que des dommages complémentaires à l'ADN nucléaire ni une interruption

du cycle cellulaire soient observés. Ces résultats corroborent l'idée selon laquelle la mitochondrie serait une cible directe des agents antinéoplasiques du fait de lésions toxiques éprouvant l'intégrité de son génome. Notons que des mutations à l'ADN mitochondrial peuvent engendrer une augmentation de la production d'espèces oxygénées au sein de la cellule. Or, le cisplatine est déjà reconnu comme à l'origine d'un stress du réticulum endoplasmique et oxydatif (Galluzzi et al. 2014). Le cumul de ces agressions pourrait ainsi provoquer un épuisement de la cellule qui perd sa capacité à réguler son propre environnement et finit par déclencher des signaux d'activation de sa propre mort par apoptose (Choi et al. 2015; Van Gisbergen et al. 2015). Notons d'ailleurs que ce stress du réticulum endoplasmique a été mis en évidence aussi bien dans des cellules énucléées qu'intactes, et est proposé comme participant à la cytotoxicité du cisplatine (Mandic et al. 2003). Une autre étude a montré que la déplétion de l'ADN mitochondrial de cellules de lymphome conduisait à une sensibilité accrue des cellules tumorales au cisplatine (Liang & Ulliyatt 1998). Pourtant, ni le niveau d'ATP ni l'expression d'ARN messagers de gènes décrits comme impliqués dans la résistance au cisplatine tels que le gène de réparation de l'ADN ERCC1 ou le gène ABCC2 encodant la protéine d'efflux MRP2, ne sont altérés alors que le cisplatine continue d'induire la mort cellulaire par apoptose. Les auteurs en concluent que les voies de signalisation cellulaire modulées par l'activité mitochondriale jouent très certainement un rôle dans la sensibilité de la cellule au cisplatine sans pour autant être à l'origine de l'activation de la mort cellulaire par apoptose (Liang & Ulliyatt 1998). Par conséquent, les dommages à l'ADN, qu'il soit nucléaire ou mitochondrial, ne semblent ni nécessaires ni suffisants à l'activité anticancéreuse du cisplatine (Mezencev 2015). L'activation de plusieurs cascades de signalisation cellulaire, avec comme but ultime la mort cellulaire, expliquerait le large spectre d'activité du cisplatine, utilisé en routine clinique dans le traitement de multiples tumeurs solides (Tsimberidou et al. 2009).

Ces données, paraissant parfois contradictoires, traduisent la complexité d'action du cisplatine, qui reste intrinsèquement liée au contexte clinique. En guise d'exemple, le glutathion, largement décrit comme impliqué dans les processus de détoxification mis en place par la cellule, est également suspecté réguler le stress oxydatif induit par les thérapies à base de platine et inhiber l'activité de protéines pro-apoptotiques telles que p53, prenant ainsi une part active à la résistance multifactorielle au cisplatine (Mezencev 2015). A l'inverse pourtant, la concentration intracellulaire en glutathion est directement corrélée à l'expression des transporteurs du cuivre CTR1 qui régulent la capture cellulaire du cisplatine. Paradoxalement,

une étude préclinique a montré qu'un traitement au cisplatine entraînait une augmentation du niveau de glutathion dans le cytosol, et notamment au sein de la mitochondrie, associée à une protection de l'ADN mitochondrial (Garrido et al. 2008). Enfin, il est important de mentionner que l'altération du génome mitochondrial, pour être favorable à un véritable effet cytotoxique du cisplatine, ne doit pas impacter sur la capacité de la mitochondrie à initier le processus de mort cellulaire par apoptose. En effet, une destruction totale des mitochondries risquerait de favoriser le basculement de la cellule vers un métabolisme glycolytique, générant des clones résistants capables de s'adapter à la pression engendrée par la thérapie. Des lésions contrôlées à la mitochondrie préalablement à un traitement anticancéreux pourraient s'avérer être une alternative intéressante au recouvrement de la sensibilité des cellules au cisplatine (Liang & Ulliyatt 1998). Rappelons également que la quantité d'adduits à l'ADN génomique est directement corrélée à la capacité de prolifération des cellules (Stewart 2007). L'impact d'un traitement au cisplatine sur les cellules quiescentes, pourtant à l'origine de la récidive, est donc restreint. D'autres données préliminaires générées au cours de ces travaux de doctorat (transcriptomique, observation des mitochondries de cellules après traitement au cisplatine et irradiations, analyse du cycle cellulaire, synergie avec la radiothérapie externe), non présentées dans le cadre de ce manuscrit, suggèrent que des investigations complémentaires permettraient non pas d'améliorer le vecteur développé mais d'optimiser son utilisation. Une étude génomique en cours, initiée dans le cadre d'une collaboration avec l'institut MitoVasc et le CHU d'Angers, vise notamment à étudier les mutations majoritaires engendrées à l'ADN mitochondrial par le cisplatine. Les premiers résultats issus d'une population de cellules U-87MG traitées au cisplatine pendant 4 heures ou 24 heures puis réensemencées pour 48 heures avant analyse ne révèlent aucune mutation notoire du génome mitochondrial. Des conditions supplémentaires devront être implémentées, notamment le recours à des traitements chroniques, afin de permettre aux cellules cancéreuses d'amplifier les mutations induites par le traitement au génome mitochondrial, mais également de se rapprocher des cycles de chimiothérapie mis en œuvre dans la pratique clinique. Tandis que la mitochondrie est désormais reconnue jouer un rôle majeur dans la tumorigénèse, l'identification de mutations du génome mitochondrial impliquées dans la résistance aux drogues, notamment au cisplatine, pourrait servir de biomarqueur prédictif de la réponse à la chimiothérapie, de façon à adapter au mieux le traitement au profil du patient (Mizutani et al. 2009).





---

## Chapitre 6 :

# Conclusion Générale & Perspectives

---



Bien que de multiples travaux de recherche tendent à en améliorer la prise en charge, le cancer demeure un enjeu de santé publique majeur. Dans la perspective d'une compréhension plus globale et intégrée de cette pathologie, l'identification des mécanismes moléculaires et cellulaires inhérents à la tumorigénèse favorise le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. La réflexion relative à diverses pistes d'amélioration du pronostic du cancer, de son dépistage préventif à son traitement à un stade avancé ou après récurrence, doit tenir compte des modalités de translation vers la clinique. En effet, l'essor des nanomédecines offre des fonctionnalités multiples mais parfois peu pertinentes face à la réalité clinique. Ainsi, les systèmes théranostiques basés sur un suivi quotidien par IRM de la biodistribution du principe actif ne sont que difficilement transposables à une application clinique du fait de la disponibilité limitée des infrastructures d'imagerie dans le paysage hospitalier. En outre, notre connaissance et notre compréhension des risques pour la santé inhérents à ces systèmes de taille nanométrique, notamment du fait de leur surface de contact intrinsèquement très élevée susceptible de fondamentalement modifier les interactions avec les tissus biologiques, restent limitées. Leur taille pourrait par exemple permettre le franchissement de muqueuses ou de barrières naturelles destinées à protéger notre organisme des toxines (Montes-Burgos et al. 2010; Bencsik 2014; Bencsik & Lestaevel 2015). A ce jour, la législation sur les nanomédecines reste globalement floue, même si la FDA reconnaît la nécessité de soumettre ces développements à des directives strictes et claires (Cheng et al. 2014). Les nanomédecines ont longtemps été supposées profiter de l'effet EPR ("Enhanced Permeation and Retention effect"). Contrairement aux molécules thérapeutiques de faible masse molaire, les macromolécules sont capables de s'évader de la circulation générale pour s'accumuler préférentiellement dans le tissu tumoral de par la perméabilité accrue du réseau vasculaire à son voisinage. Leur rétention au sein de la tumeur est la conséquence d'un drainage lymphatique défectueux. Efficace dans des modèles précliniques, l'effet EPR n'a néanmoins pas montré d'impact majeur chez l'homme et sa transposition en clinique s'en trouve largement controversée (Shen et al. 2015; Nakamura et al. 2016). Malgré ces inconnues, le développement de systèmes de libération prolongée de drogues de taille nanométrique est en plein essor. Ces nanoplateformes de plus en plus intelligentes et sophistiquées, à l'interface entre chimie de synthèse, formulation galénique, voire électronique dans le cas de micropuces capables de libérer sur demande différents principes actifs, doivent toutefois conserver une certaine simplicité d'application de façon à obtenir l'approbation des autorités sanitaires pour une translation vers la clinique (Moses et al. 2003; Peer et al. 2007; Bourzac 2012). Le recours à des matériaux déjà utilisés pour des

applications biomédicales permet notamment d'accélérer la procédure d'autorisation d'essai clinique afin de pouvoir rapidement tester la toxicité et la faisabilité du concept développé. Par ailleurs, une limitation majeure de l'exploitation actuelle de ces systèmes réside dans leur conception même puisqu'ils ciblent des *symptômes* et non pas une *entité causale* originelle du cancer. Hanahan et Weinberg ont ainsi développé une théorie définissant des caractéristiques principales du cancer, incluant une instabilité du génome en proie à diverses mutations, une immortalisation des cellules cancéreuses, une dérégulation du métabolisme énergétique *via* une transition vers une activité glycolytique, une prolifération rapide, la formation d'un réseau vasculaire anormal et anarchique (angiogenèse) permettant d'alimenter la tumeur en oxygène et en nutriments, l'absence d'immunogénicité, des propriétés inflammatoires, la capacité de migration et d'invasion d'autres tissus provoquant des métastases (Hanahan & Weinberg 2000; Hanahan & Weinberg 2011). Ce raisonnement s'inscrit dans la lignée de la théorie des mutations somatiques qui vise à expliquer le phénotype cancéreux comme la cause de variations cellulaires induites par des mutations génétiques. Toutefois, cette construction ne prend pas en compte les interactions tissulaires qui ont également montré leur rôle clé dans la tumorigenèse. Une hypothèse basée sur un postulat évolutionniste, la théorie du champ d'organisation tissulaire, a ainsi vu le jour il y a une dizaine d'années et remet ouvertement en cause la seule explication génétique au processus de癌érisation et lui préfère une compréhension à l'échelle tissulaire. Ainsi, toutes les cellules seraient intrinsèquement caractérisées par leur capacité de prolifération et de mobilité, et la tumorigenèse serait induite par des interactions anormales des cellules entre elles et avec la matrice extracellulaire (Sonnenschein & Soto 2013; Fouad & Aanei 2017). Des modèles mathématiques suggèrent par ailleurs l'avantage de la motilité des cellules cancéreuses dans la tumorigenèse sur un contexte purement prolifératif (Komarova 2015). A ce jour toutefois, les stratégies thérapeutiques utilisées en routine clinique reposent principalement sur la seule théorie des mutations somatiques et sont conçues pour intervenir aux niveaux subcellulaire et moléculaire.

Malgré l'existence d'une barrière hémato-testiculaire, l'administration de cisplatine par voie intraveineuse a révolutionné la prise en charge du cancer des testicules, et a par là-même radicalement réorganisé l'arsenal à disposition de la pratique oncologique avec l'émergence progressive de nouveaux dérivés du platine au profil de toxicité modéré. Le large spectre d'action du cisplatine et son succès foudroyant dans l'anéantissement d'environ 80 % des cancers des testicules, principalement attribué à une hypersensibilité des cellules cancéreuses

due à une faible capacité de réparation de l'ADN et donc une forte mort par apoptose, a motivé des essais cliniques pour son utilisation dans diverses pathologies, et notamment dans le glioblastome (Kelland 2007). En adjuvant au régime standard de Stupp, le cisplatine permet de réduire l'activité de la MGMT et ainsi de potentialiser l'efficacité du témozolomide. Cet effet synergique a été démontré dans plusieurs essais cliniques, appuyant la pertinence d'une telle combinaison pour le traitement des gliomes de stade avancé ou récurrent (Rocha et al. 2014). Notons que la barrière hémato-encéphalique est partiellement hermétique aux dérivés du platine qui peuvent alternativement être administrés par voie locorégionale (Cheung-Ong et al. 2013). C'est d'ailleurs dans cette configuration que les effets synergiques entre cisplatine et radiothérapie externe sont les plus prononcés (Fehlauer et al. 2005). Le recours à des thérapies locales devrait en outre permettre d'augmenter la concentration du principe actif au sein du tissu cible, d'autant plus qu'on touche ici à un organe sanctuaire puisque protégé du reste de l'organisme par des barrières physiologiques naturelles (Shi et al. 2015).

Le travail de thèse présenté à travers ce manuscrit s'inscrit ainsi dans la perspective de revisiter l'utilisation de principes actifs éprouvés, approuvés par les autorités sanitaires, dans l'espoir d'une translation rapide vers la clinique. Bien que la découverte de nouveaux agents alkylants du petit sillon de l'ADN offre de nouvelles perspectives pour la prise en charge de certains cancers résistants aux chimiothérapies conventionnelles, l'heure n'est plus au développement d'agents alkylants traditionnels, nés à l'aube de la Seconde Guerre mondiale (Pourquier 2011). Toutefois, la mise en place de stratégies alternatives innovantes visant à en potentialiser l'activité anticancéreuse donne un nouveau souffle à ces vieilles molécules. Plutôt que d'initier un nouveau développement pharmaceutique qui sous-tendrait de longues années de mise au point et d'évaluation avant une éventuelle translation en clinique, une partie de la communauté scientifique se positionne pour une optimisation des traitements. Toutefois, revisiter les stratégies thérapeutiques conventionnelles requiert des expertises critiques à l'interface entre différents domaines afin de recouper l'état des connaissances en termes de compréhension des mécanismes biologiques sous-jacents, de pharmacocinétique des chimiothérapies et des combinaisons de molécules, de la possibilité d'obtenir des effets synergiques par le biais d'autres stratégies thérapeutiques complémentaires et surtout de l'expérience clinique quotidienne de l'oncologue sur le terrain.

Ce projet s'est donc articulé autour de quatre étapes fondamentales : (i) le développement de copolymères séquencés biocompatibles et (bio)dégradables décorés en bout

de chaîne  $\alpha$  par un chélate de gadolinium et adaptés à (ii) la formulation de nanoparticules réticulées sur le cisplatine, (iii) l'intérêt de la vectorisation sur l'accumulation intracellulaire de composés platinés et la formation ultérieure d'adduits à l'ADN, et (iv) l'exploration d'autres cibles biologiques critiques de la cytotoxicité du cisplatine. Des objets bifonctionnels associant molécule antinéoplasique et agent de contraste IRM positifs ont ainsi été obtenus suite à la mise en place d'un procédé de formulation reproductible basé sur une chimie de coordination des chaînes copolymère fonctionnalisées à l'atome de platine central du cisplatine. La caractérisation physico-chimique de ces systèmes a confirmé leur échelle nanométrique avec une taille de  $101 \pm 12$  nm, une charge en complexes  $(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{II})$  de  $12,6 \pm 2,44$  wt% par rapport à la masse sèche du produit final, ce qui implique qu'au moins un tiers des fonctions carboxylate le long des chaînes copolymère participe à la réticulation sur le cisplatine, une stabilité remarquable en solution aqueuse au cours du temps ainsi qu'une libération prolongée durant 24 heures en milieu biologique. La possibilité d'utiliser cette nanoplateforme pour suivre en temps réel par IRM la biodistribution de la drogue dans le parenchyme cérébral a préalablement été évaluée par des mesures de relaxométrie *in vitro* dans l'eau et le plasma, démontrant l'efficacité accrue de l'agent de contraste macromoléculaire synthétisé comparativement au Gd-DTPA, son analogue couramment utilisé en routine clinique. Rappelons que l'injection intraveineuse de chélates de gadolinium en vue d'un examen IRM est systématiquement déconseillée aux patients traités au cisplatine du fait de la néphrotoxicité inhérente à ces deux agents. Le recours à une nanoplateforme combinant cisplatine et gadolinium administrée directement au sein du parenchyme cérébral pourrait ainsi permettre d'assurer un suivi d'imagerie sans générer de toxicité supplémentaire. Dans ce cadre, une étude préliminaire a été réalisée sur un modèle xénogénique de glioblastome humain implanté en orthotopique chez la souris immunodéprimée. L'impact du cisplatine sur deux lignées humaines de glioblastome a également été évalué suivant son mode de vectorisation. Une augmentation significative de l'accumulation intracellulaire de composés du platine et de la formation ultérieure d'adduits à l'ADN induite par un traitement à base de la prodrogue macromoléculaire synthétisée comparativement à un traitement à la même concentration en platine par une solution de cisplatine clinique pour injection intraveineuse a été mise en évidence. Une accumulation intracellulaire du principe actif réduite est couramment décrite dans la littérature comme un facteur de résistance aux drogues (Shen et al. 2012; Dasari & Tchounwou 2014; Galluzzi et al. 2014; Corte-Rodríguez et al. 2015). Malgré ce facteur *a priori* favorable, il a été observé que la quantité d'adduits à l'ADN ne semblait pas nécessairement corrélée à la mort cellulaire. Une

réflexion a alors été engagée sur l’existence de cibles alternatives, anticipées en théorie dans la littérature du fait des propriétés nucléophiles du cisplatine, mais dont la considération demeure marginale alors qu’elle pourrait s’avérer être cruciale dans la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques efficaces.

Au-delà de la validation de la preuve de concept démontrant l’intérêt de la vectorisation du cisplatine, certains points nécessiteraient des recherches supplémentaires. Notamment, le choix du test biologique mis en place pour évaluer la viabilité des cellules après exposition au traitement et ainsi remonter à la cytotoxicité de la prodrogue macromoléculaire comparativement au cisplatine libre pourrait être discuté. Le sel de tétrazolium utilisé (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-tétrazolium, MTS) est réduit par les enzymes de succinate déhydrogénase des cellules vivantes et métaboliquement actives en formazan. La mesure de l’absorbance à 490 nm est donc directement corrélée au nombre de cellules vivantes en culture, mais également à leur activité métabolique. Si l’accumulation intracellulaire de cisplatine est accrue par sa vectorisation, son profil pharmacocinétique diffère de celui du cisplatine libre. L’activation du cisplatine, consécutive à son entrée dans la cellule dans le cas du cisplatine libre, devrait être ralentie dans le cas du cisplatine vectorisé ; en effet, sur la base des résultats obtenus *in vitro* en milieu biologique, on peut supposer que la libération de la charge complète en platine du nanovecteur s’étend sur 24 heures environ. Bien que la quantité d’adduits à l’ADN formés soit considérablement augmentée par la nanovectorisation du cisplatine, la cinétique de formation d’adduits toxiques irréparables est probablement plus lente. En ce sens, réaliser un test de viabilité cellulaire 48 heures après le traitement n’est donc probablement pas suffisant pour observer un impact significatif de la drogue sur la survie cellulaire. En outre, la mise en place et l’exécution dans le temps d’un tel test est très éloignée de la routine clinique où plusieurs cycles de chimiothérapie sont le plus souvent nécessaires à une réponse thérapeutique. On atteint ici les limites de l’exploration biologique *in vitro*. Notons que la littérature fait état de quelques exemples de nanovecteurs dont la cytotoxicité *in vitro* par rapport à la drogue libre n’est pas améliorée, et ce malgré une forte accumulation intracellulaire par endocytose (Kowalcuk et al. 2011; Tippayamontri et al. 2011). Par ailleurs, le dosage du platine par ICP-MS ne permet pas de distinguer les différentes espèces en jeu. Une étude de spéciation des complexes de platine présents au sein de la cellule, et notamment des adduits à l’ADN, a été envisagée suivant le mode de vectorisation. Quelques travaux décrits dans la littérature analysent effectivement la

forme active des complexes de Pt(II) et Pt(IV) issus des principaux dérivés du platine la plus毒ique pour les cellules, notamment de façon à comprendre la suprématie du cisplatine sur ses analogues de carboplatine et d'oxaliplatine en terme d'efficacité thérapeutique et ce en dépit même d'une toxicité plus sévère (Hann et al. 2005; Bell et al. 2006; Espinosa Bosch et al. 2008; Corte-Rodríguez et al. 2015).

Du point de vue de la caractérisation physico-chimique de la prodrogue macromoléculaire, il semble ici pertinent de souligner quelques limitations inhérentes à tout système nanoparticulaire. Différentes méthodes sont couramment évoquées dans la littérature pour finement caractériser une population de particules, notamment en termes de taille moyenne et de dispersité de la population. Ainsi, les systèmes basés sur la diffraction de la lumière tels que la DLS ou le NTA supposent que les particules sont de forme sphérique pour déduire de l'intensité de la lumière diffusée une taille moyenne. Cette hypothèse est souvent abusive. L'observation en microscopie électronique de transmission permet certes de visualiser un échantillon issu d'une suspension de nanoparticules, néanmoins la morphologie de ces objets peut être impactée par la méthode même de préparation de la grille, du fait de l'évaporation de l'eau qui induit une rétractation du système sur lui-même. Cet effet est notamment préjudiciable dans le cas de l'observation de micelles formées par l'auto-assemblage spontané dans l'eau de chaînes copolymère. Dans le cas de cette étude, différentes populations de nanoparticules réticulées sur le cisplatine ont été suivies individuellement par NTA. Les conditions pour une telle analyse requièrent de travailler dans un milieu très dilué afin de pouvoir effectivement suivre chaque particule, et dépourvu de toute impureté qui pourrait interférer avec la population d'intérêt. Ainsi, la mesure ne peut être réalisée que dans de l'eau ultrapure filtrée, en aucun cas dans un milieu biologique dont les protéines et facteurs de croissance également suivis ne pourraient être différenciés de la population de nanoparticules étudiée. La stabilité des nanoparticules réticulées sur le cisplatine a donc été étudiée dans l'eau, après dilution d'un facteur 12,5. Cependant, des particules mises en solution dans un milieu biologique sont immédiatement soumises à un processus d'adsorption de protéines sur leur surface qui engendre une nouvelle distribution de taille de la population initiale de nanoparticules (Montes-Burgos et al. 2010). En outre, l'agrégation de particules entre elles limite leur capture cellulaire. Par conséquent, une caractérisation des nanoparticules dans l'eau n'est qu'indicative puisqu'elle ne reflète pas l'état du système au moment de son injection dans l'organisme ni les conditions ultérieures qu'il rencontrera à l'interface avec des tissus biologique (Gross et al. 2016). Ces

différences notables entre les conditions de mesure en amont de l'application et l'injection dans l'organisme pourraient être restreintes par l'utilisation de techniques de caractérisation orthogonales. Néanmoins, la caractérisation fine des nanomédecines, au plus près de la réalité biologique de l'organisme, demeure un enjeu majeur. D'un point de vue réglementaire, la synthèse de nanoparticules à grande échelle, suivant un procédé fiable aboutissant à la production d'objets reproductibles, nécessite la mise en place de points de contrôle permettant d'analyser et de caractériser le système à différentes étapes de la chaîne de production (Cheng et al. 2014). Un point crucial dans la perspective d'applications biomédicales repose notamment sur le procédé de stérilisation mis en œuvre, qui pourrait déstabiliser ou altérer les nanoparticules. Au cours de cette étude, nous avons stérilisé les nanoparticules par simple filtration sur 0,22 µm sous atmosphère stérile. Si cette méthode permet en outre d'éliminer les plus grosses particules et les agrégats, elle entraîne néanmoins des pertes de substance active, estimées à 30 % en moyenne.

L'avènement des thérapies ciblées, des traitements anti-angiogéniques, de la chimiothérapie radiosensibilisante et de l'immunothérapie requiert en parallèle la mise en place d'un arsenal de techniques d'imagerie quantitatives afin d'évaluer précisément la réponse de l'organisme et du tissu lésé au traitement, qui peut ainsi être adapté en conséquence, et de déterminer le moment optimum pour combiner différentes attaques dans le cas de traitements adjutants ou synergiques (Lieberman 2017). Le greffage d'agents de contraste IRM de faibles masses molaires en surface d'une nanoparticule permet d'améliorer leurs propriétés relaxométriques. Dans le cadre de cette étude, des agents de contraste à base de chélates de gadolinium, donc à contraste positif, ont été utilisés. Un suivi qualitatif par IRM sur plusieurs jours a permis de mettre en évidence la persistance dans le temps du signal de l'agent de contraste. La fonctionnalisation de surface des nanoparticules par un nombre accru de chélates de gadolinium ainsi que la possibilité de contraindre davantage leur mobilité *via* plusieurs liaisons entre l'agent de contraste et les chaînes polymère structurant la nanoparticule pourraient permettre d'améliorer leur efficacité à des fins d'imagerie. Notons que la corrélation de la distribution de l'agent de contraste au sein du parenchyme cérébral déterminée par IRM aux dommages histologiques à l'ADN sur des coupes de tissus devrait permettre de valider l'utilisation de telles nanoparticules comme outil de suivi de l'infusion et de la biodistribution de la drogue. En effet, un moyen de valider l'intégrité de la nanoplatforme au cours du temps consisterait à corréler le signal résiduel observé par IRM quelques jours après injection induit

par l'agent de contraste à la présence de dérivés du platine dans le tissu. Notons par ailleurs que plusieurs études ont rapporté des limitations dans la mise en œuvre d'une infusion convective de nanoparticules polymère dans le cerveau. La taille des pores de l'espace extracellulaire du cerveau sain est estimée comprise entre 38 et 64 nm contre environ 70 à 100 nm dans le tissu tumoral. Par conséquent, les nanoparticules injectées par CED devraient avoir une taille idéalement comprise entre 64 et 90 nm de façon à bénéficier du transport convectif interstitiel leur ouvrant l'accès au tissu tumoral tout en épargnant le tissu sain et à atteindre des volumes de distribution compatibles avec une efficacité thérapeutique (Barth et al. 2011; Zhou et al. 2012). Par ailleurs, il est important de souligner que les cellules résistantes au cisplatine sont susceptibles de présenter une capacité d'endocytose défective, qui limiterait alors la prise en charge des nanoparticules (Xue et al. 2013).

Ce travail de doctorat s'inscrit dans une volonté plus large de redéfinir l'utilisation du cisplatine comme molécule clé dans le traitement des tumeurs solides, et notamment du glioblastome. Dans ce contexte, diverses perspectives peuvent être envisagées. La fonctionnalisation de la nanoparticule « à façon » grâce au bout de chaîne acétal en  $\alpha$  du PEO par des agents d'imagerie, des ligands de ciblage ou encore des radiopharmaceutiques, permet de conférer à l'objet de multiples atouts. Rappelons toutefois que ce qui pourrait s'apparenter à des développements technologiques sophistiqués vise à intégrer ces outils à une démarche thérapeutique facilement transposable à la pratique clinique. Les systèmes développés doivent donc demeurer relativement simples et adaptés à l'application ciblée. Par ailleurs, la conjugaison de déterminants de ciblage à la nanoparticule la rend plus sélective. Bien que les effets secondaires constituent un fléau pour les patients endurant des cycles répétés de chimiothérapie, une trop forte spécificité du traitement risquerait d'épargner certains clones ainsi que des cellules en dormance, alors causes de récidive. Le pronostic extrêmement sombre du glioblastome soulève le problème clé de l'identification de cibles pertinentes. Alors même que la vectorisation du cisplatine par des systèmes nanoparticulaires permet une augmentation significative de l'accumulation intracellulaire de composés du platine et une formation accrue d'adduits à l'ADN, des phénomènes de résistance entrent en jeu et empêchent d'associer ces facteurs *a priori* favorables à un véritable bénéfice thérapeutique (Corte-Rodríguez et al. 2015). L'existence de cibles alternatives plus cruciales que l'ADN nucléaire couramment décrit dans la littérature comme site critique de fixation des complexes activés du cisplatine pourrait conduire à reconsidérer l'utilisation clinique des dérivés du platine. Ces possibles autres cibles

agiraient de concert avec des mécanismes moléculaires associés régissant l'activité anticancéreuse du cisplatine, sa toxicité ainsi que les mécanismes de résistance invoqués par les cellules tumorales (Mezencev 2015). La compréhension de ces processus pourrait permettre d'orienter l'action du cisplatine de façon sélective vers certains organites d'intérêt, notamment vers la mitochondrie dont l'implication dans les processus de cancérisation et de résistance au cisplatine est aujourd'hui largement démontrée (Mizutani et al. 2009; Hung et al. 2010; Xue et al. 2012; Marrache et al. 2014; Van Gisbergen et al. 2015; Zhang & Maurizi 2016). La prodrogue macromoléculaire développée au cours de ce travail pourrait ainsi être fonctionnalisée par un déterminant de ciblage en vue de vectoriser le cisplatine et de libérer les complexes actifs de Pt(II) sélectivement à la mitochondrie. Par ailleurs, les métaux lourds de platine et de gadolinium véhiculés par cette nanoparticule présentent la capacité de moduler le dépôt de dose pour une efficacité accrue de la radiothérapie externe, voire un effet synergique (Rima et al. 2013; Luchette et al. 2014; Porcel et al. 2014; Sancey et al. 2014; Miladi et al. 2015; Delorme et al. 2017). Cette nanomédecine biocompatible peu invasive conçue dans le contexte du glioblastome pourrait en outre, de par la furtivité que lui confère sa couronne de PEO, être évaluée dans d'autres types de tumeurs solides. Des études ultérieures nécessiteraient la définition d'un rationnel entre l'efficacité du cisplatine véhiculé, son routage au sein de la cellule tumorale et sa distribution ultime dans les différents compartiments cellulaires. Enfin, le procédé de synthèse d'une telle prodrogue par coordination de l'atome de platine central aux fonctions carboxylate le long des chaînes copolymère pourrait aisément être transposé à des dérivés du platine sous la forme Pt(IV) présentant l'intérêt d'une stabilité accrue et d'une activation locale qui permettraient de maximiser la proportion de complexes pharmacologiquement actifs à leur cible (Marrache et al. 2014). Malgré une recherche intense et l'évaluation en cours de plusieurs prodrogues macromoléculaires métalliques au travers d'essais cliniques, aucune forme nanoparticulaire d'un dérivé du platine ne bénéficie à ce jour de l'approbation des autorités sanitaires pour son utilisation en clinique. La mise en place de stratégies thérapeutiques innovantes combinant divers agents aux mécanismes d'action complémentaires en vue d'un effet synergique, ainsi que la prise en considération de cibles alternatives jusqu'alors marginalisées, pourraient donner un nouveau souffle au cisplatine, et plus largement aux agents alkylants qui tentent depuis plus d'un demi-siècle de vaincre ce fléau qu'est le cancer. Repenser et optimiser les protocoles cliniques actuels pose ainsi la question de l'utilisation de ces vieilles molécules pour relever de nouveaux défis.



## **Annexe 1 :**

### **Enrichissement en mitochondries par centrifugation différentielle**

Pour assurer un enrichissement quantitatif en mitochondries, les cellules U-87MG et U-251MG sont cultivées en T175 à une densité de  $11,4 \cdot 10^3$  cellules.cm<sup>2</sup>.

Le traitement au cisplatine est réalisé dans les conditions décrites dans les paragraphes 9 et 10 de la section Expérimentale du Chapitre 4.

Des culots secs sont obtenus comme décrit dans le paragraphe 10 de la section Expérimentale du Chapitre 4.

Les culots secs sont repris dans du PBS à raison de 100 µL de PBS 1x pour 7 millions de cellules.

La digitonine en solution à 4 mg.mL<sup>-1</sup> (v/v) est ajoutée afin de lyser les membranes cellulaires.

Les échantillons sont incubés 10 minutes à 4 °C sous agitation régulière.

La réaction de lyse des membranes est stoppée par ajout d'1 mL de PBS 1x.

Les échantillons sont centrifugés 20 minutes à 650 g, 4 °C.

Le surnageant est récupéré et centrifugé à nouveau 10 minutes à 10.000 g, 4 °C.

Le surnageant est éliminé.

Le culot de mitochondries est repris dans 1 mL de PBS 1x et centrifugé 10 minutes à 10.000 g, 4 °C.

Le surnageant est éliminé.

Une qPCR permet de vérifier que l'ADN mitochondrial est correctement amplifié.

La quantité de platine de chaque échantillon est dosée par ICP-MS et la concentration en protéines est mesurée suivant le protocole BCA décrit en Annexe 2.

## Annexes

---

## Annexe 2 : Dosage de protéines par la méthode BCA

Une gamme de 9 points est préparée à partir d'une ampoule de BSA de façon à obtenir des concentrations comprises entre 0 et 2.000 µg.mL<sup>-1</sup> de BSA.

Chaque point de gamme est déposé en duplicat dans deux puits contigus d'une microplaquette 96 puits, à raison de 10 µL par puits.

Les échantillons à analyser, préalablement dilués au quart dans de l'eau ultrapure, sont déposés en duplicat dans deux puits contigus, à raison de 10 µL par puits.

Le kit de dosage de protéines “Pierce™ BCA Protein Assay” commercialisé par ThermoScientific est utilisé pour la suite dans le respect du protocole fourni par le fabricant.

Le réactif B est dilué au 1/50<sup>ème</sup> dans le réactif A.

Un volume de 200 µL de ce mélange est ajouté à chaque puits.

La plaque est recouverte d'une feuille de papier aluminium et mise à incuber à 37 °C pendant 30 minutes.

La densité optique à 562 nm est enregistrée par un lecteur de microplaques (CLARIOstar, BMG LABTECH).

La gamme permet de tracer une droite étalon reliant densité optique et concentration en protéines.

La concentration en protéines de chaque échantillon est alors déduite des différentes mesures de densité optique à 562 nm.

## Annexes

---

### **Annexe 3 : Isolement de mitochondries, MACS mitochondria isolation kit, human (Miltenyi Biotec)**

Reprendre les culots cellulaires obtenus à partir des différentes conditions traitées à raison de  $10^7$  cellules dans 10 mL de PBS.

Centrifuger pendant 10 minutes à 300 g, 4 °C, puis éliminer le surnageant.

Reprendre chaque culot cellulaire dans 200 µL de Lysis Buffer froid.

Ajouter 200 µL d'une solution de digitonine à 4 mg.mL<sup>-1</sup> dans l'eau ultrapure.

Incuber 10 minutes à 4 °C sous agitation régulière.

Ajouter 9 mL de Separation Buffer 1x froid et homogénéiser.

Ajouter 50 µL d'anticorps Anti-TOM22 MicroBeads de façon à marquer magnétiquement les mitochondries et homogénéiser.

Incuber 1 heure en chambre froide sous agitation modérée.

Placer une colonne LS dans le champ magnétique de l'aimant QuadroMACS par condition.

Disposer un filtre de 30 µm adapté à la colonne au-dessus.

Rincer chaque colonne avec 3 mL de Separation Buffer 1x.

Verser le lysat cellulaire de chaque condition dans une colonne.

Rincer chaque colonne par trois fois 3 mL de Separation Buffer 1x.

Après élution, retirer la colonne de l'aimant et verser 1,5 mL de Separation Buffer 1x.

Immédiatement pousser avec le piston de façon à détacher les mitochondries marquées magnétiquement de la colonne.

Centrifuger pendant 2 minutes à 13.000 g, 4 °C, puis éliminer le surnageant.

Dans l'attente d'un dosage de protéines par la méthode BCA et d'un dosage du platine par ICP-MS sur les échantillons ainsi obtenus de mitochondries isolées, resuspendre le culot de mitochondries dans 50 à 80 µL de Storage Buffer avant de congeler à -20 °C.

## Annexes

---

## Bibliographie

- Agarwala, S.S. & Kirkwood, J.M., 2000. Temozolomide, a novel alkylating agent with activity in the central nervous system, may improve the treatment of advanced metastatic melanoma. *The Oncologist*, 5(2), pp.144–51.
- Akerley, W. et al., 2002. A multiinstitutional, concurrent chemoradiation trial of strontium-89, estramustine, and vinblastine for hormone refractory prostate carcinoma involving bone. *Cancer*, 94(6), pp.1654–60.
- Al-Abd, A.M. et al., 2017. Anti-angiogenic agents for the treatment of solid tumors: Potential pathways, therapy and current strategies – A review. *Journal of Advanced Research*, 8(6), pp.591–605.
- Alagkiozidis, I. et al., 2015. Metronomic cyclophosphamide with bevacizumab provides disease stabilization in patients with advanced uterine cancer. *Gynecologic Oncology Reports*, 12, pp.23–6.
- Alconcel, S.N.S., Baas, A.S. & Maynard, H.D., 2011. FDA-approved poly(ethylene glycol)–protein conjugate drugs. *Polymer Chemistry*, 2(7), p.1442.
- Amable, L., 2016. Cisplatin resistance and opportunities for precision medicine. *Pharmacological Research*, 106, pp.27–36.
- Amiji, M.M. et al., 2002. Intratumoral administration of paclitaxel in an in situ gelling poloxamer 407 formulation. *Pharmaceutical Development and Technology*, 7(2), pp.195–202.
- Anderson, C.P. et al., 2015. Pilot study of intravenous melphalan combined with continuous infusion L-S,R-buthionine sulfoximine for children with recurrent neuroblastoma. *Pediatric Blood & Cancer*, 62(10), pp.1739–46.
- Anderson, P. et al., 2008. Outpatient chemotherapy plus radiotherapy in sarcomas: Improving cancer control with radiosensitizing agents. *Cancer Control*, 15(1), pp.38–46.
- Arshad, A. et al., 2015. Convection-enhanced delivery of carboplatin PLGA nanoparticles for the treatment of glioblastoma. *PLoS ONE*, 10(7), p.e0132266.
- Artemov, D., 2003. Molecular magnetic resonance imaging with targeted contrast agents. *Journal of Cellular Biochemistry*, 90(3), pp.518–24.
- Baas, P. et al., 2015. Malignant pleural mesothelioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 26, pp.v31–v39.
- Baba, M. et al., 2012. Micellization of cisplatin (NC-6004) reduces its ototoxicity in guinea pigs. *Journal of Controlled Release*, 157(1), pp.112–7.
- Babu, N.J. et al., 2013. Temozolomide hydrochloride dihydrate. *CrystEngComm*, 15(4), pp.666–71.

- Baldi, I. et al., 2010. Épidémiologie des glioblastomes. *Neurochirurgie*, 56(6), pp.433–40.
- Baldwin, R.M. et al., 2006. Protection of glioblastoma cells from cisplatin cytotoxicity via protein kinase C $\alpha$ -mediated attenuation of p38 MAP kinase signaling. *Oncogene*, 25(20), pp.2909–19.
- Banerjee, S.S. et al., 2012. Poly(ethylene glycol)-prodrug conjugates: Concept, design, and applications. *Journal of Drug Delivery*, 2012, pp.1–17.
- Barth, R.F. et al., 2011. Comparison of intracerebral delivery of carboplatin and photon irradiation with an optimized regimen for boron neutron capture therapy of the F98 rat glioma. *Applied Radiation and Isotopes*, 69(12), pp.1813–6.
- Barua, N.U. et al., 2015. Convection-enhanced delivery of MANF – Volume of distribution analysis in porcine putamen and substantia nigra. *Journal of the Neurological Sciences*, 357(1–2), pp.264–9.
- Baskar, R. et al., 2012. Cancer and radiation therapy: Current advances and future directions. *International Journal of Medical Sciences*, 9(3), pp.193–9.
- Bateson, P., 2006. The nest's tale. A reply to Richard Dawkins. *Biology and Philosophy*, 21(4), pp.553–8.
- Batrakova, E.V., Li, S., Elmquist, W.F., et al., 2001. Mechanism of sensitization of MDR cancer cells by Pluronic block copolymers: Selective energy depletion. *British Journal of Cancer*, 85(12), pp.1987–97.
- Batrakova, E.V., Li, S., Vinogradov, S.V., et al., 2001. Mechanism of pluronic effect on P-glycoprotein efflux system in blood-brain barrier: Contributions of energy depletion and membrane fluidization. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 299(2), pp.483–93.
- Bell, D.N. et al., 2006. Specific determination of intact cisplatin and monohydrated cisplatin in human plasma and culture medium ultrafiltrates using HPLC on-line with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 837(1–2), pp.29–34.
- Bellmunt, J. et al., 2014. Bladder cancer: ESMO Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 25(Supplement 3), p.iii40-iii48.
- Bencsik, A. & Lestaev, P., 2015. Concerns regarding nanosized titanium dioxide nasal exposure and neurotoxicity study by Ze et al. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 103(6), pp.2198–200.
- Bencsik, A., 2014. Le cerveau est-il à l'abri d'un impact d'une exposition à des nanomatériaux ? *Biologie Aujourd'hui*, 208(2), pp.159–65.
- Benedetti, M. et al., 2008. Experimental evidence that a DNA polymerase can incorporate N7-platinated guanines to give platinated DNA. *Angewandte Chemie International Edition*, 47(3), pp.507–10.

- Benedetti, M. et al., 2009. Possible incorporation of free N7-platinated guanines in DNA by DNA polymerases, relevance for the cisplatin mechanism of action. In *Platinum and Other Heavy Metal Compounds in Cancer Chemotherapy*. Bonetti A. et al. (eds.), Humana Press, pp.125–32.
- Benzina, S. et al., 2006. Cell death induced in a human glioblastoma cell line by p(65)+Be neutrons combined with cisplatin. *Life Sciences*, 79(6), pp.513–8.
- Biston, M.-C. et al., 2004. Cure of Fisher rats bearing radioresistant F98 glioma treated with cis-platinum and irradiated with monochromatic synchrotron X-rays. *Cancer Research*, 64(7), pp.2317–23.
- Bjugstad, K.B. et al., 2010. Biocompatibility of poly(ethylene glycol)-based hydrogels in the brain: An analysis of the glial response across space and time. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 95(1), pp.79–91.
- Bobo, R.H. et al., 1994. Convection-enhanced delivery of macromolecules in the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(6), pp.2076–80.
- Bohyk, L. et al., 2012. Intracerebral delivery of carboplatin in combination with either 6 MV photons or monoenergetic synchrotron X-rays are equally efficacious for treatment of the F98 rat glioma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 31, p.78.
- Boulikas, T., 2009. Clinical overview on Lipoplatin™: A successful liposomal formulation of cisplatin. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 18(8), pp.1197–218.
- Bourzac, K., 2012. Nanotechnology: Carrying drugs. *Nature*, 491(7425), pp.S58-60.
- Boyd, R.D., Pichaimuthu, S.K. & Cuenat, A., 2011. New approach to inter-technique comparisons for nanoparticle size measurements; using atomic force microscopy, nanoparticle tracking analysis and dynamic light scattering. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 387(1–3), pp.35–42.
- Bracard, S. et al., 2006. Imagerie cérébrale des gliomes : Diagnostic et suivi conventionnels. *Journal de Radiologie*, 87(6 C2), pp.779–91.
- Bregoli, L. et al., 2016. Nanomedicine applied to translational oncology: A future perspective on cancer treatment. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 12(1), pp.81–103.
- Bregy, A. et al., 2013. The role of Gliadel wafers in the treatment of high-grade gliomas. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 13(12), pp.1453–61.
- Brookes, P. & Lawley, P.D., 1964. Alkylating agents. *British Medical Bulletin*, 20(2), pp.91–5.
- Bubley, G.J. et al., 1996. Effect of DNA conformation on cisplatin adduct formation. *Biochemical Pharmacology*, 51(5), pp.717–21.
- Burgess, A. et al., 2015. Focused ultrasound-mediated drug delivery through the blood-brain barrier. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 15(5), pp.477–91.

- Burtea, C. et al., 2008. Contrast agents: Magnetic resonance. In *Handbook of Experimental Pharmacology*. Semmler W. & Schwaiger M. (eds.), pp.135–65.
- Cabral, H. & Kataoka, K., 2014. Progress of drug-loaded polymeric micelles into clinical studies. *Journal of Controlled Release*, 190, pp.465–76.
- Cabral, H. et al., 2005. Preparation and biological properties of dichloro(1,2-diaminocyclohexane) platinum(II) (DACHPt)-loaded polymeric micelles. *Journal of Controlled Release*, 101, pp.223–32.
- Cai, Y. et al., 2017. Supramolecular “Trojan Horse” for nuclear delivery of dual anticancer drugs. *Journal of the American Chemical Society*, 139(8), pp.2876–9.
- Cajot, S. et al., 2011. Design of reversibly core cross-linked micelles sensitive to reductive environment. *Journal of Controlled Release*, 152(1), pp.30–6.
- Cajot, S. et al., 2012. Smart nanocarriers for pH-triggered targeting and release of hydrophobic drugs. *Acta Biomaterialia*, 8(12), pp.4215–23.
- Cajot, S. et al., 2013. Novel functional degradable block copolymers for the building of reactive micelles. *Polym. Chem.*, 4(4), pp.1025–37.
- Cajot, S., Lautram, N., et al., 2011. Design of reversibly core cross-linked micelles sensitive to reductive environment. *Journal of Controlled Release*, 152(1), pp.30–6.
- Cajot, S., Riva, R., et al., 2011. Novel amphiphilic mikto-arm star-shaped copolymers for the preparation of PLA-based nanocarriers. *Macromolecular Symposia*, 309–310(1), pp.111–22.
- Cao, Y. et al., 2015. Photo-triggered fluorescent theranostic prodrugs as DNA alkylating agents for mechlorethamine release and spatiotemporal monitoring. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 13(24), pp.6742–8.
- Caravan, P. et al., 2009. Influence of molecular parameters and increasing magnetic field strength on relaxivity of gadolinium- and manganese-based T1 contrast agents. *Contrast Media & Molecular Imaging*, 4(2), pp.89–100.
- Carlotti, S. & Peruch, F., 2015. Cyclic monomers: Epoxides, lactide, lactones, lactams, cyclic silicon-containing monomers, cyclic carbonates, and others. In *Anionic Polymerization*. Hadjichristidis N. & Hirao A. (eds.), Springer, Tokyo, Japan, pp.191–305.
- Carlson, B.L. et al., 2009. Radiosensitizing effects of TMZ observed *in vivo* only in a subset of *MGMT* methylated GBM xenografts. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 75(1), pp.212–9.
- Carlsson, S.K., Brothers, S.P. & Wahlestedt, C., 2014. Emerging treatment strategies for glioblastoma multiforme. *EMBO Molecular Medicine*, 6(11), pp.1359–70.
- Cassier, P. et al., 2010. New developments in treatment of ovarian carcinoma: Focus on trabectedin. *Cancer Management and Research*, 2, pp.233–42.

- Chalmers, A.J. et al., 2009. Cytotoxic effects of temozolomide and radiation are additive- and schedule-dependent. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 75(5), pp.1511–9.
- Chan, A.T.C. et al., 2012. Nasopharyngeal cancer: EHNS-ESMO-ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 23(suppl 7), p.vii83-vii85.
- Chapanian, R. et al., 2009. The role of oxidation and enzymatic hydrolysis on the *in vivo* degradation of trimethylene carbonate based photocrosslinkable elastomers. *Biomaterials*, 30(3), pp.295–306.
- Charest, G. et al., 2010. Concomitant treatment of F98 glioma cells with new liposomal platinum compounds and ionizing radiation. *Journal of Neuro-Oncology*, 97(2), pp.187–93.
- Chargari, C. et al., 2012. Cancer stem cells, cornerstone of radioresistance and perspectives for radiosensitization: Glioblastoma as an example. *Bulletin du Cancer*, 99(12), pp.1153–60.
- Chen, H.H.W. & Kuo, M.T., 2010. Role of glutathione in the regulation of cisplatin resistance in cancer chemotherapy. *Metal-Based Drugs*, 2010, pp.1–7.
- Chen, H.-Y. et al., 2010. Role of ERCC1 promoter hypermethylation in drug resistance to cisplatin in human gliomas. *International Journal of Cancer*, 126(8), pp.1944–54.
- Chen, W. et al., 2014. MiR-136 targets E2F1 to reverse cisplatin chemosensitivity in glioma cells. *Journal of Neuro-Oncology*, 120(1), pp.43–53.
- Chen, X. et al., 2015. MiR-873 acts as a novel sensitizer of glioma cells to cisplatin by targeting Bcl-2. *International Journal of Oncology*, 47(4), pp.1603–11.
- Cheng, Y. et al., 2014. Multifunctional nanoparticles for brain tumor imaging and therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 66, pp.42–57.
- Cheung-Ong, K., Giaever, G. & Nislow, C., 2013. DNA-damaging agents in cancer chemotherapy: Serendipity and chemical biology. *Chemistry and Biology*, 20(5), pp.648–59.
- Chime Salome, A., Onunkwo Godswill, C. & Onyishi Ikechukwu, I., 2013. Kinetics and mechanisms of drug release from swellable and non swellable matrices: A review. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 4(2), pp.97–103.
- Choi, Y.M. et al., 2015. Mechanism of cisplatin-induced cytotoxicity is correlated to impaired metabolism due to mitochondrial ROS generation. *PLoS ONE*, 10(8), p.e0135083.
- Colombo, N. et al., 2012. Non-epithelial ovarian cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 23(Supplement 7), pp.vii20–vii26.
- Connors, T.A., 1974. Alkylating agents. *Topics in Current Chemistry*, 52, pp.141–71.

- Correale, P. et al., 2010. Dose/dense metronomic chemotherapy with fractioned cisplatin and oral daily etoposide enhances the anti-angiogenic effects of bevacizumab and has strong antitumor activity in advanced non-small-cell-lung cancer patients. *Cancer Biology and Therapy*, 9(9), pp.685–93.
- Correale, P. et al., 2011. Phase II trial of bevacizumab and dose/dense chemotherapy with cisplatin and metronomic daily oral etoposide in advanced non-small-cell-lung cancer patients. *Cancer Biology and Therapy*, 12(2), pp.112–8.
- Corte-Rodríguez, M. et al., 2015. Quantitative evaluation of cellular uptake, DNA incorporation and adduct formation in cisplatin sensitive and resistant cell lines: Comparison of different Pt-containing drugs. *Biochemical Pharmacology*, 98(1), pp.69–77.
- Croce, C.M., 2009. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nature Reviews Genetics*, 10(10), pp.704–14.
- Cullen, K.J. et al., 2007. Mitochondria as a critical target of the chemotherapeutic agent cisplatin in head and neck cancer. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 39(1), pp.43–50.
- Damia, G. & D'Incalci, M., 1998. Mechanisms of resistance to alkylating agents. *Cytotechnology*, 27(1–3), pp.165–73.
- Darefsky, A.S., King, J.T. & Dubrow, R., 2012. Adult glioblastoma multiforme survival in the temozolomide era: A population-based analysis of Surveillance, Epidemiology, and End Results registries. *Cancer*, 118(8), pp.2163–72.
- Dasari, S. & Tchounwou, P.B., 2014. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, 740, pp.364–78.
- Dash, T.K. & Konkimalla, V.B., 2012. Poly-ε-caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review. *Journal of Controlled Release*, 158(1), pp.15–33.
- Davis, M., 2016. Glioblastoma: Overview of disease and treatment. *Clinical Journal of Oncology Nursing*, 20(5), pp.S2–S8.
- De Felice, F., Musio, D. & Tombolini, V., 2015. Head and neck cancer: Metronomic chemotherapy. *BMC Cancer*, 15, p.677.
- Defize, T. et al., 2012. Multifunctional poly(ε-caprolactone)-forming networks by diels-alder cycloaddition: Effect of the adduct on the shape-memory properties. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 213(2), pp.187–97.
- Degen, J.W. et al., 2003. Safety and efficacy of convection-enhanced delivery of gemcitabine or carboplatin in a malignant glioma model in rats. *Journal of Neurosurgery*, 99(5), pp.893–8.
- Delaney, G. et al., 2005. The role of radiotherapy in cancer treatment. *Cancer*, 104(6), pp.1129–37.
- Delorme, R. et al., 2017. Comparison of gadolinium nanoparticles and molecular contrast agents for radiation therapy-enhancement. *Medical Physics*, 44(11), pp.5949–60.

- DeVita, V.T. & Chu, E., 2008. A history of cancer chemotherapy. *Cancer Research*, 68(21), pp.8643–53.
- Dickinson, P.J. et al., 2010. Canine spontaneous glioma: A translational model system for convection-enhanced delivery. *Neuro-Oncology*, 12(9), pp.928–40.
- Ding, D. et al., 2011. Cisplatin-loaded gelatin-poly(acrylic acid) nanoparticles: Synthesis, antitumor efficiency *in vivo* and penetration in tumors. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 79(1), pp.142–9.
- Doherty, G.J. & McMahon, H.T., 2009. Mechanisms of endocytosis. *Annual Review of Biochemistry*, 78(1), pp.857–902.
- Dolecek, T.A. et al., 2012. CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the united states in 2005-2009. *Neuro-Oncology*, 14(Suppl 5), pp.v1–v49.
- Dolecek, T.A. et al., 2013. CBTRUS statistical report : Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro-Oncology*, 12(1), pp.28–36.
- Domingos, R.F. et al., 2009. Characterizing manufactured nanoparticles in the environment: Multimethod determination of particle sizes. *Environmental Science and Technology*, 43(19), pp.7277–84.
- Dresemann, G., 2010. Temozolomide in malignant glioma. *OncoTargets and Therapy*, 3, pp.139–46.
- Druker, B.J. et al., 2006. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 355(23), pp.2408–17.
- Duan, X. et al., 2015. Polymeric micelle-mediated delivery of DNA-targeting organometallic complexes for resistant ovarian cancer treatment. *Small*, 11(32), pp.3962–72.
- Ducray, F. & Guillemin, R., 2007. Caractéristiques radiologiques des glioblastomes. *La Lettre du Neurologue*, 11(9), pp.1–2.
- Eastman, A., 1987. The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes. *Pharmacology and Therapeutics*, 34(2), pp.155–66.
- Eckert, F. et al., 2010. Definitive radiotherapy and single-agent radiosensitizing ifosfamide in patients with localized, irresectable soft tissue sarcoma: A retrospective analysis. *Radiation Oncology*, 5(1), p.55.
- Edgren, M. & Lennernäs, B., 2000. Estramustine a radio sensitising agent. *Anticancer Research*, 20(4), pp.2677–80.
- Ehrlich, P., 1906. Collected studies on immunity. John Wiley & Sons, New York.
- Engler, A.C. et al., 2013. Accessing new materials through polymerization and modification of a polycarbonate with a pendant activated ester. *Macromolecules*, 46(4), pp.1283–90.

- Engler, A.C. et al., 2015. Hydrophilic polycarbonates: Promising degradable alternatives to poly(ethylene glycol)-based stealth materials. *Macromolecules*, 48(6), pp.1673–8.
- Erdlenbruch, B. et al., 2001. Pharmacokinetics of cisplatin and relation to nephrotoxicity in paediatric patients. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 57(5), pp.393–402.
- Espinosa Bosch, M. et al., 2008. Analytical methodologies for the determination of cisplatin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47, pp.451–9.
- Exner, A.A. et al., 2005. Enhancement of carboplatin toxicity by Pluronic block copolymers. *Journal of Controlled Release*, 106(1–2), pp.188–97.
- Fan, C.H. & Yeh, C.K., 2014. Microbubble-enhanced focused ultrasound-induced blood-brain barrier opening for local and transient drug delivery in central nervous system disease. *Journal of Medical Ultrasound*, 22(4), pp.183–93.
- Fehlauer, F. et al., 2000. Additive cytotoxic effect of cisplatin and X-irradiation on human glioma cell cultures derived from biopsy-tissue. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 126(12), pp.711–6.
- Fehlauer, F. et al., 2005. Effects of irradiation and cisplatin on human glioma spheroids: Inhibition of cell proliferation and cell migration. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 131(11), pp.723–32.
- Fennell, D.A. et al., 2016. Cisplatin in the modern era: The backbone of first-line chemotherapy for non-small cell lung cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 44, pp.42–50.
- Fernandes, C. et al., 2017. Current standards of care in glioblastoma therapy. In *Glioblastoma*. Codon Publications, pp.197–241.
- Ferrandina, G. et al., 2013. Trabectedin as single agent in the salvage treatment of heavily treated ovarian cancer patients: A retrospective, multicenter study. *Gynecologic Oncology*, 130(3), pp.505–10.
- Filipe, V., Hawe, A. & Jiskoot, W., 2010. Critical evaluation of nanoparticle tracking analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. *Pharmaceutical Research*, 27(5), pp.796–810.
- Filippoussi, M. et al., 2016. Biocompatible Zr-based nanoscale MOFs coated with modified poly( $\epsilon$ -caprolactone) as anticancer drug carriers. *International Journal of Pharmaceutics*, 509(1–2), pp.208–18.
- Fizazi, K. et al., 2015. Cancers of unknown primary site: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 26(Supplement 5), p.vi64–vi68.
- Fonseca, S.B. et al., 2011. Rerouting chlorambucil to mitochondria combats drug deactivation and resistance in cancer cells. *Chemistry & Biology*, 18(4), pp.445–53.
- Fouad, Y.A. & Aanei, C., 2017. Revisiting the hallmarks of cancer. *American Journal of Cancer Research*, 7(5), pp.1016–36.

- Freichels, H., Alaimo, D., et al., 2012.  $\alpha$ -Acetal,  $\omega$ -alkyne poly(ethylene oxide) as a versatile building block for the synthesis of glycoconjugated graft-copolymers suited for targeted drug delivery. *Bioconjugate Chemistry*, 23(9), pp.1740–52.
- Freichels, H., Danhier, F., et al., 2011. Fluorescent labeling of degradable poly(lactide-co-glycolide) for cellular nanoparticles tracking in living cells. *The International Journal of Artificial Organs*, 34(2), pp.152–60.
- Freichels, H., Jérôme, R. & Jérôme, C., 2011. Sugar-labeled and PEGylated (bio)degradable polymers intended for targeted drug delivery systems. *Carbohydrate Polymers*, 86(3), pp.1093–106.
- Freichels, H., Pourcelle, V., et al., 2012. Synthesis of poly(lactide-co-glycolide-co- $\epsilon$ -caprolactone)-graft-mannosylated poly(ethylene oxide) copolymers by combination of “clip” and “click” chemistries. *Biomacromolecules*, 13(3), pp.760–8.
- Früh, M. et al., 2013. Small-cell lung cancer (SCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 24(Supplement 6), pp.vi99-vi105.
- Fu, Y. & Kao, W.J., 2010. Drug release kinetics and transport mechanisms of non-degradable and degradable polymeric delivery systems. *Expert Opinion Drug Delivery*, 7(4), pp.429–44.
- Gallego, O., 2015. Nonsurgical treatment of recurrent glioblastoma. *Current Oncology*, 22(4), pp.e273-81.
- Gallego-Urrea, J.A., Tuoriniemi, J. & Hassellöv, M., 2011. Applications of particle-tracking analysis to the determination of size distributions and concentrations of nanoparticles in environmental, biological and food samples. *Trends in Analytical Chemistry*, 30(3), pp.473–83.
- Galluzzi, L. et al., 2012. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene*, 31(15), pp.1869–83.
- Galluzzi, L. et al., 2014. Systems biology of cisplatin resistance: Past, present and future. *Cell Death and Disease*, 5(5), pp.e1257-18.
- Ganslandt, O. et al., 2005. Proton magnetic resonance spectroscopic imaging integrated into image-guided surgery: Correlation to standard magnetic resonance imaging and tumor cell density. *Neurosurgery*, 56(Supplement 2), pp.291-8.
- Garcia, A.A. et al., 2008. Phase II clinical trial of bevacizumab and low-dose metronomic oral cyclophosphamide in recurrent ovarian cancer: A trial of the California, Chicago, and Princess Margaret Hospital phase II consortia. *Journal of Clinical Oncology*, 26(1), pp.76–82.
- Garg, S.M. et al., 2017. Traceable PEO-poly(ester) micelles for breast cancer targeting: The effect of core structure and targeting peptide on micellar tumor accumulation. *Biomaterials*, 144, pp.17–29.
- Garg, T. et al., 2015. Current strategies for targeted delivery of bio-active drug molecules in the treatment of brain tumor. *Journal of Drug Targeting*, 23(10), pp.865–87.

- Garrido, N. et al., 2008. Cisplatin-mediated impairment of mitochondrial DNA metabolism inversely correlates with glutathione levels. *The Biochemical Journal*, 414(1), pp.93–102.
- Garzon, R., Calin, G.A. & Croce, C.M., 2009. MicroRNAs in cancer. *Annual Review of Medicine*, 60(1), pp.167–79.
- Gaucher, G. et al., 2005. Block copolymer micelles: Preparation, characterization and application in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 109(1–3), pp.169–88.
- Geraldes, C.F.G.C. & Laurent, S., 2009. Classification and basic properties of contrast agents for magnetic resonance imaging. *Contrast Media & Molecular Imaging*, 4(1), pp.1–23.
- Gibson, D., 2019. Multi-action Pt(IV) anticancer agents; do we understand how they work? *Journal of Inorganic Biochemistry*, 191, pp.77–84.
- Grand, S. et al., 2006. Spectroscopie  $^1\text{H}$ , perfusion, diffusion : Quelle place pour ces techniques lors du diagnostic et du suivi des principales tumeurs cérébrales sus-tentorielles de l'adulte ? *Revue Neurologique*, 162(12), pp.1204–20.
- Gref, R. et al., 2000. ‘Stealth’ corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): Influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 18(3–4), pp.301–13.
- Grogna, M. et al., 2010. Polymer micelles decorated by gadolinium complexes as MRI blood contrast agents: Design, synthesis and properties. *Polymer Chemistry*, 1(9), pp.1485–90.
- Grogna, M., Cloots, R., Luxen, A., Jérôme, C., Passirani, C., Lautram, N., Desreux, J.-F. & Detrembleur, C., 2011. Convenient grafting through approach for the preparation of stealth polymeric blood pool magnetic resonance imaging contrast agents. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 49(17), pp.3700–8.
- Grogna, M., Cloots, R., Luxen, A., Jérôme, C., Passirani, C., Lautram, N., Desreux, J.-F., Collodoro, M., et al., 2011. Stealth macromolecular platforms for the design of MRI blood pool contrast agents. *Polymer Chemistry*, 2(10), p.2316.
- Gross, J. et al., 2016. Nanoparticle tracking analysis of particle size and concentration detection in suspensions of polymer and protein samples: Influence of experimental and data evaluation parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 104, pp.30–41.
- Grossen, P. et al., 2017. PEG-PCL-based nanomedicines: A biodegradable drug delivery system and its application. *Journal of Controlled Release*, 260, pp.46–60.
- Gryparis, E.C. et al., 2007. Effect of conditions of preparation on the size and encapsulation properties of PLGA-mPEG nanoparticles of cisplatin. *Drug Delivery*, 14(6), pp.371–80.
- Guminski, A.D. et al., 2006. MRP2 (ABCC2) and cisplatin sensitivity in hepatocytes and human ovarian carcinoma. *Gynecologic Oncology*, 100(2), pp.239–46.

- Guo, S. et al., 2013. Lipid-coated cisplatin nanoparticles induce neighboring effect and exhibit enhanced anticancer efficacy. *ACS Nano*, 7(11), pp.9896–904.
- Hainfeld, J.F. et al., 2008. Radiotherapy enhancement with gold nanoparticles. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 60(8), pp.977–85.
- Hainfeld, J.F. et al., 2010. Gold nanoparticles enhance the radiation therapy of a murine squamous cell carcinoma. *Physics in Medicine and Biology*, 55(11), pp.3045–59.
- Hainfeld, J.F. et al., 2013. Gold nanoparticle imaging and radiotherapy of brain tumors in mice. *Nanomedicine*, 8(10), pp.1601–9.
- Hainfeld, J.F., Slatkin, D.N. & Smilowitz, H.M., 2004. The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice. *Physics in Medicine and Biology*, 49(18), pp.N309-15.
- Hall, A.G. & Tilby, M.J., 1992. Mechanisms of action of, and modes of resistance to, alkylating agents used in the treatment of haematological malignancies. *Blood Reviews*, 6(3), pp.163–73.
- Hall, M.D. et al., 2008. The role of cellular accumulation in determining sensitivity to platinum-based chemotherapy. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 48(1), pp.495–535.
- Hamley, I.W., 2005. Block copolymers in solution: Fundamentals and applications, John Wiley & Sons, Ltd.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A., 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), pp.57–70.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), pp.646–74.
- Hanif, F. et al., 2017. Glioblastoma multiforme: A review of its epidemiology and pathogenesis through clinical presentation and treatment. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 18(1), pp.3–9.
- Hann, S. et al., 2005. Novel separation method for highly sensitive speciation of cancerostatic platinum compounds by HPLC-ICP-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 381(2), pp.405–12.
- Harper, B.W. et al., 2010. Advances in platinum chemotherapeutics. *Chemistry – A European Journal*, 16(24), pp.7064–77.
- Hegi, M.E. et al., 2005. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *The New England Journal of Medicine*, 352(10), pp.997–1003.
- Hennequin, C. & Favaudon, V., 2002. Biological basis for chemo-radiotherapy interactions. *European Journal of Cancer*, 38(2), pp.223–30.
- Herraez, E. et al., 2012. Cisplatin-induced chemoresistance in colon cancer cells involves FXR-dependent and FXR-independent up-regulation of ABC proteins. *Molecular Pharmaceutics*, 9(9), pp.2565–76.

- Hillaireau, H. & Couvreur, P., 2009. Nanocarriers' entry into the cell: Relevance to drug delivery. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(17), pp.2873–96.
- Hoebers, F.J.P. et al., 2008. Cisplatin-DNA adduct formation in patients treated with cisplatin-based chemoradiation: Lack of correlation between normal tissues and primary tumor. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 61(6), pp.1075–81.
- Horsman, M.R., 1995. Nicotinamide and other benzamide analogs as agents for overcoming hypoxic cell radiation resistance in tumours. A review. *Acta Oncologica*, 34(5), pp.571–87.
- Hung, W.Y. et al., 2010. Somatic mutations in mitochondrial genome and their potential roles in the progression of human gastric cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1800(3), pp.264–70.
- Hurley, J. et al., 2006. Docetaxel, cisplatin, and trastuzumab as primary systemic therapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive locally advanced breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 24(12), pp.1831–8.
- Huynh, V.T. et al., 2012. Block copolymer micelles with pendant bifunctional chelator for platinum drugs: Effect of spacer length on the viability of tumor cells. *Biomacromolecules*, 13(4), pp.1010–23.
- Jaaback, K., Johnson, N. & Ta, L., 2016. Intraperitoneal chemotherapy for the initial management of primary epithelial ovarian cancer (Review). In *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley & Sons, Ltd, p.CD005340.
- Jenab-Wolcott, J. & Giantonio, B.J., 2009. Bevacizumab: Current indications and future development for management of solid tumors. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 9(4), pp.507–17.
- Jérôme, C. & Lecomte, P., 2008. Recent advances in the synthesis of aliphatic polyesters by ring-opening polymerization. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(9), pp.1056–76.
- Jin, C. et al., 2007. The effect of paclitaxel-loaded nanoparticles with radiation on hypoxic MCF-7 cells. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 32(1), pp.41–7.
- Johnstone, T.C., Suntharalingam, K. & Lippard, S.J., 2015. Third row transition metals for the treatment of cancer. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 373(2037), p.20140185.
- Johnstone, T.C., Suntharalingam, K. & Lippard, S.J., 2016. The next generation of platinum drugs: Targeted Pt(II) agents, nanoparticle delivery, and Pt(IV) prodrugs. *Chemical Reviews*, 116(5), pp.3436–86.
- Kaina, B., Margison, G.P. & Christmann, M., 2010. Targeting  $O^6$ -methylguanine-DNA methyltransferase with specific inhibitors as a strategy in cancer therapy. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(21), pp.3663–81.

- Karfeld-Sulzer, L.S. et al., 2010. Multivalent protein polymer MRI contrast agents: Controlling relaxivity via modulation of amino acid sequence. *Biomacromolecules*, 11(6), pp.1429–36.
- Kartalou, M. & Essigmann, J.M., 2001. Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutation Research*, 478(1–2), pp.23–43.
- Kataoka, K., Harada, A. & Nagasaki, Y., 2012. Block copolymer micelles for drug delivery: Design, characterization and biological significance. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(Supplement), pp.37–48.
- Kavanagh, J.J. et al., 2005. Multi-institutional phase 2 study of TLK286 (TELCYTA™, a glutathione S-transferase P1-1 activated glutathione analog prodrug) in patients with platinum and paclitaxel refractory or resistant ovarian cancer. *International Journal of Gynecological Cancer*, 15(4), pp.593–600.
- Kelland, L., 2007. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 7(8), pp.573–84.
- Khalil, I.A. et al., 2006. Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery. *Pharmacological Reviews*, 58(1), pp.32–45.
- Kil, W.J. et al., 2008. *In vitro* and *in vivo* radiosensitization induced by the DNA methylating agent temozolomide. *Clinical Cancer Research*, 14(3), pp.931–8.
- Kohsaka, S. & Tanaka, S., 2013. Chemotherapeutic agent for glioma. In *Clinical Management and Evolving Novel Therapeutic Strategies for Patients with Brain Tumors*. Terry Lichtor (ed.), IntechOpen, pp.415–38.
- Komarova, N.L., 2015. Cancer: A moving target. *Nature*, 525, pp.198–9.
- Koshy, M. et al., 2012. Improved survival time trends for glioblastoma using the SEER 17 population-based registries. *Journal of Neurooncology*, 107(1), pp.207–12.
- Kowalcuk, A. et al., 2011. Star-shaped nano-conjugates of cisplatin with high drug payload. *International Journal of Pharmaceutics*, 404(1–2), pp.220–30.
- Krauze, M.T. et al., 2005. Real-time visualization and characterization of liposomal delivery into the monkey brain by magnetic resonance imaging. *Brain Research Protocols*, 16(1–3), pp.20–6.
- Krauze, M.T. et al., 2007. Convection-enhanced delivery of nanoliposomal CPT-11 (irinotecan) and PEGylated liposomal doxorubicin (Doxil) in rodent intracranial brain tumor xenografts. *Neuro-Oncology*, 9(4), pp.393–403.
- Kubota, H. et al., 2017. Feasibility of metronomic chemotherapy with tegafur-uracil, cisplatin, and dexamethasone for docetaxel-refractory prostate cancer. *Journal of Rural Medicine*, 12(2), pp.112–9.
- Landy, H. et al., 2004. Pilot study of estramustine added to radiosurgery and radiotherapy for treatment of high grade glioma. *Journal of Neurooncology*, 67(1–2), pp.215–20.

- Laquintana, V. et al., 2009. New strategies to deliver anticancer drugs to brain tumors. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 6(10), pp.1017–32.
- Lauro, S. et al., 2014. The use of bevacizumab in non-small cell lung cancer: An update. *Anticancer Research*, 34(4), pp.1537–45.
- Lehner, R. et al., 2013. Intelligent nanomaterials for medicine: Carrier platforms and targeting strategies in the context of clinical application. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 9(6), pp.742–57.
- Lemarchand, C. et al., 2006. Influence of polysaccharide coating on the interactions of nanoparticles with biological systems. *Biomaterials*, 27(1), pp.108–18.
- Lemée, J.-M., 2015. Au-delà des frontières du glioblastome : Caractérisation de la zone péri-tumorale des glioblastomes. Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers. Français.
- Lenglet, G., 2012. Mécanisme d'action de nouveaux agents alkylants ciblant l'ADN ou les protéines. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé – Lille II. Français.
- Lepeltier, E., Bourgaux, C. & Couvreur, P., 2014. Nanoprecipitation and the “Ouzo effect”: Application to drug delivery devices. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 71, pp.86–97.
- Li, J. et al., 2014. Complex of cisplatin with biocompatible poly(ethylene glycol) with pendant carboxyl groups for the effective treatment of liver cancer. *Journal of Applied Polymer Science*, 131(18), pp.9246–54.
- Li, Q. et al., 2012. Contribution of organic cation transporter 3 to cisplatin cytotoxicity in human cervical cancer cells. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 101(1), pp.394–404.
- Li, S. et al., 2006. A common profile for polymer-based controlled releases and its logical interpretation to general release process. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 9(2), pp.238–44.
- Li, S. et al., 2017. Overcoming resistance to cisplatin by inhibition of glutathione S-transferases (GSTs) with ethacraplatin micelles *in vitro* and *in vivo*. *Biomaterials*, 144, pp.119–29.
- Li, T. et al., 2015. Magnetic resonance imaging of folic acid-coated magnetite nanoparticles reflects tissue biodistribution of long-acting antiretroviral therapy. *International Journal of Nanomedicine*, 10, pp.3779–90.
- Liang, B.C. & Ullyatt, E., 1998. Increased sensitivity to cis-diamminedichloroplatinum induced apoptosis with mitochondrial DNA depletion. *Cell Death & Differentiation*, 5(8), pp.694–701.
- Lieberman, F., 2017. Glioblastoma update: Molecular biology, diagnosis, treatment, response assessment, and translational clinical trials. *F1000Research*, 6, p.1892.

- Ling, Y. et al., 2012. Temozolomide loaded PLGA-based superparamagnetic nanoparticles for magnetic resonance imaging and treatment of malignant glioma. *International Journal of Pharmaceutics*, 430(1–2), pp.266–75.
- Liu, G. et al., 2017. Cytotoxicity study of polyethylene glycol derivatives. *RSC Advances*, 7(30), pp.18252–9.
- Lombardi, M.Y. & Assem, M., 2017. Glioblastoma genomics: A very complicated story. In *Glioblastoma*. Codon Publications, pp.3–25.
- Lordick, F. et al., 2016. Oesophageal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 27(Supplement 5), pp.v50–v57.
- Louis, D.N. et al., 2016. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: A summary. *Acta Neuropathologica*, 131(6), pp.803–20.
- Lu, J., Sharma, L.K. & Bai, Y., 2009. Implications of mitochondrial DNA mutations and mitochondrial dysfunction in tumorigenesis. *Cell Research*, 19(7), pp.802–15.
- Luchette, M. et al., 2014. Radiation dose enhancement of gadolinium-based AGuIX nanoparticles on HeLa cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 10(8), pp.1751–5.
- Maeda, H., 2015. Toward a full understanding of the EPR effect in primary and metastatic tumors as well as issues related to its heterogeneity. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 91, pp.3–6.
- Maeda, H., Nakamura, H. & Fang, J., 2013. The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(1), pp.71–9.
- Maeda, H., Tsukigawa, K. & Fang, J., 2016. A retrospective 30 years after discovery of the enhanced permeability and retention effect of solid tumors: Next-generation therapeutics and photodynamic therapy-problems, solutions, and prospects. *Microcirculation*, 23(3), pp.173–82.
- Mai, Y. & Eisenberg, A., 2012. Self-assembly of block copolymers. *Chemical Society Reviews*, 41(18), p.5969.
- Manavitehrani, I. et al., 2016. Biomedical applications of biodegradable polyesters. *Polymers*, 8(1), p.20.
- Mandal, R., Sawyer, M.B. & Li, X.-F., 2006. Mass spectrometry study of hemoglobin-oxaliplatin complexes in colorectal cancer patients and potential association with chemotherapeutic responses. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20(17), pp.2533–8.
- Mandic, A. et al., 2003. Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(11), pp.9100–6.

- Marrache, S., Pathak, R.K. & Dhar, S., 2014. Detouring of cisplatin to access mitochondrial genome for overcoming resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(29), pp.10444–9.
- Martel-Lafay, I., 2016. Radiothérapie et traitements combinés des cancers bronchiques non à petites cellules localement avancés. *Oncologie*, 18(6), pp.385–91.
- Marth, C. et al., 2017. Cervical cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 28(Supplement 4), pp.iv72-iv83.
- Matei, D. et al., 2012. Epigenetic resensitization to platinum in ovarian cancer. *Cancer Research*, 72(9), pp.2197–205.
- Matsumoto, M., Tsuchida, T. & Kawamoto, K., 1997. Cisplatin-induced cell death in human glioma. *International Journal of Oncology*, 11(6), pp.1209–12.
- Matsumura, S., 2005. Mechanism of biodegradation. In *Biodegradable Polymers for Industrial Applications*. R. Smith (ed.), CRC Press, pp.357–410.
- Matsumura, Y. & Kataoka, K., 2009. Preclinical and clinical studies of anticancer agent-incorporating polymer micelles. *Cancer Science*, 100(4), pp.572–9.
- Matsumura, Y. & Maeda, H., 1986. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: Mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smances. *Cancer research*, 46, pp.6387–92.
- Matsumura, Y., 2008. Polymeric micellar delivery systems in oncology. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 38(12), pp.793–802.
- Mattheolabakis, G. et al., 2009. In vivo investigation of tolerance and antitumor activity of cisplatin-loaded PLGA-mPEG nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 71(2), pp.190–5.
- McCarthy, J.R. & Weissleder, R., 2008. Multifunctional magnetic nanoparticles for targeted imaging and therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(11), pp.1241–51.
- Meier, M.A.R. et al., 2005. PEO-*b*-PCL block copolymers: Synthesis, detailed characterization, and selected micellar drug encapsulation behavior. *Macromolecular Rapid Communications*, 26(24), pp.1918–24.
- Meyn, R.E. & Murray, D., 1984. Cell cycle effects of alkylating agents. *Pharmacology & Therapeutics*, 24(2), pp.147–63.
- Mezencev, R., 2015. Interactions of cisplatin with non-DNA targets and their influence on anticancer activity and drug toxicity: The complex world of the platinum complex. *Current Cancer Drug Targets*, 14(9), pp.794–816.
- Mi, P. et al., 2013. Gd-DTPA-loaded polymer-metal complex micelles with high relaxivity for MR cancer imaging. *Biomaterials*, 34(2), pp.492–500.

- Miladi, I. et al., 2015. Combining ultrasmall gadolinium-based nanoparticles with photon irradiation overcomes radioresistance of head and neck squamous cell carcinoma. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 11(1), pp.247–57.
- Miller, S.E. & House, D.A., 1989. The hydrolysis products of *cis*-dichlorodiammineplatinum(II) 2. The kinetics of formation and anation of the *cis*-diamminedi(aqua)platinum(II) cation. *Inorganica Chimica Acta*, 166, pp.189–97.
- Minko, T., Kopecková, P. & Kopecek, J., 1999. Comparison of the anticancer effect of free and HPMA copolymer-bound adriamycin in human ovarian carcinoma cells. *Pharmaceutical Research*, 16(7), pp.986–96.
- Minko, T., Kopecková, P. & Kopecek, J., 2000. Efficacy of the chemotherapeutic action of HPMA copolymer-bound doxorubicin in a solid tumor model of ovarian carcinoma. *International Journal of Cancer*, 86(1), pp.108–17.
- Mizutani, S. et al., 2009. Mutations in the mitochondrial genome confer resistance of cancer cells to anticancer drugs. *Cancer Science*, 100(9), pp.1680–7.
- Montes-Burgos, I. et al., 2010. Characterisation of nanoparticle size and state prior to nanotoxicological studies. *Journal of Nanoparticle Research*, 12(1), pp.47–53.
- Moreno, D. et al., 2010. Pharmacodynamics of cisplatin-loaded PLGA nanoparticles administered to tumor-bearing mice. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 74(2), pp.265–74.
- Moses, M.A., Brem, H. & Langer, R., 2003. Novel delivery systems in cancer chemotherapy. *Science and Medicine*, 9(5), pp.264–73.
- Mouffouk, F. et al., 2015. Self-assembled polymeric nanoparticles as new, smart contrast agents for cancer early detection using magnetic resonance imaging. *International Journal of Nanomedicine*, 10, pp.63–76.
- Mrugala, M.M., 2013. Advances and challenges in the treatment of glioblastoma: A clinician's perspective. *Discovery Medicine*, 15(83), pp.221–30.
- Mukherjee, B. et al., 2009. EGFRvIII and DNA double-strand break repair: A molecular mechanism for radioresistance in glioblastoma. *Cancer Research*, 69(10), pp.4252–9.
- Murakami, M. et al., 2011. Improving drug potency and efficacy by nanocarrier-mediated subcellular targeting. *Science Translational Medicine*, 3(64), p.64ra2.
- Na, H. Bin, Song, I.C. & Hyeon, T., 2009. Inorganic nanoparticles for MRI contrast agents. *Advanced Materials*, 21(21), pp.2133–48.
- Nakamura, Y. et al., 2016. Nanodrug delivery: Is the enhanced permeability and retention effect sufficient for curing cancer? *Bioconjugate Chemistry*, 27(10), pp.2225–38.
- Nance, E. et al., 2014. Non-invasive delivery of stealth, brain-penetrating nanoparticles across the blood-brain barrier using MRI-guided focused ultrasound. *Journal of Controlled Release*, 189, pp.123–32.

- Nazir, S. et al., 2014. Nanomaterials in combating cancer: Therapeutic applications and developments. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 10(1), pp.19–34.
- Ndagui, U., Mhlongo, N. & Soliman, M.E., 2017. Metal complexes in cancer therapy – An update from drug design perspective. *Drug Design, Development and Therapy*, 11, pp.599–616.
- Nishiyama, N. & Kataoka, K., 2006. Current state, achievements, and future prospects of polymeric micelles as nanocarriers for drug and gene delivery. *Pharmacology and Therapeutics*, 112(3), pp.630–48.
- Nishiyama, N. et al., 2003. Novel cisplatin-incorporated polymeric micelles can eradicate solid tumors in mice. *Cancer Research*, 63(24), pp.8977–83.
- Noll, D.M., Mason, T.M. & Miller, P.S., 2006. Formation and repair of interstrand cross-links in DNA. *Chemical Reviews*, 106(2), pp.277–301.
- Novello, S. et al., 2016. Metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 27(Supplement 5), pp.v1–v27.
- O’Grady, S. et al., 2014. The role of DNA repair pathways in cisplatin resistant lung cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 40(10), pp.1161–70.
- Oberg, J.A. et al., 2014. Neurocognitive functioning and quality of life in patients with recurrent malignant gliomas treated on a phase Ib trial evaluating topotecan by convection-enhanced delivery. *Neuro-Oncology Practice*, 1(3), pp.94–100.
- Oerlemans, C. et al., 2010. Polymeric micelles in anticancer therapy: Targeting, imaging and triggered release. *Pharmaceutical Research*, 27(12), pp.2569–89.
- Olar, A. & Aldape, K.D., 2012. Biomarkers classification and therapeutic decision-making for malignant gliomas. *Current Treatment Options in Oncology*, 13(4), pp.417–36.
- Oldenburg, J. et al., 2013. Testicular seminoma and non-seminoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 24(Supplement 6), pp.vi125-vi132.
- Osada, K., Christie, R.J. & Kataoka, K., 2009. Polymeric micelles from poly(ethylene glycol)-poly(amino acid) block copolymer for drug and gene delivery. *Journal of The Royal Society Interface*, 6(Supplement 3), pp.S325–S339.
- Ostrom, Q. et al., 2013. Gene markers in brain tumors: What the epileptologist should know. *Epilepsia*, 54, pp.25–9.
- Page, C.P., Cheymol, G. & Duteil, J., 1999. *Pharmacologie Intégrée*, De Boeck Université.
- Parhizkar, M. et al., 2016. Electrohydrodynamic encapsulation of cisplatin in poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for controlled drug delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 12(7), pp.1919–29.

- Pasquier, E., Kavallaris, M. & André, N., 2010. Metronomic chemotherapy: New rationale for new directions. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 7(8), pp.455–65.
- Patil, V.M. et al., 2015. A prospective randomized phase II study comparing metronomic chemotherapy with chemotherapy (single agent cisplatin), in patients with metastatic, relapsed or inoperable squamous cell carcinoma of head and neck. *Oral Oncology*, 51(3), pp.279–86.
- Patra, H.K. & Turner, A.P.F., 2014. The potential legacy of cancer nanotechnology: Cellular selection. *Trends in Biotechnology*, 32(1), pp.21–31.
- Peer, D. et al., 2007. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature Nanotechnology*, 2(12), pp.751–60.
- Pegram, M.D. et al., 2004. Results of two open-label, multicenter phase II studies of docetaxel, platinum salts, and trastuzumab in HER2-positive advanced breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 96(10), pp.759–69.
- Penczek, S. et al., 2007. Living ring-opening polymerizations of heterocyclic monomers. *Progress in Polymer Science*, 32(2), pp.247–82.
- Peppas, N.A. & Sahlin, J.J., 1989. A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. *International Journal of Pharmaceutics*, 57(2), pp.169–72.
- Porcel, E. et al., 2014. Gadolinium-based nanoparticles to improve the hadrontherapy performances. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 10(8), pp.1601–8.
- Postmus, P.E. et al., 2017. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 28(Supplement 4), pp.iv1-iv21.
- Pourquier, P., 2011. Alkylating agents. *Bulletin du Cancer*, 98(11), pp.1237–51.
- Pray, L.A., 2008. Gleevec: The breakthrough in cancer treatment. *Nature Education*, 1(1), p.37.
- Prestayko, A.W. et al., 1979. Cisplatin (*cis*-diamminedichloroplatinum II). *Cancer Treatment Reviews*, 6(1), pp.17–39.
- Qi, W. et al., 2013. Aqueous self-assembly of poly(ethylene oxide)-block-poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PEO-b-PCL) copolymers: Disparate diblock copolymer compositions give rise to nano- and meso-scale bilayered vesicles. *Nanoscale*, 5(22), pp.10908–15.
- Qian, Z.M. et al., 2002. Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway. *Pharmacological Reviews*, 54(4), pp.561–87.
- Quinn, J.A. et al., 2009. Phase II trial of temozolomide plus O<sup>6</sup>-benzylguanine in adults with recurrent, temozolomide-resistant malignant glioma. *Journal of Clinical Oncology*, 27(8), pp.1262–7.

- Reboul, F.L., 2004. Radiotherapy and chemotherapy in locally advanced non-small cell lung cancer: Preclinical and early clinical data. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 18(1), pp.41–53.
- Rima, W. et al., 2013. Internalization pathways into cancer cells of gadolinium-based radiosensitizing nanoparticles. *Biomaterials*, 34(1), pp.181–95.
- Rocha, C.R.R. et al., 2014. Glutathione depletion sensitizes cisplatin- and temozolomide-resistant glioma cells *in vitro* and *in vivo*. *Cell Death and Disease*, 5(10), p.e1505.
- Roos, W.P. et al., 2007. Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced DNA lesion  $O^6$ -methylguanine. *Oncogene*, 26(2), pp.186–97.
- Rousseau, J. et al., 2007. Enhanced survival and cure of F98 glioma-bearing rats following intracerebral delivery of carboplatin in combination with photon irradiation. *Clinical Cancer Research*, 13(17), pp.5195–201.
- Rousseau, J. et al., 2009. Efficacy of intracerebral delivery of carboplatin in combination with photon irradiation for treatment of F98 glioma-bearing rats. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 73(2), pp.530–6.
- Rousseau, J. et al., 2010. Efficacy of intracerebral delivery of cisplatin in combination with photon irradiation for treatment of brain tumors. *Journal of Neurooncology*, 98(3), pp.287–95.
- Saito, R. et al., 2004. Distribution of liposomes into brain and rat brain tumor models by convection-enhanced delivery monitored with magnetic resonance imaging. *Cancer Research*, 64(7), pp.2572–9.
- Saito, R. et al., 2005. Gadolinium-loaded liposomes allow for real-time magnetic resonance imaging of convection-enhanced delivery in the primate brain. *Experimental Neurology*, 196(2), pp.381–9.
- Sancey, L. et al., 2014. The use of theranostic gadolinium-based nanoprobes to improve radiotherapy efficacy. *The British Journal of Radiology*, 87(1041), p.20140134.
- Sanders, D.P. et al., 2010. Synthesis of functionalized cyclic carbonate monomers using a versatile pentafluorophenyl carbonate intermediate. *JACS Communications*, 132, pp.14724–6.
- Sarkar, S. et al., 2018. Tailor-made self-assemblies from functionalized amphiphiles: Diversity and applications. *Langmuir*, 34(36); pp.10449-68.
- Scharovsky, O.G., Mainetti, L.E. & Rozados, V.R., 2009. Metronomic chemotherapy: Changing the paradigm that more is better. *Current Oncology*, 16(2), pp.7–15.
- Séhédic, D. et al., 2015. Nanomedicine to overcome radioresistance in glioblastoma stem-like cells and surviving clones. *Trends in Pharmacological Sciences*, 36(4), pp.236–52.
- Seyednejad, H. et al., 2011. Functional aliphatic polyesters for biomedical and pharmaceutical applications. *Journal of Controlled Release*, 152(1), pp.168–76.
- Seystahl, K. et al., 2016. Therapeutic options in recurrent glioblastoma—An update. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 99, pp.389–408.

- Shen, B. et al., 2015. Topotecan-loaded mesoporous silica nanoparticles for reversing multi-drug resistance by synergistic chemoradiotherapy. *Chemistry – An Asian Journal*, 10(2), pp.344–8.
- Shen, D.-W. et al., 2012. Cisplatin resistance: A cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes. *Pharmacological Reviews*, 64(3), pp.706–21.
- Shen, W. et al., 2015. Thermogelling polymer–platinum(IV) conjugates for long-term delivery of cisplatin. *Biomacromolecules*, 16(1), pp.105–15.
- Shen, W. et al., 2017. Sustained codelivery of cisplatin and paclitaxel via an injectable prodrug hydrogel for ovarian cancer treatment. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 9(46), pp.40031–46.
- Shen, Y. et al., 2015. T1 relaxivities of gadolinium-based magnetic resonance contrast agents in human whole blood at 1.5, 3, and 7 T. *Investigative Radiology*, 50(5), pp.330–8.
- Shen, Y.A. et al., 2015. Bypassing the EPR effect with a nanomedicine harboring a sustained-release function allows better tumor control. *International Journal of Nanomedicine*, 10, pp.2485–502.
- Shenoy, M.A. & Singh, B.B., 1992. Chemical radiosensitizers in cancer therapy. *Cancer Investigation*, 10(6), pp.533–51.
- Shi, L. et al., 2010. MiR-21 protected human glioblastoma U87MG cells from chemotherapeutic drug temozolomide induced apoptosis by decreasing Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3 activity. *Brain Research*, 1352, pp.255–64.
- Shi, M. et al., 2015. Convection-enhancement delivery of platinum-based drugs and Lipoplatin<sup>TM</sup> to optimize the concomitant effect with radiotherapy in F98 glioma rat model. *Investigational New Drugs*, 33(3), pp.555–63.
- Siddik, Z.H., 2002. Mechanisms of action of cancer chemotherapeutic agents: DNA-interactive alkylating agents and antitumour platinum-based drugs. In *The Cancer Handbook 1st Edition*. Malcolm R. Alison (ed.), John Wiley & Sons, Ltd.
- Siddik, Z.H., 2003. Cisplatin: Mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, 22(47), pp.7265–79.
- Siegel, T., 2013. Change clinical practice for brain tumor. *Neuro-Oncology*, 15(6), pp.656–69.
- Smyth, E.C. et al., 2016. Gastric cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 27(Supplement 5), pp.v38–v49.
- Sonnenschein, C. & Soto, A.M., 2013. The aging of the 2000 and 2011 Hallmarks of Cancer reviews: A critique. *Journal of Biosciences*, 38(3), pp.651–63.
- Sprowl, J.A. et al., 2012. Associations between ABCC2 polymorphisms and cisplatin disposition and efficacy. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 91(6), pp.1022–6.

- Stathopoulos, G.P. & Boulikas, T., 2012. Lipoplatin formulation review article. *Journal of Drug Delivery*, 2012, p.581363.
- Stathopoulos, G.P., 2013. Cisplatin: Process and future. *Journal of the Balkan Union of Oncology*, 18(3), pp.564–9.
- Stewart, D.J., 2007. Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 63(1), pp.12–31.
- Strazielle, N. & Ghersi-Egea, J.F., 2013. Physiology of blood-brain interfaces in relation to brain disposition of small compounds and macromolecules. *Molecular Pharmaceutics*, 10(5), pp.1473–91.
- Stupp, R. et al., 2005. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England Journal of Medicine*, 352(10), pp.987–96.
- Stupp, R. et al., 2009. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-Year analysis of the EORTC-NCIC trial. *The Lancet Oncology*, 10(5), pp.459–66.
- Su, W.H. et al., 2012. Metronomic therapy for gynecologic cancers. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 51(2), pp.167–78.
- Sun, X. et al., 2017. A pH-responsive yolk-like nanoplatform for tumor targeted dual-mode magnetic resonance imaging and chemotherapy. *ACS Nano*, 11(7), pp.7049–59.
- Tamimi, A.F. & Juweid, M., 2017. Epidemiology and outcome of glioblastoma. In *Glioblastoma*. Codon Publications, pp.143–53.
- Tippayamontri, T. et al., 2011. Cellular uptake and cytoplasm/DNA distribution of cisplatin and oxaliplatin and their liposomal formulation in human colorectal cancer cell HCT116. *Investigational New Drugs*, 29(6), pp.1321–7.
- Tippayamontri, T. et al., 2012. Synergism in concomitant chemoradiotherapy of cisplatin and oxaliplatin and their liposomal formulation in the human colorectal cancer HCT116 model. *Anticancer Research*, 32(10), pp.4395–404.
- Todd, R.C. & Lippard, S.J., 2010. Consequences of cisplatin binding on nucleosome structure and dynamics. *Chemistry & Biology*, 17(12), pp.1334–43.
- Tomoda, K. et al., 2015. Examination of gossypol-pluronic micelles as potential radiosensitizers. *The American Association of Pharmaceutical Scientists Journal*, 17(6), pp.1369-75.
- Torisawa, Y., Nishi, T. & Minamikawa, J., 2001. NaBH<sub>4</sub> in *N*-methylpyrrolidone: A safe alternative for hydride displacement reaction. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 11(20), pp.2787–9.
- Trams, E.G., Nadkarni, M.V. & Smith, P.K., 1961. On the mechanism of action of the alkylating agents. I. Interaction of alkylating agents with nucleic acids. *Cancer Research*, 21(4), pp.560–6.

- Tsimberidou, A.M. et al., 2009. Ultimate fate of oncology drugs approved by the US Food and Drug Administration without a randomized trial. *Journal of Clinical Oncology*, 27(36), pp.6243–50.
- Uchino, H. et al., 2005. Cisplatin-incorporating polymeric micelles (NC-6004) can reduce nephrotoxicity and neurotoxicity of cisplatin in rats. *British Journal of Cancer*, 93(6), pp.678–87.
- Van Butsele, K., Cajot, S., et al., 2009. pH-Responsive flower-type micelles formed by a biotinylated poly(2-vinylpyridine)-block-poly(ethylene oxide)-block-poly( $\epsilon$ -caprolactone) triblock copolymer. *Advanced Functional Materials*, 19(9), pp.1416–25.
- Van Butsele, K., Fustin, C.-A., et al., 2009. Self-assembly and pH-responsiveness of ABC miktoarm star terpolymers. *Langmuir*, 25(1), pp.107–11.
- Van Gisbergen, M.W. et al., 2015. How do changes in the mtDNA and mitochondrial dysfunction influence cancer and cancer therapy? Challenges, opportunities and models. *Mutation Research*, 764, pp.16–30.
- Van Thuijl, H.F. et al., 2015. Evolution of DNA repair defects during malignant progression of low-grade gliomas after temozolomide treatment. *Acta Neuropathologica*, 129(4), pp.597–607.
- Vangelyte, P., Gautier, S. & Jérôme, R., 2004. About the methods of preparation of poly(ethylene oxide)-b-poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanoparticles in water - Analysis by dynamic light scattering. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 242(1–3), pp.203–11.
- Vergote, I. et al., 2009. Phase 3 randomised study of canfosfamide (Telcyta®, TLK286) versus pegylated liposomal doxorubicin or topotecan as third-line therapy in patients with platinum-refractory or -resistant ovarian cancer. *European Journal of Cancer*, 45(13), pp.2324–32.
- Vigneswaran, K., Neill, S. & Hadjipanayis, C.G., 2015. Beyond the World Health Organization grading of infiltrating gliomas: Advances in the molecular genetics of glioma classification. *Annals of Translational Medicine*, 3(7), p.95.
- Villablanca, J.G. et al., 2016. A phase I new approaches to neuroblastoma therapy study of buthionine sulfoximine and melphalan with autologous stem cells for recurrent/refractory high-risk neuroblastoma. *Pediatric Blood & Cancer*, 63(8), pp.1349–56.
- Visone, R. & Croce, C.M., 2009. MiRNAs and Cancer. *The American Journal of Pathology*, 174(4), pp.1131–8.
- Vogelbaum, M.A. & Aghi, M.K., 2015. Convection-enhanced delivery for the treatment of glioblastoma. *Neuro-Oncology*, 17(S2), p.ii3–ii8.

- Vogelbaum, M.A. et al., 2007. Convection-enhanced delivery of cintredekin besudotox (interleukin-13-PE38QQR) followed by radiation therapy with and without temozolomide in newly diagnosed malignant gliomas: Phase 1 study of final safety results. *Neurosurgery*, 61(5), pp.1031–8.
- Vogelbaum, M.A., 2007. Convection-enhanced delivery for treating brain tumors and selected neurological disorders: Symposium review. *Journal of Neurooncology*, 83(1), pp.97–109.
- Walker, M.D., Strike, T.A. & Sheline, G.E., 1979. An analysis of dose-effect relationship in the radiotherapy of malignant gliomas. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 5(10), pp.1725–31.
- Wang, D. & Lippard, S.J., 2005. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(4), pp.307–20.
- Wang, H. et al., 2009. REV3L confers chemoresistance to cisplatin in human gliomas: The potential of its RNAi for synergistic therapy. *Neuro-Oncology*, 11(6), pp.790–802.
- Warren, K.E. et al., 2012. A phase II study of O6-benzylguanine and temozolomide in pediatric patients with recurrent or progressive high-grade gliomas and brainstem gliomas: A Pediatric Brain Tumor Consortium study. *Journal of Neurooncology*, 106(3), pp.643–9.
- Warwick, G.P., 1963. The mechanism of action of alkylating agents. *Cancer Research*, 23(8 Part 1), pp.1315–33.
- Weller, M. et al., 2014. EANO guideline for the diagnosis and treatment of anaplastic gliomas and glioblastoma. *The Lancet Oncology*, 15(9), pp.e395–e403.
- White, E. et al., 2012. A phase I trial of carboplatin administered by convection-enhanced delivery to patients with recurrent/progressive glioblastoma multiforme. *Contemporary Clinical Trials*, 33(2), pp.320–31.
- Wilson, G.D., Bentzen, S.M. & Harari, P.M., 2006. Biologic basis for combining drugs with radiation. *Seminars in Radiation Oncology*, 16(1), pp.2–9.
- Wilson, T., Karajannis, M. & Harter, D., 2014. Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics. *Surgical Neurology International*, 5(64), p.132138.
- Wishart, D.S. et al., 2018. DrugBank 5.0: A major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), pp.D1074–D1082.
- Wisnovsky, S.P. et al., 2013. Targeting mitochondrial DNA with a platinum-based anticancer agent. *Chemistry & Biology*, 20(11), pp.1323–8.
- Woodruff, M.A. & Hutmacher, D.W., 2010. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science*, 35(10), pp.1217–56.
- Wu, B. & Davey, C.A., 2008. Platinum drug adduct formation in the nucleosome core alters nucleosome mobility but not positioning. *Chemistry and Biology*, 15(10), pp.1023–8.

- Wu, T. et al., 2015. Autophagy facilitates lung adenocarcinoma resistance to cisplatin treatment by activation of AMPK/mTOR signaling pathway. *Drug Design, Development and Therapy*, 9, pp.6421–31.
- Xu, J., Feng, E. & Song, J., 2014. Renaissance of aliphatic polycarbonates: New techniques and biomedical applications. *Journal of Applied Polymer Science*, 131(5), pp.39822–51.
- Xu, S. et al., 2017. Supramolecular cisplatin-vorinostat nanodrug for overcoming drug resistance in cancer synergistic therapy. *Journal of Controlled Release*, 266, pp.36–46.
- Xu, W., Ling, P. & Zhang, T., 2013. Polymeric micelles, a promising drug delivery system to enhance bioavailability of poorly water-soluble drugs. *Journal of Drug Delivery*, 2013, 340315.
- Xue, X. et al., 2012. Mitaplatin increases sensitivity of tumor cells to cisplatin by inducing mitochondrial dysfunction. *Molecular Pharmaceutics*, 9(3), pp.634–44.
- Xue, X. et al., 2013. Nanoscale drug delivery platforms overcome platinum-based resistance in cancer cells due to abnormal membrane protein trafficking. *ACS Nano*, 7(12), pp.10452–64.
- Yamasaki, M. et al., 2011. Role of multidrug resistance protein 2 (MRP2) in chemoresistance and clinical outcome in oesophageal squamous cell carcinoma. *British Journal of Cancer*, 104(4), pp.707–13.
- Yamashita, Y. et al., 2007. Convection-enhanced delivery of a topoisomerase I inhibitor (nanoliposomal topotecan) and a topoisomerase II inhibitor (pegylated liposomal doxorubicin) in intracranial brain tumor xenografts1. *Neuro-Oncology*, 9(1), pp.20–8.
- Yang, F. et al., 2014. Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1845(1), pp.84–9.
- Yang, Q. et al., 2016. Polymer nanoparticle delivery of dichloroacetate and DACH-Pt to enhance antitumor efficacy and lower systemic toxicity. *Biomater. Sci.*, 4(4), pp.661–9.
- Yang, T. et al., 2016. Anti-tumor efficiency of lipid-coated cisplatin nanoparticles co-loaded with microRNA-375. *Theranostics*, 6(1), pp.142–54.
- Yang, W. et al., 2011. Convection-enhanced delivery of carboplatin in combination with radiotherapy for the treatment of brain tumors. *Journal of Neurooncology*, 101(3), pp.379–90.
- Yang, W. et al., 2014. Radiation therapy combined with intracerebral administration of carboplatin for the treatment of brain tumors. *Radiation Oncology*, 9, p.25.
- Yang, W.-H. et al., 2017. Revision of the concept of anti-angiogenesis and its applications in tumor treatment. *Chronic Diseases and Translational Medicine*, 3(1), pp.33–40.
- Yang, Y. et al., 2012. MiR-136 promotes apoptosis of glioma cells by targeting AEG-1 and Bcl-2. *FEBS Letters*, 586(20), pp.3608–12.

- Yang, Z. et al., 2006. Cisplatin preferentially binds mitochondrial DNA and voltage-dependent anion channel protein in the mitochondrial membrane of head and neck squamous cell carcinoma: Possible role in apoptosis. *Clinical Cancer Research*, 12(19), pp.5817–25.
- Ye, H. et al., 2006. Poly( $\gamma$ ,l-glutamic acid)-cisplatin conjugate effectively inhibits human breast tumor xenografted in nude mice. *Biomaterials*, 27(35), pp.5958–65.
- Ye, H. et al., 2015. Sustained, low-dose intraperitoneal cisplatin improves treatment outcome in ovarian cancer mouse models. *Journal of Controlled Release*, 220, pp.358–67.
- Ye, W., 2016. The complexity of translating anti-angiogenesis therapy from basic science to the clinic. *Developmental Cell*, 37(2), pp.114–25.
- Yoo, B. et al., 2014. Combination treatment with theranostic nanoparticles for glioblastoma sensitization to TMZ. *Molecular Imaging and Biology*, 16(5), pp.680–9.
- Yuan, Y. et al., 2014. Targeted theranostic platinum(IV) prodrug with a built-in aggregation-induced emission light-up apoptosis sensor for noninvasive early evaluation of its therapeutic responses *in situ*. *Journal of the American Chemical Society*, 136(6), pp.2546–54.
- Zabielska-Koczywąs, K. & Lechowski, R., 2017. The use of liposomes and nanoparticles as drug delivery systems to improve cancer treatment in dogs and cats. *Molecules*, 22(12), p.e2167.
- Zhang, C. et al., 2017. Convection enhanced delivery of cisplatin-loaded brain penetrating nanoparticles cures malignant glioma in rats. *Journal of Controlled Release*, 263, pp.112–9.
- Zhang, J., Stevens, M.F.G. & Bradshaw, T. D., 2012. Temozolomide: Mechanisms of action, repair and resistance. *Current Molecular Pharmacology*, 5(1), pp.102–14.
- Zhang, N. et al., 2012. Probing the interaction of cisplatin with cytochrome c by electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 84(14), pp.6206–12.
- Zhang, R. et al., 2015. Convection-enhanced delivery of SN-38-loaded polymeric micelles (NK012) enables consistent distribution of SN-38 and is effective against rodent intracranial brain tumor models. *Drug Delivery*, 23(8), pp.2780–6.
- Zhang, Y. & Maurizi, M.R., 2016. Mitochondrial ClpP activity is required for cisplatin resistance in human cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1862(2), pp.252–64.
- Zhidkov, N. et al., 2013. Continuous intraperitoneal carboplatin delivery for the treatment of late-stage ovarian cancer. *Molecular Pharmaceutics*, 10, pp.3315–22.
- Zhou, J. et al., 2012. Novel delivery strategies for glioblastoma. *Cancer*, 18(1), pp.89–99.
- Zhou, J. et al., 2014. FOXM1 modulates cisplatin sensitivity by regulating EXO1 in ovarian cancer. *PLoS ONE*, 9(5), p.e96989.
- Zhou, Z., Singh, R. & Souweidane, M.M., 2017. Convection-enhanced delivery for diffuse intrinsic pontine glioma treatment. *Current Neuropharmacology*, 15(1), pp.116–28.

- Zhu, H. et al., 2012. Responsive fluorescent Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@PVA hybrid nanogels for temperature-sensing, dual-modal imaging, and drug delivery. *Biomaterials*, 33(10), pp.3058–69.
- Ziello, J.E., Huang, Y. & Jovin, I.S., 2010. Cellular endocytosis and gene delivery. *Molecular Medicine*, 16(5–6), pp.222–9.
- Zustovich, F. et al., 2009. A phase II study of cisplatin and temozolomide in heavily pre-treated patients with temozolomide-refractory high-grade malignant glioma. *Anticancer Research*, 29(10), pp.4275–9.

## Bibliographie

---





## Hélène LAJOUS

R&D engineer

Ph.D. in biomedical technologies

Scientist position in the formulation of MRI contrast agents and targeted drug delivery systems for clinical applications

in [linkedin.com/in/helene-lajous](https://www.linkedin.com/in/helene-lajous)

### ★ Assets

Commitment

Adaptability / Transversality

Sense of initiative

Problem solving

Critical and analytical mind

Maturity

Persistence

Communication: writing and presenting

Teaching

Teamwork / Collaborations

### 🗣 Languages

French: mother tongue

English ★★★★★

fluent oral and written (C1)  
scientific literature writing

German ★★★★★

fluent oral and written (C1)

### 🌐 Interests

Art: music, literature, painting, photography

Guitar (16 years), Piano

Drama in German

Sport: hiking, swimming, diving

Traveling and discovering other cultures

Associative work

I am an enthusiastic researcher and biomedical engineer, passionate about tackling critical challenges in medicine and working in a multidisciplinary environment with the view of a translation to the clinics.

### Work experiences

Nov. 2014 - May 2018: **Erasmus Mundus Joint Doctorate in Nanomedicine and Pharmaceutical Innovation (EMJD NanoFar)**

**Research Center in Oncology & Immunology Nantes Angers (CRCINA), Angers, France**

**Center for Education and Research on Macromolecules (CERM), Liege, Belgium**

“Cisplatin: an old drug to tackle new challenges”

Development of a multifunctional macromolecular prodrug for the local treatment of glioblastoma

- Synthesis and functionalization of amphiphilic block copolymers
- Formulation, physicochemical characterization and biocompatibility study of hybrid nanoparticles
- Relaxometry study of macromolecular MRI contrast agents at 7T
- MRI monitoring of the biodistribution over time of the designed nanoplateform after stereotactic injection in rodents
- Biological evaluation on human glioblastoma cell lines
- Survival study in glioblastoma-bearing mice

Oct. 2015 - Sept. 2017: **Undergraduate Teaching**

**University Institute of Technology - Biological Engineering, Angers, France**

- Tutorials: pharmacology and toxicology of anticancer agents, nanomedicine
- Lab works: animal behavior, preclinical MRI of rodents, bioinformatics
- Supervision of a student in the framework of her literature review: “Benefits and limits of the use of alkylating(-like) agents in clinical practice”
- Follow-up of literature reviews and internships in laboratories

April - Oct. 2014: **Research Engineer**

**NeuroSpin, French Atomic and Alternative Energies Commission (CEA), Plateau de Saclay, Gif-sur-Yvette, France**

- Voxelwise genome-wide association study (vGWAS) on gray matter volume: implementation of a mass univariate linear model (MULM) in the subjects of the IMAGEN cohort
- Development of multivariate association algorithms between neuro-imaging, sulci features and genetic polymorphism in the study of body mass index

Oct. 2013 - March 2014: **Research Assistant**

**Biomedical Research Center Bichat-Beaujon, National Institute for Health and Medical Research (INSERM), Paris, France**

- Implementation of a simulator for DHCE-MRI: liver perfusion modeling
- Development and optimization of ultra-short time echo (UTE) sequences for dynamic gadoxetate-enhanced MRI at 7T in the rat

Feb. - August 2013: **Research Intern**

**Clinatec, CEA, Grenoble, France**  
**Grenoble Institute of Neurosciences (GIN), University-affiliated Hospital, INSERM, La Tronche, France**

- Setting of an experimental protocol for quantitative cellular MRI

## Hélène LAJOUS



### Computing & Programming

Mendeley	★★★★★
ImageJ	★★★★★
GraphPad Prism	★★★★★
Matlab	★★★★★
Python	★★★★★
C	★★★★★
Unix/Linux OS	★★★★★



### Chemistry

Ring-opening polymerization

Synthesis, organic  
and coordination chemistry

Characterization  
NMR, SEC



### Pharmaceutical sciences

Formulation of polymeric self-  
assemblies  
nanoparticles, micelles, prodrugs,  
macromolecular MRI contrast agents

Physicochemical characterization  
DLS, NTA



### Biology

Cell culture  
human cell lines in normoxia

Cell biology  
clonogenic and cytotoxicity assays



### In vivo experimentation

Design of experiments  
Stereotaxy  
implantation of tumor cells  
convection-enhanced delivery (CED)  
of therapeutic/diagnostic molecules



### MR Imaging

Bruker 4.7T / 7T  
ParaVision 5-6      ★★★★★  
Anatomic MRI in rodents  
T1 and T2-weighted images of the  
brain and the liver  
Quantitative MRI of phantoms  
relaxometry studies of MRI contrast  
agents (Gd-based, USPIO, ...)

## Education and Training

Nov. 2014 - May 2018:

**Ph.D. degree in Biomedical  
Technologies, Vectorization,  
Nanomedicine and Biomaterials**

**University Bretagne-Loire**, Angers, France

**University of Liege**, Liege, Belgium

June 2015:

**Design and application of procedures  
in animal experimentation**

**National Veterinary and Agri-Food School (ONIRIS)**, Nantes, France

November 2013:

**Contrast enhanced body perfusion  
workshop**

**European Society of Molecular and Functional Imaging (ESMOFIR)**,  
Barcelona, Spain

Sept. 2009 - Aug. 2013:

**MSc. Engineering degree with honors**

**Graduate School of Engineering in Energy, Water and Environmental  
Sciences, Grenoble Institute of Technology (INPG)**, Grenoble, France

- Master's degree in Biomedical Engineering and Medical Imaging
- Bachelor's degree in Electrical Engineering

Sept. 2007 - July 2009:

**"Classes Préparatoires aux Grandes  
Écoles"**, specialty physics and chemistry

## Scientific Achievements

### Publications:

Rethinking alkylating(-like) agents for solid tumor management.

**H. Lajous et al.**, Review article - invited for peer review in *Trends in Pharmacological Sciences*.

Hybrid Gd<sup>3+</sup>/cisplatin cross-linked nanoparticles enhance platinum accumulation and formation of DNA adducts in glioblastoma cell lines.  
**H. Lajous et al.**, *Biomater. Sci.*, 2018, **6**, 2386-2409.

*In vivo* quantification of magnetically labeled cells by MRI relaxometry.  
**U. Gimenez, H. Lajous et al.**, *Contrast Media Mol. Imaging*, 2016, **11**, 535-543.

### Communications:

Active participation in 5 international conferences with a focus on:

- nanomedicine
- new chemical and biological tools for targeting in cancer imaging and therapy
- imaging and technology for health
- toxic and essential elements

**References are available on request**

# Curriculum Vitae

---







**Titre :** Cisplatine : une vieille molécule pour de nouveaux défis

*Développement d'une prodrogue macromoléculaire multifonctionnelle applicable au traitement local du glioblastome*

**Mots clés :** nanoparticule, cisplatine, poly(oxyde d'éthylène), polyester, IRM, agent de contraste à base de gadolinium, cancer, traitement locorégional

**Résumé :** Le glioblastome constitue la tumeur primitive maligne la plus fréquente et la plus agressive du système nerveux central, caractérisée par un pronostic sombre. L'infusion locale dans le parenchyme cérébral du cisplatine a présenté des résultats encourageants sur des modèles précliniques. La nanovectorisation permet de concentrer l'efficacité thérapeutique d'agents anticancéreux à leur cible. Leur fonctionnalisation par des unités d'imagerie offre la possibilité de suivre de façon non invasive par imagerie par résonance magnétique (IRM) leur biodistribution au sein du tissu lésé. Dans cette optique, un copolymère triséquencé amphiphile biocompatible a été synthétisé par polymérisations par ouverture de cycle successives à partir d'un poly(oxyde d'éthylène) (PEO). Après micellisation dans l'eau, des complexes de gadolinium ont été greffés sur la couronne de PEO et les fonctions carboxylate situées en périphérie du cœur micellaire se sont réticulées sur le cisplatine, conduisant à la formation d'une prodrogue macromoléculaire de taille nanométrique stable dans le temps. Le potentiel de ces nanoparticules bifonctionnelles comme agents de contraste IRM a été exploré à haut champ magnétique (7 T). Une telle vectorisation du cisplatine a en outre permis d'augmenter de façon significative l'accumulation du platine dans deux lignées humaines de glioblastome ainsi que la formation d'adduits à l'ADN par rapport à la drogue libre. L'implication de mécanismes biologiques sous-jacents à cette étude pose la question de l'existence de cibles alternatives critiques des dérivés du platine, remettant en cause le paradigme établi depuis un demi-siècle définissant l'ADN comme la cible ultime du cisplatine.

**Title:** Cisplatin: an old drug to tackle new challenges

*Development of a multifunctional macromolecular prodrug for the local treatment of glioblastoma*

**Keywords:** nanoparticle, cisplatin, drug delivery system, poly(ethylene oxide), polyester, MRI, gadolinium-based contrast agent, cancer, local treatment

**Abstract:** Glioblastoma is the most frequent and aggressive primary malignant tumor of the central nervous system. Its prognosis remains gloomy. Local infusion of cisplatin within the brain parenchyma exhibited promising results in preclinical models. Nanovectorization of anticancer agents even promotes the concentration of their therapeutic efficiency at their target. Anchorage of imaging moieties on such smart drug delivery systems enables the non-invasive monitoring of their biodistribution within the damaged tissue by magnetic resonance imaging (MRI). From this perspective, a biocompatible amphiphilic triblock copolymer was synthesized by successive ring-opening polymerizations from a poly(ethylene oxide) (PEO). After micellization in water, gadolinium complexes were grafted to the PEO corona and the carboxylate functions located at the surface of the micelle's core were able to cross-link with cisplatin. A stable nano-sized macromolecular prodrug was therefore recovered. Relaxometry measurements at a high magnetic field (7 T) confirmed the intrinsic potential of these hybrid nanoparticles as alternative MRI contrast agents. Besides, cisplatin vectorization enabled a significant increase in the accumulation of platinum compounds in two human glioblastoma cell lines as well as in the subsequent formation of DNA adducts in comparison with the free drug. Biological mechanisms below this study raise the question whether critical alternative targets of platinum derivatives might exist, thus undermining the old-established paradigm that defines DNA as the ultimate target of cisplatin.