



HAL
open science

Nanocapsules lipidiques chargées en ferrocifènes : évaluations physico-chimiques et biologiques pour application dans le traitement du cancer de l’ovaire

Pierre Idlas

► **To cite this version:**

Pierre Idlas. Nanocapsules lipidiques chargées en ferrocifènes : évaluations physico-chimiques et biologiques pour application dans le traitement du cancer de l’ovaire. Médecine humaine et pathologie. Université d’Angers, 2022. Français. NNT : 2022ANGE0050 . tel-04008837

HAL Id: tel-04008837

<https://theses.hal.science/tel-04008837>

Submitted on 28 Feb 2023

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

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : Technologie Biomédicales, Vectorisation, Nanomédecine

Par

Pierre IDLAS

Nanocapsules lipidiques chargées en ferrocifènes : évaluations physico-chimiques et biologiques pour une application dans le traitement du cancer de l'ovaire

Thèse présentée et soutenue à Angers, le 02/12/2022

Unité de recherche : Micro et Nanomédecines Translationnelles, INSERM 1066 – CNRS 6021

Thèse N° :

Rapporteurs avant soutenance :

Géraldine PIEL Professeur, Université de Liège

Gilles GASSER Professeur, Université PSL

Composition du Jury :

Président :	Karine ANDRIEUX	Professeur, Université Paris Cité
Examineurs :	Catherine LADAVIERE	Directrice de recherche CNRS, UMR CNRS 5223 / IMP
	Géraldine PIEL	Professeur, Université de Liège
	Karine ANDRIEUX	Professeur, Université Paris Cité
	Anne VESSIERES	Directrice de recherche CNRS, Université Paris-Sorbonne
	Gilles GASSER	Professeur, Université PSL
	Igor CHOURPA	Professeur, Université de Tours

Dir. de thèse : Catherine PASSIRANI Professeur, Université d'Angers, INSERM 1066 – CNRS 6021

Co-dir. de thèse : Elise LEPELTIER Maître de conférences, Université d'Angers, INSERM 1066 – CNRS 6021

L'auteur du présent document vous autorise à le partager, reproduire, distribuer et communiquer selon les conditions suivantes :



- Vous devez le citer en l'attribuant de la manière indiquée par l'auteur (mais pas d'une manière qui suggérerait qu'il approuve votre utilisation de l'œuvre).
- Vous n'avez pas le droit d'utiliser ce document à des fins commerciales.
- Vous n'avez pas le droit de le modifier, de le transformer ou de l'adapter.

Consulter la licence creative commons complète en français :
<http://creativecommons.org/licences/by-nc-nd/2.0/fr/>

Les travaux présentés dans cette thèse ont été effectués au Laboratoire de Micro et Nanomédecines Translationnelles (MINT – UMR Inserm 1066 – CNRS 6021) situé à l’Institut de Biologie Santé, sur le site du CHU à Angers. Maintenant que j’arrive à la rédaction des remerciements, cela veut dire qu’il est temps pour moi de remercier plusieurs personnes que j’ai côtoyées, qui m’ont accompagné pendant ces trois longues années de thèse.

Avant toute chose, j’aimerais remercier la Professeur Géraldine Piel et le Professeur Gilles Gasser pour le travail de relecture que vous allez effectuer sur ce manuscrit de thèse. Ensuite, j’aimerais aussi remercier les autres personnes qui ont accepté d’être membre du Jury : la Docteur Catherine Ladavière, la Docteur Anne Vessières, la Professeur Karine Andrieux, le professeur Igor Chourpa.

Je remercie également le Professeur Patrick Saulnier, directeur du Laboratoire MINT, de m’avoir accueilli dans sa structure au cours des trois années écoulées.

Je souhaite tout particulièrement remercier ma directrice de thèse, Catherine Passirani, et ma cotutrice de thèse Elise Lepeltier. Cela devient compliqué pour moi de vous dissocier car vous formez vraiment une belle équipe d’encadrantes toutes les deux, scientifiquement et humainement. Tout d’abord, j’aimerais vous remercier d’avoir cru en moi, dès le début, en me donnant la possibilité de pouvoir réaliser cette thèse. Au cours de ces trois années, j’ai beaucoup appris scientifiquement à vos côtés à travers toutes les réunions que nous avons pu faire. Malgré des conditions qui n’ont pas toujours été évidentes, vous avez souvent été présentes. Ensuite, je tiens à vous remercier pour votre écoute et de n’avoir jamais fermé la porte aux différentes propositions que je pouvais faire par rapport au projet. Merci aussi pour vos conseils scientifiques, professionnels et pour les compliments que vous m’avez donnés. Enfin, merci de m’avoir écouté sur les derniers mois qui ont été compliqués, de m’avoir laissé cette liberté de m’organiser en fonction de ce qui était le mieux pour moi.

Je souhaite aussi donner mes remerciements aux autres membres du projet NaTeMOC, le Professeur Gérard Jaouen, le Docteur Pascal Pigeon, le Médecin Didier Decaudin, la Docteur Fariba Nemati. Merci pour cette collaboration. J’ai pris plaisir à travailler avec vous et à participer à nos réunions semestrielles.

Dans l’équipe des permanents du laboratoire MINT, j’aimerais remercier plus particulièrement Nolwenn Lautram pour son aide apportée sur les appareils chromatographiques. Je tiens à remercier aussi le Docteur Guillaume Bastiat pour son aide en rhéologie et toutes les discussions que nous avons pu avoir. Enfin, je tiens à m’excuser auprès des deux pour la colonne chromatographique... Merci à tous les autres permanents du laboratoire MINT pour votre gentillesse.

J’aimerais remercier tous les doctorants et amis avec qui j’ai pu être en contact, partager des moments de convivialité avec eux. Plus particulièrement, merci à vous Pierre et Nicolas. Dommage que nos thèses ne se soient pas passées au même moment. Merci à Adélie (et Sam aussi) et Audrey pour tous les moments passés, à m’écouter me plaindre aussi. Et merci de m’avoir soutenu sur la fin. Je souhaite remercier aussi Sébastien, Marion, Milad, Flavien, Abdallah, Marie-Anne pour les moments partagés.

REMERCIEMENTS

J'aimerais maintenant remercier ma famille : mes parents, mes sœurs, pour avoir toujours été là. J'arrive à la fin de dix longues années d'études et cela n'aurait pas été possible sans vous. Je ne vais pas m'attarder plus que cela car il y aurait tant à dire. Je ne peux aussi m'empêcher d'avoir une énorme pensée pour mes grands-parents paternels, qui nous ont quittés pendant ma première année de thèse. Cette thèse que je défendrai un 2 Décembre, jour de sacre de Napoléon. Si ce n'est pas un signe cela Papi.

Je souhaite aussi remercier mes amis, que ce soit l'équipe bretonne et l'équipe lyonnaise. Merci pour tous les bons moments que l'on a vécus et pour tous ceux que l'on vivra encore.

Enfin arrivant à la fin, il me reste à remercier deux personnes en particulier. Sans elles, je ne crois pas que je serais arrivé au bout de cette thèse.

Cécile, les amitiés sont chères mais la tienne l'est encore plus. Merci d'être là tout simplement. J'ai toujours eu de la chance de pouvoir compter sur toi.

Alex', ma plus belle rencontre de ces trois dernières années. Malgré ce qui s'est passé, je n'ai qu'un seul mot à te dire : MERCI pour tout.

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné(e) **Pierre Idlas**
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 **27 / 09 / 2022**

Table des abréviations

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ARN : Acide ribonucléique

ATCC : American Type Culture Collection

BSA : « Bovine serum albumin » ou Albumine de sérum bovin

CHIP: Chimiothérapie hyperthermique intrapéritonéale

DiD : 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindodicarbocyanine Perchlorate

DIEA : diisopropylethylamine

DMF: dimethylformamide

EMA: European Medicines Agency

EPR : Enhanced Permeation and Retention

ER: Estrogen Receptor

EGFR: “Epidermal growth factor receptor” ou récepteur de facteur de croissance épidermique

FBS : Fetal Bovine Serum

FIGO: Fédération Internationale de Gynécologie-Obstétrique

FDA : Food and Drug Administration

HBTU: hexafluorophosphate

HGSOC : High Grade Serous Ovarian Cancer

LHRH: Luteinizing hormone-releasing hormone

LNCs : Nanocapsules lipidiques

MEC: Matrice extracellulaire

MOF: Metal – Organic Framework

NMP: N-methyl-2-pyrrolidone

NPs : Nanoparticules

NTA : Nanoparticle Tracking Analysis

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PARP : poly(ADP-ribose) polymérase

PDX : Patient-Derived-Xenograft

PIT : « Phase-inversion Temperature » ou Température d’inversion de phase

PMAP : « pH-dependent membrane-active peptides”

ROS : Espèces réactives de l’oxygène ou « Reactive oxygen species »

SIR : Single ion recording

TFA : «Trifluoroacetic acid»

TIS: Triisopropylsilane

UPLC : Ultra-Performance Liquid Chromatography

VEGFR : « Vascular endothelial growth factor receptor» ou récepteur de facteur de croissance endothélial vasculaire

VIH: Virus de l'Immunodéficience Humaine

Table des figures

Figure 1. Structures de différents types de nano-vecteurs utilisés dans le domaine des nanomédicaments	22
Figure 2. a) Structure générale des ferrocifènes. Les groupements R ₁ , R ₂ et R ₃ peuvent être modulés ; b) Structure du P722 , appartenant à la famille des succinimide-ferrocifènes ; c) Structure d'une nanocapsule lipidique : cœur de triglycéride entouré d'une membrane de tensioactifs PEGylés et de phosphatidylcholine.....	24
Figure 3. a) Représentation des différentes origines des cancers de l'ovaire et de l'incidence correspondante (Torre et al. 2018; Henderson et al. 2021); b) Histologie des cancers épithéliaux de l'ovaire ainsi que l'expression en pourcentage des stades selon la classification FIGO (Torre et al. 2018; Henderson et al. 2021).....	36
Figure 4. Voies d'internalisation des peptides pénétrants dans le cytoplasme des cellules.	83
Figure 5. Liste non-exhaustive de méthodes de fonctionnalisation de surface de NPs par un peptide pénétrant.	87
Figure 6. a) Observation macroscopique d'une formulation P769 -LNCs à 5.2 mg/g à + 1 jours et + 28 jours après formulation ; b) Stabilité du P769 dans les LNCs, en suspension liquide (bleu clair) ou sous forme de gel (bleu foncé), en présence d'argon (motif noir) ou non (pas de motif) (3 < n < 5, moyenne ± écart type). Analyse statistique réalisée en utilisant le test analyse de Kruskal-Wallis avec un test de Dunn pour comparer les groupes entre eux.	128
Figure 7. Stabilité du P769 au cours du temps dans le Labrafac® WL 1349 et le Kolliphor® HS 15 (hydroxystéarate de PEG) (n = 1).....	129
Figure 8. Schéma explicatif sur la stabilité du P769 en présence de dioxygène, confirmant l'hypothèse sur la position du P769 en surface des LNCs.	129
Figure 9. Viabilité des cellules U87MG de glioblastome après 72 h de traitement avec : a) P722 (triangle orange), (Z)-P849 (triangle rouge foncé) et (E)-P849 (triangle rose) ; b) P769 (triangle bleu), (Z)-P998 (triangle vert clair), (E)-P998 (triangle vert foncé) (n = 3, moyenne ± écart type).....	131
Figure 10. Viabilité des cellules U87MG de glioblastome après 72 h de traitement avec : a) P722 -LNCs (cercle orange), (Z)-P849 -LNCs (cercle rouge foncé) et (E)-P849 -LNCs (cercle rose) ; b) P769 -LNCs (cercle bleu), (Z)-P998 -LNCs (cercle vert clair), (E)-P998 -LNCs (cercle vert foncé) (n = 3, moyenne ± écart type).....	131
Figure 11. Résumé des principaux résultats obtenus lors de projet ANR.	198
Figure 12. Structure du P722 et de son métabolite actif (à gauche) ; Structure d'APR-246 et de son métabolite actif (à droite).	204
Figure 13. Schéma explicatif de l'application du gel P769 -LNCs pour traiter les cellules gliales résiduelles après chirurgie cytoréductrice d'une tumeur gliale.	205

Table des tableaux

Tableau 1. Classification FIGO des différents stades des cancers de l’ovaire.	34
Tableau 2. Différence histologique, génomique et de traitement entre les cancers épithéliaux de l’ovaire de type I et de type II.....	41
Tableau 3. Liste non-exhaustive de peptides pénétrants selon leurs caractéristiques physico-chimiques.	81
Tableau 4. Liste non-exhaustive de peptides pénétrants utilisés pour modifier des NPs afin de traiter le cancer épithélial de l’ovaire.	88
Tableau 5. Résumé de la forme thérapeutique obtenue selon la structure du ferrocifène	134

Table des matières

<u>INTRODUCTION GENERALE.....</u>	<u>19</u>
--	------------------

<u>CHAPITRE 1. ETAT DE L'ART</u>	<u>33</u>
---	------------------

1. CANCER DE L'OVAIRE.....	33
1.1 DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES, HISTOLOGIQUES ET FACTEURS DE RISQUES DES CANCERS DE L'OVAIRE	33
1.1.1 Données épidémiologiques	33
1.1.2 Caractérisations génomiques et histologiques des cancers de l'ovaire	34
1.1.3 Facteurs de risques	36
1.2 TRAITEMENTS ACTUELS DU CANCER EPITHELIAL DE L'OVAIRE SEREUX DE HAUT GRADE	37
1.2.1 Chirurgie	38
1.2.2 Chimiothérapie	38
1.2.3 Thérapie ciblées.....	39
1.3 ESSAIS CLINIQUES SUR LE CANCER EPITHELIAL DE L'OVAIRE SEREUX DE HAUT GRADE.....	41
1.4 NANOMEDICAMENTS DEVELOPPES CONTRE LE CANCER EPITHELIAL DE L'OVAIRE SEREUX DE HAUT GRADE.....	42
1.5 ROLE DU STRESS OXYDANT DANS LA SENSIBILITE A LA CHIMIOETHERAPIE DU CANCER EPITHELIAL DE L'OVAIRE SEREUX DE HAUT GRADE	44
1.5.1 Effet paradoxal des espèces réactives de l'oxygène (ROS)	44
1.5.2 Rôle du stress oxydant dans le cancer épithélial de l'ovaire séreux de haut grade	44
1.6 REFERENCES.....	46
2. FERROCIFENES ET NANOCAPSULES LIPIDIQUES : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	53
3. PEPTIDES PENETRANTS.....	78
3.1 GENERALITE SUR LES PEPTIDES PENETRANTS.....	78
3.1.1 Historique et définition.....	78
3.1.2 Classification des peptides pénétrants	79
3.2 VOIES D'INTERNALISATION DES PEPTIDES PENETRANTS.....	81
3.2.1 Les voies d'internalisation	81
3.2.2 Les facteurs physico-chimiques influençant l'internalisation	83
3.3 METHODES DE FONCTIONNALISATION DE SURFACE DES NANOPARTICULES PAR LES PEPTIDES PENETRANTS ET APPLICATION AU TRAITEMENT DU CANCER EPITHELIAL DE L'OVAIRE	85
3.4 REFERENCES.....	89

<u>CHAPITRE 2. CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUES DE NANOCAPSULES LIPIDIQUES CHARGEES EN FERROCIFENES</u>	<u>97</u>
---	------------------

1. INTRODUCTION	97
2. ARTICLE SOUMIS DANS LANGMUIR : PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERIZATION OF FERROCIFEN LIPID NANOCAPSULES: CUSTOMED DELIVERY SYSTEMS GUIDED BY THE MOLECULAR STRUCTURE.....	98
3. COMPLEMENT AU CHAPITRE 2: CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUES DE NANOCAPSULES LIPIDIQUES CHARGEES EN FERROCIFENES.....	126
3.1 MATERIELS ET METHODES.....	126
3.1.1 Matériels.....	126
3.1.2 Méthodes	126
3.2 RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	127

3.2.1	Stabilité de la formulation P769-LNCs liquide et du gel P769-LNCs, avec ou sans argon	127
3.2.2	Viabilité cellulaire des cellules U87MG après traitements avec les différents succinimide-ferrocifènes.....	130
3.3	CONCLUSION	131
3.4	REFERENCES.....	132
4.	CONCLUSION.....	133

CHAPITRE 3. EVALUATION DE L'EFFICACITE *IN VIVO* DES FORMULATIONS FURTIVES DE P53-LNCS ET DE P722-LNCS SUR DES MODELES DE TUMEURS DERIVES DE PATIENTES HUMAINES ET GREFFEES SUR SOURIS..... 137

1.	INTRODUCTION	137
2.	ARTICLE PUBLIÉ DANS INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS « FERROCIFEN STEALTH LNCs AND CONVENTIONAL CHEMOTHERAPY : A PROMISING COMBINATION AGAINST MULTIDRUG-RESISTANT OVARIAN ADENOCARCINOMA	138
3.	CONCLUSION.....	155

CHAPITRE 4. MODIFICATION DE SURFACE DES NANOCAPSULES LIPIDIQUES PAR GREFFAGE D'UN PEPTIDE PENETRANT SPECIFIQUE DES CELLULES CANCEREUSES DE L'OVAIRE ET EVALUATION DE LA CINETIQUE D'INTERNALISATION CELLULAIRE 159

1.	INTRODUCTION	159
2.	CELL PENETRATING PEPTIDE FUNCTIONALIZED LIPID NANOCAPSULES TO SPECIFICALLY TARGET OVARIAN CANCER CELL: AN <i>IN VITRO</i> STUDY	160
3.	CONCLUSION.....	190

DISCUSSION GENERALE 193

1.	RESUME DES TRAVAUX	193
2.	AMELIORATION DES FORMULATIONS.....	199
3.	ETUDES MECANISTIQUES <i>IN VITRO</i>	202
4.	ETUDES <i>IN VIVO</i>	204
5.	REFERENCES	206

CONCLUSION GENERALE 215

Introduction Générale

Introduction générale

D'après la norme ISO/TS 80004 de 2015, les nanotechnologies sont « l'application de connaissances scientifiques à des fins de manipulation et de contrôle de la matière principalement à l'échelle nanométrique, afin d'utiliser les propriétés et phénomènes dépendant de la taille et de la structure, différents de ceux associés aux atomes ou molécules individuels, ou aux extrapolations par rapport à des dimensions plus grandes du même matériau » ('ISO/TS 80004-1:2015(Fr), Nanotechnologies — Vocabulaire — Partie 1: Termes "Coeur" n.d.). Sans que l'être humain en ait parfois conscience, les nanotechnologies se retrouvent dans tous les domaines (électronique, environnement, défense, alimentation, médecine etc...) et objets de son quotidien comme les peintures (nanoparticules de titane), les articles de sport (nanotubes de carbone) ou encore les écrans OLED d'ordinateurs. Dans ce projet de thèse, l'un des domaines des nanotechnologies qui sera développé est celui du médical et pharmaceutique avec l'utilisation des nanoparticules en tant que vecteurs de substances actives, appelés nanomédicaments.

Le monde des nanomédicaments est un domaine multidisciplinaire, générant beaucoup d'investissements depuis plusieurs années et en constante progression depuis le début des années 1960 (Bobo et al. 2016; Park, Otte, and Park 2022; Gadekar et al. 2021; Domingues et al. 2022). En 2019, dans une lettre d'opinion publiée dans « *Journal of Controlled Release* », le professeur émérite Patrick Couvreur donnait la définition suivante : « le terme nanomédicament réfère à la formulation d'une molécule active sous forme de nanoparticules en vue d'améliorer ou contrôler la biodisponibilité, la pharmacocinétique, la biodistribution et/ou le métabolisme d'un principe actif, d'en augmenter l'index thérapeutique (efficacité pharmacologique versus toxicité) et de permettre de faire de l'imagerie et du diagnostic » (Couvreur 2019). Ainsi, les nanomédicaments permettent de protéger une molécule active, d'augmenter l'absorption en facilitant le phénomène de diffusion à travers l'organisme, de modifier la pharmacocinétique et donc d'améliorer l'efficacité du principe actif. C'est ainsi tout l'art de la galénique : choisir le bon nano-vecteur pour mettre en formulation la molécule active tout en préservant ses propriétés initiales. Ainsi, le nano-système utilisé a son importance tout comme la molécule active.

Il est possible de distinguer 3 phases historiques dans le développement des nanomédicaments. Les nanoparticules dites de « 1^{ère} génération » présentent une surface qui a été peu ou pas modifiée chimiquement par rapport au matériau constitutif principal. Après administration *in vivo*, ces vecteurs s'accumulent rapidement et principalement dans le foie, l'un des principaux organes d'élimination. En effet, lors d'une administration par voie intraveineuse, ces nanoparticules vont adsorber à leur surface des opsonines présentes dans le plasma. Cette adsorption entraînera ensuite une reconnaissance de ce « complexe » nanoparticule – opsonines par les phagocytes mononuclés du système réticulo-endothélial du foie (aujourd'hui appelé SPM, système des phagocytes mononuclés) et principalement par les cellules de Kupffer (macrophages hépatiques) (Passirani et al. 1998), limitant ainsi leur durée de vie

dans l'organisme et donc l'efficacité du nanomédicament. Cependant, c'est dans cette idée d'une accumulation rapide dans le foie que certains chercheurs ont tiré parti de ce problème d'opsonisation afin de traiter des cancers hépatiques notamment (Qi, Xu, and Chen 2007; Chiannikulchai et al. 1990). Cependant, aucuns nanomédicaments utilisant cette stratégie n'ont été approuvés par les instances internationales, contrairement à la deuxième génération de nanoparticules.

Les nanoparticules dites de « 2^{ème} génération » présentent quant à elles une surface modifiée par des polymères hydrophiles et flexibles, principalement à base de polyéthylène glycol (PEG). Il a été vu que ces polymères permettaient d'éviter les phénomènes d'opsonisation par des répulsions stériques (Vonarbourg et al. 2006; Veronese and Pasut 2005). Dans le cas d'une recherche appliquée contre le cancer, cette modification de surface des nanoparticules a permis d'améliorer l'accumulation des nano-systèmes au niveau du site tumoral via l'effet « Enhanced Permeation and Retention » (EPR) (H. Maeda et al. 2000). Dans ce cas, les nanoparticules sont dites « furtives » et les chercheurs ont donné à cette stratégie le nom de ciblage passif. Cependant, cet effet « EPR » divise aujourd'hui la communauté scientifique (Danhier 2016; Sindhwani et al. 2020) car il est plus ou moins présent suivant la nature de la tumeur. Il repose sur un phénomène de perméabilité vasculaire due à un espacement des jonctions intercellulaires des tissus endothéliaux et à un faible drainage lymphatique au niveau des cellules tumorales (Hiroshi Maeda 2012). Cet effet a fait ses preuves au niveau pré-clinique, sur des tumeurs solides, mais le passage en clinique a montré plus de difficultés étant donné l'hétérogénéité des tumeurs selon chaque patient.

Les nanoparticules dites de « 3^{ème} génération » sont des nanoparticules dont la surface est cette fois-ci modifiée par des ligands spécifiques permettant de cibler des récepteurs surexprimés au niveau du site d'action (Danhier 2016). Ces ligands peuvent être des anticorps ou des peptides pénétrants. Une fois adsorbés ou liés de façon covalente à la surface des nanoparticules, ils vont permettre de cibler des récepteurs surexprimés soit à la surface des cellules cancéreuses (récepteur au folate, récepteur de glycoprotéines etc...), soit des récepteurs surexprimés au niveau de l'endothélium tumoral (intégrine, facteur de croissance endothélial vasculaire etc...). Ainsi, cette stratégie permet un ciblage actif des cellules tumorales et donc de réduire les phénomènes de toxicité envers les cellules saines.

Enfin, les récentes recherches apportées sur la synthèse de polymères biocompatibles et répondant à des stimuli physiques et exogènes (variation de température, application d'un champ magnétique ou électrique) ou à des stimuli chimiques et endogènes (variation de la concentration enzymatique, variation du pH, différence de potentiel redox) ont permis de développer une « 4^{ème} génération » de nanoparticules. Ces nanoparticules intelligentes vont par exemple permettre, dans un environnement biologique adapté aux propriétés des biomatériaux utilisés, une libération contrôlée de la molécule active encapsulée (Mura, Nicolas, and Couvreur 2013; Dheer, Nicolas, and Shankar 2019).

Les nanoparticules envisagées sont nombreuses et peuvent être classifiées selon leur composition en trois grandes familles : les nanoparticules organiques, inorganiques et organométalliques. Parmi les nanoparticules organiques, les nanoparticules à base de phospholipides comme les liposomes (Tejada-Berges et al. 2002) ou encore les nanoparticules lipidiques solides (Mehnert and Mäder 2001), les nanoparticules à base de polymères (Shariati et al. 2020), les micelles de polymère (Deshmukh et al. 2017) ou encore les dendrimères (Santos, Veiga, and Figueiras 2019) peuvent être citées. Parmi les nanoparticules inorganiques, souvent utilisées pour leurs propriétés magnétique et optique en imagerie médicale, les nanoparticules métalliques comme celles d'oxydes de fer (Satpathy et al. 2014), d'or ou d'aluminium sont particulièrement prometteuses. Enfin, de par leur structure leur conférant un haut degré de cristallinité, une surface chimiquement modulable et une grande porosité, les nanoparticules organométalliques (« Metal – Organic Framework » (MOF)) peuvent être aussi des nano-vecteurs de choix pour l'encapsulation et la délivrance de molécules actives (He et al. 2014). Cette liste est non exhaustive et un schéma explicatif plus complet des différents types de nano-systèmes est donné en **Figure 1**.

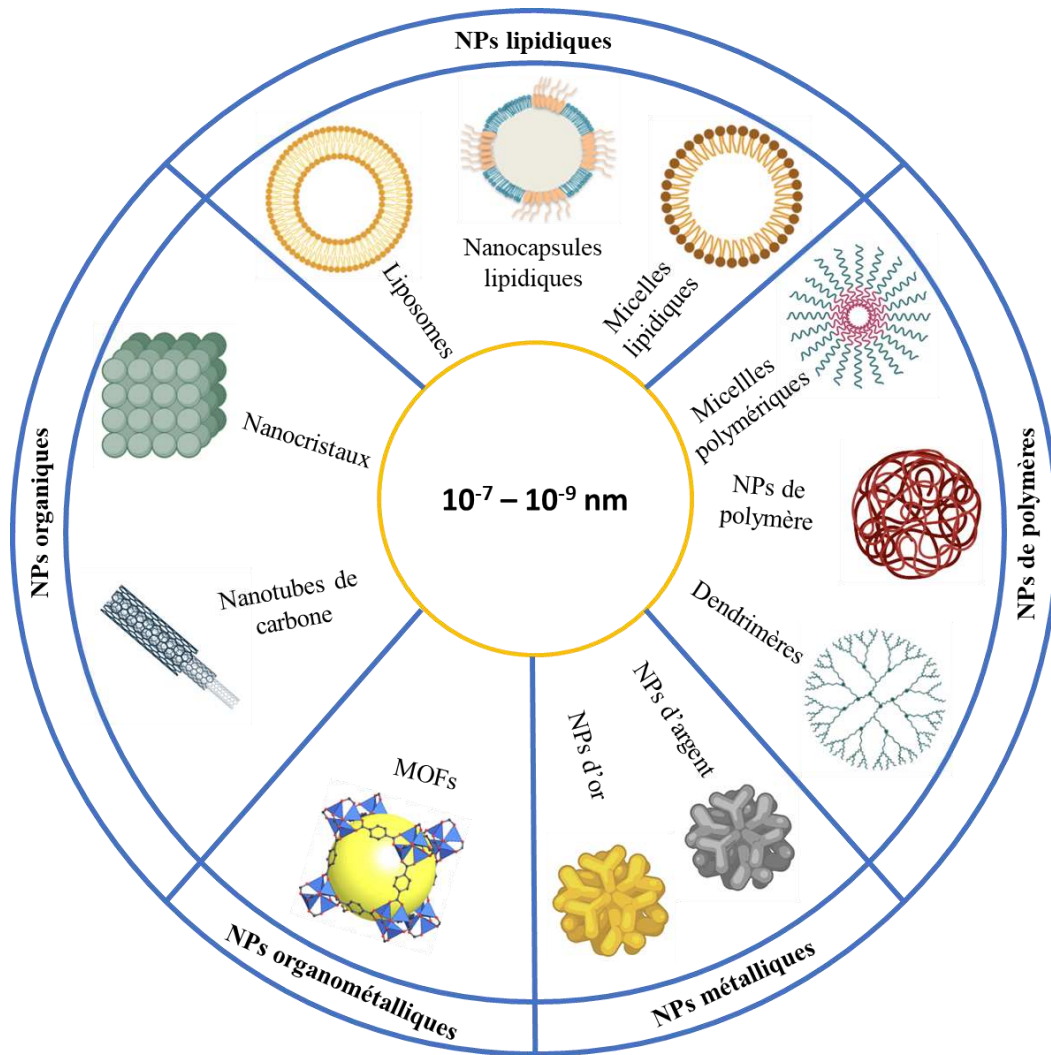


Figure 1. Structures de différents types de nano-vecteurs utilisés dans le domaine des nanomédicaments

Malgré une progression importante en recherche académique dans ce domaine, il a fallu attendre quelques décennies pour voir un premier essor des nanomédicaments sur le marché mondial avec notamment l'utilisation de liposomes PEGylés ou encore de nanoparticules conjuguant protéine et molécule active. Ainsi, en 1996, l'entreprise Janssen développait le Doxil®, une formulation de liposomes PEGylés encapsulant la doxorubicine chlorhydrate. Ces liposomes présentent à leur surface une chaîne polymérique à base de PEG ce qui permet d'éviter les phénomènes d'opsonisation. Ce médicament est utilisé aujourd'hui pour traiter notamment le cancer de l'ovaire en seconde intention lorsqu'il y a des résistances à la chimiothérapie à base de platine (Tejada-Berges et al. 2002). Un autre exemple bien connu est l'Abraxane®, développé par l'entreprise Celgene et utilisé dès 2005 pour traiter le cancer du sein et depuis 2013 pour traiter le cancer de la prostate (Bobo et al. 2016). Ce nanomédicament est composé de protéine d'albumine complexée au paclitaxel, un anticancéreux classique.

Même s'ils sont principalement orientés contre le cancer, les nanomédicaments sont aussi utilisés et certains commercialisés pour traiter des maladies infectieuses (Schoenmaker et al. 2021; Perry and Jarvis 2001), des maladies inflammatoires (Patel and Ghosh 2008), des maladies cardiovasculaires (Katsuki et al. 2017) ou encore des troubles neurologiques (Jarema et al. 2017). Au regard des événements récents, le point d'orgue international de cette discipline est la recherche et la mise sur le marché en une année des vaccins combinant ARN messenger et nanoparticules lipidiques développés par les entreprises Pfizer/BioNTech et Moderna, afin de répondre en urgence à la pandémie du Covid-19 (Schoenmaker et al. 2021) : ceci a permis d'asseoir une certaine légitimité des nanomédicaments auprès de la communauté scientifique et plus encore auprès du grand public.

Le cancer est considéré comme le fléau du 21^{ème} siècle. D'après les chiffres de l'organisation mondiale de la Santé, même si le nombre de cancers diminue depuis 2005, en 2020 (hommes et femmes compris), 19,3 millions de personnes auront été atteintes d'un cancer dont 9,96 millions de décès, soit près d'un cancer sur deux (taux de mortalité de 48 %). Et les estimations pour l'horizon 2040 ne sont pas optimistes puisque l'OMS estime que le nombre de cancers s'élèvera à 30,2 millions, soit une augmentation de 36 % des cas, avec près de 16,3 millions de décès (taux de mortalité de 46 %). Au niveau du cancer de l'ovaire, l'Agence Internationale de Recherche sur le cancer prévoit une augmentation de 37 % des patientes avec une augmentation de 48 % de la mortalité principalement due à un faible pronostic de survie après les traitements classiques aux chimiothérapies à base de taxol et platine ('Cancer Tomorrow' n.d.; Matulonis et al. 2016). En effet, des mécanismes de défense récurrents se mettent en place par la tumeur et sont rencontrés dans de nombreux cancers comme le glioblastome, le cancer du sein ou encore le cancer de l'ovaire : ils sont appelés des phénomènes de résistance à la chimiothérapie. La communauté scientifique s'attèle ainsi à la recherche de nouvelles molécules actives afin d'améliorer les possibilités de traitements thérapeutiques.

A la fin des années 80, l'équipe du Professeur Jaouen, basée sur Paris, a développé un nouveau type de chimie, la chimie bio-organométallique. L'idée était de conférer de nouvelles propriétés biologiques à l'anticancéreux tamoxifène en lui ajoutant un complexe organométallique à base de fer, de ruthénium ou de rhodium (Jaouen, Vessières, and Top 2015). Parmi ces différents organométalliques, la famille des ferrocifènes (**Figure 2.a**) a montré des propriétés biologiques remarquables, *in vitro* et *in vivo*, sur plusieurs types de cancer (glioblastome, cancer du sein triple négatif, mélanome métastatique) (Idlas et al. 2021). Plusieurs types de structures ont été obtenues, avec une librairie de plus de 300 ferrocifènes au total qui ont été synthétisés (Jaouen, Vessières, and Top 2015). L'ensemble de ce travail a permis la création d'une start-up appelée Feroscan (collaborateur).

Dans ce projet, la famille la plus récente sera utilisée, dans laquelle le plus d'espoir est fondé de par son efficacité obtenue *in vitro* notamment sur des lignées cellulaires de cancer de l'ovaire : le succinimide-ferrocifène **P722 (Figure 2.b)** (Pigeon et al. 2017). Les ferrocifènes feront l'objet d'une description

plus détaillée dans le chapitre I consacré à l'état de l'art (cf. revue bibliographique « Ferrocifen loaded lipid nanocapsules : a promising anticancer medication against multidrug resistant tumors »).

Cependant, à cause de la lipophilie des ferrocifènes et afin de pouvoir être administrés par voie intraveineuse, une étape de formulation est nécessaire. Dans ce projet, les nano-systèmes utilisés sont les nanocapsules lipidiques (LNCs). Les LNCs ont été développées et brevetées par le laboratoire MINT en 2002 (Heurtault et al. 2002). Ces nano-objets sont composés d'un cœur de triglycérides entouré d'une membrane de tensioactifs PEGylés (**Figure 2.c**). Ainsi cette structure rend possible l'encapsulation de molécules lipophiles comme les ferrocifènes (Idlas et al. 2021). De plus, la membrane PEGylée flexible des LNCs permet de réaliser des stratégies de ciblage passif (LNCs de base ou après post-insertion de phospholipides PEGylés) (Lainé et al. 2014) mais aussi des stratégies de ciblage actif (adsorption ou greffage covalent de peptides ou d'anticorps monoclonaux) (Béduneau et al. 2007; Karim et al. 2018). Les LNCs seront détaillées dans le chapitre I sur l'état de l'art (cf. revue bibliographique « Ferrocifen loaded lipid nanocapsules : a promising anticancer medication against multidrug resistant tumors »).

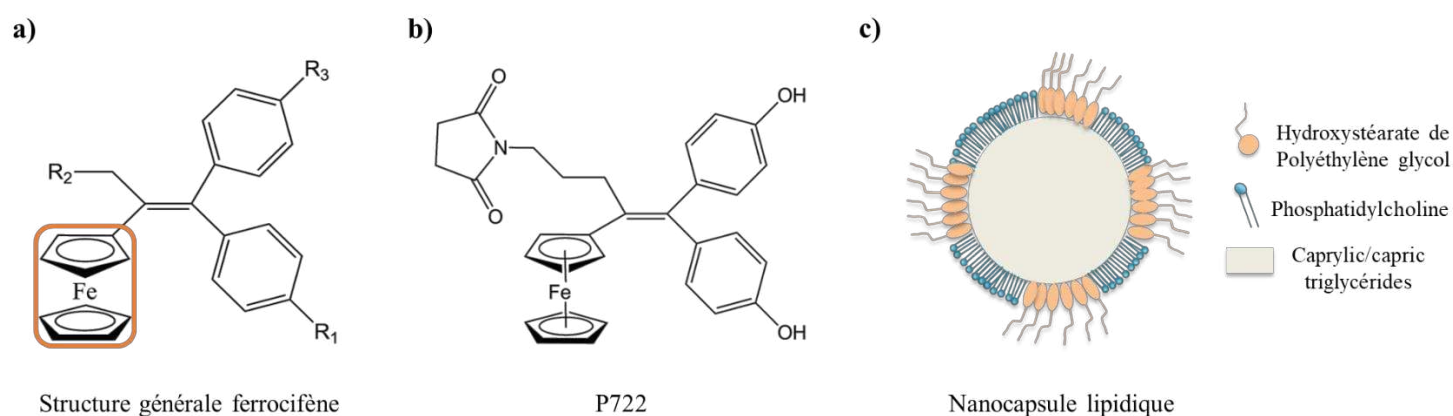


Figure 2. a) Structure générale des ferrocifènes. Les groupements R_1 , R_2 et R_3 peuvent être modulés ; **b)** Structure du **P722**, appartenant à la famille des succinimide-ferrocifènes ; **c)** Structure d'une nanocapsule lipidique : cœur de triglycéride entouré d'une membrane de tensioactifs PEGylés et de phosphatidylcholine.

Ce projet de thèse, financé par l'ANR PRCE « NaTeMOc », est composé d'un consortium de trois entités : le laboratoire MINT pour l'apport de son expertise sur les LNCs ; Feroscan pour la synthèse des ferrocifènes ; l'Institut Curie pour la réalisation des études d'efficacité *in vivo* des formulations.

Ainsi, dans ce projet, afin de réaliser une stratégie de ciblage passif en premier lieu puis de ciblage spécifique des cellules cancéreuses ovariennes en second lieu, la surface des LNCs a été modifiée par l'ajout d'un phospholipide PEGylé (DSPE-PEG₂₀₀₀) ou par l'ajout d'un peptide pénétrant, appelé TLS (Ma et al. 2013). L'efficacité biologique de ces différentes formulations a ensuite été étudiée par l'Institut Curie, sur des modèles de tumeurs épithéliales de l'ovaire dérivées de patientes, greffés sur souris (modèles de « Patient-Derived-Xenograft »).

Les objectifs de cette thèse étaient donc multiples :

- Formulation des LNCs encapsulant le succinimide-ferrocifène **P722**
- Post-insertion du phospholipide PEGylé à la surface des LNCs
- Synthèse, purification et caractérisation du peptide pénétrant TLS
- Adsorption et/ou greffage covalent du peptide pénétrant
- Activité *in vitro* et internalisation des LNCs modifiées en surface par le peptide pénétrant
- Activité *in vivo* des différentes formulations

Dans la première partie du manuscrit, le chapitre I, consacré à l'état de l'art, présentera des généralités sur le cancer de l'ovaire, une description précise des ferrocifènes ainsi que des LNCs et les différentes études *in vitro* et *in vivo* réalisées. Une description des peptides pénétrants sera ensuite donnée avec des exemples d'application pour le cancer de l'ovaire.

La seconde partie regroupera l'ensemble des principaux résultats expérimentaux obtenus au cours de cette thèse et sera divisée en trois chapitres. Le chapitre II présentera une caractérisation physico-chimique détaillée des formulations obtenues de LNCs chargées avec différents succinimide-ferrocifènes. Ces résultats ont permis de mettre en évidence une relation structure moléculaire – nano-système selon le ferrocifène utilisé. Ensuite, le chapitre III présentera l'étude *in vivo* des formulations sur des modèles de tumeurs de l'ovaire dérivées de patientes humaines greffés sur souris. Enfin le chapitre IV présentera les résultats obtenus lors de la modification de surface des LNCs par le peptide pénétrant TLS et l'effet apporté sur l'internalisation des LNCs par des cellules cancéreuses ovariennes. La dernière partie du manuscrit sera constituée d'une discussion générale de l'ensemble des résultats obtenus permettant ainsi de mettre en avant les perspectives issues de ce travail.

Références

- Béduneau, Arnaud, Patrick Saulnier, François Hindré, Anne Clavreul, Jean-Christophe Leroux, and Jean-Pierre Benoit. 2007. 'Design of Targeted Lipid Nanocapsules by Conjugation of Whole Antibodies and Antibody Fab' Fragments'. *Biomaterials* 28 (33): 4978–90. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.05.014>.
- Bobo, Daniel, Kye J. Robinson, Jiaul Islam, Kristofer J. Thurecht, and Simon R. Corrie. 2016. 'Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date'. *Pharmaceutical Research* 33 (10): 2373–87. <https://doi.org/10.1007/s11095-016-1958-5>.
- 'Cancer Tomorrow'. n.d. Accessed 21 April 2022. https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype?types=1&sexes=0&mode=population&group_populations=1&multiple_populations=1&multiple_cancers=0&cancers=25&populations=903_904_905_908_909_935&single_unit=10000.
- Chiannikulchai, N., N. Ammoury, B. Caillou, J. P. Devissaguet, and P. Couvreur. 1990. 'Hepatic Tissue Distribution of Doxorubicin-Loaded Nanoparticles after i.v. Administration in Reticulosarcoma M 5076 Metastasis-Bearing Mice'. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 26 (2): 122–26. <https://doi.org/10.1007/BF02897257>.
- Couvreur, Patrick. 2019. 'Nanomedicine: From Where Are We Coming and Where Are We Going?' *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 311–312 (October): 319–21. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.10.020>.
- Danhier, F. 2016. 'To Exploit the Tumor Microenvironment: Since the EPR Effect Fails in the Clinic, What Is the Future of Nanomedicine?' *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 244 (Pt A): 108–21. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.11.015>.
- Deshmukh, Anand S., Pratik N. Chauhan, Malleshappa N. Noolvi, Kiran Chaturvedi, Kuntal Ganguly, Shyam S. Shukla, Mallikarjuna N. Nadagouda, and Tejraj M. Aminabhavi. 2017. 'Polymeric Micelles: Basic Research to Clinical Practice'. *International Journal of Pharmaceutics* 532 (1): 249–68. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.09.005>.
- Dheer, Divya, Julien Nicolas, and Ravi Shankar. 2019. 'Cathepsin-Sensitive Nanoscale Drug Delivery Systems for Cancer Therapy and Other Diseases'. *Advanced Drug Delivery Reviews* 151–152 (December): 130–51. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.01.010>.
- Domingues, Cátia, Ana Santos, Carmen Alvarez-Lorenzo, Angel Concheiro, Ivana Jarak, Francisco Veiga, Isabel Barbosa, Marília Dourado, and Ana Figueiras. 2022. 'Where Is Nano Today and Where Is It Headed? A Review of Nanomedicine and the Dilemma of Nanotoxicology'. *ACS Nano*, June. <https://doi.org/10.1021/acsnano.2c00128>.
- Gadekar, Vedant, Yogeshwari Borade, Suraj Kannaujia, Kuldeep Rajpoot, Neelima Anup, Vishakha Tambe, Kiran Kalia, and Rakesh K. Tekade. 2021. 'Nanomedicines Accessible in the Market for Clinical Interventions'. *Journal of Controlled Release* 330 (February): 372–97. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.12.034>.
- He, Chunbai, Kuangda Lu, Demin Liu, and Wenbin Lin. 2014. 'Nanoscale Metal–Organic Frameworks for the Co-Delivery of Cisplatin and Pooled siRNAs to Enhance Therapeutic Efficacy in Drug-Resistant Ovarian Cancer Cells'. *Journal of the American Chemical Society* 136 (14): 5181–84. <https://doi.org/10.1021/ja4098862>.
- Heurtault, Béatrice, Patrick Saulnier, Brigitte Pech, Jacques-Emile Proust, and Jean-Pierre Benoit. 2002. 'A Novel Phase Inversion-Based Process for the Preparation of Lipid Nanocarriers'. *Pharmaceutical Research* 19 (6): 875–80. <https://doi.org/10.1023/a:1016121319668>.

- Idlas, Pierre, Elise Lepeltier, Gérard Jaouen, and Catherine Passirani. 2021. 'Ferrocifen Loaded Lipid Nanocapsules: A Promising Anticancer Medication against Multidrug Resistant Tumors'. *Cancers* 13 (10): 2291. <https://doi.org/10.3390/cancers13102291>.
- 'ISO/TS 80004-1:2015(Fr), Nanotechnologies — Vocabulaire — Partie 1: Termes "Coeur"'. n.d. Accessed 20 July 2022. <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:ts:80004:-1:ed-2:v1:fr>.
- Jaouen, Gérard, Anne Vessières, and Siden Top. 2015. 'Ferrocifen Type Anti Cancer Drugs'. *Chemical Society Reviews* 44 (24): 8802–17. <https://doi.org/10.1039/c5cs00486a>.
- Jarema, Marek, Przemysław Bienkowski, Janusz Heitzman, Tadeusz Parnowski, and Janusz Rybakowski. 2017. 'Paliperidone Palmitate: Effectiveness, Safety, and the Use for Treatment of Schizophrenia'. *Psychiatria Polska* 51 (1): 7–21. <https://doi.org/10.12740/PP/64581>.
- Karim, Reatul, Elise Lepeltier, Lucille Esnault, Pascal Pigeon, Laurent Lemaire, Claire Lépinoux-Chambaud, Nicolas Clere, et al. 2018. 'Enhanced and Preferential Internalization of Lipid Nanocapsules into Human Glioblastoma Cells: Effect of a Surface-Functionalizing NFL Peptide'. *Nanoscale* 10 (28): 13485–501. <https://doi.org/10.1039/c8nr02132e>.
- Katsuki, Shunsuke, Tetsuya Matoba, Jun-Ichiro Koga, Kaku Nakano, and Kensuke Egashira. 2017. 'Anti-Inflammatory Nanomedicine for Cardiovascular Disease'. *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 4: 87. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2017.00087>.
- Lainé, A.-L., J. Gravier, M. Henry, L. Sancey, J. Béjaud, E. Pancani, M. Wiber, et al. 2014. 'Conventional versus Stealth Lipid Nanoparticles: Formulation and in Vivo Fate Prediction through FRET Monitoring'. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 188 (August): 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.05.042>.
- Ma, Chuying, Guangfu Yin, Fei You, Yan Wei, Zhongbing Huang, Xianchun Chen, and Danhong Yan. 2013. 'A Specific Cell-Penetrating Peptide Induces Apoptosis in SKOV3 Cells by down-Regulation of Bcl-2'. *Biotechnology Letters* 35 (11): 1791–97. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1263-x>.
- Maeda, H., J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, and K. Hori. 2000. 'Tumor Vascular Permeability and the EPR Effect in Macromolecular Therapeutics: A Review'. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 65 (1–2): 271–84. [https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(99\)00248-5](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(99)00248-5).
- Maeda, Hiroshi. 2012. 'Macromolecular Therapeutics in Cancer Treatment: The EPR Effect and Beyond'. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 164 (2): 138–44. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.04.038>.
- Matulonis, Ursula A., Anil K. Sood, Lesley Fallowfield, Brooke E. Howitt, Jalid Sehoul, and Beth Y. Karlan. 2016. 'Ovarian Cancer'. *Nature Reviews Disease Primers* 2 (1): 1–22. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.61>.
- Mehnert, W., and K. Mäder. 2001. 'Solid Lipid Nanoparticles: Production, Characterization and Applications'. *Advanced Drug Delivery Reviews* 47 (2–3): 165–96. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(01\)00105-3](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(01)00105-3).
- Mura, Simona, Julien Nicolas, and Patrick Couvreur. 2013. 'Stimuli-Responsive Nanocarriers for Drug Delivery'. *Nature Materials* 12 (11): 991–1003. <https://doi.org/10.1038/nmat3776>.
- Park, Haesun, Andrew Otte, and Kinam Park. 2022. 'Evolution of Drug Delivery Systems: From 1950 to 2020 and Beyond'. *Journal of Controlled Release* 342 (February): 53–65. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.12.030>.

- Passirani, C., G. Barratt, J. P. Devissaguet, and D. Labarre. 1998. 'Interactions of Nanoparticles Bearing Heparin or Dextran Covalently Bound to Poly(Methyl Methacrylate) with the Complement System'. *Life Sciences* 62 (8): 775–85. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(97\)01175-2](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(97)01175-2).
- Patel, V. K., and S. Ghosh. 2008. 'Certolizumab Pegol in Crohn's Disease'. *Drugs of Today (Barcelona, Spain: 1998)* 44 (11): 837–44. <https://doi.org/10.1358/dot.2008.44.11.1278425>.
- Perry, C. M., and B. Jarvis. 2001. 'Peginterferon-Alpha-2a (40 KD): A Review of Its Use in the Management of Chronic Hepatitis C'. *Drugs* 61 (15): 2263–88. <https://doi.org/10.2165/00003495-200161150-00013>.
- Pigeon, Pascal, Yong Wang, Siden Top, Feten Najlaoui, Maria Concepcion Garcia Alvarez, Jérôme Bignon, Michael J. McGlinchey, and Gérard Jaouen. 2017. 'A New Series of Succinimido-Ferrociphenols and Related Heterocyclic Species Induce Strong Antiproliferative Effects, Especially against Ovarian Cancer Cells Resistant to Cisplatin'. *Journal of Medicinal Chemistry* 60 (20): 8358–68. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00743>.
- Qi, Lifeng, Zirong Xu, and Minli Chen. 2007. 'In Vitro and in Vivo Suppression of Hepatocellular Carcinoma Growth by Chitosan Nanoparticles'. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 43 (1): 184–93. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2006.08.029>.
- Santos, Ana, Francisco Veiga, and Ana Figueiras. 2019. 'Dendrimers as Pharmaceutical Excipients: Synthesis, Properties, Toxicity and Biomedical Applications'. *Materials (Basel, Switzerland)* 13 (1): E65. <https://doi.org/10.3390/ma13010065>.
- Satpathy, Minati, Liya Wang, Rafal Zielinski, Weiping Qian, Malgorzata Lipowska, Jacek Capala, Gee Young Lee, et al. 2014. 'Active Targeting Using HER-2-Affibody-Conjugated Nanoparticles Enabled Sensitive and Specific Imaging of Orthotopic HER-2 Positive Ovarian Tumors'. *Small (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)* 10 (3): 544–55. <https://doi.org/10.1002/smll.201301593>.
- Schoenmaker, Linde, Dominik Witzigmann, Jayesh A. Kulkarni, Rein Verbeke, Gideon Kersten, Wim Jiskoot, and Daan J. A. Crommelin. 2021. 'mRNA-Lipid Nanoparticle COVID-19 Vaccines: Structure and Stability'. *International Journal of Pharmaceutics* 601 (May): 120586. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120586>.
- Shariati, Molood, Giovanna Lollo, Kevin Matha, Benedicte Descamps, Christian Vanhove, Leen Van de Sande, Wouter Willaert, et al. 2020. 'Synergy between Intraperitoneal Aerosolization (PIPAC) and Cancer Nanomedicine: Cisplatin-Loaded Polyarginine-Hyaluronic Acid Nanocarriers Efficiently Eradicate Peritoneal Metastasis of Advanced Human Ovarian Cancer'. *ACS Applied Materials & Interfaces*, June. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c05554>.
- Sindhvani, Shrey, Abdullah Muhammad Syed, Jessica Ngai, Benjamin R. Kingston, Laura Maiorino, Jeremy Rothschild, Presley MacMillan, et al. 2020. 'The Entry of Nanoparticles into Solid Tumours'. *Nature Materials* 19 (5): 566–75. <https://doi.org/10.1038/s41563-019-0566-2>.
- Tejada-Berges, T., C. O. Granai, M. Gordinier, and W. Gajewski. 2002. 'Caelyx/Doxil for the Treatment of Metastatic Ovarian and Breast Cancer'. *Expert Review of Anticancer Therapy* 2 (2): 143–50. <https://doi.org/10.1586/14737140.2.2.143>.
- Veronese, Francesco M., and Gianfranco Pasut. 2005. 'PEGylation, Successful Approach to Drug Delivery'. *Drug Discovery Today* 10 (21): 1451–58. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(05\)03575-0](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(05)03575-0).

Vonarbourg, Arnaud, Catherine Passirani, Patrick Saulnier, and Jean-Pierre Benoit. 2006. 'Parameters Influencing the Stealthiness of Colloidal Drug Delivery Systems'. *Biomaterials* 27 (24): 4356–73. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.03.039>.

Chapitre 1

Chapitre 1. Etat de l'art

1. Cancer de l'ovaire

1.1 Données épidémiologiques, histologiques et facteurs de risques des cancers de l'ovaire

1.1.1 Données épidémiologiques

Le cancer de l'ovaire est le 7^{ème} cancer le plus fréquent et le 8^{ème} cancer le plus mortel chez la femme dans le monde (Lisio et al. 2019). Il est la principale cause de mortalité chez la femme parmi les cancers gynécologiques. En 2018, environ 295 000 femmes étaient diagnostiquées avec un cancer de l'ovaire et environ 185 000 en succombaient la même année, dans le monde (Bray et al. 2018). Si l'on s'attarde sur les chiffres à l'échelle de la France, le cancer de l'ovaire se place au 5^{ème} rang des décès par cancer chez la femme en 2018, avec environ 3500 décès pour 5000 cancers diagnostiqués la même année. Même si les nombres de cas diagnostiqués et de décès restent bien en dessous de ceux concernant les cancers du sein ou du poumon, ce cancer n'en reste pas moins un cancer très agressif avec un faible taux de survie. Le taux de survie est directement lié à l'avancée du cancer lors du diagnostic. Etant donné que le cancer de l'ovaire est peu symptomatique et que les biomarqueurs caractéristiques sont difficilement détectables, la plupart des cancers de l'ovaire sont diagnostiqués à un stade avancé selon la classification de la Fédération Internationale de Gynécologie-Obstétrique (FIGO), stade III ou IV (**Tableau 1**). Ainsi, entre la période 2010 – 2015, le taux de survie globale à cinq ans était de 90 % pour les stades I, versus 43 % pour les stades III.

Si l'on regarde les chiffres de l'Agence Internationale de Recherche sur le cancer, pour les deux prochaines décennies (2020 – 2040), le nombre de cas de cancers de l'ovaire devrait augmenter de 37 % avec un taux de mortalité de 48 %. Cela est principalement expliqué par l'augmentation de la population mondiale et par le changement de nos modes de vie (pilule, alimentation...). Ces estimations ne peuvent évidemment prédire les possibles avancés scientifiques et technologiques qui permettraient une meilleure compréhension biologique de ce cancer et une potentielle amélioration des moyens de détection et de traitement.

Tableau 1. Classification FIGO des différents stades des cancers de l’ovaire.

Stades FIGO	Description
Stade I	La tumeur est limitée aux ovaires (un seul ou les deux)
Stade IA	Le cancer est limité à un seul ovaire et reste contenu à l’intérieur
Stade IB	Le cancer atteint les deux ovaires et reste contenu à l’intérieur
Stade IC	Le cancer touche un ou les deux ovaires, mais les cellules cancéreuses peuvent avoir traversé la capsule ovarienne, s’être propagées à la surface de l’ovaire ou se trouver dans le liquide de l’abdomen
Stade II	La tumeur se trouve dans un ou deux ovaires, avec une extension locale (extension pelvienne)
Stade IIA	Propagation de la tumeur au niveau de l’utérus ou aux trompes de Fallope. Les cellules cancéreuses ne sont pas présentes dans le liquide de l’abdomen
Stade IIB	Propagation de la tumeur à d’autres organes pelviens (vessie, rectum etc...). Les cellules cancéreuses se trouvent aussi dans le liquide abdominal
Stade III	La tumeur s’est étendue au péritoine et/ou aux ganglions lymphatiques situés dans le bassin (ganglions pelviens). Développement de métastases locales
Stade IIIA	Apparition de métastases microscopiques au niveau du péritoine
Stade IIIB	Apparition de métastases mesurant jusqu’à 2 cm au niveau du péritoine
Stade IIIC	Apparition de métastases mesurant plus de 2 cm et/ou propagation aux ganglions pelviens
Stade IV	La tumeur s’est propagée vers des organes éloignés (foie, poumon etc...). Développement de métastases à distance

1.1.2 Caractérisations génomiques et histologiques des cancers de l’ovaire

Trois familles histologiques de tumeurs de l’ovaire sont identifiées : (i) les cancers épithéliaux de l’ovaire à une fréquence de 90 % ; (ii) les cancers d’origine stromale (3 %) ; (iii) les cancers d’origine germinale (2 %). Pour 5 % des cancers de l’ovaire, aucune identification n’est possible (Torre et al. 2018; Henderson et al. 2021) (**Figure 3.a**). Les tumeurs d’origine épithéliale se développent principalement sur l’épithélium ovarien de surface (cellules épithéliales recouvrant l’ovaire) ou au niveau des trompes de Fallope (Auersperg 2013; Kindelberger et al. 2007). Parmi les tumeurs d’origine épithéliale, plusieurs sous-type histologiques ont été répertoriés et regroupés sous deux types (type I et type II) selon des facteurs clinico-pathologiques et les mutations génétiques associées.

Le carcinome (tumeur maligne) séreux de haut grade est un cancer épithélial dit de type II et est de loin le plus fréquent des sous-types histologiques, avec une fréquence d’environ 75 % (**Tableau 2**). Plus de 80 % de ces carcinomes sont caractérisés par une mutation du gène TP53 (Matulonis et al. 2016; Cancer Genome Atlas Research Network 2011; Lisio et al. 2019). Ce gène est un gène suppresseur de tumeur

ainsi qu'un gène maintenant la stabilité génomique. Il est en général inactivé et s'active une fois que la cellule est endommagée ou stressée. Ainsi, il permet de réguler le cycle cellulaire en arrêtant le processus de mitose en phase G1 et peut aussi déclencher le processus d'apoptose (Vogelstein, Lane, and Levine 2000; Chan et al. 2000; Salani et al. 2008). Ainsi, des mutations sur ce gène vont induire une levée du point de contrôle de la mitose. Cela va provoquer une accumulation d'erreurs génomiques et donc une grande instabilité chromosomique (Just, Borghese, and Alexandre 2015) (**Tableau 2**). D'après la **Figure 3.b**, c'est un carcinome très agressif et invasif puisque 51 % et 29 % sont diagnostiqués à un stade avancé, stade III ou stade IV respectivement, selon la classification FIGO (Torre et al. 2018; Henderson et al. 2021). A ces stades, la tumeur se trouve dans un ovaire ou les deux et est métastasée soit dans le péritoine (stade III) ou dans d'autres parties du corps situées à l'extérieur de l'abdomen et du bassin (stade IV) (**Tableau 1**). La seconde mutation la plus fréquente est celle des gènes BRAC1 et BRAC2. Environ 25 % des patientes atteintes d'un carcinome séreux de haut grade présentent ces mutations. Une explication plus détaillée de ces mutations sera faite au paragraphe suivant sur les facteurs de risques.

Les carcinomes que l'on regroupe sous le type I, avec une fréquence d'environ 25 %, sont les carcinomes séreux de bas grade, les carcinomes endométriaux, les carcinomes à cellules claires et les carcinomes mucineux (**Figure 3.b**). Contrairement aux carcinomes séreux de haut grade, plus de la moitié de ces carcinomes sont diagnostiqués à des stades peu avancés, stade I ou stade II, selon la classification FIGO (Henderson et al. 2021; Just, Borghese, and Alexandre 2015). C'est-à-dire que ces tumeurs se développent principalement dans un ou deux ovaires, avec très peu de métastases locales (**Tableau 1**). Une liste non exhaustive des principales mutations génétiques pour ces différents carcinomes est donnée en **Tableau 2** ((Kurman and Shih 2011). Ces gènes associés sont impliqués dans des voies de signalisation régulant la prolifération et la différenciation cellulaire. Ces tumeurs présentent très rarement des mutations du gène TP53, d'où leur stabilité chromosomique. La première voie de traitement consiste en une chirurgie suivie d'une chimiothérapie à base de carboplatine / paclitaxel (**Tableau 2**). Ces tumeurs de type I sont peu sensibles à la chimiothérapie mais du fait de leur stade peu avancé et de leur croissance lente, le traitement permet d'avoir un taux de survie sur 5 ans supérieur à 70 % (Kaldawy et al. 2016).

Dans ce projet, l'intérêt est porté au cancer épithélial séreux de haut grade. Les tumeurs épithéliales de type I ne seront donc pas détaillées par la suite.

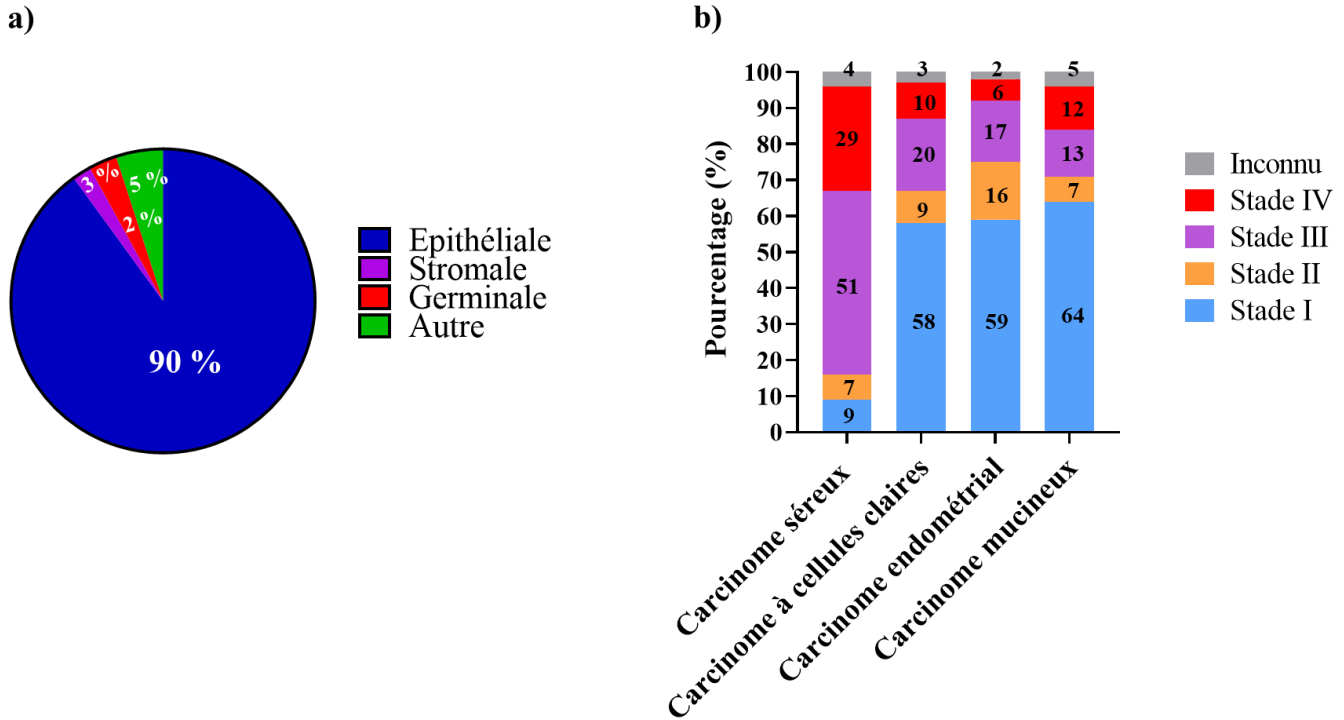


Figure 3. a) Représentation des différentes origines des cancers de l'ovaire et de l'incidence correspondante (Torre et al. 2018; Henderson et al. 2021); b) Histologie des cancers épithéliaux de l'ovaire ainsi que l'expression en pourcentage des stades selon la classification FIGO (Torre et al. 2018; Henderson et al. 2021).

1.1.3 Facteurs de risques

Le premier facteur de risque est l'âge des patientes. En effet, le cancer de l'ovaire est très rare chez la femme jeune. Le risque de développer un cancer de l'ovaire augmente avec l'âge, plus nettement après 50 ans. La moyenne d'âge d'apparition des tumeurs épithéliales de l'ovaire est de 64 ans. Cependant, 12,1 % de ces tumeurs sont diagnostiquées avant 44 ans, notamment chez les patientes porteuses des mutations des gènes BRAC1 et BRAC2 (Geoffron et al. 2021). Il est ainsi possible de dire que le cancer de l'ovaire est principalement un cancer de la femme ménopausée.

Un second facteur, physiologique, qui accentuerait le risque est lié à l'activité génitale de la femme. En effet, l'ovulation a lieu en moyenne une fois par mois. Lors de l'ovulation, l'épithélium ovarien de surface, tissu épithélial recouvrant les ovaires, se rompt pour entraîner la libération d'un ovocyte vers l'utérus en passant par les trompes de Fallope. Une fois la libération faite, un processus de cicatrisation a lieu via la prolifération de cellules épithéliales. Ces répétitions fréquentes pourraient être à l'origine de mutations responsables de l'apparition d'un cancer épithélial de l'ovaire, provoquant de possibles dommages au niveau de l'ADN (Fathalla 2013). Une hypothèse émise en 1971 (Fathalla 1971) et confirmée par plusieurs études épidémiologiques et de méta-analyses depuis 2008 décrit que l'utilisation de la contraception orale oestroprogestative est associée à une réduction du risque d'apparition des

carcinomes séreux, endométriaux et à cellules claires (Fathalla 2013; Havrilesky et al. 2013).

Un autre facteur de risque, considéré comme le principal, est la présence d'antécédents familiaux au premier degré. Entre 10 à 15 % des cancers épithéliaux de l'ovaire sont d'origine héréditaire, c'est-à-dire qu'ils sont associés à une mutation d'un gène de prédisposition. Ces gènes de prédisposition au cancer de l'ovaire sont les gènes BRAC1 et BRAC2, qui sont aussi des gènes de prédisposition au cancer du sein. On parle dans ce cas de syndromes BRAC1 et BRAC2 ou encore de syndromes sein-ovaire (Just, Borghese, and Alexandre 2015). La plupart des cancers épithéliaux de l'ovaire associés à une mutation BRAC1/2 sont de type séreux de haut grade (**Tableau 2**). Une large étude de données réalisée en 2017 et qui recense les résultats d'études nationales principalement réalisées aux Royaume-Unis, aux Pays-Bas et en France entre la période 1997 – 2011, a montré que le risque cumulé à 80 ans de développer un cancer de l'ovaire était de 44 % en cas de mutation de BRAC1 et de 17 % en cas de mutation de BRAC2 (Kuchenbaecker et al. 2017). Les gènes BRAC1 et BRAC2 sont des gènes suppresseurs de tumeurs qui vont coder pour des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN (da Cunha Colombo Bonadio et al. 2018; De Picciotto et al. 2016). Ils permettent donc de maintenir l'intégrité du génome. La principale voie de réparation de l'ADN est la recombinaison homologue qui permet de protéger le génome des cassures double-brins de l'ADN, considérées comme la principale forme de dommage sur l'ADN (da Cunha Colombo Bonadio et al. 2018; De Picciotto et al. 2016). En plus des mutations de BRAC1 et BRAC2, d'autres gènes de la voie de la recombinaison homologue peuvent être altérés dans les carcinomes séreux de haut grade. L'ensemble de ces altérations et donc une défaillance de la recombinaison homologue seraient présentes dans environ 50 % des tumeurs épithéliales séreuses de haut grade (Just, Borghese, and Alexandre 2015; Cancer Genome Atlas Research Network 2011).

Enfin, comme pour beaucoup de cancers, l'environnement a aussi un impact sur l'apparition des cancers de l'ovaire. Ainsi, plusieurs méta-analyses ont confirmé que le tabac pouvait provoquer un risque supplémentaire de survenue de carcinome mucineux. Aucun lien n'a été montré sur les autres types histologiques : endométrial, à cellules claires, séreux de bas ou haut grade (Faber et al. 2013; 'Ovarian Cancer and Smoking: Individual Participant Meta-Analysis Including 28 114 Women with Ovarian Cancer from 51 Epidemiological Studies' 2012). Cependant, une méta-analyse publiée en 2018 a mis en évidence un lien entre l'utilisation du talc périnéal et l'apparition de carcinomes séreux (Berge et al. 2018).

1.2 Traitements actuels du cancer épithélial de l'ovaire séreux de haut grade

Comme expliqué précédemment, ce projet se concentrera sur le cancer épithélial de l'ovaire de haut grade, dit de type II, représentant 75 % des cancers ovariens d'origine épithéliale (**Tableau 2**).

1.2.1 Chirurgie

Le cancer épithélial séreux de haut grade est un cancer souvent diagnostiqué à un stade avancé où la dissémination des cellules cancéreuses vers le péritoine a déjà commencé. Le standard thérapeutique de premier choix reste donc la réalisation d'une chirurgie de cytoréduction si l'exérèse macroscopiquement complète est jugée possible par les chirurgiens. C'est une pratique chirurgicale très lourde pour la patiente (ablation de l'utérus, ablation des trompes de Fallope, ablation des ovaires). Ainsi, l'état général de la patiente et sa capacité à supporter l'intervention est aussi un facteur à prendre en compte avant de réaliser l'intervention. La survie de la patiente est significativement corrélée à la taille des résidus tumoraux qui n'ont pas pu être retirés lors de l'intervention chirurgicale. Ainsi, une méta-analyse publiée en 2012 a montré que la médiane de survie globale (cohorte de 203 patientes) diminuait à 37 mois lorsqu'un résidu tumoral de plus de 1 cm était laissé, contre 86 mois pour une chirurgie de cytoréduction complète (Chang, Bristow, and Ryu 2012). Cependant, la chirurgie de cytoréduction n'est complète que d'un point de vue macroscopique. Il existe très souvent des résidus tumoraux microscopiques en fin d'intervention, provoquant ainsi un taux de récurrence péritonéal élevé (environ 60 % deux ans après intervention).

1.2.2 Chimiothérapie

Après chirurgie ou lorsque l'exérèse macroscopiquement complète n'est pas jugée possible par le chirurgien, un traitement par chimiothérapie est prodigué à la patiente. La chimiothérapie de référence consiste à associer un traitement à base de platine (cisplatine ou carboplatine) et de paclitaxel toutes les trois semaines. Selon le stade de la tumeur (stade III ou stade IV), le nombre de cycles de chimiothérapie varie de six à huit. L'association de ces traitements a permis d'améliorer significativement la médiane de survie des patientes avec une rémission chez environ 80 % des patientes. La sensibilité initiale de la plupart des patientes pour le cisplatine ou le carboplatine s'explique par le fait que plus de 50 % ont une défaillance de la recombinaison homologue (da Cunha Colombo Bonadio et al. 2018; De Picciotto et al. 2016). Comme expliqué précédemment, c'est un processus qui permet de réparer les dommages sur l'ADN. Le cisplatine et le carboplatine sont des agents alkylants de l'ADN (Reedijk 2009). Ainsi, étant donné la défaillance de la recombinaison homologue, processus principal pour réparer l'ADN, l'apoptose des cellules cancéreuses sera dans un premier temps très efficace. Cependant, environ 80 % de ces patientes rechutent et développent des résistances aux traitements à base de platine (Matulonis et al. 2016). Cela peut s'expliquer notamment par des phénomènes de seconde mutation sur les gènes BRAC1 et BRAC2 qui vont restaurer les gènes initiaux. Ainsi, ces gènes pourront à nouveau coder pour activer la recombinaison homologue, induisant ainsi des réparations de l'ADN endommagé (De Picciotto et al. 2016; da Cunha Colombo Bonadio et al. 2018).

Certaines techniques ont été développées pour traiter de façon locale, après chirurgie de cytoréduction, les résidus tumoraux toujours présents en fin d'intervention. Par exemple, la chimiothérapie hyperthermique intrapéritonéale (CHIP) consiste à appliquer une solution à base de carboplatine,

chauffée à une température de 40 – 41 °C pour traiter les résidus tumoraux microscopiques. Cela permet une application tissulaire locale de la substance active, combinée à l'effet cytotoxique de l'hyperthermie. Cependant, son utilisation reste toujours controversée et aucun consensus international n'a été trouvé. Par exemple, cette voie de traitement post-chirurgicale est autorisée en France, alors que les instances européennes ne la recommandent pas (Lavoue et al. 2019; Colombo et al. 2019).

1.2.3 Thérapie ciblées

Les connaissances génomiques des mécanismes biologiques et moléculaires des cellules cancéreuses et du micro-environnement tumoral ont particulièrement progressées, permettant des avancées majeures dans le domaine des thérapies ciblées. En effet, les processus participant à la croissance tumorale et à la dissémination des cellules cancéreuses ou encore les processus participant à la réparation de l'ADN sont devenus des cibles de choix dans le traitement du cancer épithélial de l'ovaire séreux de haut grade.

a. Voies pro-angiogéniques

Le micro-environnement tumoral est constitué d'une variété de cellules comme les fibroblastes, les cellules immunitaires, les cellules endothéliales (vaisseaux sanguins et vaisseaux lymphatiques) mais aussi de composés non-cellulaires participant à la composition de la matrice extracellulaire (MEC) (protéines fibreuses, protéoglycanes), d'enzymes remodelant la MEC (métalloprotéases matricielles) ou encore de facteurs de croissances (Cho, Howell, and Colvin 2015; Petrova et al. 2018). Le micro-environnement tumoral peut être une source de résistance aux thérapies anti-cancéreuses (Sun 2016) mais l'avoir pour cible thérapeutique pourrait être une stratégie de choix (Roma-Rodrigues et al. 2019). L'angiogenèse est un phénomène essentiel dans la croissance tumorale et dans la dissémination des cellules tumorales, phénomène dû à la surexpression des facteurs de croissances de l'endothélium vasculaire. C'est dans l'idée de cibler ces facteurs de croissance qu'ont été développés les anti-angiogéniques.

Le bévacizumab est un anticorps monoclonal qui cible les facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire et qui va permettre ensuite son inactivation. Il est actuellement le seul anti-angiogénique à avoir une autorisation de mise sur le marché (AMM) pour traiter, en combinaison avec la chimiothérapie, les cancers de l'ovaire, dont le carcinome séreux de haut grade (Matulonis et al. 2016; Lisio et al. 2019).

b. Inhibiteurs de la poly(ADP-ribose) polymérase (PARP)

➔ Rôle de la protéine PARP

Au cours de l'existence d'une cellule, l'ADN est continuellement soumis à des dommages provenant de produits toxiques ou encore d'une mauvaise réplication de l'ADN. Ces altérations sont d'origines multiples : modifications d'une base purique (adénine, guanine) ou d'une base pyrimidique (cytosine, thymine, uracile) dans la séquence ; cassure d'un brin de l'ADN ; cassure double-brins de l'ADN ; réticulation inter ou intra brin de l'ADN (Papa et al. 2016). Afin de réparer ces lésions et de maintenir

l'intégrité génomique, les cellules ont développé des mécanismes de réparation de l'ADN. Par exemple, pour réparer les cassures double-brins de l'ADN, la voie de la recombinaison homologe est activée, comme déjà abordée précédemment dans cette partie (da Cunha Colombo Bonadio et al. 2018). Quant aux cassures simple-brin, qui sont les altérations les plus fréquentes, trois mécanismes de réparation ont été identifiés : réparation de mésappariement de bases ; réparation par excision de nucléotides ; réparation par excision de base. Ce dernier mécanisme est activé par une protéine nucléaire, PARP-1 (responsable de plus de 90 % des activations) qui va reconnaître et se lier au brin d'ADN cassé (Papa et al. 2016).

➔ Action des inhibiteurs PARP

Cette découverte du rôle de la protéine PARP-1 dans les mécanismes de réparation de l'ADN a permis de développer une thérapie ciblée à travers l'inhibition de ce mécanisme d'action. Ces nouveaux médicaments sont appelés des inhibiteurs PARP. Beaucoup de praticiens considèrent cette avancée thérapeutique comme l'une des plus grandes de la dernière décennie.

Les essais cliniques (Phase I, Phase II et Phase III) réalisés avec le premier inhibiteur PARP appelé olaparib, approuvé depuis par les instances internationales de santé (FDA et EMA), ont montré que ce médicament induisait une réponse positive uniquement chez les patientes présentant une mutation des gènes BRAC1/2 (Audeh et al. 2010; Gelmon et al. 2011). Les cellules des patientes atteintes d'une mutation BRAC1/2 et traitées par olaparib sont ainsi privées de deux mécanismes de réparation de l'ADN, la voie de la recombinaison homologe via les mutations BRAC1/2, et la voie de la réparation par excision de base (Papa et al. 2016) : il a ainsi été déduit qu'un phénomène de létalité synthétique, mort cellulaire obtenue par la synergie d'action de deux événements non létaux individuellement, était responsable de l'activité thérapeutique de l'olaparib.

Tableau 2. Différence histologique, génomique et de traitement entre les cancers épithéliaux de l'ovaire de type I et de type II

Cancer épithélial de l'ovaire	Type I	Type II
Histologie	Séreux de bas grade Endométrial Cellules claires Mucineux	Séreux de haut grade
Fréquence (%)	25	75
Prédisposition génétique et/ou mutation (fréquence en %)	KRAS et BRAF (> 50 %) HER2, PTEN, PI3K	TP53 (> 80 %) BRAC1 et BRAC2 (≈ 15 %)
Instabilité chromosomique	Faible	Forte
Recombinaison homologue	Active	Défaillante
Traitement	Chirurgie Peu sensible au carboplatine ou cisplatine (mais 1 ^{ère} voie de traitement)	Chirurgie Sensible au carboplatine ou cisplatine mais rechute fréquente Inhibiteur PARP Bévacizumab

1.3 Essais cliniques sur le cancer épithélial de l'ovaire séreux de haut grade

La plupart des essais cliniques réalisés pendant la dernière décennie sur le cancer épithélial de l'ovaire de haut grade se sont axés sur la combinaison de différents traitements, souvent approuvés, afin de surmonter les résistances développées (Lee, Minasian, and Kohn 2019). Plusieurs traitements par immunothérapie (anticorps monoclonaux) ont été combinés avec le Doxil® ou avec la chimiothérapie conventionnelle (carboplatine et paclitaxel). Par exemple, l'essai clinique de phase III JAVELIN Ovarian 200, consistait à étudier le potentiel bénéfique de l'anticorps monoclonal avélumab, seul ou en combinaison avec le Doxil®. Les résultats de l'essai n'ont montré aucune amélioration du taux de survie des patientes avec la monothérapie à l'avélumab ou avec la combinaison au Doxil®, par rapport au Doxil® seul (Pujade-Lauraine et al. 2021). Ce même anticorps monoclonal a aussi été testé en combinaison avec le carboplatine et le paclitaxel (essai clinique JAVELIN Ovarian 100) pour un résultat similaire (Monk et al. 2021). A ce jour, aucun bénéfice de l'immunothérapie n'a été mis en évidence sur le cancer épithélial de l'ovaire. D'autres essais cliniques ont consisté à combiner des inhibiteurs PARP avec des anti-angiogéniques, sans grand succès non plus par rapport à la chimiothérapie classique (Liu et al. 2022).

Des essais cliniques ont aussi été réalisés avec de nouvelles molécules et/ou avec de nouveaux moyens

de délivrance en association avec des traitements déjà approuvés (inhibiteurs PARP, Doxil®, bevacizumab, carboplatine). Ces nouvelles molécules ont pour but de proposer des alternatives aux traitements actuels. Parmi ces molécules, il est possible de trouver des inhibiteurs de la sérine/thréonine-protéine kinase ATR (enzyme activée pour répondre aux cassures simple-brin de l'ADN), des inhibiteurs de points de contrôle du cycle cellulaire ainsi que des modulateurs épigénétiques pour la réactivation de certains gènes (McMullen et al. 2020). Par exemple, deux essais cliniques PiSARRO (NCT02098343) et PiSARRO-R (NCT03268382) ont utilisé la molécule APR-246, pouvant réactiver la protéine mutante p53 exprimé par la mutation du gène TP53, en combinaison avec le carboplatine et/ou le Doxil® (Gourley et al. 2016; Aprea Therapeutics 2022). Cette molécule APR-246 est très intéressante car elle forme un métabolite actif électrophile, appelé accepteur de Michael, capable de réagir avec des cystéines de la protéine mutante p53 (Zhang et al. 2018). Les résultats du premier essai clinique PiSARRO (NCT02098343) ont confirmé que APR-246 pouvait surmonter la résistance au carboplatine comme observé pré-cliniquement (Mohell et al. 2015). Enfin, l'essai clinique NCT0165207 a cette fois-ci testé la combinaison d'un nanomédicament avec l'anti-angiogénique bévacizumab. Le nanomédicament utilisé était le CRLX101, un conjugué cyclodextrine-polymère-camptothécine capable de s'auto-assembler pour former des nanoparticules. Les résultats obtenus ont montré que l'association avec le bévacizumab pouvait être une stratégie intéressante avec une toxicité limitée sur les patientes (Krasner et al. 2021).

Bien que beaucoup d'essais cliniques aient été réalisées, la plupart font appel à des traitements déjà approuvés et pour lesquels certaines résistances apparaissent. Les essais cliniques utilisant un nanomédicament ont principalement été menés avec le Doxil®. Quelques-uns ont été réalisés avec des nanoparticules de paclitaxel (Abraxane®) ou encore avec le CRLX101 (Martín-Sabroso et al. 2021). Cependant leur nombre reste toutefois limité, malgré un nombre important de recherches précliniques sur de nouveaux nanomédicaments.

1.4 Nanomédicaments développés contre le cancer épithélial de l'ovaire séreux de haut grade

Les thérapies actuelles pour traiter le cancer épithélial de l'ovaire présentent des effets indésirables conséquents. Par exemple, même si une administration de la chimiothérapie par voie intrapéritonéale contribue à une amélioration de la survie des patientes comparée à une administration par voie intraveineuse, elle s'accompagne aussi d'un risque accru de toxicité pour les tissus (Tewari et al. 2015; Armstrong et al. 2006). Ainsi, afin d'augmenter l'index thérapeutique des principaux composés de chimiothérapie (paclitaxel, carboplatine, doxorubicine), les nano-systèmes sont des outils de choix. Ils permettent l'encapsulation et la protection de ces molécules et améliorent leur diffusion à travers les différentes barrières biologiques, conférant ainsi une meilleure biodisponibilité de l'actif. La surface de ces vecteurs peut également être fonctionnalisée par des ligands, afin de cibler spécifiquement les cellules tumorales. Beaucoup de nanomédicaments ont été développés et testés *in vitro* et/ou *in vivo*

pour cibler spécifiquement les cancers épithéliaux de l'ovaire (majoritairement les séreux de haut grade) en jouant sur la surexpression de différents types de récepteurs au niveau des cellules (surexpression de glycoprotéines, surexpression de récepteurs aux facteurs de croissances) (Cho, Howell, and Colvin 2015; Z. Wang, Meng, and Zhong 2021) et en tirant partie de l'effet EPR. Le seul cliniquement approuvé est d'ailleurs le Doxil®, liposomes PEGylés encapsulant la doxorubicine, utilisé en seconde intention comme expliqué dans l'introduction générale (Tejada-Berges et al. 2002). L'utilisation du PEG confère à ce nanomédicament des propriétés de furtivité qui lui permettent de s'accumuler au niveau du site tumoral via l'effet EPR. Les principales cibles surexprimées par les cellules cancéreuses ovariennes sont les récepteurs folates (glycoprotéines transmembranaires) présents chez plus de 80 % des patientes (Birrer et al. 2019), les récepteurs CD44 (glycoprotéines transmembranaires) (Gao et al. 2015), les récepteurs de facteurs de croissance épithéliaux (HER1 et HER2 étant les plus exprimés) (Mehner et al. 2017), les intégrines (glycoprotéines) (Dhaliwal and Shepherd 2022), certaines hormones et enzymes (Z. Wang, Meng, and Zhong 2021). Ainsi, plusieurs nano-systèmes ont été formulés, que ce soit des dendrimères, des nanoparticules de polymères, des nanoparticules lipidiques ou encore des nanoparticules inorganiques dont la surface a été modifiée par des ligands spécifiques ciblant les récepteurs précédemment cités, comme l'acide folique (ciblant les récepteurs folate) (Cruz et al. 2020; Luiz et al. 2019), l'acide hyaluronique (ciblage de CD44) (Shariati et al. 2020; L. Wang and Jia 2016), l'anticorps monoclonal C225 (ciblage de HER1) (Kotcherlakota et al. 2019) et des peptides pénétrants (ciblage des intégrines) (Kulhari et al. 2016; Xiao et al. 2012).

Enfin, lorsque les nanomédicaments sont administrés, il est important de réaliser des études de biodistribution et de toxicité au niveau des principaux organes. Les quelques études réalisées sur l'accumulation des nanoparticules et l'impact potentiel sur les ovaires sont arrivées aux mêmes résultats. Quelle que soit la nature des nanomédicaments utilisés (lipidiques, de polymère, inorganiques), les études de biodistribution ont montré qu'ils s'accumulaient au niveau des ovaires (Lainé et al. 2014; Schädlich et al. 2012; Poley et al. 2022). De plus, l'étude la plus récente, de 2022, a montré que cette accumulation était dépendante du cycle menstruel. En effet, lors de l'ovulation, une accumulation plus importante des nanoparticules était observée. Cela s'explique par le fait que lors de l'ovulation, un phénomène d'angiogenèse important a lieu au niveau des ovaires et de l'utérus. Cela s'accompagne par une augmentation des facteurs de croissance de l'endothélial vasculaire et une perméabilité accrue des vaisseaux sanguins (Poley et al. 2022). Cet effet ouvre de nouvelles perspectives pour le traitement du cancer épithélial de l'ovaire. En effet, il serait important de prendre en compte le cycle menstruel lors de l'administration des nanomédicaments. Cependant, cela amène aussi à une toxicité accrue pouvant notamment engendrer un problème de fertilité (Poley et al. 2022; R. Wang et al. 2018).

1.5 Rôle du stress oxydant dans la sensibilité à la chimiothérapie du cancer épithélial de l'ovaire séreux de haut grade

1.5.1 Effet paradoxal des espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Parmi les différentes caractéristiques des cancers, l'hétérogénéité du métabolisme des cellules cancéreuses, notamment du métabolisme énergétique, est devenu l'objet d'études approfondies. La prolifération cellulaire chronique des cellules cancéreuses, souvent incontrôlée, est aussi due au métabolisme énergétique des cellules (Hanahan 2011). La production de l'énergie (ATP) se fait via les mitochondries selon deux principaux mécanismes complémentaires : le cycle de Krebs (cycle de l'acide citrique) et la phosphorylation oxydative. De par le mécanisme de la phosphorylation oxydative, les mitochondries sont l'un des organites produisant le plus d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Les ROS sont des métabolites de l'oxygène, hautement réactifs, dont le niveau est maintenu par des systèmes de défense anti-oxydants dont les principaux sont le système du glutathion et le système de la thioredoxine (Kardeh, Ashkani-Esfahani, and Alizadeh 2014; Arnér and Holmgren 2006). Les différentes études menées sur le rôle des ROS d'un point de vue biologique ont mis en évidence un effet paradoxal de ces composés (Kardeh, Ashkani-Esfahani, and Alizadeh 2014). En effet, les ROS jouent un rôle dans le maintien de l'homéostasie cellulaire, dans la protection des cellules, dans la régulation des facteurs de transcription ainsi que dans le contrôle de la prolifération cellulaire en induisant des phénomènes d'apoptose et donc dans la défense contre le cancer. Paradoxalement, un excès de ROS peut endommager les protéines cellulaires et l'ADN, provoquer la peroxydation des lipides, menant à des dommages fatals au niveau cellulaire. Ces espèces sont aussi responsables de la carcinogénèse via notamment l'induction de phénomènes d'angiogénèse et d'inflammation (Kardeh, Ashkani-Esfahani, and Alizadeh 2014). C'est en connaissant cette dualité de mécanismes que des thérapies générant des ROS au sein des cellules cancéreuses ont vu le jour, comme le carboplatine ou la doxorubicine. Cependant, du fait d'un stress oxydatif chronique plus élevé que dans les cellules normales, les cellules cancéreuses ont développé leur propre système de défense anti-oxydants. Ainsi, combiner plusieurs générateurs de ROS ou un composé ciblant les systèmes de défense anti-oxydants avec un générateur de ROS pourrait être une stratégie thérapeutique intéressante.

1.5.2 Rôle du stress oxydant dans le cancer épithélial de l'ovaire séreux de haut grade

L'équipe du Dr. Mechta-Grigoriou de l'Institut Curie s'est intéressée à catégoriser de manière précise le cancer épithélial de l'ovaire séreux de haut grade en se concentrant en particulier sur le rôle du stress oxydant. L'objectif était de déterminer de nouvelles pistes thérapeutiques permettant de traiter le carcinome séreux de haut grade, sous-type histologique le plus récurrent. Ainsi, dans une étude publiée en 2011, l'équipe a fait une corrélation entre l'expression d'une famille de micro-ARN, miRNA-200, et deux catégories de patientes, celle présentant une signature type « fibreuse » et celle présentant une signature de type « stress oxydant ». De plus, bien que l'accumulation chronique de ROS favorise la croissance tumorale, les patientes à la signature « stress oxydant » ont une meilleure sensibilité à la

chimiothérapie, notamment à base de paclitaxel (Mateescu et al. 2011; Batista, Grusso, and Mehta-Grigoriou 2013). Une étude plus récente publiée en 2019 a confirmé le rôle du stress oxydant dans la sensibilité des carcinomes séreux de haut grade à la chimiothérapie. En effet, en combinant des analyses génomiques, protéomiques et bioénergétiques, la même équipe a cette fois-ci classifié les carcinomes séreux de haut grade selon leur métabolisme mitochondrial. Les tumeurs caractérisées par un métabolisme mitochondrial reposant sur la phosphorylation oxydative et le cycle de Krebs, présentent un stress oxydatif chronique et sont sensibles au carboplatine. Les tumeurs caractérisées par une production d'énergie via le métabolisme du glucose et présentant donc peu de stress oxydant, sont peu sensibles au carboplatine. Ces différences de métabolisme ont permis la catégorisation suivante : les tumeurs séreuses de haut grade dites « High OXPHOS » et les tumeurs séreuses de haut grade dites « Low OXPHOS ».

Comme décrit précédemment, le cancer épithélial de l'ovaire séreux de haut grade est un cancer souvent diagnostiqué à un stade avancé (stade III ou stade IV), nécessitant une chirurgie de cytoréduction suivi d'un cycle de traitement par chimiothérapie. Les inconvénients des traitements actuels pour la patiente, les rechutes fréquentes liées aux phénomènes de résistance, responsables du faible taux de survie à 5 ans, entraînent la nécessité de trouver de nouveaux traitements ou de nouvelles combinaisons de traitements. Ainsi, en s'appuyant sur les travaux de l'équipe du Dr. Mehta-Grigoriou et sur le rôle des ROS comme stratégie thérapeutique, imaginer une thérapie qui associerait un générateur de ROS à la chimiothérapie actuelle pourrait être une stratégie intéressante pour traiter le carcinome séreux de haut grade, notamment pour sensibiliser les tumeurs dites « Low OXPHOS ». C'est donc dans cette optique que les ferrocifènes ont été utilisés dans ce projet. Les différents mécanismes d'action de ces molécules ainsi que les résultats *in vivo* obtenus sur des cancers multi-résistants (glioblastome, mélanome métastatique, cancer du sein triple-négatif) seront décrits dans la partie suivante, à travers une revue bibliographique publiée dans *Cancers* en 2021.

1.6 Références

- Aprea Therapeutics. 2022. 'PiSARRO-R: P53 Suppressor Activation in Platinum-Resistant High Grade Serous Ovarian Cancer, a Phase II Study of Systemic Pegylated Liposomal Doxorubicin Chemotherapy With APR-246'. Clinical trial registration NCT03268382. [clinicaltrials.gov. https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03268382](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03268382).
- Armstrong, Deborah K., Brian Bundy, Lari Wenzel, Helen Q. Huang, Rebecca Baergen, Shashikant Lele, Larry J. Copeland, Joan L. Walker, Robert A. Burger, and Gynecologic Oncology Group. 2006. 'Intraperitoneal Cisplatin and Paclitaxel in Ovarian Cancer'. *The New England Journal of Medicine* 354 (1): 34–43. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa052985>.
- Arnér, Elias S. J., and Arne Holmgren. 2006. 'The Thioredoxin System in Cancer'. *Seminars in Cancer Biology*, The Thioredoxin System in Cancer, 16 (6): 420–26. <https://doi.org/10.1016/j.semcan.2006.10.009>.
- Audeh, M. William, James Carmichael, Richard T. Penson, Michael Friedlander, Bethan Powell, Katherine M. Bell-McGuinn, Clare Scott, et al. 2010. 'Oral Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibitor Olaparib in Patients with BRCA1 or BRCA2 Mutations and Recurrent Ovarian Cancer: A Proof-of-Concept Trial'. *Lancet (London, England)* 376 (9737): 245–51. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60893-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60893-8).
- Auersperg, Nelly. 2013. 'The Origin of Ovarian Cancers--Hypotheses and Controversies'. *Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)* 5 (2): 709–19. <https://doi.org/10.2741/s401>.
- Batista, L., T. Gruosso, and F. Mehta-Grigoriou. 2013. 'Ovarian Cancer Emerging Subtypes: Role of Oxidative Stress and Fibrosis in Tumour Development and Response to Treatment'. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 45 (6): 1092–98. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.03.001>.
- Berge, Wera, Kenneth Mundt, Hung Luu, and Paolo Boffetta. 2018. 'Genital Use of Talc and Risk of Ovarian Cancer: A Meta-Analysis'. *European Journal of Cancer Prevention: The Official Journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)* 27 (3): 248–57. <https://doi.org/10.1097/CEJ.0000000000000340>.
- Birrer, Michael J., Ilaria Betella, Lainie P. Martin, and Kathleen N. Moore. 2019. 'Is Targeting the Folate Receptor in Ovarian Cancer Coming of Age?' *The Oncologist* 24 (4): 425–29. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2018-0459>.
- Bray, Freddie, Jacques Ferlay, Isabelle Soerjomataram, Rebecca L. Siegel, Lindsey A. Torre, and Ahmedin Jemal. 2018. 'Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries'. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 68 (6): 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
- Cancer Genome Atlas Research Network. 2011. 'Integrated Genomic Analyses of Ovarian Carcinoma'. *Nature* 474 (7353): 609–15. <https://doi.org/10.1038/nature10166>.
- Chan, W. Y., K. K. Cheung, J. O. Schorge, L. W. Huang, W. R. Welch, D. A. Bell, R. S. Berkowitz, and S. C. Mok. 2000. 'Bcl-2 and P53 Protein Expression, Apoptosis, and P53 Mutation in Human Epithelial Ovarian Cancers'. *The American Journal of Pathology* 156 (2): 409–17. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64744-X](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64744-X).

- Chang, Suk-Joon, Robert E. Bristow, and Hee-Sug Ryu. 2012. 'Impact of Complete Cytoreduction Leaving No Gross Residual Disease Associated with Radical Cytoreductive Surgical Procedures on Survival in Advanced Ovarian Cancer'. *Annals of Surgical Oncology* 19 (13): 4059–67. <https://doi.org/10.1245/s10434-012-2446-8>.
- Cho, Angela, Viive M. Howell, and Emily K. Colvin. 2015. 'The Extracellular Matrix in Epithelial Ovarian Cancer – A Piece of a Puzzle'. *Frontiers in Oncology* 5. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2015.00245>.
- Colombo, N., C. Sessa, A. du Bois, J. Ledermann, W. G. McCluggage, I. McNeish, P. Morice, et al. 2019. 'ESMO-ESGO Consensus Conference Recommendations on Ovarian Cancer: Pathology and Molecular Biology, Early and Advanced Stages, Borderline Tumours and Recurrent Disease†'. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 30 (5): 672–705. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz062>.
- Cruz, Adriana, Pedro Mota, Cristiano Ramos, Rita F. Pires, Cindy Mendes, José P. Silva, Sofia C. Nunes, Vasco D. B. Bonifácio, and Jacinta Serpa. 2020. 'Polyurea Dendrimer Folate-Targeted Nanodelivery of L-Buthionine Sulfoximine as a Tool to Tackle Ovarian Cancer Chemoresistance'. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 9 (2): E133. <https://doi.org/10.3390/antiox9020133>.
- Cunha Colombo Bonadio, Renata Rodrigues da, Rodrigo Nogueira Fogace, Vanessa Costa Miranda, and Maria del Pilar Estevez Diz. 2018. 'Homologous Recombination Deficiency in Ovarian Cancer: A Review of Its Epidemiology and Management'. *Clinics* 73 (Suppl 1). <https://doi.org/10.6061/clinics/2018/e450s>.
- De Picciotto, Nicolas, Wulfran Cacheux, Arnaud Roth, Pierre O. Chappuis, and S. Intidhar Labidi-Galy. 2016. 'Ovarian Cancer: Status of Homologous Recombination Pathway as a Predictor of Drug Response'. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 101 (May): 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2016.02.014>.
- Dhaliwal, Dolly, and Trevor G. Shepherd. 2022. 'Molecular and Cellular Mechanisms Controlling Integrin-Mediated Cell Adhesion and Tumor Progression in Ovarian Cancer Metastasis: A Review'. *Clinical & Experimental Metastasis* 39 (2): 291–301. <https://doi.org/10.1007/s10585-021-10136-5>.
- Faber, Mette T., Susanne K. Kjær, Christian Dehrendorff, Jenny Chang-Claude, Klaus K. Andersen, Estrid Høgdall, Penelope M. Webb, et al. 2013. 'Cigarette Smoking and Risk of Ovarian Cancer: A Pooled Analysis of 21 Case–Control Studies'. *Cancer Causes & Control : CCC* 24 (5): 10.1007/s10552-013-0174–4. <https://doi.org/10.1007/s10552-013-0174-4>.
- Fathalla, M. F. 1971. 'Incessant Ovulation--a Factor in Ovarian Neoplasia?' *Lancet (London, England)* 2 (7716): 163. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(71\)92335-x](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(71)92335-x).
- Fathalla, M.F. 2013. 'Incessant Ovulation and Ovarian Cancer – a Hypothesis Re-Visited'. *Facts, Views & Vision in ObGyn* 5 (4): 292–97.
- Gao, Yan, Rosemary Foster, Xiaoqian Yang, Yong Feng, Jacson K. Shen, Henry J. Mankin, Francis J. Hornicek, Mansoor M. Amiji, and Zhenfeng Duan. 2015. 'Up-Regulation of CD44 in the Development of Metastasis, Recurrence and Drug Resistance of Ovarian Cancer'. *Oncotarget* 6 (11): 9313–26. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3220>.
- Gelmon, Karen A., Marc Tischkowitz, Helen Mackay, Kenneth Swenerton, André Robidoux, Katia Tonkin, Hal Hirte, et al. 2011. 'Olaparib in Patients with Recurrent High-Grade Serous or Poorly

- Differentiated Ovarian Carcinoma or Triple-Negative Breast Cancer: A Phase 2, Multicentre, Open-Label, Non-Randomised Study'. *The Lancet. Oncology* 12 (9): 852–61. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(11\)70214-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70214-5).
- Geoffron, S., A. Lier, E. de Kermadec, N. Sermondade, J. Varinot, I. Thomassin-Naggara, S. Bendifallah, E. Daraï, N. Chabbert-Buffet, and K. Kolanska. 2021. 'Fertility Preservation in Women with Malignant and Borderline Ovarian Tumors: Experience of the French ESGO-Certified Center and Pregnancy-Associated Cancer Network (CALG)'. *Gynecologic Oncology* 161 (3): 817–24. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2021.03.030>.
- Gourley, Charlie, John Green, Hani Gabra, Ignace Vergote, Bristi Basu, James D. Brenton, Ulf Björklund, Austin M. Smith, and Mikael Von Euler. 2016. 'PISARRO: A EUTROC Phase Ib Study of APR-246 in Combination with Carboplatin (C) and Pegylated Liposomal Doxorubicin (PLD) in Platinum Sensitive Relapsed High Grade Serous Ovarian Cancer (HGSOC)'. *Journal of Clinical Oncology* 34 (15_suppl): 5571–5571. https://doi.org/10.1200/JCO.2016.34.15_suppl.5571.
- Havrilesky, Laura J., Patricia G. Moorman, William J. Lowery, Jennifer M. Gierisch, Remy R. Coeytaux, Rachel Peragallo Urrutia, Michaela Dinan, et al. 2013. 'Oral Contraceptive Pills as Primary Prevention for Ovarian Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis'. *Obstetrics and Gynecology* 122 (1): 139–47. <https://doi.org/10.1097/AOG.0b013e318291c235>.
- Henderson, Edward, Gabriel Huynh, Kirsty Wilson, Magdalena Plebanski, and Simon Corrie. 2021. 'The Development of Nanoparticles for the Detection and Imaging of Ovarian Cancers'. *Biomedicines* 9 (11): 1554. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9111554>.
- Just, Pierre-Alexandre, Bruno Borghese, and Jérôme Alexandre. 2015. 'Classification des carcinomes de l'endomètre et de l'ovaire', 10.
- Kaldawy, Anis, Yakir Segev, Ofer Lavie, Ron Auslender, Victoria Sopik, and Steven A. Narod. 2016. 'Low-Grade Serous Ovarian Cancer: A Review'. *Gynecologic Oncology* 143 (2): 433–38. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2016.08.320>.
- Kardeh, Sina, Soheil Ashkani-Esfahani, and Ali Mohammad Alizadeh. 2014. 'Paradoxical Action of Reactive Oxygen Species in Creation and Therapy of Cancer'. *European Journal of Pharmacology* 735 (July): 150–68. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.04.023>.
- Kindelberger, David W., Yonghee Lee, Alexander Miron, Michelle S. Hirsch, Colleen Feltmate, Fabiola Medeiros, Michael J. Callahan, et al. 2007. 'Intraepithelial Carcinoma of the Fimbria and Pelvic Serous Carcinoma: Evidence for a Causal Relationship'. *The American Journal of Surgical Pathology* 31 (2): 161–69. <https://doi.org/10.1097/01.pas.0000213335.40358.47>.
- Kotcherlakota, Rajesh, Kalyan Vydiyam, Durga Jeyalakshmi Srinivasan, Sudip Mukherjee, Arpita Roy, Madhusudana Kuncha, T. Nageswara Rao, Ramakrishna Sistla, Vijaya Gopal, and Chitta Ranjan Patra. 2019. 'Restoration of P53 Function in Ovarian Cancer Mediated by Gold Nanoparticle-Based EGFR Targeted Gene Delivery System'. *ACS Biomaterials Science & Engineering* 5 (7): 3631–44. <https://doi.org/10.1021/acsbmaterials.9b00006>.
- Krasner, Carolyn N., Susana M. Campos, Chantay L. Young, Karan R. Chadda, Hang Lee, Michael J. Birrer, Neil S. Horowitz, et al. 2021. 'Sequential Phase II Clinical Trials Evaluating CRLX101 as Monotherapy and in Combination with Bevacizumab in Recurrent Ovarian Cancer'. *Gynecologic Oncology* 162 (3): 661–66. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2021.07.002>.

- Kuchenbaecker, Karoline B., John L. Hopper, Daniel R. Barnes, Kelly-Anne Phillips, Thea M. Mooij, Marie-José Roos-Blom, Sarah Jervis, et al. 2017. 'Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers'. *JAMA* 317 (23): 2402–16. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.7112>.
- Kulhari, Hitesh, Deep Pooja, Raju Kota, T. Srinivasa Reddy, Rico F. Tabor, Ravi Shukla, David J. Adams, Ramakrishna Sistla, and Vipul Bansal. 2016. 'Cyclic RGDfK Peptide Functionalized Polymeric Nanocarriers for Targeting Gemcitabine to Ovarian Cancer Cells'. *Molecular Pharmaceutics* 13 (5): 1491–1500. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00935>.
- Kurman, Robert J., and Ie-Ming Shih. 2011. 'Molecular Pathogenesis and Extraovarian Origin of Epithelial Ovarian Cancer—Shifting the Paradigm'. *Human Pathology* 42 (7): 918–31. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2011.03.003>.
- Lainé, A.-L., J. Gravier, M. Henry, L. Sancey, J. Béjaud, E. Pancani, M. Wiber, et al. 2014. 'Conventional versus Stealth Lipid Nanoparticles: Formulation and in Vivo Fate Prediction through FRET Monitoring'. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 188 (August): 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.05.042>.
- Lavoue, V., C. Huchon, C. Akladios, P. Alfonsi, N. Bakrin, M. Ballester, S. Bendifallah, et al. 2019. 'Management of Epithelial Cancer of the Ovary, Fallopian Tube, and Primary Peritoneum. Short Text of the French Clinical Practice Guidelines Issued by FRANCOGYN, CNGOF, SFOG, and GINECO-ARCAGY, and Endorsed by INCa'. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology* 236 (May): 214–23. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2019.03.010>.
- Lee, Jung-Min, Lori Minasian, and Elise C. Kohn. 2019. 'New Strategies in Ovarian Cancer Treatment'. *Cancer* 125 (S24): 4623–29. <https://doi.org/10.1002/cncr.32544>.
- Lisio, Michael-Antony, Lili Fu, Alicia Goyeneche, Zu-hua Gao, and Carlos Telleria. 2019. 'High-Grade Serous Ovarian Cancer: Basic Sciences, Clinical and Therapeutic Standpoints'. *International Journal of Molecular Sciences* 20 (4): 952. <https://doi.org/10.3390/ijms20040952>.
- Liu, Joyce F., Mark F. Brady, Ursula A. Matulonis, Austin Miller, Elise C. Kohn, Elizabeth M. Swisher, David Cella, et al. 2022. 'Olaparib With or Without Cediranib Versus Platinum-Based Chemotherapy in Recurrent Platinum-Sensitive Ovarian Cancer (NRG-GY004): A Randomized, Open-Label, Phase III Trial'. *Journal of Clinical Oncology* 40 (19): 2138–47. <https://doi.org/10.1200/JCO.21.02011>.
- Luiz, Marcela Tavares, Juliana Palma Abriata, Giovanni Loureiro Raspantini, Larissa Bueno Tofani, Fernando Fumagalli, Shaiani Maria Gil de Melo, Flavio da Silva Emery, et al. 2019. 'In Vitro Evaluation of Folate-Modified PLGA Nanoparticles Containing Paclitaxel for Ovarian Cancer Therapy'. *Materials Science and Engineering: C* 105 (December): 110038. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110038>.
- Martín-Sabroso, Cristina, Ana Isabel Fraguas-Sánchez, Rafaela Raposo-González, and Ana Isabel Torres-Suárez. 2021. 'Perspectives in Breast and Ovarian Cancer Chemotherapy by Nanomedicine Approach: Nanoformulations in Clinical Research'. *Current Medicinal Chemistry* 28 (17): 3271–86. <https://doi.org/10.2174/0929867327666200819115403>.
- Mateescu, Bogdan, Luciana Batista, Melissa Cardon, Tina Gruosso, Yvan de Feraudy, Odette Mariani, André Nicolas, et al. 2011. 'MiR-141 and MiR-200a Act on Ovarian Tumorigenesis by Controlling Oxidative Stress Response'. *Nature Medicine* 17 (12): 1627–35. <https://doi.org/10.1038/nm.2512>.

- Matulonis, Ursula A., Anil K. Sood, Lesley Fallowfield, Brooke E. Howitt, Jalid Sehouli, and Beth Y. Karlan. 2016. 'Ovarian Cancer'. *Nature Reviews Disease Primers* 2 (1): 1–22. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.61>.
- McMullen, Michelle, Katherine Karakasis, Ainhoa Madariaga, and Amit M. Oza. 2020. 'Overcoming Platinum and PARP-Inhibitor Resistance in Ovarian Cancer'. *Cancers* 12 (6): 1607. <https://doi.org/10.3390/cancers12061607>.
- Mehner, Christine, Ann L. Oberg, Krista M. Goergen, Kimberly R. Kalli, Matthew J. Maurer, Aziza Nassar, Ellen L. Goode, et al. 2017. 'EGFR as a Prognostic Biomarker and Therapeutic Target in Ovarian Cancer: Evaluation of Patient Cohort and Literature Review'. *Genes & Cancer* 8 (5–6): 589–99. <https://doi.org/10.18632/genesandcancer.142>.
- Mohell, N., J. Alfredsson, Å Fransson, M. Uustalu, S. Byström, J. Gullbo, A. Hallberg, V. J. N. Bykov, U. Björklund, and K. G. Wiman. 2015. 'APR-246 Overcomes Resistance to Cisplatin and Doxorubicin in Ovarian Cancer Cells'. *Cell Death & Disease* 6 (6): e1794–e1794. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.143>.
- Monk, Bradley J., Nicoletta Colombo, Amit M. Oza, Keiichi Fujiwara, Michael J. Birrer, Leslie Randall, Elena V. Poddubskaya, et al. 2021. 'Chemotherapy with or without Avelumab Followed by Avelumab Maintenance versus Chemotherapy Alone in Patients with Previously Untreated Epithelial Ovarian Cancer (JAVELIN Ovarian 100): An Open-Label, Randomised, Phase 3 Trial'. *The Lancet. Oncology* 22 (9): 1275–89. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(21\)00342-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(21)00342-9).
- 'Ovarian Cancer and Smoking: Individual Participant Meta-Analysis Including 28 114 Women with Ovarian Cancer from 51 Epidemiological Studies'. 2012. *The Lancet. Oncology* 13 (9): 936–45. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70322-4](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70322-4).
- Papa, Anselmo, Davide Caruso, Martina Strudel, Silverio Tomao, and Federica Tomao. 2016. 'Update on Poly-ADP-Ribose Polymerase Inhibition for Ovarian Cancer Treatment'. *Journal of Translational Medicine* 14 (September): 267. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-1027-1>.
- Petrova, Varvara, Margherita Annicchiarico-Petruzzelli, Gerry Melino, and Ivano Amelio. 2018. 'The Hypoxic Tumour Microenvironment'. *Oncogenesis* 7 (1): 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41389-017-0011-9>.
- Poley, Maria, Patricia Mora-Raimundo, Yael Shammai, Maya Kaduri, Lilach Koren, Omer Adir, Jeny Shklover, et al. 2022. 'Nanoparticles Accumulate in the Female Reproductive System during Ovulation Affecting Cancer Treatment and Fertility'. *ACS Nano*, March. <https://doi.org/10.1021/acsnano.1c07237>.
- Pujade-Lauraine, Eric, Keiichi Fujiwara, Jonathan A. Ledermann, Amit M. Oza, Rebecca Kristeleit, Isabelle-Laure Ray-Coquard, Gary E. Richardson, et al. 2021. 'Avelumab Alone or in Combination with Chemotherapy versus Chemotherapy Alone in Platinum-Resistant or Platinum-Refractory Ovarian Cancer (JAVELIN Ovarian 200): An Open-Label, Three-Arm, Randomised, Phase 3 Study'. *The Lancet Oncology* 22 (7): 1034–46. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(21\)00216-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(21)00216-3).
- Reedijk, Jan. 2009. 'Platinum Anticancer Coordination Compounds: Study of DNA Binding Inspires New Drug Design'. *European Journal of Inorganic Chemistry* 2009 (10): 1303–12. <https://doi.org/10.1002/ejic.200900054>.

- Roma-Rodrigues, Catarina, Rita Mendes, Pedro V. Baptista, and Alexandra R. Fernandes. 2019. 'Targeting Tumor Microenvironment for Cancer Therapy'. *International Journal of Molecular Sciences* 20 (4): E840. <https://doi.org/10.3390/ijms20040840>.
- Salani, R., R. J. Kurman, R. Giuntoli, G. Gardner, R. Bristow, T.-L. Wang, and I.-M. Shih. 2008. 'Assessment of TP53 Mutation Using Purified Tissue Samples of Ovarian Serous Carcinomas Reveals a Higher Mutation Rate than Previously Reported and Does Not Correlate with Drug Resistance'. *International Journal of Gynecological Cancer: Official Journal of the International Gynecological Cancer Society* 18 (3): 487–91. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1438.2007.01039.x>.
- Schädlich, Andreas, Stefan Hoffmann, Thomas Mueller, Henrike Caysa, Cornelia Rose, Achim Göpferich, Jun Li, Judith Kuntsche, and Karsten Mäder. 2012. 'Accumulation of Nanocarriers in the Ovary: A Neglected Toxicity Risk?' *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 160 (1): 105–12. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.02.012>.
- Shariati, Molood, Giovanna Lollo, Kevin Matha, Benedicte Descamps, Christian Vanhove, Leen Van de Sande, Wouter Willaert, et al. 2020. 'Synergy between Intraperitoneal Aerosolization (PIPAC) and Cancer Nanomedicine: Cisplatin-Loaded Polyarginine-Hyaluronic Acid Nanocarriers Efficiently Eradicate Peritoneal Metastasis of Advanced Human Ovarian Cancer'. *ACS Applied Materials & Interfaces*, June. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c05554>.
- Sun, Yu. 2016. 'Tumor Microenvironment and Cancer Therapy Resistance'. *Cancer Letters* 380 (1): 205–15. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.07.044>.
- Tejada-Berges, T., C. O. Granai, M. Gordinier, and W. Gajewski. 2002. 'Caelyx/Doxil for the Treatment of Metastatic Ovarian and Breast Cancer'. *Expert Review of Anticancer Therapy* 2 (2): 143–50. <https://doi.org/10.1586/14737140.2.2.143>.
- Tewari, Devansu, James J. Java, Ritu Salani, Deborah K. Armstrong, Maurie Markman, Thomas Herzog, Bradley J. Monk, and John K. Chan. 2015. 'Long-Term Survival Advantage and Prognostic Factors Associated With Intraperitoneal Chemotherapy Treatment in Advanced Ovarian Cancer: A Gynecologic Oncology Group Study'. *Obstetrical and Gynecological Survey* 70 (8): 505–6. <https://doi.org/10.1097/01.ogx.0000469913.56599.ae>.
- Torre, Lindsey A., Britton Trabert, Carol E. DeSantis, Kimberly D. Miller, Goli Samimi, Carolyn D. Runowicz, Mia M. Gaudet, Ahmedin Jemal, and Rebecca L. Siegel. 2018. 'Ovarian Cancer Statistics, 2018'. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 68 (4): 284–96. <https://doi.org/10.3322/caac.21456>.
- Vogelstein, B., D. Lane, and A. J. Levine. 2000. 'Surfing the P53 Network'. *Nature* 408 (6810): 307–10. <https://doi.org/10.1038/35042675>.
- Wang, Liping, and Erxia Jia. 2016. 'Ovarian Cancer Targeted Hyaluronic Acid-Based Nanoparticle System for Paclitaxel Delivery to Overcome Drug Resistance'. *Drug Delivery* 23 (5): 1810–17. <https://doi.org/10.3109/10717544.2015.1101792>.
- Wang, Ruolan, Bin Song, Junrong Wu, Yanli Zhang, Aijie Chen, and Longquan Shao. 2018. 'Potential Adverse Effects of Nanoparticles on the Reproductive System'. *International Journal of Nanomedicine* 13 (December): 8487–8506. <https://doi.org/10.2147/IJN.S170723>.
- Wang, Zhe, Fenghua Meng, and Zhiyuan Zhong. 2021. 'Emerging Targeted Drug Delivery Strategies toward Ovarian Cancer'. *Advanced Drug Delivery Reviews* 178 (November): 113969. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.113969>.

- Xiao, Kai, Yuanpei Li, Joyce S. Lee, Abby M. Gonik, Tiffany Dong, Gabriel Fung, Eduardo Sanchez, et al. 2012. "'OA02" Peptide Facilitates the Precise Targeting of Paclitaxel-Loaded Micellar Nanoparticles to Ovarian Cancer in Vivo'. *Cancer Research* 72 (8): 2100–2110. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3883>.
- Zhang, Qiang, Vladimir J. N. Bykov, Klas G. Wiman, and Joanna Zawacka-Pankau. 2018. 'APR-246 Reactivates Mutant P53 by Targeting Cysteines 124 and 277'. *Cell Death & Disease* 9 (5): 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0463-7>.

2. Ferrocifènes et nanocapsules lipidiques : revue bibliographique

Review

Ferrocifen Loaded Lipid Nanocapsules: A Promising Anticancer Medication against Multidrug Resistant Tumors

Pierre Idlas ¹, Elise Lepeltier ¹ , Gérard Jaouen ^{2,3} and Catherine Passirani ^{1,*} 

¹ Micro & Nanomedecines Translationnelles (MINT), University of Angers, Inserm, The National Center for Scientific Research (CNRS), SFR ICAT, 49000 Angers, France; pierre.idlas@univ-angers.fr (P.I.); elise.lepeltier@univ-angers.fr (E.L.)

² Sorbonne Universités, Université IPCM, Paris 6, UMR 8232, IPCM, 4 place Jussieu, 75005 Paris, France; gerard.jaouen@chimieparistech.psl.eu

³ PSL University, Chimie ParisTech, CNRS, Institut de Recherche de Chimie Paris, 75005 Paris, France

* Correspondence: catherine.passirani@univ-angers.fr

Simple Summary: One of the primary causes of chemotherapy failure is the occurrence of cancer multidrug resistance (MDR). Uncontrolled growth of resistant tumor cells leads to metastasis and recurrence, associated with high mortalities. Ferrocifens have been shown to possess anticancer properties via an original mechanism dependent on redox properties and generation of active metabolites that can cause disruption of cell metabolism. However, these molecules are highly insoluble in water, requiring a formulation stage before being administered in vivo. Lipid nanocapsules (LNCs) have already demonstrated their ability to successfully encapsulate various hydrophobic therapeutic agents, such as ferrocifens, and offer the option of surface modification, making it possible to adapt the pharmacological behavior of the nanocarrier. The aim of this review is to give, for the first time, an overview of the in vitro and in vivo studies performed with ferrocifen-loaded LNCs on several MDR cancers.



Citation: Idlas, P.; Lepeltier, E.; Jaouen, G.; Passirani, C. Ferrocifen Loaded Lipid Nanocapsules: A Promising Anticancer Medication against Multidrug Resistant Tumors. *Cancers* **2021**, *13*, 2291. <https://doi.org/10.3390/cancers13102291>

Academic Editor: Sanjiv Prashar

Received: 12 April 2021

Accepted: 4 May 2021

Published: 11 May 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Abstract: Resistance of cancer cells to current chemotherapeutic drugs has obliged the scientific community to seek innovative compounds. Ferrocifens, lipophilic organometallic compounds composed of a tamoxifen scaffold covalently bound to a ferrocene moiety, have shown very interesting antiproliferative, cytotoxic and immunologic effects. The formation of ferrocenyl quinone methide plays a crucial role in the multifaceted activity of ferrocifens. Lipid nanocapsules (LNCs), meanwhile, are nanoparticles obtained by a free organic solvent process. LNCs consist of an oily core surrounded by amphiphilic surfactants and are perfectly adapted to encapsulate these hydrophobic compounds. The different in vitro and in vivo experiments performed with this ferrocifen-loaded nanocarrier have revealed promising results in several multidrug-resistant cancer cell lines such as glioblastoma, breast cancer and metastatic melanoma, alone or in combination with other therapies. This review provides an exhaustive summary of the use of ferrocifen-loaded LNCs as a promising nanomedicine, outlining the ferrocifen mechanisms of action on cancer cells, the nanocarrier formulation process and the in vivo results obtained over the last two decades.

Keywords: nanomedicine; bioorganometallic drug; cancer; preclinical trial; combination therapy



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Nanomedicine is a multidisciplinary field embracing researchers from chemistry, galenic pharmacy, biochemistry and biology, with the aim of developing innovative therapies using biologically active molecules (drugs) formulated in nanoparticles (NPs) to treat a panel of diseases such as cancer, inflammatory diseases or neurological disorders. The field of oncology is predominant and has been of increasing interest since the anti-cancer nanomedicine Doxil[®] became the first to win FDA approval [1–3]. Over recent decades, many small active molecules (cisplatin, doxorubicin, tamoxifen, paclitaxel, etc.) were synthesized and are now used in current chemotherapy treatments. For example,

platinum-based chemotherapy, akin to cisplatin, has been used alone or in combination in 70% of cancer treatments [4]. The main target of platinum coordination complexes and doxorubicin is DNA, leading to the apoptosis of cells. However, one drawback of these current treatments is the resistance developed by some cancer cells to proapoptotic stimuli, for example, in glioblastoma and melanoma, resulting in the ineffectiveness of these molecules [4,5]. Tamoxifen, the usual treatment molecule for breast cancer, is known as a selective estrogen receptor modulator (SERM). Conversely, its nonselectivity against hormone-independent cancer such as triple-negative breast cancer significantly reduces the spectrum of its applications [6]. Paclitaxel is a microtubule-stabilizing drug able to block cell cycle progression, thus inhibiting the growth of cancer cells, with interesting recent results observed in immunotherapy [7]. However, many studies have proved that paclitaxel is a substrate of the membrane-bound drug efflux pump P-glycoprotein (P-gp) and shows limited efficacy against the resistant tumors [8].

In the late 1980s, Jaouen et al. synthesized a new class of bio-organometallic molecules [9,10]. The idea was to use an organometallic complex based on iron, ruthenium or rhodium covalently bound to a tamoxifen scaffold, which could offer new curative properties with a wide range of biological applications due to its direct metal-carbon covalent bond. The potential efficacy of these innovative compounds is conferred by the chemical reactivity of the organometallic complex, different from that of the metal or the organic ligands alone. Amongst these complexes, the ferrocifen family consists of a ferrocene moiety covalently bound to a tamoxifen skeleton that has shown promising *in vitro* results against MDR cancer cell lines [11–13]. However, ferrocifen compounds are hydrophobic and need a suitable formulation strategy for intravenous injection, the most commonly used route of administration in cancer patients.

Three generations of nanoparticles (NPs) can be differentiated. In the 1970s, the first nanomedicines were biodegradable but accumulated mainly in the liver. The second generation is characterized by the surface modification with hydrophilic molecules, mainly polyethylene glycol (PEG), in order to confer stealth properties and to passively accumulate in solid tumor tissues via the so-called enhanced permeation and retention (EPR) effect [14,15]. However, the EPR effect still divides the scientific community [16,17]. Explored since the 1990s [18–20], the third generation of nanomedicines concerns their surface modification by an active ligand such as a monoclonal antibody or a peptide for specific cancer cell targeting called “active targeting”. Since the beginning of the 21st century, these innovative NPs have received the most attention, with this surface modification aiming to improve the biodistribution and limit the side effects of the drugs [21–23]. Within this array of nanocarriers, Heurtault et al. patented a hybrid structure between polymer NPs and liposomes, called lipid nanocapsules (LNCs). LNCs are prepared by a solvent-free process and are composed of an oily core surrounded by a shell of lecithin and PEGylated surfactants [24,25]. More than a hundred studies have confirmed the real promise of these NPs as a drug delivery system, especially suitable for the ferrocifen molecules [26–32].

The aim of this review is to give, for the first time, an exhaustive overview on the *in vitro* and *in vivo* studies performed with ferrocifen-loaded LNCs. Firstly, ferrocifen mechanisms of action at the cellular level will be detailed in relation to potential anti-MDR activity. Then, the specificities of LNCs will be described, especially through their potential as ferrocifen nanocarriers, and the *in vivo* experiments on MDR cancers such as glioblastoma, metastatic melanoma and breast cancer will be reviewed.

2. Ferrocifens: Promising Molecules against Cancer

Ferrocifen compounds were synthesized for the first time in 1996 by Jaouen et al. [33,34]. The general molecular structure is composed of a tamoxifen scaffold bound to a ferrocene moiety (Figure 1). The initial idea was to use an old drug, tamoxifen, and add a metallocene such as ferrocene or ruthenocene in order to confer new properties on the molecule. The ferrocifen family exhibited the best bioactivity [35].

The ease of ferrocene functionalization and the ability to shape the overall structure by adding a basic side chain (Figure 1, group R₁) or to change the functional group

R_2 has allowed the synthesis of more than three hundred complexes over the last two decades, some of them showing anticancer properties on a large panel of MDR cancer cell lines including glioblastoma, metastatic melanoma, breast cancer and leukemia [36–39]. Indeed, structure–activity relationship studies have allowed for the identification of the best potential candidates for in vivo studies. In this section, the link between the structure of 5 ferrocifen molecules (P5, P15, P53, P722 and DP1, see Table 1) and their biological efficiency on cancer cells will be detailed.

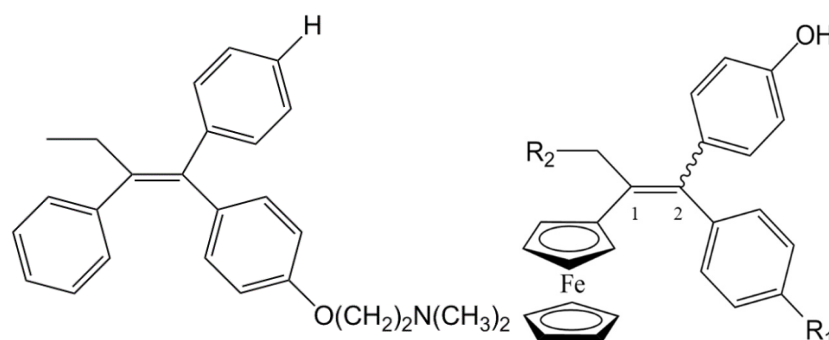


Figure 1. General structure of tamoxifen and ferrocifen compounds.

2.1. Ferrocifen Mechanisms of Action

Since the first synthesis of ferrocifen compounds was performed, the mechanism of action has been increasingly well-understood. It has been shown to vary depending on whether the molecule is used as an anticancer agent or as immunomodulator or antiparasitic compounds [40,41]. This review focuses on the anticancer properties of ferrocifens. All the studies performed have demonstrated that the cell death pathway induced by these organometallic molecules differs according to the structure of the complexes, the cell lines tested and the ferrocifen concentration [41]. The use of these complexes is particularly potent as they can confer both antiproliferative and cytotoxic effects, as schematically summarized in Figure 2. The formation of the quinone methide (QM) and its effects at the cellular level, discussed subsequently, are elements needed to be determined to understand this phenomenon.

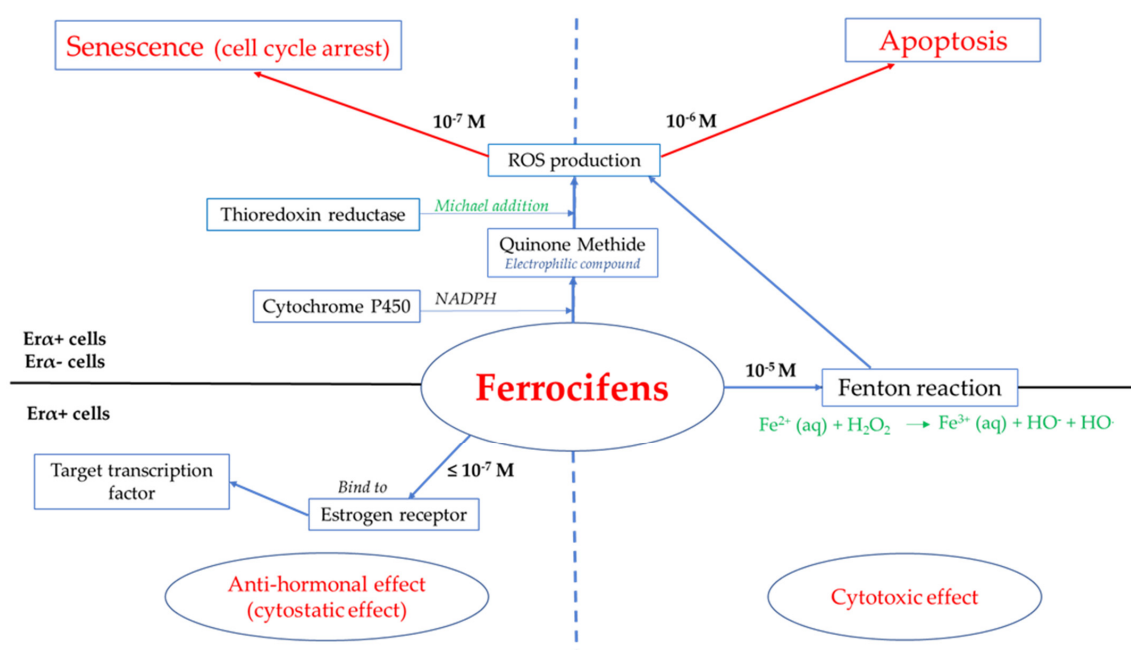


Figure 2. Ferrocifen mechanisms of action at the cellular level: at a concentration $\leq 10^{-7}$ M, ferrocifens present a cytostatic effect; at a concentration $> 10^{-7}$ M, ferrocifens present a cytotoxic effect.

Table 1. Structure of P5, P15, P53, DP1 and P722 ferrocifens and their corresponding quinone methides.

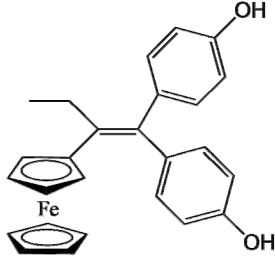
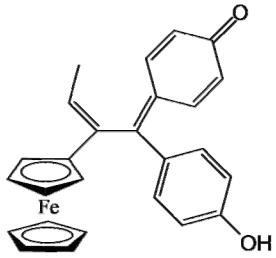
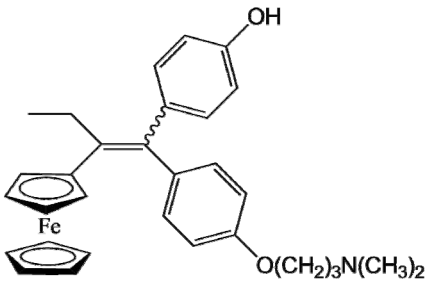
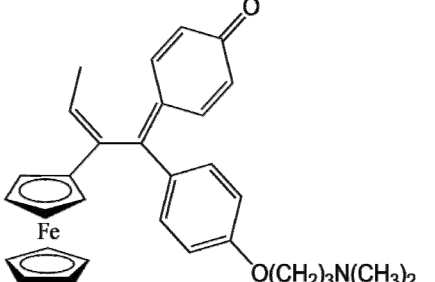
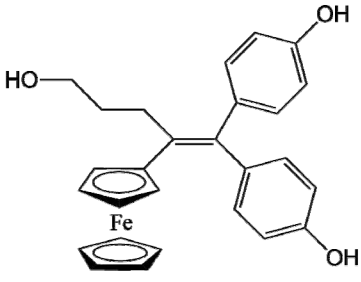
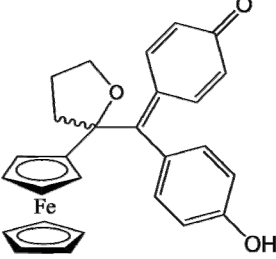
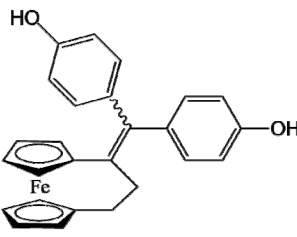
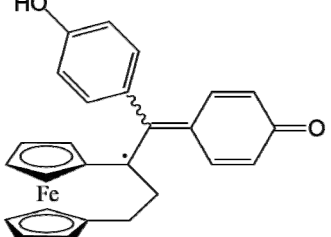
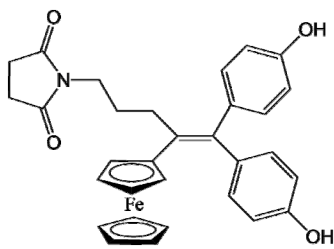
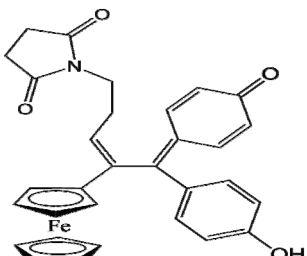
Ferrocifen	Quinone Methide
 <p data-bbox="608 663 778 689">P5 (Fc-di-OH)</p>	 <p data-bbox="1134 663 1305 689">Vinyl-QM-P5</p>
 <p data-bbox="608 1005 794 1032">P15 (Fc-OHTam)</p>	 <p data-bbox="1134 1005 1321 1032">Vinyl-QM-P15</p>
 <p data-bbox="608 1487 794 1514">P53 (Fc-Tri-OH)</p>	 <p data-bbox="1134 1335 1321 1361">Furane-QM-P53</p>
 <p data-bbox="592 1935 826 1962">DP1 (Ansa-Fc-di-OH)</p>	 <p data-bbox="1150 1935 1305 1962">Radical DP1</p>

Table 1. Cont.

Ferrocifen	Quinone Methide
 <p>P722</p>	 <p>QM-P722</p>

2.1.1. Formation of the Quinone Methide

The formation of quinone methide (QM) can only occur if the ferrocenyl group is located on carbon 2 of the but-1-ene group and if the phenol is on carbon 1 (Figure 1). This configuration allows a conjugated π -system between the ferrocenyl and the phenol groups [11,42]. Moreover, the unique redox properties of ferrocene could lead to the reversible oxidation of Fe(II) to Fe(III) in the presence of Reactive Oxygen Species (ROS), molecules overexpressed in cancer cells. Indeed, the ferrocene has a redox potential similar to the redox potential found in the cell and is thus favorable for in vitro electron transfer [43]. Then, as shown in Figure 3, a redox process involving two electrons and two protons leads to the formation of a phenoxy radical and then to the QM. All the steps presented in Figure 3 have been confirmed by electrochemistry and electron paramagnetic resonance [42,44]. The authors of these studies attribute this QM formation to the role of the ferrocene as a “redox antenna”, followed by an electronic delocalization [45,46]. However, according to the initial ferrocifen structure, the QMs obtained for P5, P15, P53 and P722 will not have the same structures, as presented in Table 1, and this difference will confer variable biological efficacy [47–49]. Indeed, P53 showed a better efficacy than P5 and P15 on several MDR cancer cell lines such as MDA-MB-231 triple-negative breast cancer and cisplatin-resistant A2780cisR human ovarian cancer cells, due to its ability to form two QMs: a vinyl QM such as P5 or P15 but also a QM involving a furan heterocycle, conferring good stability on its structure. From these two QMs, several metabolites could be produced in vitro and bind to various cell targets, such as glutathione [50]. For P722, its exceptional antiproliferative effect may be explained by the atypical lone pair- π interaction between one carbonyl group of the imide and the center of the aromatic QM ring, responsible for an improvement of the stability of the QM-P722 [48]. No QM could be isolated from DP1 (ansa-FcdiOH) by electron paramagnetic resonance spectroscopy studies; more precisely, its QM was too unstable, with a short half-life. Nevertheless, the high cytotoxicity of DP1 compared to the acyclic series P5 and P15 could come from the formed free radical QM [51,52].

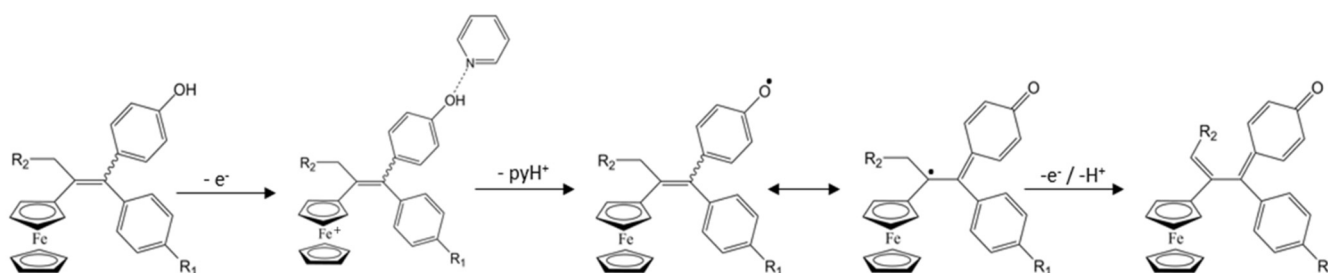


Figure 3. Mechanism of quinone methide formation from ferrocifen. This mechanism was confirmed by electrochemistry and electron paramagnetic resonance.

2.1.2. Ferrocifen Mechanisms of Action at the Cellular Level

Early studies proposed some possible tumor cell mechanisms due to the well-known antiestrogenic effect of ferrocifens (cytostatic effect) [12,53]. Interestingly, ferrocifens can also drive senescence (another cytostatic effect) as well as apoptosis (cytotoxic effect), depending on the initial concentration used [41,54]. Senescence is an irreversible arrest of proliferation via different pathways, such as genomic damage caused by the activation of p53, a tumor-suppressor protein controlling the expression of numerous activation factors in cells. Tables 2 and 3 show the values of half maximal inhibitory concentration IC₅₀ (concentration inhibiting 50% of a specific activity of a biological target) and of growth inhibition concentration GI₅₀ (concentration inhibiting 50% of cell proliferation), found for the different ferrocifens: all the different values are in the low or submicromolar range. This can be explained by the multiple pathways of activity, as discussed below.

Table 2. IC₅₀ values in μM on some cancer cell lines (breast, glioblastoma, melanoma and ovarian) of P5 and P15 ferrocifens.

	Cell Line	P5	P15
Breast	MCF7	[55]	[55]
	MDA-MB-231	[56]	[56]
Glioblastoma	U87MG	[57]	-
	9L	[58]	-
Melanoma	WM35	[37]	[37]
	WM793	[37]	[37]
	WM9	[37]	[37]
	SK-Mel28	[59]	-
Ovarian	A2780	[56]	-
	A2780cisR	[56]	-
		IC ₅₀ (μM)	
		0.5–2	
		2–10	

Table 3. GI₅₀ values in μM on some cancer cell lines (breast, central nervous system (CNS) cancer, melanoma, ovarian cancer and leukemia) of the DP1, P53 and P722 ferrocifens.

	Cell Line	DP1 [51]	P53 [50]	P722 [48]
Breast	MCF7			
	MDA-MB-231			
CNS	SF-295			
	SF-539			
	SF-268			
Melanoma	SK-MEL-2			
	SK-MEL-28			
	SK-MEL-5			
Ovarian	IGROV1			
	SK-OV-3			
Leukemia	HL-60(TB)			
	MOLT-4			
		GI ₅₀ (μM)		
		<0.1		
		0.1–0.5		
		0.5–2		
		2–10		
		>10		

Antiestrogenic Proliferative Effect

The antiestrogenic proliferative effect of the ferrocifens has been well-discussed in the literature. With their molecular structures, they can bind to the estrogen receptor, filling the hydrophobic pocket [60] and, by modulating the expression of oxidative stress

proteins, block the binding of 17β -oestradiol, which plays an important role in regulating hydrogen peroxide levels in ER α + cells [61]. This can lead to an interruption of breast cancer cell proliferation. Even if the relative binding affinity (RBA) of ferrocifens for the estrogen receptor is lower than with tamoxifen, probably due to the steric effect of the ferrocenyl group, the values are still satisfactory, at around 10% [38,41]. According to Paterni et al., a good ER-ligand should possess two OH groups (one should be a phenol or a phenol bioisostere) linked by a lipophilic central scaffold and placed at a distance of about 11 Å [62]; this is the case for P15, whose structure corresponds to this description and presents the highest RBA values (11.5%) compared to P5 (9.6%) [41]. Moreover, Jaouen et al. showed that modifying one phenol by adding a basic chain, such as $-(\text{CH}_2)_3\text{NMe}_2$ in P15 (group R₁ in Figure 1), could improve the antiestrogen effect of ferrocifens [38,53,63]. Moreover, the length of this chain is an important parameter as no antiestrogenic effect was found with the basic chain $-(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$. This can be explained by the fact that the lone pair of the nitrogen needs to interact by hydrogen bonding with the Asp351 of the estrogen receptor to provide the right position in the ER pocket, leading to the correct ER conformation [38]. This is why P15, due to its structure, has a better antiestrogenic effect than P5. This antiestrogenic effect is only observed at low concentration (0.1 μM) and will induce senescence [50,52,54]; it is considered to be the first organometallic selective estrogen receptor modulator.

Cytotoxic Effect

The cytotoxic effect of the ferrocifens seems to be related to the unique redox properties of ferrocene, able to induce a reversible oxidation of Fe(II) to Fe(III) (Fenton reaction), followed by the production of ROS known for their bioreactivity [64,65], and related to the structure of the ferrocifen molecule [38,42,48,66,67]. Studies on compounds possessing other moieties instead of iron, such as ruthenium, titanium or rhenium, showed that these compounds did not produce the cytotoxic effect observed with ferrocifens at the same concentration (1 μM) [13].

As mentioned above, the formation of QM has been suggested as one of the principal causes of the cytotoxic effect [35,38,68]. It corresponds to the major active metabolite obtained in the reaction between the ferrocifen and the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) present in the P450 cytochrome [68], except for DP1 (QM half-life too short). Depending on the initial ferrocifen used, other metabolites are obtained but their biological efficiency is less convincing or is still under investigation. It has been shown that the QM, being electrophilic, could react with various cell targets such as thiols from thioredoxin reductase (TrxR), via a Michael addition [36,52,56,67]. TrxR is a selenoenzyme permitting cellular redox regulation by activating transcription factors that alter gene expression and peroxiredoxins, allowing a decrease in ROS [61,69]. This enzyme is found both in cytosol and mitochondria of cells and is often overexpressed in cancer cells [61]. For DP1, as previously mentioned, electron paramagnetic resonance studies did not detect formation of the QM (or it was too unstable to be detected) but only the QM radical, which is also highly cytotoxic, especially on TrxR ($\text{IC}_{50} = 0.15 \mu\text{M}$) [52]. The higher cytotoxicity of DP1 compared to P5 or P15 on cancer cells could be explained as follows: DP1 can react with both the selenocysteine and thiols from TrxR, whereas P5 and P15 selectively react with only the selenol group [36,52]. Another example of how the ferrocifen structure can change the biological reactivity of the compound is presented by a comparison between P5 and P15. It has been shown that both could inhibit TrxR present in cytosol in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells, but only P15 had showed inhibitive action on mitochondrial TrxR in Jurkat cells (leukaemia cell line) [36,67,70]. Indeed, whereas P5 induces a redox imbalance leading to lipid peroxidation in cytoplasm, P15 has an additional effect on mitochondria due to the dimethylamine propyl chain $-(\text{CH}_2)_3\text{N}(\text{CH}_3)_2$, a lipophilic cation in the cancer cell environment, allowing a preferential localization in mitochondria. According to Scalcon et al., this overexpression of oxidized thioredoxin in mitochondria led to an increase in ROS

and the release of cytochrome c, which can activate the caspase-cascade system, enzymes responsible for apoptosis [70–72].

Thus, ferrocifens could be seen as promising anticancer compounds as they provide a variety of mechanisms of action, depending on the cell line treated, the concentration used and their molecular structure. For example, by forming QM, ferrocifens behave as ROS-producing compounds by increasing the ROS level inside an oxidative stress environment. Moreover, it may be possible to consider ferrocifen as a prodrug: the corresponding QM inhibits cytosolic and mitochondrial TrxR more efficiently than the parent compound. However, in order to further analyze the efficacy of these molecules and to perform in vivo studies, ferrocifens need to be formulated in nanocarriers. Indeed, due to their high lipophilicity, they cannot be injected as a solution into the circulatory system and lipid nanocapsules could represent one potential answer to this.

3. Lipid Nanocapsule Characteristics

3.1. Composition and Formulation Process

Nanometric colloidal systems, as drug carriers, are dispersed systems, often oil in water dispersions, in which solid or liquid phases are in suspension in a fluid medium. The main process to obtain these systems is to use emulsification or nanoprecipitation methods. However, one drawback of these methods is the use of organic solvents, required to solubilize the excipients, mainly lipids or polymers [24]. Moreover, the size of nanoparticles (NPs) is one of the main parameters to be controlled for pharmaceutical applications, as they influence cell internalization and in vivo biodistribution. To avoid instability mechanisms, such as droplet coalescence, high amounts of surfactants and cosurfactants are often needed, leading to potential toxicity for human use. With the objective of optimizing these different parameters, Heurtault et al. developed a new process patented in 2001 [25]: lipid nanocapsules (LNCs) exhibiting a core-shell structure composed of a liquid oily core and an amorphous surfactant shell (Figure 4), without the use of any organic solvent. The formulation process is described in Figure 4a: a mixture of the various constituents is made, followed by three temperature cycles to pass through the phase inversion zone (PIZ) described below.

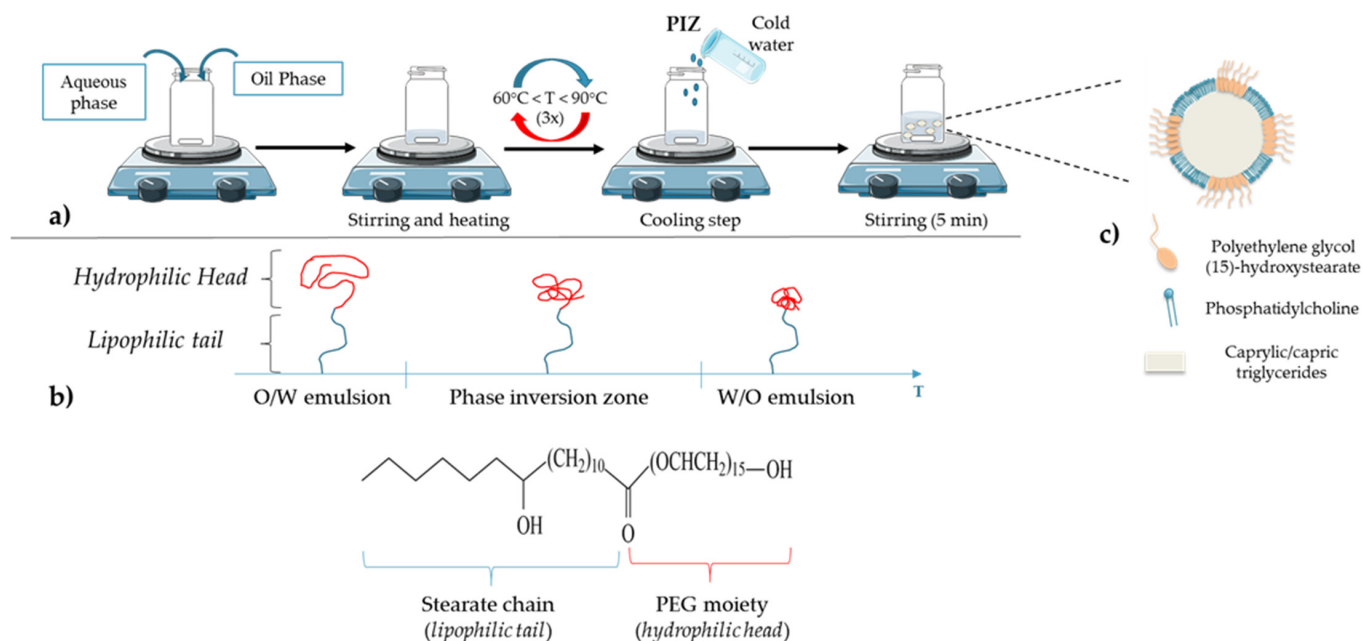


Figure 4. (a) Lipid nanocapsule (LNC) formulation: a free organic solvent process; (b) schematic behavior of polyethylene glycol (15)-hydroxystearate under temperature variation (polyethylene glycol (15)-hydroxystearate becomes more hydrophobic when the temperature increases, which leads to the phase inversion from oil in water to water in oil emulsions); (c) general structure of LNC: an oily core composed of caprylic/capric triglycerides surrounded by a shell made of phosphatidylcholine from soybean and polyethylene glycol (15)-hydroxystearate.

LNCs are composed of three main parts: an oily phase, an aqueous phase and non-ionic surfactants. The oily phase is composed of caprylic/capric triglycerides (commercial name: Labrafac[®] WR 1349), nonionic hydrophilic polyethylene glycol (15)-hydroxystearate surfactant (Solutol[®] HS 15) and, as an amphiphilic cosurfactant, phosphatidylcholine from soybean (Lipoid[®]). The last principal component is the aqueous phase, MiliQ[®] water, containing a fixed amount of sodium chloride (NaCl) to make the suspension injectable [24–27]. The size can be adjusted within a very narrow distribution. Thus, in order to obtain LNCs with an average size between 20 and 100 nm, the amounts of triglycerides, nonionic surfactants and water to be added are: 10–40% (*w/w*) of polyethylene glycol (15)-hydroxystearate; 35–80% (*w/w*) of water; 10–25% (*w/w*) of caprylic/capric triglycerides. It should be noted that each constituent has an influence on LNC formulation and stability [73]. For example, when the proportion of polyethylene glycol (15)-hydroxystearate increases, the average diameter and size distribution of the LNCs decrease. This phenomenon could be attributed to both the strong hydrophilic character of the nonionic surfactant due to the PEG part and the strong hydrophobic property from the stearate chain, bringing a great stability to the oil in water system (Figure 4b) [73]. According to its structure and properties, this molecule is responsible for the phase inversion of the system from oil in water to water in oil emulsion (Figure 4b). Briefly, the phase inversion temperature method is a low-energy emulsification method first introduced by Shinoda and Saito in 1969 [74]. This method is based on the specific ability of the usual nonionic surfactants, such as PEG surfactants, to modify their affinity for water and oil depending on temperature. As the temperature increases, the lipophilic property of nonionic surfactants becomes preponderant as a consequence of the dehydration of ethylene oxide groups from the PEG moiety. This dehydration is due to the rupture of the hydrogen bonds between oxide groups and water molecules, following the thermal agitation (Figure 4b). Thus, when the balance between lipophilicity and hydrophilicity appears in the phase inversion zone (PIZ), the system is a bicontinuous microemulsion and it is suddenly broken up by a rapid cooling step, immediately generating a nanoemulsion of small droplets constituting the LNCs (Figure 4a) [24,75]. Moreover, the use of polyethylene glycol (15)-hydroxystearate is of interest due to its ability to block P-glycoprotein (P-gp) related drug efflux, one of the main factors leading to tumor cell resistance in chemotherapy [76].

Concerning the surface structure of LNCs, several studies have shown that phosphatidylcholine is anchored in the oily phase, whereas the polyethylene glycol (15)-hydroxystearate is oriented towards the water phase (Figure 4c) [24,73,77].

3.2. Surface Modification (Passive and Active Targeting)

The principal drawback of NPs for drug delivery is the fact that these nanocarriers are recognized by the mononuclear phagocyte system (MPS) as foreign bodies. Indeed, after a systemic injection, the clearance of nanocarriers from the blood can be very rapid, due to the macrophages of the MPS, particularly Kupffer cells in the liver, and the complement system. Plasma protein such as C3b molecules (named opsonins), mostly present in blood, can bind to the surface of the NPs due to weak forces such as electrostatic and hydrophobic interactions, forming a protein corona (opsonization). Then, opsonins are recognized by macrophages, leading to the phagocytosis of the NPs [78–81]. However, one of the advantages of LNCs is their ability to carry out surface modifications, as shown in Figure 5, to improve the efficacy of the nanocarrier after administration. Several studies have shown the value of the PEG-based (DSPE-PEG₂₀₀₀) coating in the design of long-circulating LNCs [77,82–86]. PEG was chosen due to its physico-chemical characteristics: it is uncharged and hydrophilic [86,87]. Due to these characteristics, the PEG layer makes it possible to avoid the adsorption of opsonins and thus reduce clearance by the MPS [80,81]. Through surface modification of the LNCs with PEG, the nanocarriers acquire stealth properties, improving their blood circulation time and leading to a better accumulation in the tumor site. This is the so-called “passive targeting”. Indeed, Béduneau et al. have studied the stealth properties of LNCs decorated with PEG₁₅₀₀ stearate after an

intravenous injection in a murine model. The results obtained revealed that this LNC modification allowed a very weak complement consumption and an increase in the blood circulation half-time, by reducing the protein adsorption, and hence the opsonization, due to an efficient steric hindrance [82]. These results were confirmed by other studies where PEG₂₀₀₀-coated LNCs improved the biodistribution in a murine model by extending the blood circulation time associated with good structural stability over several hours, after intravenous injection [26,83,88,89].

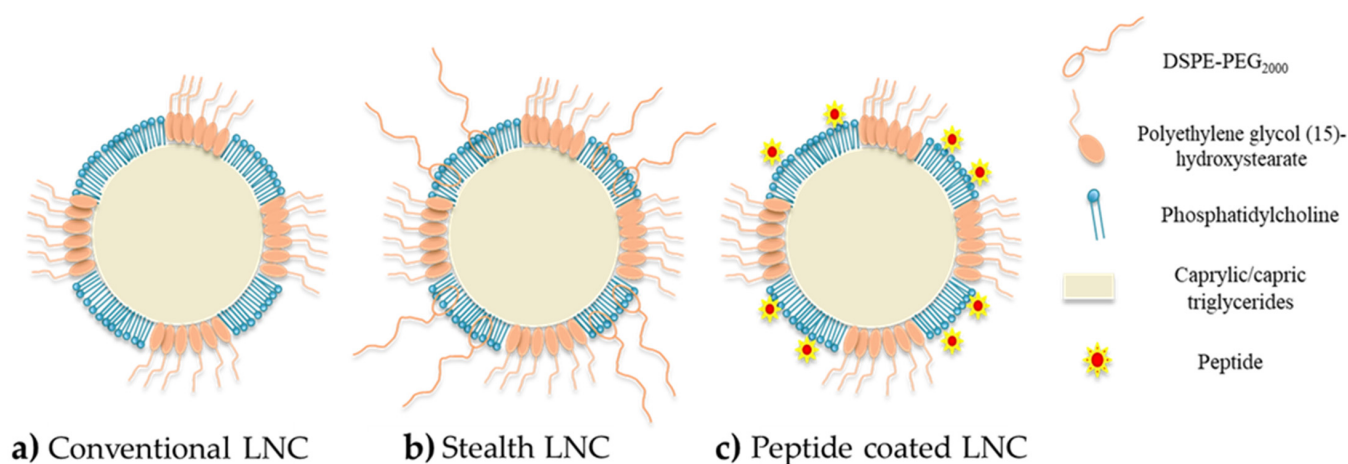


Figure 5. Schematic structure of LNCs: (a) conventional LNCs (without surface modification); (b) stealth LNCs with surface modification by DSPE-PEG₂₀₀₀; (c) active targeting LNCs with surface modification by peptides.

Moreover, the use of DSPE-PEG can be of interest for covalent functionalization, offering the possibility of shaping the terminal group of the molecule [90]. For example, Béduneau et al. used DSPE-PEG₂₀₀₀ functionalized with reactive-sulfhydryl maleimide groups (malDSPE-PEG) to perform an active targeting strategy via the covalent grafting of a homing moiety such as monoclonal antibody to the maleimide function [91]. In another study, Resnier et al. used the same molecule (malDSPE-PEG) to covalently bond a small artificial affinity protein named affitins, used as an alternative to antibodies [92]. Moreover, according to the structure of polyethylene glycol (15)-hydroxystearate possessing an acyl PEGylated group, a direct covalent bonding between this group and the amine on the N-terminal chain of a peptide can also be performed via a transacylation reaction. This process to prepare active functionalized LNCs by transacylation reaction was patented by Benoit and Perrier in 2010 [93]. Finally, the surface decoration can also be performed by a simple physico-chemical adsorption. This last strategy was particularly developed using a cell penetrating peptide, permitting improved capacity for NPs to cross cellular membranes with low toxicity and via energy-dependent and/or -independent mechanisms [28,94]. Indeed, Karim et al. used the NFL peptide, known to specifically enter glioblastoma cells and disturb the microtubule network [29], to functionalize the surface of ferrocifen-loaded LNCs [95]. Due to this functionalization, the uptake in U87MG cells (glioma cancer cell line) of the corresponding functionalized LNCs was higher than with conventional LNCs and lower in astrocytes (normal human astrocytes). This uptake seemed to be an energy-dependent process—a combination of micropinocytosis, clathrin-mediated and caveolin-mediated endocytosis [95].

4. Ferrocifen-Loaded LNCs: In Vitro Studies

Most of the ferrocifen compounds synthesized in recent decades have shown a promising efficacy on the National Cancer Institute (NCI) panel of 60 cancer cell lines (lung, breast, brain, ovary, kidney, prostate, melanoma, leukemia, colon, CNS, etc.), as presented in Tables 2 and 3.

Several studies demonstrated that the IC₅₀ values were not affected by the encapsulation of ferrocifens into LNCs, whatever the formulation used. Indeed, Lainé et al. showed that the IC₅₀ of free P15 on MDA-MB-231 breast cancer cells was 2 µM. The same value was found after LNC encapsulation [55]. For P53, Karim et al. obtained a similar IC₅₀ on U87 mg glioma cells free or encapsulated into LNCs, with even a better efficacy after NFL peptide adsorption on P53 LNCs [95]. It was shown in this study that LNCs did not lead to any additional toxicity to the cancer cells. This was confirmed on SK-Mel28 melanoma cells by Resnier et al., where P5 and DP1 had the same toxicity profiles as free compounds or were encapsulated into LNCs, with no variation of the IC₅₀ [59]. The same conclusion can be drawn for another melanoma cell line, B16F10, for free P722- or P722-loaded LNCs [96]. Moreover, several in vitro assessments showed that ferrocifens could induce both senescence and apoptosis depending on the concentration used. Indeed, Vessières et al. showed that P15 led to a higher percentage of senescence in both MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells by using a senescence-associated β-galactosidase assessment (one of the markers of senescence), compared to the tamoxifen (OH-TAM) [54], as shown in Figure 6a. The encapsulation of P15 in LNCs did not hamper its effect on MDA-MB-231 cells, as revealed by Lainé et al., who found that flow cytometry analysis confirmed a senescence phenomenon with an S phase cycle arrest after two days of treatment at the corresponding P15 IC₅₀, 1 µM (Figure 6b) [55].

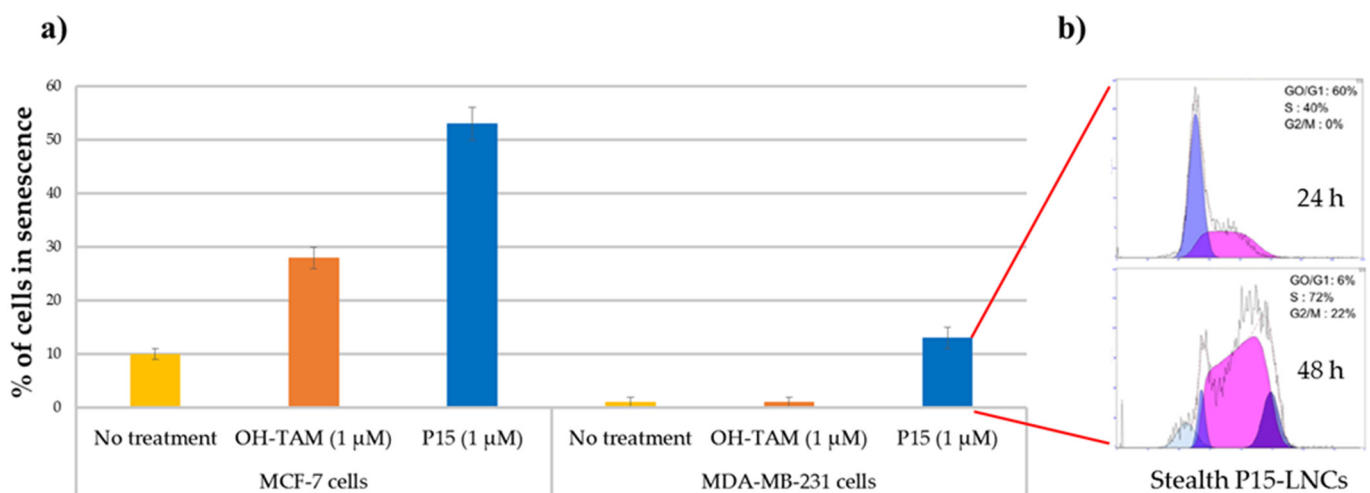


Figure 6. (a) Percentage of cells in senescence obtained by SA-galactosidase staining, 5 days after treatment on MCF-7 cells and MDA-MB-231 cells (no treatment as control in yellow; OH-TAM at 1 µM in orange; P15 at 1 µM in blue); (b) flow cytometric analysis profile of the MDA-MB-231 cell cycle 24 and 48 h after stealth P15-LNC treatment. A cell cycle arrest in S phase was observed corresponding to a senescence phenomenon (adapted with permission from [54,55], Copyright 2021 Elsevier).

Moreover, flow cytometry analysis allowed determination of the effect of concentration on the apoptotic or senescence pathways. Indeed, Lainé et al. showed that at 0.1 µM, DP1-loaded LNCs induced cell cycle blockage in the S phase in 9L glioma cells, a characteristic of senescence, whereas at a higher concentration (0.5 µM), DP1-loaded LNCs blocked cells in the G0/G1 phase and led to apoptosis. This was confirmed by the counting of the apoptotic cells: 15% of apoptotic cells at 0.5 µM of DP1 compared to 5% at 0.1 µM [55]. Using a different method, Topin-Ruiz et al. demonstrated that P722-loaded LNCs potentiated apoptosis via the intrinsic pathway: increase in procaspase 9, cleaved caspase 9 and procaspase 3 in B16F10 melanoma cells after treatment, opening up a new therapeutic strategy with encapsulated P722 [96].

Finally, while ferrocifens demonstrated outstanding effects on various cancer cell lines, it is important to note that these compounds resulted in little or no toxicity on healthy cells, such as melanocytes and astrocytes, even after encapsulation into LNCs [37,39].

Indeed, Allard et al. showed that at a concentration up to 10 μM for P5, the cell viability of astrocytes was still higher than 80%, whereas the IC_{50} of P5 on glioma 9L cells was about 0.5 μM . This phenomenon was explained by the fact that P5 could take advantage of the microenvironment of the cancerous cell, rich in ROS and leading to the corresponding QM, whereas the high amount of antioxidant proteins such as glutathione in astrocytes allowed an efficient scavenging of ROS. Another explanation advanced by the authors would be due to the easier accessibility of ferrocifens to the intracellular target during cell division. The same result was observed with conventional loaded LNCs, confirming the theory that the low toxicity observed in healthy cells is due to the mechanism of action of these organometallic compounds and not to an active targeting strategy. However, in some studies, the surface modification of the LNCs with active ligands (antibody, peptide, etc.) was studied, either because they did not contain ferrocifens [26] or because the recognition of certain cancer cells by active targeted LNCs was expected to allow an even more specific accumulation in the tumor cells, as observed, for example, with NFL P53 LNCs [95].

5. Ferrocifen-Loaded Lipid Nanocapsules: In Vivo Experiments

All the in vivo studies carried out on ferrocifen-loaded lipid nanocapsules (LNCs) are summarized in Table 4 below. Several ferrocifens (P5, P15, DP1, P53 and P722) were successfully encapsulated in LNCs. The efficiency of these drug delivery systems on several cancer cells lines (glioma, melanoma, breast cancer) was discussed. No cytotoxicity or hepatotoxicity was found, whatever the number of injections, administration route or formulation strategy.

Table 4. In vivo studies performed with P5-, P15-, P53- and DP1-loaded LNCs on glioblastoma, metastatic melanoma and breast cancers.

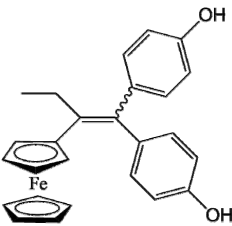
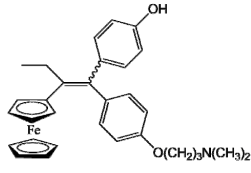
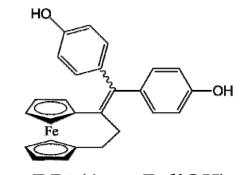
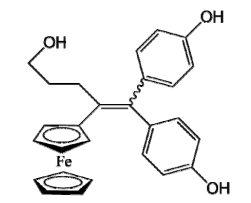
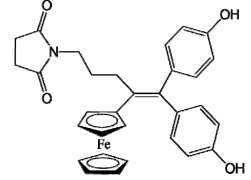
Ferrocifens Used (Names)	Pathology	LNC Formulation	Encapsulation Efficiency (Drug Loading)	In Vivo Studies
 <p>P5 (Fc-di-OH)</p>	Glioblastoma (9L glioma cells)	Conventional LNCs	>98% (1.0 mg/g or 6.5 mg/g)	Single intratumoral injection (400 μL); ectopic model [39]
	Glioblastoma (9L glioma cells)	Conventional LNCs	96% (1.0 mg/g or 6.5 mg/g)	Single intracranial injection by CED (60 μL , 0.36 mg/rat) + 3 irradiations of 6 Gy doses; orthotopic model [58]
	Glioblastoma (9L glioma cells)	NFL-TBS-63 peptide-coated LNCs	(6.1 mg/mL)	Intracarotid injection (400 μL , 2.5 mg/rat); orthotopic model [28]
	Glioblastoma (9L glioma cells)	Stealth LNCs	>98% (6.5 mg/g)	Injection by CED (60 μL , 0.36 mg/kg rat); orthotopic model [28]
	Glioblastoma (9L glioma cells)	Stealth LNCs and conventional LNCs	(6.5 mg/g)	Single intravenous injection (400 μL , 2.4 mg/rat); ectopic model [88]
	Glioblastoma (U87MG cells)	LNC-loaded MIAMI cells	(2.6 mg/mL)	Single intravenous injection (400 μL , 2.4 mg/rat); orthotopic model [88]
	Glioblastoma (U87MG cells)	LNC-loaded MIAMI cells	(6.0 mg/g of LNCs) 20 μg of P5/MIAMI cells	Intracarotid injection (400 μL , 2.4 mg/rat), orthotopic model [97]
	Glioblastoma (U87MG cells)	LNC-loaded MIAMI cells	(6.0 mg/g of LNCs) 20 μg of P5/MIAMI cells	CED injection (60 μL , 0.36 mg/rat), orthotopic model [97]
	Glioblastoma (U87MG cells)	LNC-loaded MIAMI cells	(2.6 mg/mL)	Intratumoral injection (100 μL), heterotopic model [98]
	Melanoma (SK-Mel28 human cells)	Stealth LNCs	92% (6.0 mg/mL)	Intratumoral injection (3.6 μg /mouse), orthotopic model [57]
				Repeated intravenous injection (45 mg/kg); ectopic model [59]

Table 4. Cont.

Ferrocifens Used (Names)	Pathology	LNC Formulation	Encapsulation Efficiency (Drug Loading)	In Vivo Studies
 P15 (FcOHTam)	Breast cancer (MDA-MB-231 cells)	Stealth LNCs	100% (8.0 mg/mL)	Repeated intraperitoneal injection (2×) (20 mg/kg); ectopic model [55]
 DP1 (Ansa-FcdiOH)	Melanoma (SK-Mel28 human cells)	Stealth LNCs	96% (6.0 mg/mL)	Repeated intravenous injection (45 mg/kg); ectopic model [59]
		Stealth LNCs with Bcl-2 siRNA	85% (6.0 mg/mL)	Repeated intravenous injection (45 mg/kg); ectopic model [59]
 P53 (FctriOH)	Glioblastoma (9L glioma cells)	Stealth LNCs	(6.4 mg/g)	Repeated intravenous injection (10×) (20 mg/kg); ectopic model [99]
	Glioblastoma (U87MG cells)	NFL-TBS40-63 peptide-coated LNCs	>99% (2.67 mg/g)	Intravenous injection (2×) (70 µL, 20 mg/kg); ectopic model [95]
 P722	Melanoma (B16F10 cells)	Stealth LNCs	65%	Intraperitoneal injection (7 mg/kg); orthotopic model [96]

5.1. Glioblastoma

Malignant brain tumors are among the most severe cancers due to their poor diagnosis and life expectancy. Glioblastoma is the most common and aggressive type of primary malignant brain tumor, resulting in the assignment of grade IV, the highest grade in the World Health Organization classification [100]. Glioblastoma remains a difficult cancer to treat; surgery followed by radiotherapy and/or chemotherapy only slightly increases survival rates. Indeed, even if some improvements in diagnosis and treatments have been made, the survival rate still remains low, with most patients dying within two years after diagnosis. One of the main problems in treating glioblastoma is the need to cross the blood–brain barrier (BBB). Thus, discovering new strategies and treatments to cross the BBB and target the tumoral microenvironment remains a challenge. For example, in recent decades, convection-enhanced delivery (CED) has been developed (in the early 1990s) and is now considered as a promising administrative route [101,102]. This technique is a local delivery method (direct intracranial delivery) that enhances the drug brain distribution by continuously injecting a therapeutic fluid under positive pressure [102,103]. According to MacKay et al. [103], the ideal nanoparticle for CED would be smaller than 100 nm in diameter with a neutral or negative surface charge. Thus, LNCs seem to have the required characteristics as they can be formulated with a diameter of around 50 nm, with a zeta potential that is often negative. Allard et al. and Huynh et al. demonstrated that using P5-loaded LNCs for CED injection was promising but strongly dependent on the formulation strategy [39,97]. Indeed, several studies demonstrated the importance of the formulation process chosen (conventional P5-LNCs; stealth P5-LNCs; peptide-coated P5-LNCs) depending on the administration route: local administration via CED, intravenous

injection or intracarotid injection. Indeed, Huynh et al. obtained an increase in the median survival time (28 days compared to 25 days for untreated group) of orthotopic 9L glioma-bearing rats after CED injection of conventional P5-LNCs compared to stealth P5-LNCs. The opposite was observed after a single intracarotid injection (30 days with the stealth P5-LNCs compared to 27 days with the conventional LNCs) [97], as shown in Figure 7a. These results can be linked to the PEGylation paradox. On the one hand, PEG allows an increase in blood circulation time, avoiding the opsonization phenomenon and resulting in a higher accumulation of nanocarriers at the tumor site. On the other hand, PEG can prevent the cell internalization of nanocarriers [16]. The passive targeting strategy is thus more suitable for a systemic injection than for a local injection. In another study, Lainé et al. made the same observation: the administration route had to be decided based on the formulation strategy. The authors formulated NFL peptide-coated P5-loaded LNCs and injected them into an orthotopic rat model (9L glioma cells) by a single intracarotid or by CED injections. No improvement in the median survival rate was obtained by CED injection, compared to the intracarotid injection, for which the survival of rats was improved, with some animals surviving until 44 days with a treatment by NFL peptide-coated P5-LNCs (a median survival time of 27 days for the untreated rats was obtained) [28]. It is a clear improvement compared to the 30 days of median survival time obtained with stealth P5-LNCs and the 27 days obtained for the conventional P5-LNCs in the same orthotopic model [97]. These results, shown as Kaplan–Meier plots in Figure 7a, demonstrated the advantage of active targeting for systemic administration, by using peptide-coated ferrocifen LNCs.

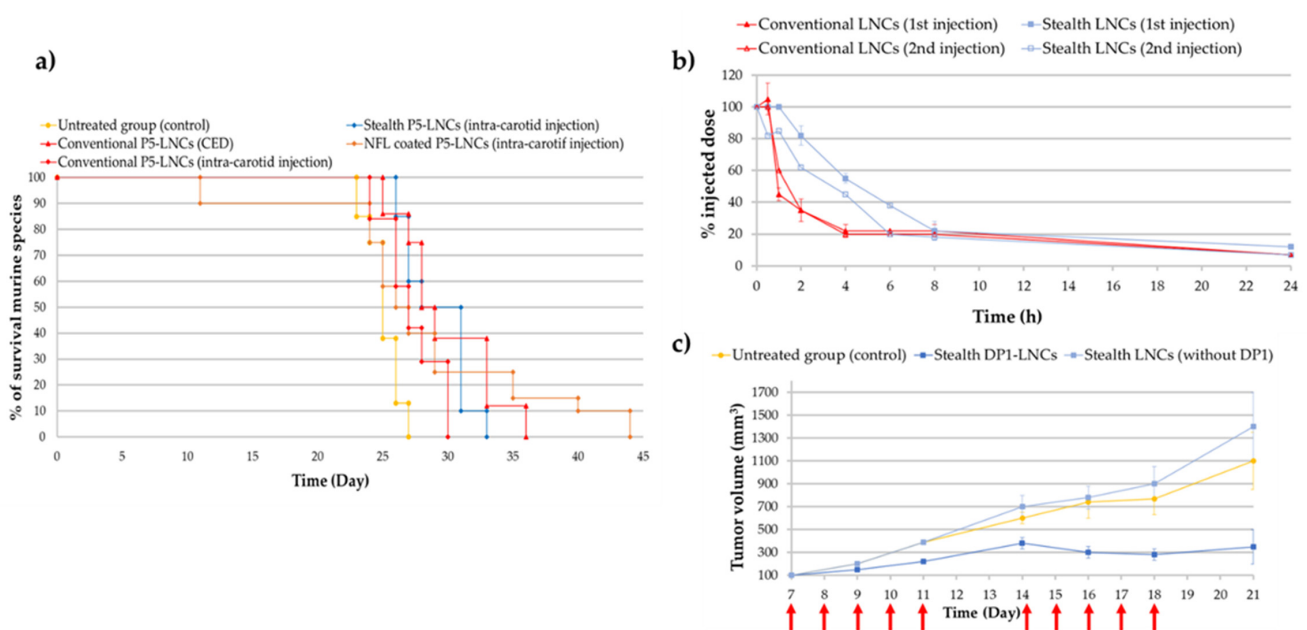


Figure 7. (a) Kaplan–Meier survival plots for 9L glioma-bearing rats receiving CED injection of conventional P5-LNCs (red triangle) or intracarotid injection of NFL-coated P5-LNCs (orange diamond), stealth P5-LNCs (blue diamond) and conventional P5-LNCs (red diamond). The red arrow indicates the injection day: day 6 (adapted with permission from [28,97], Copyright 2021 Elsevier); (b) ABC phenomenon evaluation of stealth LNCs between the first (blue square) and second injection (unfilled blue square) (adapted with permission from [99], Copyright 2021 Elsevier); (c) in vivo treatment efficiency of stealth DP1-LNCs (dark blue square) on ectopic 9L glioma-bearing rats, the red arrows indicated the days of injections (adapted with permission from [99], Copyright 2021 Elsevier).

Finally, it is well-known that repeated intravenous injections may allow the increase in the drug concentration in tumor tissue but may lead to some side effects such as the Accelerated Blood Clearance (ABC) phenomenon and hepatotoxicity [104]. Even if only one study was performed on this ABC phenomenon with ferrocifens, the results obtained by Lainé et al. were unusual. Indeed, the second injection of stealth DP1-loaded

LNCs did not show any drastic decrease in LNC blood circulation time, as shown in Figure 7b, in comparison with several studies where PEGylation of nanocarriers such as liposomes or gold NPs induced an immune response, leading to a rapid clearance of the nanocarriers [99,104,105]. Moreover, repeated intravenous injections (10 injections) of stealth DP1-LNCs did not induce any hepatotoxicity according to immunohistological analyses. A promising tumor volume reduction was even obtained, from 1400 mm³ for untreated rats to 300 mm³ for treated rats after 21 days (Figure 7c), showing that this drug delivery nanocarrier could be injected into animals several times with good benefits. These results could be explained by the senescence phenomenon, with an S phase arrest evidenced during the cell cycle and confirmed by previous observations made with DP1, such as the inhibition of pluripotent cancer cells [106]. Thus, all the studies performed on ferrocifen-loaded LNCs showed very promising results in glioma models.

5.2. Other Cancers

5.2.1. Breast Cancer

Breast cancer is one of the most common cancers, corresponding to 15% of all cancer deaths among women. Metastasis to other organs such as the liver, lung, brain and bones, is frequent and accounts for the majority of deaths from this cancer [107,108]. Hopefully, the mechanism involved in breast cancer metastasis is now better understood (discovery of genes related to breast cancer), aiding the development of new therapeutic strategies. The estrogen receptor (ER) is known as a major target for breast cancer chemotherapy. Indeed, more than 70% of breast cancers are ER α +. This is the reason selective estrogen receptor modulators (SERMs) have been developed in recent decades. The best known SERM is tamoxifen (TAM). However, one major drawback of this chemotherapeutic molecule is its selective activity against only hormone-dependent estrogen receptor ER α + cases and not hormone-independent estrogen receptor ER α - cases. Moreover, TAM therapy presents some side effects such as risk of endometrial cancer, pulmonary embolism, stroke and deep-vein thrombosis [109]. As previously mentioned, ferrocifens were effective *in vitro* against breast cancer cell lines such as MCF-7 cells (ER α + cells) and MDA-MB-231 cells (ER α - cells). The *in vivo* efficacy of P15 was explored in triple-negative breast cancer (TNBC) cell lines, MDA-MB-231 cells, using stealth P15-LNCs [55]. An ectopic model was chosen and two intraperitoneal injections of the suspension were applied. This study provided evidence that blank stealth LNCs did not have any biological effect on the MDA-MB-231 cells compared to the stealth P15-LNCs, confirming the *in vitro* results obtained on the nontoxicity of LNCs. A significant 36% decrease in the tumor volume was found for mice treated with stealth P15-LNCs after 24 days of treatment injection compared to the blank stealth LNC control (Figure 8a). This tumor volume reduction was associated with the cytostatic effect of the stealth P5-LNCs on MDA-MB-231 cells, as shown *in vitro* by flow cytometry, with an S cell cycle arrest. This is the first result evidenced *in vivo* with ferrocifens on this highly resistant cancer and it appears to be very promising [55].

5.2.2. Metastatic Melanoma

Malignant melanoma is the leading cause of death from skin cancer with a 5-year survival rate of less than 10%. Normally, surgery is an adequate treatment when the tumor is diagnosed early enough. A chemotherapy treatment with dacarbazine (DTIC) is additionally applied, with a low response rate [110]. There is a real need to overcome the high resistance phenomena of melanoma cells against chemotherapy. Thus, Resnier et al. decided to test ferrocifen-LNCs against this pathology. They showed promising results with ferrocifen-loaded LNCs on metastatic melanoma compared to dacarbazine treatment. Stealth DP1-loaded LNCs and stealth P5-loaded LNCs were intravenously injected (1 injection per day, 5 days consecutively) for 3 weeks on an ectopic murine model of human SK-Mel28 melanoma cells. The results demonstrated that stealth DP1-loaded LNC treatment was more efficient than stealth P5-loaded LNCs and DTIC treatment. Indeed, the tumor volume reduction was better with the use of formulated DP1, 21 days

after the first injection, as shown in Figure 8b. The tumor volume was reduced by 40% with stealth DP1-LNCs and 9% with stealth P5-LNCs compared to the untreated group and a difference of around 13% was observed between stealth DP1-LNCs and DTIC treatments. This result confirmed the highest sensitivity of DP1 observed in vitro (compared to P5) on human SK-Mel28 melanoma cells ($IC_{50} = 1 \mu\text{M}$ for DP1; $IC_{50} = 3 \mu\text{M}$ for P5 and $IC_{50} > 100 \mu\text{M}$ for DITC) [59].

Moreover, as previously mentioned for 9L glioma cells [99], this study confirmed that LNCs did not present any hepatotoxicity. Indeed, after several injections, the amount of aspartate aminotransferase (ASAT) and alanine aminotransferase (ALAT), enzymatic biomarkers of liver inflammation, were similar between blood samples from untreated mice and blood samples from treated mice [59].

Finally, it was shown for the first time, in another recent study, that some ferrocifens could induce a new therapeutic pathway in resistant melanoma cancer. Indeed, as previously described, P722-loaded LNCs were used on an orthotopic murine model of human B16F10 melanoma. In addition to an induction of apoptosis via the intrinsic pathway, the results revealed a significant increase in activated CD_8^+ T lymphocytes after treatment of stealth P722-LNCs, leading to immunogenic cell death [96].

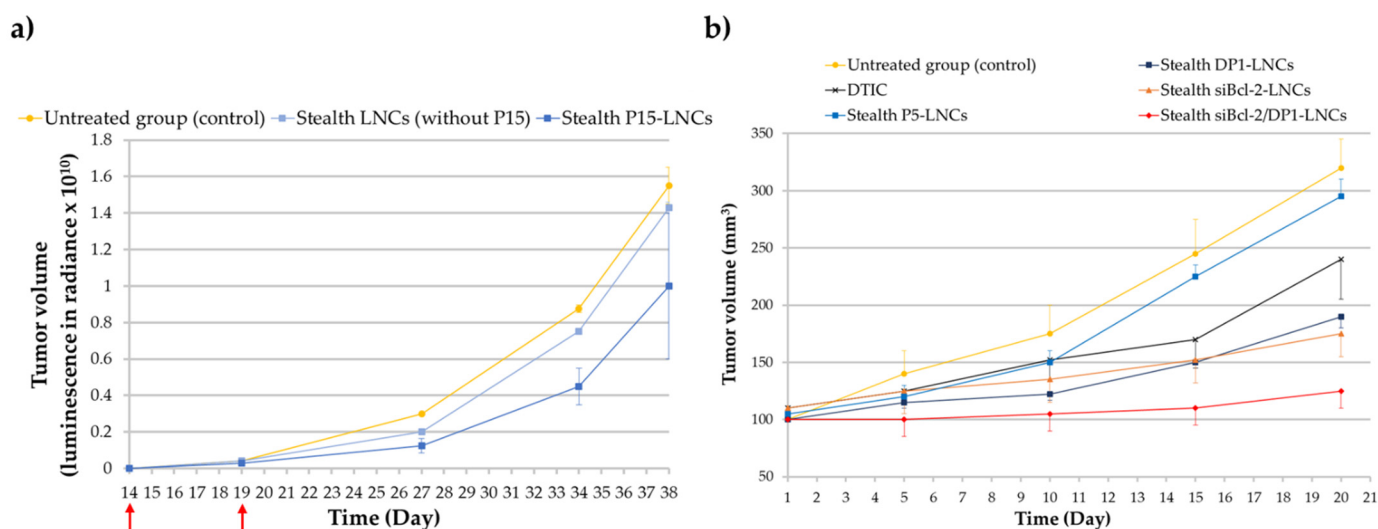


Figure 8. (a) Tumor volume evolution after intraperitoneal injections of stealth P15-LNCs in mice bearing ectopic MDA-MB-231 cells. The red arrows indicate the days of treatment. Bioluminescence has been measured in radiance (pixels/second/cm²/square) in order to obtain the tumor volume (adapted with permission from [55], Copyright 2021 Elsevier); (b) tumor volume evolution after repeated intravenous injections of stealth DP1-LNCs (blue dark square), P5-LNCs (blue square), dacarbazine/DTIC (dark cross), stealth siBcl-2-LNCs (orange triangle) and stealth siBcl-2/DP1-LNCs (red diamond) on SK-Mel28 cells bearing mice. The abscissa axis starts after the treatment injections (adapted with permission from [59], Copyright 2021 Elsevier).

6. Association with Other Therapies: An Interesting Perspective

6.1. Ferrocifens and Radiotherapy

As previously described, glioblastoma remains difficult to treat despite improvements in chemotherapy and radiotherapy [111–113]. In previous work, Allard et al. showed that using LNCs to encapsulate a lipophilic radiopharmaceutical compound for internal radiotherapy could be promising [32]. External sources of radiation remain the chief radiotherapeutic treatment method; however, ferrocifen-loaded LNCs were indeed used in combination with external radiotherapy on an orthotopic 9L glioma model in rats. After administration of P5-loaded LNCs by CED at a corresponding dose of 0.36 mg/rat, followed by three irradiations of 6 Gy doses, a synergic effect between ferrocifen treatment and radiotherapy was observed. With only chemotherapy treatment using P5-loaded LNCs, the median survival time of rats was improved: 25 days for the untreated rats and 27.5 days

for the treated rats [58,88]. Better yet, combination with external irradiation treatments led to a clear improvement: the median survival time of rats was 40 days, similar to that for NFL-coated P5-LNCs [28,58]. Local irradiation was able to potentiate the cytotoxic action of P5 with the production of ROS inside the tumor microenvironment, allowing the formation of the corresponding QM. Indeed, it is well-known that the level of ROS in the brain is low due to the high concentration of antioxidants. Thus, ionizing radiation probably allowed the formation of ROS followed by the oxidation of Fe(II) to Fe(III) of the ferrocifen. Ferrocifen-loaded LNCs could thus be used as an efficient radiosensitive anticancer drug delivery system.

6.2. Ferrocifens and Gene Therapy

Several studies highlighted the idea that overexpression of Bcl-2 could be responsible for the chemoresistance of melanoma [114,115]. Bcl-2 is a gene regulating the apoptotic pathway by blocking the oligomerization of proapoptotic proteins such as Bax and Bak. Small interfering RNA (siRNA)-mediated gene therapy could be a promising strategy to inhibit the expression of Bcl-2 in melanoma. However, one major problem of siRNA is its low bioavailability in the bloodstream and incapacity to diffuse through the cell membrane [116]. Nevertheless, it has been demonstrated that LNCs could be used as DNA and siRNA delivery systems [31,89,117–119]. Previously, Resnier et al. showed that siRNA preformulated in lipoplexes could be incorporated in stealth LNCs with an encapsulation efficiency of around 60%, and no cytotoxicity of this nanocarrier was seen in SK-Mel28 melanoma cells [85]. The same authors then decided to combine gene therapy and chemotherapy by the association of Bcl-2 siRNA and stealth DP1-loaded LNCs to treat SK-Mel28 melanoma cells. DP1 was used for the *in vivo* study as it was the most efficacious in SK-Mel28 melanoma cells compared to P5, as mentioned previously [59,85]. After repeated intravenous injections of the stealth siBcl-2/DP1-LNCs for one week followed by two weeks of stealth DP1-LNC treatment, a synergic effect was observed in an ectopic murine model. This allowed a tumor reduction of about 50% compared to 25% for an individual administration of siBcl-2-LNCs and stealth DP1-LNCs. Bcl-2 siRNA would inhibit Bcl-2 expression, allowing melanoma cells to respond to the action of DP1, thereafter inducing apoptosis as well as senescence [59]. This was the first confirmation that ferrocifen-loaded LNCs could be very promising nanocarriers combined with gene therapy (Figure 8b)) in a multitherapy strategy.

6.3. Ferrocifen-LNC-Loaded Cellular Vectors

Another potent strategy to target cancer cells with NPs is to use mesenchymal stromal cells (MSCs), such as marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a subpopulation of MSCs. In glioblastoma studies, it has been highlighted that MIAMI cells were mainly localized at the border between tumor cells and healthy brain cells. For this application, LNCs were efficiently internalized into MIAMI cells without any negative effects on cell viability and differentiation, allowing their migration towards U87MG glioma cells. However, such modified MIAMI cells did not modify the survival of U87MG-bearing mice [98,120–122]. In further studies, ferrocifens were encapsulated into LNC-loaded MIAMI cells in order to target U87MG glioma cells [57,98]. The internalization of the P5-loaded LNCs in MIAMI cells did not induce any cytotoxic effect on MIAMI cells. A single intratumoral injection of this new vector on an orthotopic U87MG glioma model in nude mice resulted in a significant reduction in the tumor volume [98]. This was confirmed by a study of Clavreul et al., where they compared the efficacy of a single intratumoral injection of P5 LNC-loaded MIAMI cells (treatment 1) with the efficiency of a single intratumoral injection of P5-loaded LNCs (treatment 2). Magnetic resonance imaging (MRI) indicated that treatment 1 induced a better reduction in the tumor volume. Even though the median survival time was still modest (29 days), this increase was obtained with a single injection (dose of 3.6 µg/animal) [57], whereas chemotherapy with ferrocifen-loaded LNCs usually involved several injections [99], or a higher dose of treatment (2.4 mg/animal with a CED

injection, 0.36 mg/animal with an intravenous injection) [28,39,88]. Combining stem cell therapy with ferrocifen-loaded LNCs could be another promising alternative tool.

7. Conclusions

Since their first synthesis at the end of the 1990s, ferrocifens, molecules of the organometallic family of compounds, have been under constant investigation to understand their mechanisms of action. They have shown remarkable *in vitro* antiproliferative and cytotoxic effects on various cancer cell lines. Their mechanisms of action are different from those of the usual chemotherapeutic compounds (cisplatin, doxorubicin, paclitaxel and tamoxifen), well-known DNA-damaging or microtubule-stabilizing agents and SERMs. Indeed, ferrocifens are molecules endowed with multiple biological properties, including anticancer activity, that induce inhibition of cancer cell growth through apoptosis and/or senescence according to the conditions previously described (structure of the complexes, ferrocifen concentration, cell lines tested depending on whether they are healthy or cancerous). Additionally, by taking advantage of the microenvironment of the tumor (acid pH and oxidative stress), these organometallic compounds might overcome the resistance of MDR cancer to apoptosis. Moreover, ferrocenyl quinone methide, which has selective electrophilic reactivity, can interact with thioredoxin reductase and so inhibit its activity, leading to the production of ROS. These promising *in vitro* results have been confirmed widely in *in vivo* experiments by using LNCs as nanocarriers to encapsulate the highly lipophilic ferrocifens. Whether on ectopic or orthotopic models, whatever the cancer cell lines tested—glioblastoma, breast cancer, metastatic melanoma, all well-known for their chemoresistance to current therapy—in *in vivo* treatment by ferrocifen LNCs revealed, in most cases, an increased median survival rate in animal models. The rationale for combining therapies using drugs or other strategies (gene therapy, radiotherapy, stem cell therapy, etc.) operating via different mechanisms and/or acting synergistically, and thus decreasing the likelihood that resistant cancer cells will develop, was also successfully tested with ferrocifen LNCs.

However, even if there is evidence for the effectiveness of these nanomedicines, it is important to keep a critical eye on the results obtained as they can vary depending on the selected model—ectopic or orthotopic. For example, it is well-known that orthotopic tumor models develop a tumor microenvironment closer to the reality than the ectopic tumor models [123]. Moreover, for most of the studies, the cell lines were not directly derived from patients. Thus, to go deeper into the promising preclinical studies with ferrocifen-loaded LNCs, it should be interesting to perform experiments *in vivo* on PDX models to reduce, as far as possible, the gap between human tumors and preclinical models, so as to be more representative of the tumor microenvironment of human patients [124,125].

Author Contributions: Original draft preparation, P.I.; writing—review and editing, P.I., C.P., E.L., G.J.; supervision, C.P., E.L., G.J. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: This article is based upon work from COST Action STRATAGEM, CA17104, supported by COST (European Cooperation in Science and Technology) (www.cost.eu, accessed on 5 May 2021). The authors would like to thank this COST Action “New diagnostic and therapeutic tools against multidrug resistant tumours” and the Agence Nationale de la Recherche (ANR PRCE NaTeMOc N° ANR-19-CE18-0022-01) for its financial support.

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

References

1. Uziely, B.; Jeffers, S.; Isacson, R.; Kutsch, K.; Wei-Tsao, D.; Yehoshua, Z.; Libson, E.; Muggia, F.M.; Gabizon, A. Liposomal Doxorubicin: Antitumor Activity and Unique Toxicities during Two Complementary Phase I Studies. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **1995**, *13*, 1777–1785. [[CrossRef](#)]

2. Bobo, D.; Robinson, K.J.; Islam, J.; Thurecht, K.J.; Corrie, S.R. Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date. *Pharm. Res.* **2016**, *33*, 2373–2387. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Couvreur, P. Nanomedicine: From Where Are We Coming and Where Are We Going? *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2019**, *311–312*, 319–321. [[CrossRef](#)]
4. Reedijk, J. Platinum Anticancer Coordination Compounds: Study of DNA Binding Inspires New Drug Design. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2009**, *2009*, 1303–1312. [[CrossRef](#)]
5. Al-Malky, H.S.; Al Harthi, S.E.; Osman, A.-M.M. Major Obstacles to Doxorubicin Therapy: Cardiotoxicity and Drug Resistance. *J. Oncol. Pharm. Pract. Off. Publ. Int. Soc. Oncol. Pharm. Pract.* **2020**, *26*, 434–444. [[CrossRef](#)]
6. Ali, S.; Rasool, M.; Chaoudhry, H.; N Pushparaj, P.; Jha, P.; Hafiz, A.; Mahfooz, M.; Abdus Sami, G.; Azhar Kamal, M.; Bashir, S.; et al. Molecular Mechanisms and Mode of Tamoxifen Resistance in Breast Cancer. *Bioinformation* **2016**, *12*, 135–139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Zhu, L.; Chen, L. Progress in Research on Paclitaxel and Tumor Immunotherapy. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **2019**, *24*. [[CrossRef](#)]
8. Cao, Y.; Wei, Z.; Li, M.; Wang, H.; Yin, L.; Chen, D.; Wang, Y.; Chen, Y.; Yuan, Q.; Pu, X.; et al. Formulation, Pharmacokinetic Evaluation and Cytotoxicity of an Enhanced- Penetration Paclitaxel Nanosuspension. *Curr. Cancer Drug Targets* **2019**, *19*, 338–347. [[CrossRef](#)]
9. Jaouen, G.; Vessieres, A. Transition Metal Carbonyl Oestrogen Receptor Assay. *Pure Appl. Chem.* **1985**, *57*, 1865–1874. [[CrossRef](#)]
10. Jaouen, G.; Vessieres, A.; Top, S.; Ismail, A.A.; Butler, I.S. Metal Carbonyl Fragments as a New Class of Markers in Molecular Biology. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 4778–4780. [[CrossRef](#)]
11. Hillard, E.; Vessièrès, A.; Le Bideau, F.; Plazuk, D.; Spera, D.; Huché, M.; Jaouen, G. A Series of Unconjugated Ferrocenyl Phenols: Prospects as Anticancer Agents. *ChemMedChem* **2006**, *1*, 551–559. [[CrossRef](#)]
12. Top, S.; Vessièrès, A.; Cabestaing, C.; Laios, I.; Leclercq, G.; Provot, C.; Jaouen, G. Studies on Organometallic Selective Estrogen Receptor Modulators. (SERMs) Dual Activity in the Hydroxy-Ferrocifen Series. *J. Organomet. Chem.* **2001**, *637–639*, 500–506. [[CrossRef](#)]
13. Vessièrès, A.; Top, S.; Beck, W.; Hillard, E.; Jaouen, G. Metal Complex SERMs (Selective Oestrogen Receptor Modulators). The Influence of Different Metal Units on Breast Cancer Cell Antiproliferative Effects. *Dalton Trans. Camb. Engl.* **2003**, *2006*, 529–541. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Maeda, H. Macromolecular Therapeutics in Cancer Treatment: The EPR Effect and Beyond. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2012**, *164*, 138–144. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Maeda, H. The 35th Anniversary of the Discovery of EPR Effect: A New Wave of Nanomedicines for Tumor-Targeted Drug Delivery—Personal Remarks and Future Prospects. *J. Pers. Med.* **2021**, *11*, 229. [[CrossRef](#)]
16. Danhier, F. To Exploit the Tumor Microenvironment: Since the EPR Effect Fails in the Clinic, What Is the Future of Nanomedicine? *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2016**, *244*, 108–121. [[CrossRef](#)]
17. Sindhvani, S.; Syed, A.M.; Ngai, J.; Kingston, B.R.; Maiorino, L.; Rothschild, J.; MacMillan, P.; Zhang, Y.; Rajesh, N.U.; Hoang, T.; et al. The Entry of Nanoparticles into Solid Tumours. *Nat. Mater.* **2020**, *19*, 566–575. [[CrossRef](#)]
18. Poste, G.; Kirsh, R. Site-Specific (Targeted) Drug Delivery in Cancer Therapy. *Bio/Technology* **1983**, *1*, 869–878. [[CrossRef](#)]
19. Rolland, A.; Bourel, D.; Genetet, B.; Le Verge, R. Monoclonal Antibodies Covalently Coupled to Polymethacrylic Nanoparticles: In Vitro Specific Targeting to Human T Lymphocytes. *Int. J. Pharm.* **1987**, *39*, 173–180. [[CrossRef](#)]
20. Barbet, J.; Machy, P.; Leserman, L.D. Monoclonal Antibody Covalently Coupled to Liposomes: Specific Targeting to Cells. *J. Supramol. Struct. Cell. Biochem.* **1981**, *16*, 243–258. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Hirsjärvi, S.; Passirani, C.; Benoit, J.-P. Passive and Active Tumour Targeting with Nanocarriers. *Curr. Drug Discov. Technol.* **2011**, *8*, 188–196. [[CrossRef](#)]
22. Clemons, T.D.; Singh, R.; Sorolla, A.; Chaudhari, N.; Hubbard, A.; Iyer, K.S. Distinction Between Active and Passive Targeting of Nanoparticles Dictate Their Overall Therapeutic Efficacy. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* **2018**, *34*, 15343–15349. [[CrossRef](#)]
23. Attia, M.F.; Anton, N.; Wallyn, J.; Omran, Z.; Vandamme, T.F. An Overview of Active and Passive Targeting Strategies to Improve the Nanocarriers Efficiency to Tumour Sites. *J. Pharm. Pharmacol.* **2019**, *71*, 1185–1198. [[CrossRef](#)]
24. Heurtault, B.; Saulnier, P.; Pech, B.; Proust, J.-E.; Benoit, J.-P. A Novel Phase Inversion-Based Process for the Preparation of Lipid Nanocarriers. *Pharm. Res.* **2002**, *19*, 875–880. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Heurtault, B.; Saulnier, P.; Benoit, J.-P.; Proust, J.-E.; Pech, B.; Richard, J. Lipid Nanocapsules, Preparation Process and Use as Medicine. U.S. Patent 8057823B2, 15 November 2011. Available online: <https://patents.google.com/patent/US8057823B2/en> (accessed on 17 April 2020).
26. Béduneau, A.; Hindré, F.; Clavreul, A.; Leroux, J.-C.; Saulnier, P.; Benoit, J.-P. Brain Targeting Using Novel Lipid Nanovectors. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2008**, *126*, 44–49. [[CrossRef](#)]
27. Roger, E.; Lagarce, F.; Garcion, E.; Benoit, J.-P. Lipid Nanocarriers Improve Paclitaxel Transport throughout Human Intestinal Epithelial Cells by Using Vesicle-Mediated Transcytosis. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2009**, *140*, 174–181. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Laine, A.-L.; Huynh, N.T.; Clavreul, A.; Balzeau, J.; Béjaud, J.; Vessieres, A.; Benoit, J.-P.; Eyer, J.; Passirani, C. Brain Tumour Targeting Strategies via Coated Ferrociphenol Lipid Nanocapsules. *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Pharm. Verfahrenstechnik EV* **2012**, *81*, 690–693. [[CrossRef](#)]

29. Balzeau, J.; Pinier, M.; Berges, R.; Saulnier, P.; Benoit, J.-P.; Eyer, J. The Effect of Functionalizing Lipid Nanocapsules with NFL-TBS.40-63 Peptide on Their Uptake by Glioblastoma Cells. *Biomaterials* **2013**, *34*, 3381–3389. [[CrossRef](#)]
30. Carradori, D.; Saulnier, P.; Pr at, V.; des Rieux, A.; Eyer, J. NFL-Lipid Nanocapsules for Brain Neural Stem Cell Targeting in Vitro and in Vivo. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2016**, *238*, 253–262. [[CrossRef](#)]
31. David, S.; Montier, T.; Carmoy, N.; Resnier, P.; Clavreul, A.; M evel, M.; Pitard, B.; Benoit, J.-P.; Passirani, C. Treatment Efficacy of DNA Lipid Nanocapsules and DNA Multimodular Systems after Systemic Administration in a Human Glioma Model. *J. Gene Med.* **2012**, *14*, 769–775. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Allard, E.; Hindré, F.; Passirani, C.; Lemaire, L.; Lepareur, N.; Noiret, N.; Menei, P.; Benoit, J.-P. 188Re-Loaded Lipid Nanocapsules as a Promising Radiopharmaceutical Carrier for Internal Radiotherapy of Malignant Gliomas. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2008**, *35*, 1838–1846. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Top, S.; Tang, J.; Vessières, A.; Carrez, D.; Provot, C.; Jaouen, G. Ferrocenyl Hydroxytamoxifen: A Prototype for a New Range of Oestradiol Receptor Site-Directed Cytotoxics. *Chem. Commun.* **1996**, 955–956. [[CrossRef](#)]
34. Top, S.; Dauer, B.; Vaissermann, J.; Jaouen, G. Facile Route to Ferrocifen, 1-[4-(2-Dimethylaminoethoxy)]-1-(Phenyl-2-Ferrocenyl-but-1-Ene), First Organometallic Analogue of Tamoxifen, by the McMurry Reaction. *J. Organomet. Chem.* **1997**, *541*, 355–361. [[CrossRef](#)]
35. Vessières, A.; Wang, Y.; McGlinchey, M.J.; Jaouen, G. Multifaceted Chemical Behaviour of Metallocene (M = Fe, Os) Quinone Methides. Their Contribution to Biology. *Coord. Chem. Rev.* **2021**, *430*, 213658. [[CrossRef](#)]
36. Citta, A.; Folda, A.; Bindoli, A.; Pigeon, P.; Top, S.; Vessières, A.; Salmain, M.; Jaouen, G.; Rigobello, M.P. Evidence for Targeting Thioredoxin Reductases with Ferrocenyl Quinone Methides. A Possible Molecular Basis for the Antiproliferative Effect of Hydroxyferrocifens on Cancer Cells. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 8849–8859. [[CrossRef](#)]
37. Michard, Q.; Jaouen, G.; Vessieres, A.; Bernard, B.A. Evaluation of Cytotoxic Properties of Organometallic Ferrocifens on Melanocytes, Primary and Metastatic Melanoma Cell Lines. *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102*, 1980–1985. [[CrossRef](#)]
38. Nguyen, A.; Vessières, A.; Hillard, E.A.; Top, S.; Pigeon, P.; Jaouen, G. Ferrocifens and Ferrocifenols as New Potential Weapons against Breast Cancer. *CHIMIA* **2007**, *61*, 716–724. [[CrossRef](#)]
39. Allard, E.; Passirani, C.; Garcion, E.; Pigeon, P.; Vessières, A.; Jaouen, G.; Benoit, J.-P. Lipid Nanocapsules Loaded with an Organometallic Tamoxifen Derivative as a Novel Drug-Carrier System for Experimental Malignant Gliomas. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2008**, *130*, 146–153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Soares, M.B.P.; Costa, J.F.O.; de S a, M.S.; dos Santos, R.R.; Pigeon, P.; Jaouen, G.; Santana, A.E.G.; Goulart, M.O.F.; Hillard, E. Antiparasitic and Immunomodulatory Activities of 1,1-Bis(4-Hydroxyphenyl)-2-Phenyl-but-1-Ene and Its Protected and Free 2-Ferrocenyl Derivatives. *Drug Dev. Res.* **2010**. [[CrossRef](#)]
41. Jaouen, G.; Vessières, A.; Top, S. Ferrocifen Type Anti Cancer Drugs. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 8802–8817. [[CrossRef](#)]
42. Hillard, E.; Vessières, A.; Thouin, L.; Jaouen, G.; Amatore, C. Ferrocene-Mediated Proton-Coupled Electron Transfer in a Series of Ferrocifen-Type Breast-Cancer Drug Candidates. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 285–290. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Kovacic, P. Unifying Mechanism for Anticancer Agents Involving Electron Transfer and Oxidative Stress: Clinical Implications. *Med. Hypotheses* **2007**, *69*, 510–516. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Messina, P.; Labbé, E.; Buriez, O.; Hillard, E.A.; Vessières, A.; Hamels, D.; Top, S.; Jaouen, G.; Frapart, Y.M.; Mansuy, D.; et al. Deciphering the Activation Sequence of Ferrociphenol Anticancer Drug Candidates. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 6581–6587. [[CrossRef](#)]
45. Hillard, E.A.; de Abreu, F.C.; Ferreira, D.C.M.; Jaouen, G.; Goulart, M.O.F.; Amatore, C. Electrochemical Parameters and Techniques in Drug Development, with an Emphasis on Quinones and Related Compounds. *Chem. Commun.* **2008**, 2612–2628. [[CrossRef](#)]
46. Zekri, O.; Hillard, E.A.; Top, S.; Vessières, A.; Pigeon, P.; Plamont, M.-A.; Huché, M.; Boutamine, S.; McGlinchey, M.J.; Müller-Bunz, H.; et al. Role of Aromatic Substituents on the Antiproliferative Effects of Diphenyl Ferrocenyl Butene Compounds. *Dalton Trans. Camb. Engl.* **2009**, 4318–4326. [[CrossRef](#)]
47. Wang, Y.; Pigeon, P.; Top, S.; McGlinchey, M.J.; Jaouen, G. Organometallic Antitumor Compounds: Ferrocifens as Precursors to Quinone Methides. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2015**, *54*, 10230–10233. [[CrossRef](#)]
48. Wang, Y.; Pigeon, P.; Top, S.; Sanz García, J.; Troufflard, C.; Ciofini, I.; McGlinchey, M.J.; Jaouen, G. Atypical Lone Pair- π Interaction with Quinone Methides in a Series of Imido-Ferrociphenol Anticancer Drug Candidates. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2019**, *58*, 8421–8425. [[CrossRef](#)]
49. Richard, M.-A.; Hamels, D.; Pigeon, P.; Top, S.; Dansette, P.M.; Lee, H.Z.S.; Vessières, A.; Mansuy, D.; Jaouen, G. Oxidative Metabolism of Ferrocene Analogues of Tamoxifen: Characterization and Antiproliferative Activities of the Metabolites. *ChemMedChem* **2015**, *10*, 981–990. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Wang, Y.; Dansette, P.M.; Pigeon, P.; Top, S.; McGlinchey, M.J.; Mansuy, D.; Jaouen, G. A New Generation of Ferrociphenols Leads to a Great Diversity of Reactive Metabolites, and Exhibits Remarkable Antiproliferative Properties. *Chem. Sci.* **2018**, *9*, 70–78. [[CrossRef](#)]
51. G ormen, M.; Pigeon, P.; Top, S.; Hillard, E.A.; Huché, M.; Hartinger, C.G.; de Montigny, F.; Plamont, M.-A.; Vessières, A.; Jaouen, G. Synthesis, Cytotoxicity, and COMPARE Analysis of Ferrocene and [3]Ferrocenophane Tetrasubstituted Olefin Derivatives against Human Cancer Cells. *ChemMedChem* **2010**, *5*, 2039–2050. [[CrossRef](#)]

52. Scalcon, V.; Citta, A.; Folda, A.; Bindoli, A.; Salmain, M.; Ciofini, I.; Blanchard, S.; de Jesús Cázares-Marinero, J.; Wang, Y.; Pigeon, P.; et al. Enzymatic Oxidation of Ansa-Ferrocifen Leads to Strong and Selective Thioredoxin Reductase Inhibition in Vitro. *J. Inorg. Biochem.* **2016**, *165*, 146–151. [[CrossRef](#)]
53. Jaouen, G.; Top, S.; Vessières, A.; Leclercq, G.; Quivy, J.; Jin, L.; Croisy, A. The First Organometallic Antioestrogens and Their Antiproliferative Effects. *Comptes Rendus Académie Sci. Ser. IIC Chem.* **2000**, *3*, 89–93. [[CrossRef](#)]
54. Vessières, A.; Corbet, C.; Heldt, J.M.; Lories, N.; Jouy, N.; Laios, I.; Leclercq, G.; Jaouen, G.; Toillon, R.-A. A Ferrocenyl Derivative of Hydroxytamoxifen Elicits an Estrogen Receptor-Independent Mechanism of Action in Breast Cancer Cell Lines. *J. Inorg. Biochem.* **2010**, *104*, 503–511. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Lainé, A.-L.; Adriaenssens, E.; Vessières, A.; Jaouen, G.; Corbet, C.; Desruelles, E.; Pigeon, P.; Toillon, R.-A.; Passirani, C. The in Vivo Performance of Ferrocenyl Tamoxifen Lipid Nanocapsules in Xenografted Triple Negative Breast Cancer. *Biomaterials* **2013**, *34*, 6949–6956. [[CrossRef](#)]
56. Wang, Y.; Richard, M.-A.; Top, S.; Dansette, P.M.; Pigeon, P.; Vessières, A.; Mansuy, D.; Jaouen, G. Ferrocenyl Quinone Methide-Thiol Adducts as New Antiproliferative Agents: Synthesis, Metabolic Formation from Ferrociphenols, and Oxidative Transformation. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2016**, *55*, 10431–10434. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Clavreul, A.; Montagu, A.; Lainé, A.-L.; Tétaud, C.; Lautram, N.; Franconi, F.; Passirani, C.; Vessières, A.; Montero-Menei, C.N.; Menei, P. Targeting and Treatment of Glioblastomas with Human Mesenchymal Stem Cells Carrying Ferrociphenol Lipid Nanocapsules. *Int. J. Nanomed.* **2015**, *10*, 1259–1271. [[CrossRef](#)]
58. Allard, E.; Jarnet, D.; Vessières, A.; Vinchon-Petit, S.; Jaouen, G.; Benoit, J.-P.; Passirani, C. Local Delivery of Ferrociphenol Lipid Nanocapsules Followed by External Radiotherapy as a Synergistic Treatment against Intracranial 9L glioma Xenograft. *Pharm. Res.* **2010**, *27*, 56–64. [[CrossRef](#)]
59. Resnier, P.; Galopin, N.; Sibiril, Y.; Clavreul, A.; Cayon, J.; Briganti, A.; Legras, P.; Vessières, A.; Montier, T.; Jaouen, G.; et al. Efficient Ferrocifen Anticancer Drug and Bcl-2 Gene Therapy Using Lipid Nanocapsules on Human Melanoma Xenograft in Mouse. *Pharmacol. Res.* **2017**, *126*, 54–65. [[CrossRef](#)]
60. Patra, M.; Gasser, G. The Medicinal Chemistry of Ferrocene and Its Derivatives. *Nat. Rev. Chem.* **2017**, *1*, 1–12. [[CrossRef](#)]
61. Rao, A.K.; Ziegler, Y.S.; McLeod, I.X.; Yates, J.R.; Nardulli, A.M. Thioredoxin and Thioredoxin Reductase Influence Estrogen Receptor Alpha-Mediated Gene Expression in Human Breast Cancer Cells. *J. Mol. Endocrinol.* **2009**, *43*, 251–261. [[CrossRef](#)]
62. Paterni, I.; Granchi, C.; Katzenellenbogen, J.A.; Minutolo, F. Estrogen Receptors Alpha (ER α) and Beta (ER β): Subtype-Selective Ligands and Clinical Potential. *Steroids* **2014**, *90*, 13–29. [[CrossRef](#)]
63. Hillard, E.A.; Vessières, A.; Jaouen, G. Ferrocene Functionalized Endocrine Modulators as Anticancer Agents. In *Medicinal Organometallic Chemistry; Topics in Organometallic Chemistry*; Jaouen, G., Metzler-Nolte, N., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2010; pp. 81–117. [[CrossRef](#)]
64. Osella, D.; Mahboobi, H.; Colangelo, D.; Cavigiolo, G.; Vessières, A.; Jaouen, G. FACS Analysis of Oxidative Stress Induced on Tumour Cells by SERMs. *Inorganica Chim. Acta* **2005**, *358*, 1993–1998. [[CrossRef](#)]
65. Fouda, M.F.R.; Abd-Elzaher, M.M.; Abdelsamaia, R.A.; Labib, A.A. On the Medicinal Chemistry of Ferrocene. *Appl. Organomet. Chem.* **2007**, *21*, 613–625. [[CrossRef](#)]
66. Hillard, E.A.; Vessières, A.; Top, S.; Pigeon, P.; Kowalski, K.; Huché, M.; Jaouen, G. Organometallic Diphenols: The Importance of the Organometallic Moiety on the Expression of a Cytotoxic Effect on Breast Cancer Cells. *J. Organomet. Chem.* **2007**, *692*, 1315–1326. [[CrossRef](#)]
67. Tonolo, F.; Salmain, M.; Scalcon, V.; Top, S.; Pigeon, P.; Folda, A.; Caron, B.; McGlinchey, M.J.; Toillon, R.-A.; Bindoli, A.; et al. Small Structural Differences between Two Ferrocenyl Diphenols Determine Large Discrepancies of Reactivity and Biological Effects. *ChemMedChem* **2019**, *14*, 1717–1726. [[CrossRef](#)]
68. Hamels, D.; Dansette, P.M.; Hillard, E.A.; Top, S.; Vessières, A.; Herson, P.; Jaouen, G.; Mansuy, D. Ferrocenyl Quinone Methides as Strong Antiproliferative Agents: Formation by Metabolic and Chemical Oxidation of Ferrocenyl Phenols. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9124–9126. [[CrossRef](#)]
69. Zhang, J.; Li, X.; Han, X.; Liu, R.; Fang, J. Targeting the Thioredoxin System for Cancer Therapy. *Trends Pharmacol. Sci.* **2017**, *38*, 794–808. [[CrossRef](#)]
70. Scalcon, V.; Salmain, M.; Folda, A.; Top, S.; Pigeon, P.; Shirley Lee, H.Z.; Jaouen, G.; Bindoli, A.; Vessières, A.; Rigobello, M.P. Tamoxifen-like Metallocaffens Target the Thioredoxin System Determining Mitochondrial Impairment Leading to Apoptosis in Jurkat Cells. *Met. Integr. Biometal Sci.* **2017**, *9*, 949–959. [[CrossRef](#)]
71. Kardeh, S.; Ashkani-Esfahani, S.; Alizadeh, A.M. Paradoxical Action of Reactive Oxygen Species in Creation and Therapy of Cancer. *Eur. J. Pharmacol.* **2014**, *735*, 150–168. [[CrossRef](#)]
72. Carneiro, B.A.; El-Deiry, W.S. Targeting Apoptosis in Cancer Therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2020**, 1–23. [[CrossRef](#)]
73. Heurtault, B.; Saulnier, P.; Pech, B.; Venier-Julienne, M.-C.; Proust, J.-E.; Phan-Tan-Luu, R.; Benoît, J.-P. The Influence of Lipid Nanocapsule Composition on Their Size Distribution. *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* **2003**, *18*, 55–61. [[CrossRef](#)]
74. Shinoda, K.; Saito, H. The Stability of O/W Type Emulsions as Functions of Temperature and the HLB of Emulsifiers: The Emulsification by PIT-Method. *J. Colloid Interface Sci.* **1969**, *30*, 258–263. [[CrossRef](#)]
75. Anton, N.; Gayet, P.; Benoit, J.-P.; Saulnier, P. Nano-Emulsions and Nanocapsules by the PIT Method: An Investigation on the Role of the Temperature Cycling on the Emulsion Phase Inversion. *Int. J. Pharm.* **2007**, *344*, 44–52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

76. Garcion, E.; Lamprecht, A.; Heurtault, B.; Paillard, A.; Aubert-Pouessel, A.; Denizot, B.; Menei, P.; Benoit, J.-P. A New Generation of Anticancer, Drug-Loaded, Colloidal Vectors Reverses Multidrug Resistance in Glioma and Reduces Tumor Progression in Rats. *Mol. Cancer Ther.* **2006**, *5*, 1710–1722. [CrossRef]
77. Heurtault, B.; Saulnier, P.; Pech, B.; Benoit, J.P.; Proust, J. Interfacial Stability of Lipid Nanocapsules. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2003**, *30*, 225–235. [CrossRef]
78. Vu, V.P.; Gifford, G.B.; Chen, F.; Benasutti, H.; Wang, G.; Groman, E.V.; Scheinman, R.; Saba, L.; Moghimi, S.M.; Simberg, D. Immunoglobulin Deposition on Biomolecule Corona Determines Complement Opsonization Efficiency of Preclinical and Clinical Nanoparticles. *Nat. Nanotechnol.* **2019**, *14*, 260–268. [CrossRef] [PubMed]
79. Afshar-Kharghan, V. The Role of the Complement System in Cancer. *J. Clin. Investig.* **2017**, *127*, 780–789. [CrossRef] [PubMed]
80. Passirani, C.; Barratt, G.; Devissaguet, J.P.; Labarre, D. Interactions of Nanoparticles Bearing Heparin or Dextran Covalently Bound to Poly(Methyl Methacrylate) with the Complement System. *Life Sci.* **1998**, *62*, 775–785. [CrossRef]
81. Knop, K.; Hoogenboom, R.; Fischer, D.; Schubert, U.S. Poly(Ethylene Glycol) in Drug Delivery: Pros and Cons as Well as Potential Alternatives. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, *49*, 6288–6308. [CrossRef]
82. Béduneau, A.; Saulnier, P.; Anton, N.; Hindré, F.; Passirani, C.; Rajerison, H.; Noiret, N.; Benoit, J.-P. Pegylated Nanocapsules Produced by an Organic Solvent-Free Method: Evaluation of Their Stealth Properties. *Pharm. Res.* **2006**, *23*, 2190–2199. [CrossRef] [PubMed]
83. Lainé, A.-L.; Gravier, J.; Henry, M.; Sancey, L.; Béjaud, J.; Pancani, E.; Wiber, M.; Texier, I.; Coll, J.-L.; Benoit, J.-P.; et al. Conventional versus Stealth Lipid Nanoparticles: Formulation and in Vivo Fate Prediction through FRET Monitoring. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2014**, *188*, 1–8. [CrossRef]
84. Perrier, T.; Saulnier, P.; Fouchet, F.; Lautram, N.; Benoit, J.-P. Post-Insertion into Lipid NanoCapsules (LNCs): From Experimental Aspects to Mechanisms. *Int. J. Pharm.* **2010**, *396*, 204–209. [CrossRef]
85. Resnier, P.; LeQuinio, P.; Lautram, N.; André, E.; Gaillard, C.; Bastiat, G.; Benoit, J.-P.; Passirani, C. Efficient in Vitro Gene Therapy with PEG siRNA Lipid Nanocapsules for Passive Targeting Strategy in Melanoma. *Biotechnol. J.* **2014**, *9*, 1389–1401. [CrossRef] [PubMed]
86. Vonarbourg, A.; Passirani, C.; Saulnier, P.; Simard, P.; Leroux, J.C.; Benoit, J.P. Evaluation of Pegylated Lipid Nanocapsules versus Complement System Activation and Macrophage Uptake. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2006**, *78*, 620–628. [CrossRef]
87. Thakur, S.; Kesharwani, P.; Tekade, R.K.; Jain, N.K. Impact of Pegylation on Biopharmaceutical Properties of Dendrimers. *Polymer* **2015**, *59*, 67–92. [CrossRef]
88. Huynh, N.T.; Morille, M.; Bejaud, J.; Legras, P.; Vessieres, A.; Jaouen, G.; Benoit, J.-P.; Passirani, C. Treatment of 9L Gliosarcoma in Rats by Ferrociphenol-Loaded Lipid Nanocapsules Based on a Passive Targeting Strategy via the EPR Effect. *Pharm. Res.* **2011**, *28*, 3189–3198. [CrossRef]
89. Morille, M.; Montier, T.; Legras, P.; Carmoy, N.; Brodin, P.; Pitard, B.; Benoit, J.-P.; Passirani, C. Long-Circulating DNA Lipid Nanocapsules as New Vector for Passive Tumor Targeting. *Biomaterials* **2010**, *31*, 321–329. [CrossRef]
90. Pasut, G.; Veronese, F.M. State of the Art in PEGylation: The Great Versatility Achieved after Forty Years of Research. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2012**, *161*, 461–472. [CrossRef] [PubMed]
91. Béduneau, A.; Saulnier, P.; Hindré, F.; Clavreul, A.; Leroux, J.-C.; Benoit, J.-P. Design of Targeted Lipid Nanocapsules by Conjugation of Whole Antibodies and Antibody Fab' Fragments. *Biomaterials* **2007**, *28*, 4978–4990. [CrossRef]
92. Resnier, P.; Lepeltier, E.; Emina, A.L.; Galopin, N.; Bejaud, J.; David, S.; Ballet, C.; Benvegnu, T.; Pecorari, F.; Chourpa, I.; et al. Model Affitin and PEG Modifications onto siRNA Lipid Nanocapsules: Cell Uptake and in Vivo Biodistribution Improvements. *RSC Adv.* **2019**, *9*, 27264–27278. [CrossRef]
93. Benoit, J.-P.; Perrier, T. Method for Preparing Functionalized Lipid Capsules. U.S. Patent 9333181B2, 5 October 2016. Available online: <https://patents.google.com/patent/US9333181B2/en> (accessed on 9 June 2020).
94. Bechara, C.; Sagan, S. Cell-Penetrating Peptides: 20 Years Later, Where Do We Stand? *FEBS Lett.* **2013**, *587*, 1693–1702. [CrossRef] [PubMed]
95. Karim, R.; Lepeltier, E.; Esnault, L.; Pigeon, P.; Lemaire, L.; Lépinoux-Chambaud, C.; Clere, N.; Jaouen, G.; Eyer, J.; Piel, G.; et al. Enhanced and Preferential Internalization of Lipid Nanocapsules into Human Glioblastoma Cells: Effect of a Surface-Functionalizing NFL Peptide. *Nanoscale* **2018**, *10*, 13485–13501. [CrossRef]
96. Topin-Ruiz, S.; Mellinger, A.; Lepeltier, E.; Bourreau, C.; Fouillet, J.; Riou, J.; Jaouen, G.; Martin, L.; Passirani, C.; Clere, N. P722 Ferrocifen Loaded Lipid Nanocapsules Improve Survival of Murine Xenografted-Melanoma via a Potentiation of Apoptosis and an Activation of CD8+ T Lymphocytes. *Int. J. Pharm.* **2021**, *593*, 120111. [CrossRef]
97. Huynh, N.T.; Passirani, C.; Allard-Vannier, E.; Lemaire, L.; Roux, J.; Garcion, E.; Vessieres, A.; Benoit, J.-P. Administration-Dependent Efficacy of Ferrociphenol Lipid Nanocapsules for the Treatment of Intracranial 9L Rat Gliosarcoma. *Int. J. Pharm.* **2012**, *423*, 55–62. [CrossRef] [PubMed]
98. Roger, M.; Clavreul, A.; Huynh, N.T.; Passirani, C.; Schiller, P.; Vessièrès, A.; Montero-Menei, C.; Menei, P. Ferrociphenol Lipid Nanocapsule Delivery by Mesenchymal Stromal Cells in Brain Tumor Therapy. *Int. J. Pharm.* **2012**, *423*, 63–68. [CrossRef] [PubMed]
99. Lainé, A.-L.; Clavreul, A.; Rousseau, A.; Tétaud, C.; Vessieres, A.; Garcion, E.; Jaouen, G.; Aubert, L.; Guilbert, M.; Benoit, J.-P.; et al. Inhibition of Ectopic Glioma Tumor Growth by a Potent Ferrocenyl Drug Loaded into Stealth Lipid Nanocapsules. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2014**, *10*, 1667–1677. [CrossRef]

100. Omuro, A.; DeAngelis, L.M. Glioblastoma and Other Malignant Gliomas: A Clinical Review. *JAMA* **2013**, *310*, 1842–1850. [[CrossRef](#)]
101. Vinchon-Petit, S.; Jarnet, D.; Paillard, A.; Benoit, J.-P.; Garcion, E.; Menei, P. In Vivo Evaluation of Intracellular Drug-Nanocarriers Infused into Intracranial Tumours by Convection-Enhanced Delivery: Distribution and Radiosensitisation Efficacy. *J. Neurooncol.* **2010**, *97*, 195–205. [[CrossRef](#)]
102. Allard, E.; Passirani, C.; Benoit, J.-P. Convection-Enhanced Delivery of Nanocarriers for the Treatment of Brain Tumors. *Biomaterials* **2009**, *30*, 2302–2318. [[CrossRef](#)]
103. MacKay, J.A.; Deen, D.F.; Szoka, F.C. Distribution in Brain of Liposomes after Convection Enhanced Delivery; Modulation by Particle Charge, Particle Diameter, and Presence of Steric Coating. *Brain Res.* **2005**, *1035*, 139–153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Ishida, T.; Kiwada, H. Accelerated Blood Clearance (ABC) Phenomenon upon Repeated Injection of PEGylated Liposomes. *Int. J. Pharm.* **2008**, *354*, 56–62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Zhao, J.; Qin, Z.; Wu, J.; Li, L.; Jin, Q.; Ji, J. Zwitterionic Stealth Peptide-Protected Gold Nanoparticles Enable Long Circulation without the Accelerated Blood Clearance Phenomenon. *Biomater. Sci.* **2017**, *6*, 200–206. [[CrossRef](#)]
106. Bruyère, C.; Mathieu, V.; Vessières, A.; Pigeon, P.; Top, S.; Jaouen, G.; Kiss, R. Ferrocifen Derivatives That Induce Senescence in Cancer Cells: Selected Examples. *J. Inorg. Biochem.* **2014**, *141*, 144–151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Sun, Y.-S.; Zhao, Z.; Yang, Z.-N.; Xu, F.; Lu, H.-J.; Zhu, Z.-Y.; Shi, W.; Jiang, J.; Yao, P.-P.; Zhu, H.-P. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *Int. J. Biol. Sci.* **2017**, *13*, 1387–1397. [[CrossRef](#)]
108. Scully, O.J.; Bay, B.-H.; Yip, G.; Yu, Y. Breast Cancer Metastasis. *Cancer Genomics Proteomics* **2012**, *9*, 311–320.
109. Yang, Y.; Pan, W.; Tang, X.; Wu, S.; Sun, X. A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials Comparing the Efficacy and Safety of Anastrozole versus Tamoxifen for Breast Cancer. *Oncotarget* **2017**, *8*, 48362–48374. [[CrossRef](#)]
110. Pautu, V.; Leonetti, D.; Lepeltier, E.; Clere, N.; Passirani, C. Nanomedicine as a Potent Strategy in Melanoma Tumor Microenvironment. *Pharmacol. Res.* **2017**, *126*, 31–53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
111. Wang, Z.; Yang, G.; Zhang, Y.-Y.; Yao, Y.; Dong, L.-H. A Comparison between Oral Chemotherapy Combined with Radiotherapy and Radiotherapy for Newly Diagnosed Glioblastoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Medicine* **2017**, *96*, e8444. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Hau, E.; Shen, H.; Clark, C.; Graham, P.H.; Koh, E.-S.; L McDonald, K. The Evolving Roles and Controversies of Radiotherapy in the Treatment of Glioblastoma. *J. Med. Radiat. Sci.* **2016**, *63*, 114–123. [[CrossRef](#)]
113. Grauer, O.; Jaber, M.; Hess, K.; Weckesser, M.; Schwindt, W.; Maring, S.; Wölfer, J.; Stummer, W. Combined Intracavitary Thermotherapy with Iron Oxide Nanoparticles and Radiotherapy as Local Treatment Modality in Recurrent Glioblastoma Patients. *J. Neurooncol.* **2019**, *141*, 83–94. [[CrossRef](#)]
114. Lee, E.F.; Harris, T.J.; Tran, S.; Evangelista, M.; Arulananda, S.; John, T.; Ramnac, C.; Hobbs, C.; Zhu, H.; Gunasingh, G.; et al. BCL-XL and MCL-1 Are the Key BCL-2 Family Proteins in Melanoma Cell Survival. *Cell Death Dis.* **2019**, *10*, 342. [[CrossRef](#)]
115. Ilmonen, S.; Hernberg, M.; Pyrhönen, S.; Tarkkanen, J.; Asko-Seljavaara, S. Ki-67, Bcl-2 and P53 Expression in Primary and Metastatic Melanoma. *Melanoma Res.* **2005**, *15*, 375–381. [[CrossRef](#)]
116. David, S.; Resnier, P.; Guillot, A.; Pitard, B.; Benoit, J.-P.; Passirani, C. SiRNA LNCs—a Novel Platform of Lipid Nanocapsules for Systemic SiRNA Administration. *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Pharm. Verfahrenstechnik EV* **2012**, *81*, 448–452. [[CrossRef](#)]
117. David, S.; Carmoy, N.; Resnier, P.; Denis, C.; Misery, L.; Pitard, B.; Benoit, J.-P.; Passirani, C.; Montier, T. In Vivo Imaging of DNA Lipid Nanocapsules after Systemic Administration in a Melanoma Mouse Model. *Int. J. Pharm.* **2012**, *423*, 108–115. [[CrossRef](#)]
118. David, S.; Passirani, C.; Carmoy, N.; Morille, M.; Mevel, M.; Chatin, B.; Benoit, J.-P.; Montier, T.; Pitard, B. DNA Nanocarriers for Systemic Administration: Characterization and in Vivo Bioimaging in Healthy Mice. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2013**, *2*, e64. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
119. Lagarce, F.; Passirani, C. Nucleic-Acid Delivery Using Lipid Nanocapsules. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2016**, *17*, 723–727. [[CrossRef](#)]
120. Roger, M.; Clavreul, A.; Venier-Julienne, M.-C.; Passirani, C.; Sindji, L.; Schiller, P.; Montero-Menei, C.; Menei, P. Mesenchymal Stem Cells as Cellular Vehicles for Delivery of Nanoparticles to Brain Tumors. *Biomaterials* **2010**, *31*, 8393–8401. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
121. Roger, M.; Clavreul, A.; Sindji, L.; Chassevent, A.; Schiller, P.C.; Montero-Menei, C.N.; Menei, P. In Vitro and in Vivo Interactions between Glioma and Marrow-Isolated Adult Multilineage Inducible (MIAMI) Cells. *Brain Res.* **2012**, *1473*, 193–203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Roger, M.; Clavreul, A.; Venier-Julienne, M.-C.; Passirani, C.; Montero-Menei, C.; Menei, P. The Potential of Combinations of Drug-Loaded Nanoparticle Systems and Adult Stem Cells for Glioma Therapy. *Biomaterials* **2011**, *32*, 2106–2116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Gengenbacher, N.; Singhal, M.; Augustin, H.G. Preclinical Mouse Solid Tumour Models: Status Quo, Challenges and Perspectives. *Nat. Rev. Cancer* **2017**, *17*, 751–765. [[CrossRef](#)]
124. Decaudin, D. Primary Human Tumor Xenografted Models ('tumorgrafts') for Good Management of Patients with Cancer. *Anticancer Drugs* **2011**, *22*, 827–841. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Byrne, A.T.; Alferez, D.G.; Amant, F.; Annibali, D.; Arribas, J.; Biankin, A.V.; Bruna, A.; Budinská, E.; Caldas, C.; Chang, D.K.; et al. Interrogating Open Issues in Cancer Precision Medicine with Patient-Derived Xenografts. *Nat. Rev. Cancer* **2017**, *17*, 254–268. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

3. Peptides pénétrants

Dans la revue bibliographique précédente ont été recensées les différentes applications *in vivo* étudiées avec les LNCs encapsulant un ferrocifène. La plupart des stratégies envisagées reposaient sur l'effet « EPR » en modifiant la surface des LNCs avec un phospholipide PEGylé. Cependant, bien que cette technique permette d'éviter des phénomènes d'opsonisation et que des résultats prometteurs aient été obtenus, la chaîne PEGylée peut aussi empêcher l'internalisation cellulaire des nanoparticules au niveau de la tumeur. Ce problème d'internalisation et éventuellement d'incapacité à atteindre la cible cellulaire souhaitée est d'ailleurs l'un des principaux obstacles à l'administration de molécules actives encapsulées dans des NPs PEGylées. Afin de cibler plus spécifiquement l'environnement tumoral et ses cellules cancéreuses, plusieurs stratégies ont été développées pour « décorer » la surface des NPs reposant sur l'utilisation d'anticorps, de protéines ou encore de peptides pénétrants. La décoration des LNCs par un peptide pénétrant est la stratégie envisagée dans ce projet de thèse. La dernière partie de l'état de l'art porte donc sur les peptides pénétrants, les voies d'internalisation empruntées et les stratégies de décoration des NPs par ces molécules.

3.1 Généralité sur les peptides pénétrants

3.1.1 Historique et définition

La recherche sur les peptides pénétrants est aussi récente que celle sur les nanomédicaments. En effet, en 1965, dans une étude publiée dans le journal « Science », Ryser et Hancock ont montré que les histones (protéines riches en lysine et arginine) et des polyamines cationiques stimulaient l'internalisation de l'albumine par les cellules tumorales (Ryser and Hancock 1965). Deux décennies plus tard, en 1988, Frankel et Pabo et aussi Green et Loewenstein ont découvert que la protéine transactivatrice de transcription du VIH « transactivator of transcription protein of VIH », plus connue aujourd'hui sous le nom de TAT, pouvait traverser la membrane cellulaire et être internalisée efficacement par les cellules (Frankel and Pabo 1988; Green and Loewenstein 1988). Cette protéine est composée de 86 acides aminés. Cependant, toute la chaîne peptidique n'est pas utile à l'internalisation par la cellule comme cela est montré en 1997 par Vivès *et al.* (Vivès, Brodin, and Lebleu 1997). Pour une internalisation efficace, le peptide TAT peut être composé uniquement de 13 acides aminés voire même de 9 acides aminés (RKKRRQRRR) (Park *et al.* 2002). Un autre exemple est la découverte française d'une hémoprotéine de *Drosophila melanogaster* dont une séquence de 16 acides aminés est responsable d'une internalisation cellulaire (Joliot *et al.* 1991; Derossi *et al.* 1994). Ce peptide cationique (RQIKIWFQNRRMKWKK) est connu sous le nom de pAntp(43-58) ou encore pénétratine. A partir de ces premières découvertes, une définition des peptides pénétrants a été donnée. Les peptides pénétrants regroupe une famille de peptides dont la séquence varie entre 5 et 30 acides aminés et qui ont la propriété de pouvoir traverser efficacement la membrane cellulaire de tout type de cellules via des mécanismes d'internalisation dépendante et/ou indépendante en énergie (Bechara and Sagan 2013;

Guidotti, Brambilla, and Rossi 2017). Ils ont également la capacité d'améliorer l'internalisation de cargos qui leur sont liés covalamment, comme des petites molécules, des protéines ou encore des nanoparticules (Bechara and Sagan 2013; Milletti 2012). Cependant, beaucoup de ces peptides pénétrants ne sont pas spécifiques à un type de cellule, ce qui peut être une limite à un ciblage spécifique dans le cas d'une thérapie cancéreuse par exemple. Les peptides pénétrants peuvent être classés selon leur origine (naturelle, chimérique, synthétique) mais aussi selon leurs propriétés physico-chimiques comme développé ci-dessous

3.1.2 Classification des peptides pénétrants

a. Peptides cationiques

Les peptides pénétrants cationiques sont des peptides dont la charge est largement positive à un pH physiologique. Ils sont composés principalement d'une séquence d'acides aminés basiques comme l'arginine R et la lysine K. Les exemples les plus répandus sont le peptide TAT₄₈₋₆₀, la pénétratine, qui sont d'origine naturelle, mais aussi les polyarginines R_n, les polylysines et DPV1047, d'origine synthétique (**Tableau 3**) (Milletti 2012; Guidotti, Brambilla, and Rossi 2017). Les études réalisées sur les polyarginines indiquent qu'au minimum 7 charges positives sont nécessaires afin d'avoir une internalisation efficace (Bechara and Sagan 2013).

Enfin, il existe une classe particulière de peptides pénétrants cationiques dont la séquence va permettre une localisation nucléaire (Milletti 2012). Ce sont des peptides dont la séquence en acides aminés est principalement composée de lysine, d'arginine et/ou de proline. Cependant, ils ne sont pas considérés comme de bons peptides pénétrants car la charge positive est souvent faible.

b. Peptides amphiphiles

Beaucoup de peptides pénétrants amphiphiles sont chimériques, c'est-à-dire qu'ils résultent d'une conjugaison chimique entre un domaine hydrophobe et un domaine plus hydrophile (Milletti 2012), notamment l'association d'un peptide hydrophobe avec un peptide à localisation nucléaire peu cationique. Du fait de leur caractère amphiphile mais aussi des acides aminés qui les composent, ces peptides vont avoir des structures secondaires variées comme une structure hélice- α ou une structure feuillet- β . Quelques exemples sont le Pep-1, association d'une séquence d'acides aminés riche en tryptophane (KETWWETWWTEW) et du peptide à localisation nucléaire SV40 (PKKRKV), et le transportane qui résulte de l'association des peptides galanine et mastoparane (**Tableau 3**).

c. Peptides hydrophobes

L'hydrophobicité d'un peptide pénétrant est déterminée par le nombre d'acides aminés hydrophobes présents dans la séquence peptidique (alanine, leucine, tryptophane, tyrosine etc...). Sa charge globale est proche de la neutralité. Ces peptides vont être composés en partie d'acides aminés apolaires et d'acides aminés hydrophobes. Certaines fonctions chimiques présentes sur des acides aminés vont aussi avoir un rôle essentiel sur l'internalisation des peptides hydrophobes comme c'est le cas pour le

tryptophane (Bechara and Sagan 2013; Milletti 2012). Le rôle du tryptophane sera détaillé plus longuement dans la sous-partie sur les voies d'internalisation.

d. Peptides activables et peptides ciblant la tumeur

Comme évoqué précédemment, beaucoup de peptides pénétrants ne sont pas spécifiques à un type cellulaire. Ainsi, afin de contourner cette limitation, des peptides pénétrants activables ont été synthétisés. Ces nouvelles molécules, composées d'un peptide pénétrant cationique lié à une espèce poly-anionique par une liaison covalente clivable, vont répondre à un stimuli endogène (variation de pH, température, surexpression d'une enzyme etc...) ou à un stimuli exogène (rayonnement infrarouge, rayonnement ultraviolet etc...) pour être déprotégées dans l'environnement tumoral et ainsi exercer leur effet de ciblage et d'internalisation au niveau des cellules cancéreuses (Yang et al. 2015; Xia et al. 2013).

Un autre moyen de gagner en spécificité a été de trouver des peptides pénétrants ciblant spécifiquement des récepteurs surexprimés au niveau des cellules tumorales, comme les récepteurs aux facteurs de croissance épidermiques (EGFR), aux facteurs de croissance endothéliaux vasculaires (VEGFR) ou encore aux intégrines $\alpha_v\beta_3$ ou $\alpha_v\beta_6$ (Liu et al. 2017). Un des exemples les plus connus sont les peptides ciblant les intégrines $\alpha_v\beta_3$ pour lesquels il a été montré qu'un motif RGD était indispensable (Witt et al. 2009; Sugahara et al. 2009). Enfin, certains peptides pénétrants possèdent deux fonctions, l'une de ciblage et d'internalisation, et l'autre d'activité biologique (Kebebe et al. 2018). C'est notamment le cas du peptide TLS (TLSGAFELSRDK) (**Tableau 3**), peptide utilisé dans le cadre de ce projet, qui est un peptide ciblant spécifiquement la lignée cellulaire SKOV3 de cancer de l'ovaire (surexprimant des protéoglycanes en surface) et ayant une activité pro-apoptotique en régulant l'expression du facteur apoptotique Bcl-2. Du fait de son activité thérapeutique, une synergie a été mise en évidence avec la doxorubicine sur un effet antiprolifératif sur les cellules SKOV3 (Ma, Yin, You, et al. 2013). Cette même équipe de recherche a aussi montré que le peptide WSG (WSGPGVWGASVK) (**Tableau 3**) pouvait être un peptide de choix pour le ciblage des cellules cancéreuses ovariennes, avec en supplément une activité anti-métastatique (Ma, Yin, Yan, et al. 2013; Pu et al. 2014).

Tableau 3. Liste non-exhaustive de peptides pénétrants selon leurs caractéristiques physico-chimiques.

Peptide pénétrant	Séquence	Classe
TAT ₄₈₋₆₀	GRKKRRQRRRPPQ	Cationique
pénétratine	RQIKIWFQNRRMKWKK	Cationique
polyarginine	R _n , 7 < n < 15	Cationique
DPV1047	VKRGLKLRHVRPRVTRMDV	Cationique
Pep-1	KETWWETWWTEWSQPKKRVK	Amphiphile
MAP	KLALKLALKALKALKLA	Amphiphile
transportane	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKL	Amphiphile
Pep-7	SDLWEMMMVSLACQY	Hydrophobe
RGD	Séquence avec motif RGD	Cibleur de la matrice extracellulaire
TLS	TLSGAFELSRDK	Cibleur de tumeur (SKOV3)
WSG	WSGPGVWGASVK	Cibleur de tumeur (SKOV3)

L'effet de ces différentes classes de peptides pénétrants est relié à différentes voies d'internalisation cellulaire.

3.2 Voies d'internalisation des peptides pénétrants

Depuis la découverte des premiers peptides pénétrants, les mécanismes par lesquels ces composés étaient internalisés dans le cytoplasme des cellules ont beaucoup été étudiés, et en tirer une règle systématique est particulièrement complexe. En effet, l'internalisation dépend de plusieurs facteurs liés au peptide lui-même comme sa taille (nombre d'acides aminés), sa concentration, sa nature physico-chimique, mais aussi à des facteurs externes comme la cellule étudiée. Ainsi, selon les conditions expérimentales choisies, il est possible de mettre en évidence plusieurs voies d'entrées possibles pour un même peptide. Par exemple, des études distinctes ont montré que le peptide TAT s'internalisait par différentes voies d'entrées comme la macropinocytose, l'endocytose médiée par les cavéoles et l'endocytose médiée par les clathrines.

3.2.1 Les voies d'internalisation

Les voies d'internalisation des peptides pénétrants sont divisées en deux groupes, l'une indépendante en énergie (translocation directe), l'autre dépendante en énergie (endocytose) (**Figure 4**). Ces mécanismes d'internalisation sont également les principaux mécanismes qui ont été recensés pour les nanoparticules (Sousa de Almeida et al. 2021) (**Figure 4**).

L'endocytose est la principale voie d'internalisation des peptides pénétrants ainsi que des conjugués peptide-NPs (Tian and Zhou 2021). C'est un mécanisme naturel, dépendant en énergie (ATP) et ubiquitaire à toutes cellules. Plusieurs chemins sont exploitables comme la macropinocytose, l'endocytose médiée par les clathrines, l'endocytose médiée par les cavéoles, l'endocytose indépendante des clathrines et/ou cavéoles (**Figure 4**) (Bechara and Sagan 2013; Guidotti, Brambilla, and Rossi 2017). La prédominance d'une voie par rapport à une autre va dépendre des caractéristiques physico-chimiques du peptide ou du conjugué peptide-NPs et de la membrane cellulaire. Cependant, une fois que le peptide pénétrant se trouve dans l'endosome, celui-ci doit pouvoir être libéré pour éviter une dégradation lysosomale. Ce problème d'échappement à l'endosome peut être contourné en jouant sur les propriétés physico-chimiques des peptides pénétrants : les peptides ayant une charge cationique importante pourront bénéficier d'un effet « éponge » et un échappement endosomal sera alors observé (Erazo-Oliveras et al. 2012). Il est à noter que cette charge positive pourra ensuite représenter un problème au regard de la toxicité sur les tissus sains.

La pénétration directe ou encore appelée translocation directe est une voie d'entrée dans la cellule qui se fait de manière indépendante en énergie et en température mais dépendante de la concentration extracellulaire en peptide (Bechara and Sagan 2013). Cette voie d'entrée repose sur l'interaction entre le peptide pénétrant chargé positivement et la membrane cellulaire chargée négativement (phosphatidylsérines, protéoglycanes, glycosaminoglycanes). Cette interaction va provoquer une déstabilisation des phospholipides de la membrane plasmique (Kosuge et al. 2008; Fretz et al. 2007). Ainsi, plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer l'entrée dans le milieu intracellulaire, comme la formation de micelles inverses, la formation de pores ou encore le « carpet model ». Dans ce modèle, le peptide interagit avec la membrane cellulaire via des interactions hydrophobes, provoquant la formation de pores (**Figure 4**) (Bechara and Sagan 2013; Guidotti, Brambilla, and Rossi 2017). Comme expliqué précédemment, beaucoup des peptides pénétrants ne sont pas spécifiques. Cependant il peut y avoir une plus grande sélectivité des peptides cationiques à interagir avec la membrane plasmique des cellules cancéreuses car celles-ci comportent plus de charges négatives que les cellules saines. En effet, cela vient de la surexpression de certaines molécules de surface comme les sulfates d'héparanes, notamment dans le cas des cellules cancéreuses ovariennes (Jobin and Alves 2014; Knelson, Nee, and Blobe 2014; Hillemeier et al. 2022), ou encore de phospholipides comme la phosphatidylsérine (Jobin and Alves 2014). L'avantage majeur de la translocation directe est l'évitement d'une dégradation endolysosomale.

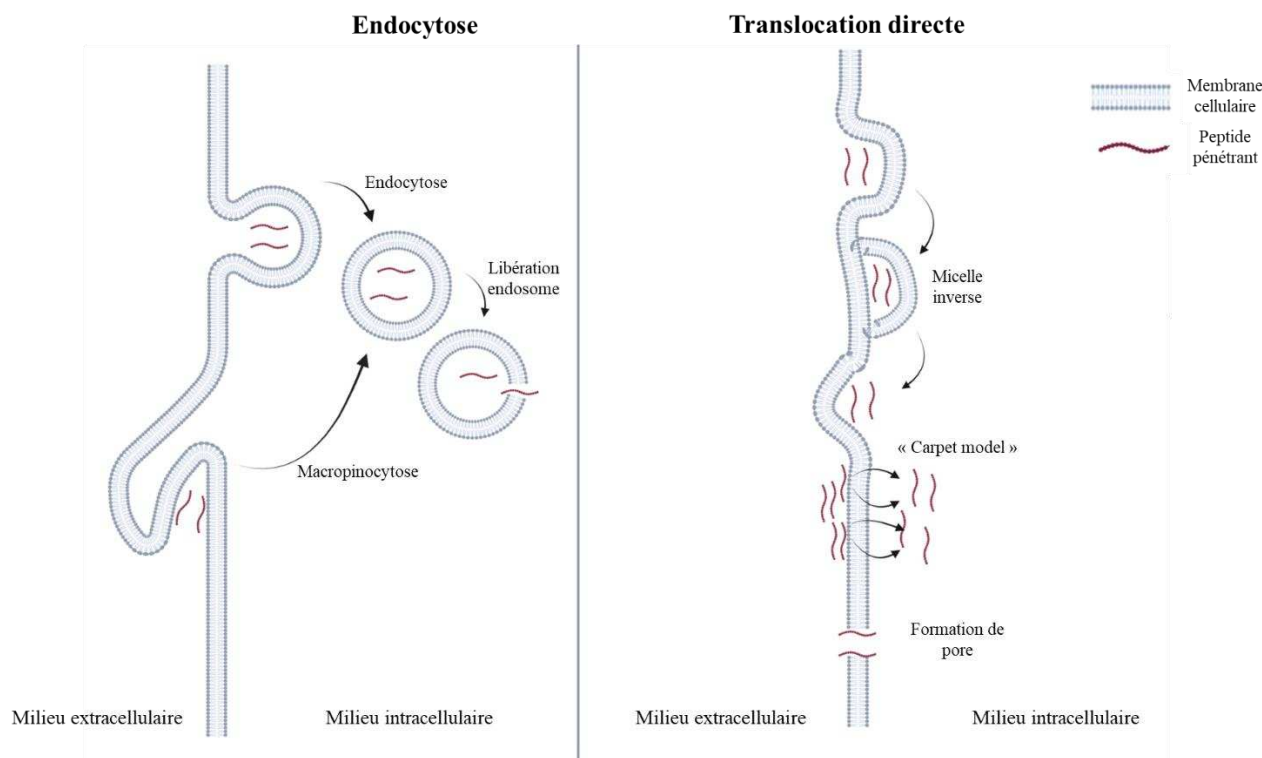


Figure 4. Voies d'internalisation des peptides pénétrants dans le cytoplasme des cellules.

3.2.2 Les facteurs physico-chimiques influençant l'internalisation

Plusieurs facteurs peuvent influencer le mécanisme d'internalisation dans le milieu intracellulaire et de nombreux laboratoires se consacrent à leur étude, comme le Laboratoire des Biomolécules, à Paris, où a été découverte la pénétratine.

Beaucoup de ces facteurs sont liés à la présence ou non de certains acides aminés. Ainsi, le tryptophane W, acide aminé hydrophobe, a un fort « pouvoir » d'internalisation. En effet, la présence du groupement indole, hétérocycle aromatique, sur la chaîne latérale, va permettre notamment des interactions électrons π – anions provenant des composés tels que les protéoglycanes de la membrane plasmique (Bechara and Sagan 2013). Quelques études ont d'ailleurs montré que l'ajout d'un ou plusieurs résidus tryptophane sur des oligo-arginines favorisait l'internalisation cellulaire (Maiolo, Ferrer, and Ottinger 2005; Rydberg et al. 2012). Un autre acide aminé important est l'arginine R, le nombre optimal d'arginines sur les polyarginines étant compris entre 7 et 15 (Bechara and Sagan 2013). La charge positive apportée par cet acide aminé à pH physiologique, favorisant ainsi l'interaction avec la membrane plasmique, n'est pas la seule explication en faveur d'une internalisation cellulaire. En effet, plusieurs études ont montré que la substitution d'une lysine, cationique à pH physiologique également, dans la séquence peptidique par des arginines favorisait le processus d'interaction et d'internalisation cellulaire (Tünnemann et al. 2008; Mitchell et al. 2000). Cela s'explique par le fait que contrairement à la lysine, l'arginine, via son groupement guanidine sur la chaîne latérale, peut avoir des interactions

hydrogènes bidentées avec des groupements sulfates, carboxylates et phosphates présents à la surface des cellules (Rothbard et al. 2004; Nakase et al. 2008). Enfin, la présence d'acide aspartique D et d'acide glutamique E confèrent aux peptides une propriété pH-dépendante. Ces peptides sont appelés PMAP « pH-dependent membrane-active peptides ». C'est l'une des stratégies développées pour améliorer l'échappement endosomal du peptide. En effet, le pH de l'endosome diminue au cours du temps. Cette diminution de pH va entraîner une protonation des acides aspartique et glutamique, donnant un caractère plus hydrophobe au peptide d'origine. Cette hydrophobicité accrue va permettre une amélioration de la perméabilité membranaire de l'endosome pour le peptide et donc favoriser son échappement (Berger et al. 2021; Erazo-Oliveras et al. 2012). Un autre facteur déterminant dans l'internalisation est la position des acides aminés dans la séquence. En effet, sur des polyarginines, l'espacement entre les résidus arginines a son importance. En effet, une étude a montré qu'espacer des résidus arginines sur un hepta-arginine R₇ favorisait l'internalisation. Les auteurs expliquent cela par une plus grande flexibilité de la chaîne peptidique, facilitant ainsi l'interaction des groupements guanidines avec la membrane chargée négativement des cellules (Rothbard et al. 2002). De plus, une étude a montré des différences d'internalisation entre des peptides d'origine et leurs « scrambles », peptides ayant les mêmes acides aminés mais dans des positions différentes aléatoires (Mueller et al. 2008). Ces différences de position vont finalement amener à des changements de structures secondaire et tertiaire, un facteur qui semble être plus important que la présence de charges positives (Scheller et al. 1999).

L'internalisation est aussi liée à la stéréochimie des peptides pénétrants. Afin d'étudier l'effet de la stéréochimie sur l'internalisation, une technique consiste à remplacer les acides aminés de stéréochimie L (naturelle) par les acides aminés de stéréochimie D (non naturelle). Ainsi, une étude a montré que les peptides polyarginine R₉-D et pénétratine D sont moins bien internalisés que les peptides de stéréochimie L correspondante (Verdurmen et al. 2011). Cependant, il existe des contradictions quant à cet effet puisqu'une autre étude a démontré le contraire pour le polyarginine R₉ (Tünnemann et al. 2008). Enfin, il semblerait que les peptides de stéréochimie D possèdent une meilleure stabilité et permettent d'échapper plus facilement à l'endosome que les peptides de stéréochimie L, malgré une internalisation cellulaire plus faible (Najjar et al. 2017).

Enfin, un dernier facteur recensé est la différence d'internalisation entre un peptide linéaire, et ce même peptide sous forme cyclique. En effet, en plus d'une stabilité accrue, le peptide TAT cyclisé et le polyarginine R₁₀ cyclisé s'internalisent plus rapidement que leurs homologues linéaires (Friedler et al. 2000; Lättig-Tünnemann et al. 2011). Lättig-Tünnemann *et al.* explique cela par la rigidité apportée sur la conformation pour le polyarginine R₁₀ cyclisé. Cela est en contradiction avec ce qui était supposé par Rothbard *et al.*. Cependant, à partir de ces deux études, ils semblerait que ce soit l'espacement entre les résidus guanidine qui soit le facteur clé. En effet, pour le polyarginine R₁₀ cyclique, les groupements guanidines sont plus espacés que dans le polyarginine linéaire.

Bien que plusieurs voies d'internalisation cellulaire aient été recensées, elles restent tout de même difficiles à étudier comme le montre les quelques exemples cités pour lesquels un même peptide pénétrant va s'internaliser par des mécanismes différents. De plus, dans le cas d'une étude de translocation directe, les méthodes choisies sont souvent une déplétion en énergie (ATP) ainsi qu'une diminution de la température (de 37 °C à 4 °C) afin d'inhiber l'endocytose. Or, ces méthodes contribuent aussi à diminuer la translocation directe puisqu'à faible température, la fluidité et la dynamique de la membrane est affectée (Bechara and Sagan 2013). Ainsi, même si l'importance de certains facteurs ne sont plus à questionner, il est nécessaire de garder un regard critique quant aux méthodes expérimentales utilisées et toujours souligner que ces conclusions sont peptides et cellules-dépendantes.

3.3 Méthodes de fonctionnalisation de surface des nanoparticules par les peptides pénétrants et application au traitement du cancer épithélial de l'ovaire

Les peptides pénétrants peuvent être conjugués à différents types de cargos (peptide, protéine, acide nucléique, nanoparticule) via des méthodes physiques comme l'adsorption, reposant sur des interactions électrostatiques, hydrophobes, des liaisons hydrogènes ou encore des interactions de Van der Waals, ou, via des méthodes chimiques reposant sur une liaison covalente entre le peptide et le cargo (Koren and Torchilin 2012; Tashima 2017). Les réactions chimiques qui peuvent être utilisées sont aussi nombreuses que la variété de réactions chimiques existantes : chimie des carbodiimides, chimie du soufre, métathèse, réaction de Diels-Alder ... Cependant, l'un des principaux inconvénients de la liaison covalente est le risque de modifier l'activité biologique du peptide dû à un changement de conformation par exemple. Un exemple est celui du peptide NFL avec les LNCs (Karim et al. 2018). En effet, les auteurs de l'étude stipulent que la liaison covalente du peptide NFL à la surface des LNCs a diminué drastiquement les propriétés biologiques initiales du peptide, ce qui n'était pas le cas lorsqu'il était adsorbé à la surface des LNCs. Mais, l'un des inconvénients majeurs à l'utilisation de l'adsorption comme méthode de décoration est la disparition du peptide de manière prématurée, avant qu'il n'ait pu atteindre sa cible cellulaire.

A travers une liste non exhaustive d'exemples avec pour application le cancer épithélial de l'ovaire, différentes méthodes de modification de surface vont être présentées (**Tableau 4** et **Figure 5**).

Comme décrit dans l'état de l'art sur le cancer de l'ovaire, les principales cibles cellulaires sont les récepteurs aux facteurs de croissance épithéliaux, les intégrines, les hormones et aussi les enzymes. Kulhari *et al.* ont choisi de cibler l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ pour proposer une nouvelle voie de traitement du cancer épithélial de l'ovaire. Les auteurs ont ainsi formulé des NPs de PLGA encapsulant la gemcitabine. Les peptides ayant un motif RGD permettant de cibler cette sous-unité d'intégrine, la surface de ces NPs a été modifiée par un peptide cyclique de 5 acides aminés, le cRGDfK (**Tableau 4**). Un lien covalent a été réalisé grâce à la chimie des carbodiimides (couplage EDC/NHS) entre le PLGA et le peptide (**Figure 5**). Les auteurs ont démontré une internalisation dans les cellules SKOV3 plus

importante des NPs lorsque celles-ci étaient modifiées en surface par le peptide cibleur de tumeur (Kulhari et al. 2016).

Les récepteurs aux facteurs de croissance épithéliaux sont surexprimés au niveau des cellules cancéreuses ovariennes. Cibler ces récepteurs peut donc être une stratégie particulièrement intéressante. Dans une étude publiée en 2018, Zhou *et al.* ont préparé un polymersome encapsulant la doxorubicine, modifié en surface par le peptide GE11 (**Tableau 4**). L'un des copolymères formant le polymersome a été lié de façon covalente au peptide par une liaison peptidique en utilisant la chimie des carbodiimides (**Figure 5**). Les auteurs ont montré par la suite une meilleure internalisation dans les cellules SKOV3 des nanoparticules modifiées par le peptide GE11, comparées aux polymersomes non-modifiés. Enfin, en comparant avec la formulation Doxil®, qui est un traitement de second choix pour les cancers de l'ovaire, le GE11-polymersome encapsulant la doxorubicine s'avère avoir un meilleur index thérapeutique (Zou et al. 2018).

Une autre possibilité est de cibler des hormones surexprimées au niveau tumoral. Par exemple, 80 % des cancers épithéliaux de l'ovaire surexpriment l'hormone de libération de la lutéinostimuline (LH-RH). Dans ce cadre, une équipe a modifié des NPs de polycaprolactone, stabilisées par de l'albumine de sérum bovin (BSA), avec un peptide ciblant les récepteurs LH-RH (**Tableau 4**). Afin de réaliser cette modification covalente, une réaction permettant de produire une base de Schiff (imine) a été réalisée en utilisant un linker, le glutaraldéhyde (**Figure 5**). Les études *in vitro* réalisées ont montré que les NPs modifiées par le peptide s'internalisaient mieux dans les cellules SKOV3-TR30, lignée cellulaire résistante au paclitaxel, que celles non-modifiées. Les études *in vivo* ont confirmé l'intérêt de cette stratégie puisqu'une réduction significative du volume tumoral est obtenue avec les NPs modifiées en surface (Pan et al. 2020).

Certaines enzymes sont aussi surexprimées par les tumeurs ovariennes. C'est notamment le cas de la protéase hepsine (Miao et al. 2008). En 2018, Lee *et al.* ont synthétisé un peptide chimérique (RIPL) dont une séquence de 5 acides aminés sur les 16 permettent de cibler spécifiquement cette protéase (**Tableau 4**). Ce peptide a été utilisé pour modifier la surface de nanoparticules lipidiques via une conjugaison thiol-maleimide (**Figure 5**). Les études de cytométrie en flux et de microscopie confocale ont permis de montrer que les nanoparticules lipidiques fonctionnalisées ciblaient spécifiquement les cellules SKOV3, avec une internalisation plus importante que les vecteurs non-modifiés (Lee et al. 2018).

Une autre stratégie consiste à cibler des protéines. Dans le cas du cancer épithélial de l'ovaire, la protéine plectine est surexprimée (Perez et al. 2021). C'est la stratégie qui a été envisagée par une équipe en 2018. En effet, des liposomes possédant des groupements maleimide en surface ont été modifiés par le peptide KTLLPTP-GGSK(FAM)C via la liaison covalente thiol-maleimide (**Tableau 4** et **Figure 5**). Ces nano-vecteurs, modifiés ou non, sont chargés avec un inhibiteur PARP. La modification réalisée a permis d'améliorer significativement l'internalisation dans les cellules SKOV3 et OVCAR8. Cela a été confirmé par les études *in vivo* réalisées sur un modèle de tumeur OVCAR8 sur souris où une diminution

significative du volume tumoral a été obtenue après traitement par les liposomes décorés en surface et encapsulant un inhibiteur PARP, comparée à l'inhibiteur PARP seul ou aux vecteurs non-décorés (Dasa et al. 2018).

Enfin, Van den Brand *et al.* ont obtenu des nanoparticules résultant de la complexation électrostatique entre le peptide pénétrant PepFect14 chargé positivement, et un ARN messager (mRNA) chargé négativement (**Figure 5**). La stratégie envisagée par l'équipe n'a pas été de cibler la tumeur ovarienne en utilisant un peptide spécifique mais d'utiliser un peptide pénétrant et d'administrer les nanoparticules par voie locale via une approche intrapéritonéale. La comparaison faite avec une formulation lipide/mRNA a montré que le complexe peptide/mRNA possédait une meilleure capacité d'internalisation sur un modèle sphéroïde de SKOV3, ce qui a par la suite été confirmé *in vivo* (van den Brand et al. 2019).

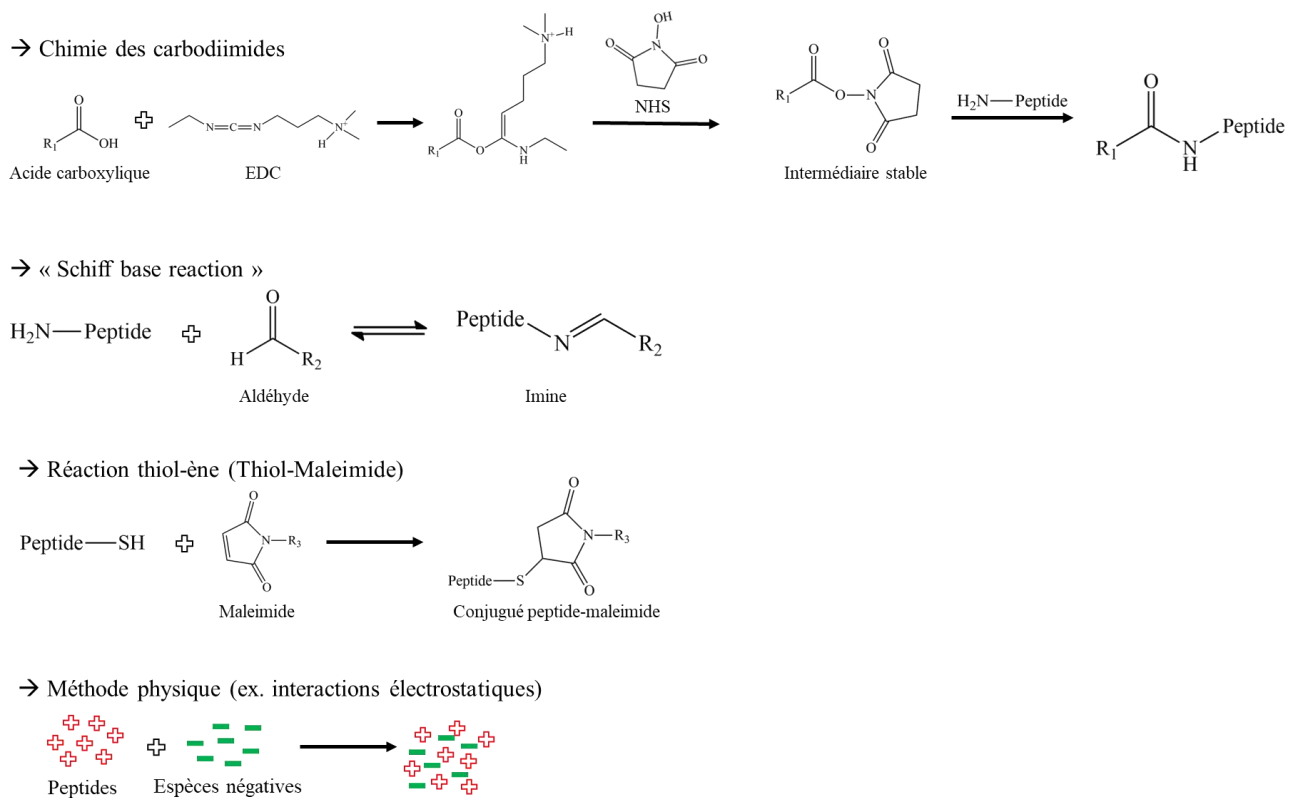


Figure 5. Liste non-exhaustive de méthodes de fonctionnalisation de surface de NPs par un peptide pénétrant.

Tableau 4. Liste non-exhaustive de peptides pénétrants utilisés pour modifier des NPs afin de traiter le cancer épithélial de l’ovaire.

Peptide (séquence)	Cible	Méthode de modification	Modèle cellulaire	Ref
cRGDfK	Intégrine $\alpha_v\beta_3$	Couplage EDC/NHS	SKOV3	(Kulhari et al. 2016)
GE11 (YHWYGYTPQNVI)	EGFR	Couplage EDC/NHS	SKOV3	(Zou et al. 2018)
LHRH (GPRLGYSWHE)	Récepteur LHRH	Réaction produisant une base de Schiff	SKOV3-TR30	(Pan et al. 2020)
RIPL (IPLVVPLRRRRRRRRC)	Enzyme hepsine	Conjugaison thiol-Maleimide	SKOV3	(Lee et al. 2018)
KTLLPTP-GGSK(FAM)C	Protéine plectine	Conjugaison thiol-Maleimide	SKOV3 OVCAR8	(Dasa et al. 2018)
PepFect14 (Stearyl-AGYLLGKLLOOLAAAALLOOLL-NH₂)	Aucune	Complexation avec un mRNA)	SKOV3	(van den Brand et al. 2019)

Les avancées scientifiques réalisées autour de la compréhension du micro-environnement tumoral ont ouvert le champ à plusieurs stratégies de ciblage actif des tumeurs, comme l’utilisation des peptides pénétrants, dans le but de traiter les cancers, notamment celui du cancer épithélial de l’ovaire. Cependant, malgré 30 années de recherches sur les peptides pénétrants, aucun des principaux peptides à pénétration cellulaire n’est encore approuvé par les instances internationales (FDA et EMA). Cela peut s’expliquer par l’instabilité de ces peptides (dégradation par les protéases), une libération prématurée du peptide avant d’avoir atteint la cible cellulaire et/ou la formation de la protéine corona qui pourrait masquer en partie le peptide après administration *in vivo*. C’est d’ailleurs dans cet objectif que des stratégies de protection par des polymères sensibles à un stimuli interne (pH, température etc...) ou externe (rayonnement infrarouge, rayonnement UV, magnétique etc...) ont vu le jour, afin d’assurer une protection du peptide jusqu’au site tumoral et permettre ensuite une déprotection de celui-ci dans l’environnement adéquat et donc un ciblage des cellules par le peptide pénétrant.

3.4 Références

- Bechara, Chérine, and Sandrine Sagan. 2013. 'Cell-Penetrating Peptides: 20 Years Later, Where Do We Stand?' *FEBS Letters* 587 (12): 1693–1702. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.04.031>.
- Berger, Manon, Anna Lechanteur, Brigitte Evrard, and Géraldine Piel. 2021. 'Innovative Lipoplexes Formulations with Enhanced siRNA Efficacy for Cancer Treatment: Where Are We Now?' *International Journal of Pharmaceutics* 605 (August): 120851. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120851>.
- Brand, Dirk van den, Mark A. J. Gorris, Alexander H. van Asbeck, Emma Palmen, Inge Ebisch, Harry Dolstra, Mattias Hallbrink, Leon F. A. G. Massuger, and Roland Brock. 2019. 'Peptide-Mediated Delivery of Therapeutic mRNA in Ovarian Cancer'. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 141 (August): 180–90. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.05.014>.
- Dasa, Siva Sai Krishna, Galina Diakova, Ryo Suzuki, Anne M. Mills, Michael F. Gutknecht, Alexander L. Klibanov, Jill K. Slack-Davis, and Kimberly A. Kelly. 2018. 'Plectin-Targeted Liposomes Enhance the Therapeutic Efficacy of a PARP Inhibitor in the Treatment of Ovarian Cancer'. *Theranostics* 8 (10): 2782–98. <https://doi.org/10.7150/thno.23050>.
- Derossi, D., A. H. Joliot, G. Chassaing, and A. Prochiantz. 1994. 'The Third Helix of the Antennapedia Homeodomain Translocates through Biological Membranes'. *The Journal of Biological Chemistry* 269 (14): 10444–50.
- Erazo-Oliveras, Alfredo, Nandhini Muthukrishnan, Ryan Baker, Ting-Yi Wang, and Jean-Philippe Pellois. 2012. 'Improving the Endosomal Escape of Cell-Penetrating Peptides and Their Cargos: Strategies and Challenges'. *Pharmaceutics (Basel, Switzerland)* 5 (11): 1177–1209. <https://doi.org/10.3390/ph5111177>.
- Frankel, A. D., and C. O. Pabo. 1988. 'Cellular Uptake of the Tat Protein from Human Immunodeficiency Virus'. *Cell* 55 (6): 1189–93. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90263-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90263-2).
- Fretz, Marjan M., Neal A. Penning, Saly Al-Taei, Shiroh Futaki, Toshihide Takeuchi, Ikuhiko Nakase, Gert Storm, and Arwyn T. Jones. 2007. 'Temperature-, Concentration- and Cholesterol-Dependent Translocation of L- and D-Octa-Arginine across the Plasma and Nuclear Membrane of CD34+ Leukaemia Cells'. *The Biochemical Journal* 403 (2): 335–42. <https://doi.org/10.1042/BJ20061808>.
- Friedler, Assaf, Dorit Friedler, Nathan W. Luedtke, Yitzhak Tor, Abraham Loyter, and Chaim Gilon. 2000. 'Development of a Functional Backbone Cyclic Mimetic of the HIV-1 Tat Arginine-Rich Motif *'. *Journal of Biological Chemistry* 275 (31): 23783–89. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002200200>.
- Green, M., and P. M. Loewenstein. 1988. 'Autonomous Functional Domains of Chemically Synthesized Human Immunodeficiency Virus Tat Trans-Activator Protein'. *Cell* 55 (6): 1179–88. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90262-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90262-0).
- Guidotti, Giulia, Liliana Brambilla, and Daniela Rossi. 2017. 'Cell-Penetrating Peptides: From Basic Research to Clinics'. *Trends in Pharmacological Sciences* 38 (4): 406–24. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.01.003>.
- Hillemeier, Lara, Nancy Adriana Espinoza-Sanchez, Burkhard Greve, Nourhan Hassan, Anca Chelariu-Raicu, Ludwig Kiesel, and Martin Götte. 2022. 'The Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycan

- Syndecan-3 Promotes Ovarian Cancer Pathogenesis'. *International Journal of Molecular Sciences* 23 (10): 5793. <https://doi.org/10.3390/ijms23105793>.
- Jobin, Marie-Lise, and Isabel D. Alves. 2014. 'On the Importance of Electrostatic Interactions between Cell Penetrating Peptides and Membranes: A Pathway toward Tumor Cell Selectivity?' *Biochimie, From Membranes to Pathologies*, 107 (December): 154–59. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.07.022>.
- Joliot, A, C Pernelle, H Deagostini-Bazin, and A Prochiantz. 1991. 'Antennapedia Homeobox Peptide Regulates Neural Morphogenesis.' *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (5): 1864–68.
- Karim, Reatul, Elise Lepeltier, Lucille Esnault, Pascal Pigeon, Laurent Lemaire, Claire Lépinoux-Chambaud, Nicolas Clere, et al. 2018. 'Enhanced and Preferential Internalization of Lipid Nanocapsules into Human Glioblastoma Cells: Effect of a Surface-Functionalizing NFL Peptide'. *Nanoscale* 10 (28): 13485–501. <https://doi.org/10.1039/c8nr02132e>.
- Kebebe, Dereje, Yuanyuan Liu, Yumei Wu, Maikhone Vilakhamxay, Zhidong Liu, and Jiawei Li. 2018. 'Tumor-Targeting Delivery of Herb-Based Drugs with Cell-Penetrating/Tumor-Targeting Peptide-Modified Nanocarriers'. *International Journal of Nanomedicine* 13: 1425–42. <https://doi.org/10.2147/IJN.S156616>.
- Knelson, Erik H., Jasmine C. Nee, and Gerard C. Blobe. 2014. 'Heparan Sulfate Signaling in Cancer'. *Trends in Biochemical Sciences* 39 (6): 277–88. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.03.001>.
- Koren, Erez, and Vladimir P. Torchilin. 2012. 'Cell-Penetrating Peptides: Breaking through to the Other Side'. *Trends in Molecular Medicine* 18 (7): 385–93. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.04.012>.
- Kosuge, Michie, Toshihide Takeuchi, Ikuhiko Nakase, Arwyn Tomos Jones, and Shiroh Futaki. 2008. 'Cellular Internalization and Distribution of Arginine-Rich Peptides as a Function of Extracellular Peptide Concentration, Serum, and Plasma Membrane Associated Proteoglycans'. *Bioconjugate Chemistry* 19 (3): 656–64. <https://doi.org/10.1021/bc700289w>.
- Kulhari, Hitesh, Deep Pooja, Raju Kota, T. Srinivasa Reddy, Rico F. Tabor, Ravi Shukla, David J. Adams, Ramakrishna Sistla, and Vipul Bansal. 2016. 'Cyclic RGDfK Peptide Functionalized Polymeric Nanocarriers for Targeting Gemcitabine to Ovarian Cancer Cells'. *Molecular Pharmaceutics* 13 (5): 1491–1500. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00935>.
- Lättig-Tünnemann, Gisela, Manuel Prinz, Daniel Hoffmann, Joachim Behlke, Caroline Palm-Apergi, Ingo Morano, Henry D. Herce, and M. Cristina Cardoso. 2011. 'Backbone Rigidity and Static Presentation of Guanidinium Groups Increases Cellular Uptake of Arginine-Rich Cell-Penetrating Peptides'. *Nature Communications* 2 (1): 453. <https://doi.org/10.1038/ncomms1459>.
- Lee, Sang Gon, Chang Hyun Kim, Si Woo Sung, Eun Seok Lee, Min Su Goh, Ho Yub Yoon, Myung Joo Kang, Sangkil Lee, and Young Wook Choi. 2018. 'RIPL Peptide-Conjugated Nanostructured Lipid Carriers for Enhanced Intracellular Drug Delivery to Hepsin-Expressing Cancer Cells'. *International Journal of Nanomedicine* 13: 3263–78. <https://doi.org/10.2147/IJN.S166021>.
- Liu, Ruiwu, Xiaocen Li, Wenwu Xiao, and Kit S. Lam. 2017. 'Tumor-Targeting Peptides from Combinatorial Libraries'. *Advanced Drug Delivery Reviews* 110–111 (February): 13–37. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.05.009>.

- Ma, Chuying, Guangfu Yin, Danhong Yan, Xueling He, Li Zhang, Yan Wei, and Zhongbing Huang. 2013. 'A Novel Peptide Specifically Targeting Ovarian Cancer Identified by in Vivo Phage Display'. *Journal of Peptide Science: An Official Publication of the European Peptide Society* 19 (12): 730–36. <https://doi.org/10.1002/psc.2555>.
- Ma, Chuying, Guangfu Yin, Fei You, Yan Wei, Zhongbing Huang, Xianchun Chen, and Danhong Yan. 2013. 'A Specific Cell-Penetrating Peptide Induces Apoptosis in SKOV3 Cells by down-Regulation of Bcl-2'. *Biotechnology Letters* 35 (11): 1791–97. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1263-x>.
- Maiolo, James R., Marc Ferrer, and Elizabeth A. Ottinger. 2005. 'Effects of Cargo Molecules on the Cellular Uptake of Arginine-Rich Cell-Penetrating Peptides'. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1712 (2): 161–72. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.04.010>.
- Miao, Jiangyong, David Mu, Burce Ergel, Rajasekhar Singavarapu, Zhenfeng Duan, Scott Powers, Esther Oliva, and Sandra Orsulic. 2008. 'Hepsin Colocalizes with Desmosomes and Induces Progression of Ovarian Cancer in a Mouse Model'. *International Journal of Cancer* 123 (9): 2041–47. <https://doi.org/10.1002/ijc.23726>.
- Milletti, Francesca. 2012. 'Cell-Penetrating Peptides: Classes, Origin, and Current Landscape'. *Drug Discovery Today* 17 (15–16): 850–60. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.03.002>.
- Mitchell, D. J., D. T. Kim, L. Steinman, C. G. Fathman, and J. B. Rothbard. 2000. 'Polyarginine Enters Cells More Efficiently than Other Polycationic Homopolymers'. *The Journal of Peptide Research: Official Journal of the American Peptide Society* 56 (5): 318–25. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3011.2000.00723.x>.
- Mueller, Judith, Ines Kretschmar, Rudolf Volkmer, and Prisca Boisguerlin. 2008. 'Comparison of Cellular Uptake Using 22 CPPs in 4 Different Cell Lines'. *Bioconjugate Chemistry* 19 (12): 2363–74. <https://doi.org/10.1021/bc800194e>.
- Najjar, Kristina, Alfredo Erazo-Oliveras, Dakota J. Brock, Ting-Yi Wang, and Jean-Philippe Pellois. 2017. 'An L- to d-Amino Acid Conversion in an Endosomolytic Analog of the Cell-Penetrating Peptide TAT Influences Proteolytic Stability, Endocytic Uptake, and Endosomal Escape'. *The Journal of Biological Chemistry* 292 (3): 847–61. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.759837>.
- Nakase, Ikuhiko, Toshihide Takeuchi, Gen Tanaka, and Shiroh Futaki. 2008. 'Methodological and Cellular Aspects That Govern the Internalization Mechanisms of Arginine-Rich Cell-Penetrating Peptides'. *Advanced Drug Delivery Reviews, Membrane Permeable Peptide Vectors: Chemistry and Functional Design for the Therapeutic Applications*, 60 (4): 598–607. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.10.006>.
- Pan, Qianqian, Jingjun Tian, Huihui Zhu, Liangjie Hong, Zhengwei Mao, Joaquim Miguel Oliveira, Rui L. Reis, and Xiao Li. 2020. 'Tumor-Targeting Polycaprolactone Nanoparticles with Codelivery of Paclitaxel and IR780 for Combinational Therapy of Drug-Resistant Ovarian Cancer'. *ACS Biomaterials Science & Engineering* 6 (4): 2175–85. <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.0c00163>.
- Park, Jinseu, Jiyeon Ryu, Kyeong-Ae Kim, Hak Joo Lee, Jae Hoon Bahn, Kyuhyung Han, Eui Yul Choi, Kil Soo Lee, Hyeok Yil Kwon, and Soo Young Choi. 2002. 'Mutational Analysis of a Human Immunodeficiency Virus Type 1 Tat Protein Transduction Domain Which Is Required for Delivery of an Exogenous Protein into Mammalian Cells'. *The Journal of General Virology* 83 (Pt 5): 1173–81. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-5-1173>.

- Perez, Samantha M., Julien Dimastromatteo, Charles N. Landen, and Kimberly A. Kelly. 2021. 'A Novel Monoclonal Antibody Targeting Cancer-Specific Plectin Has Potent Antitumor Activity in Ovarian Cancer'. *Cells* 10 (9): 2218. <https://doi.org/10.3390/cells10092218>.
- Pu, Ximing, Chuying Ma, Guangfu Yin, Fei You, and Yan Wei. 2014. 'Cell Adhesion and Invasion Inhibitory Effect of an Ovarian Cancer Targeting Peptide Selected via Phage Display in Vivo'. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 443 (3): 858–63. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.12.058>.
- Rothbard, Jonathan B., Theodore C. Jessop, Richard S. Lewis, Bryce A. Murray, and Paul A. Wender. 2004. 'Role of Membrane Potential and Hydrogen Bonding in the Mechanism of Translocation of Guanidinium-Rich Peptides into Cells'. *Journal of the American Chemical Society* 126 (31): 9506–7. <https://doi.org/10.1021/ja0482536>.
- Rothbard, Jonathan B., Erik Kreider, Christopher L. VanDeusen, Lee Wright, Bryan L. Wylie, and Paul A. Wender. 2002. 'Arginine-Rich Molecular Transporters for Drug Delivery: Role of Backbone Spacing in Cellular Uptake'. *Journal of Medicinal Chemistry* 45 (17): 3612–18. <https://doi.org/10.1021/jm0105676>.
- Rydberg, Hanna A., Maria Matson, Helene L. Amand, Elin K. Esbjörner, and Bengt Nordén. 2012. 'Effects of Tryptophan Content and Backbone Spacing on the Uptake Efficiency of Cell-Penetrating Peptides'. *Biochemistry* 51 (27): 5531–39. <https://doi.org/10.1021/bi300454k>.
- Ryser, H. J., and R. Hancock. 1965. 'Histones and Basic Polyamino Acids Stimulate the Uptake of Albumin by Tumor Cells in Culture'. *Science (New York, N.Y.)* 150 (3695): 501–3. <https://doi.org/10.1126/science.150.3695.501>.
- Scheller, Anne, Johannes Oehlke, Burkhard Wiesner, Margitta Dathe, Eberhard Krause, Michael Beyermann, Mathias Melzig, and Michael Bienert. 1999. 'Structural Requirements for Cellular Uptake of α -Helical Amphipathic Peptides'. *Journal of Peptide Science* 5 (4): 185–94. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1387\(199904\)5:4<185::AID-PSC184>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1387(199904)5:4<185::AID-PSC184>3.0.CO;2-9).
- Sousa de Almeida, Mauro, Eva Susnik, Barbara Drasler, Patricia Taladriz-Blanco, Alke Petri-Fink, and Barbara Rothen-Rutishauser. 2021. 'Understanding Nanoparticle Endocytosis to Improve Targeting Strategies in Nanomedicine'. *Chemical Society Reviews* 50 (9): 5397–5434. <https://doi.org/10.1039/D0CS01127D>.
- Sugahara, Kazuki N., Tabet Teesalu, Priya Prakash Karmali, Venkata Ramana Kotamraju, Lilach Agemy, Olivier M. Girard, Douglas Hanahan, Robert F. Mattrey, and Erkki Ruoslahti. 2009. 'Tissue-Penetrating Delivery of Compounds and Nanoparticles into Tumors'. *Cancer Cell* 16 (6): 510–20. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.10.013>.
- Tashima, Toshihiko. 2017. 'Intelligent Substance Delivery into Cells Using Cell-Penetrating Peptides'. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 27 (2): 121–30. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.11.083>.
- Tian, Yuan, and Shaobing Zhou. 2021. 'Advances in Cell Penetrating Peptides and Their Functionalization of Polymeric Nanoplatforms for Drug Delivery'. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Nanomedicine and Nanobiotechnology* 13 (2): e1668. <https://doi.org/10.1002/wnan.1668>.
- Tünnemann, Gisela, Gohar Ter-Avetisyan, Robert M. Martin, Martin Stöckl, Andreas Herrmann, and M. Cristina Cardoso. 2008. 'Live-Cell Analysis of Cell Penetration Ability and Toxicity of Oligo-

- Arginines'. *Journal of Peptide Science: An Official Publication of the European Peptide Society* 14 (4): 469–76. <https://doi.org/10.1002/psc.968>.
- Verdurmen, Wouter P. R., Petra H. Bovee-Geurts, Parvesh Wadhvani, Anne S. Ulrich, Mattias Hällbrink, Toin H. van Kuppevelt, and Roland Brock. 2011. 'Preferential Uptake of L- versus D-Amino Acid Cell-Penetrating Peptides in a Cell Type-Dependent Manner'. *Chemistry & Biology* 18 (8): 1000–1010. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2011.06.006>.
- Vivès, E., P. Brodin, and B. Lebleu. 1997. 'A Truncated HIV-1 Tat Protein Basic Domain Rapidly Translocates through the Plasma Membrane and Accumulates in the Cell Nucleus'. *The Journal of Biological Chemistry* 272 (25): 16010–17. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.25.16010>.
- Witt, Hendrik, Katarina Hajdin, Kristina Iljin, Oliver Greiner, Felix K. Niggli, Beat W. Schäfer, and Michele Bernasconi. 2009. 'Identification of a Rhabdomyosarcoma Targeting Peptide by Phage Display with Sequence Similarities to the Tumour Lymphatic-Homing Peptide LyP-1'. *International Journal of Cancer* 124 (9): 2026–32. <https://doi.org/10.1002/ijc.24170>.
- Xia, Huimin, Guangzhi Gu, Quanyin Hu, Zhongyang Liu, Mengyin Jiang, Ting Kang, Deyu Miao, et al. 2013. 'Activatable Cell Penetrating Peptide-Conjugated Nanoparticles with Enhanced Permeability for Site-Specific Targeting Delivery of Anticancer Drug'. *Bioconjugate Chemistry* 24 (3): 419–30. <https://doi.org/10.1021/bc300520t>.
- Yang, Yang, YanFang Yang, XiangYang Xie, ZhiYuan Wang, Wei Gong, Hui Zhang, Ying Li, FangLin Yu, ZhiPing Li, and XingGuo Mei. 2015. 'Dual-Modified Liposomes with a Two-Photon-Sensitive Cell Penetrating Peptide and NGR Ligand for siRNA Targeting Delivery'. *Biomaterials* 48 (April): 84–96. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.01.030>.
- Zou, Yan, Yifeng Xia, Fenghua Meng, Jian Zhang, and Zhiyuan Zhong. 2018. 'GE11-Directed Functional Polymersomal Doxorubicin as an Advanced Alternative to Clinical Liposomal Formulation for Ovarian Cancer Treatment'. *Molecular Pharmaceutics* 15 (9): 3664–71. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00024>.

Chapitre 2

Chapitre 2. Caractérisation physico-chimiques de nanocapsules lipidiques chargées en ferrocifènes

1. Introduction

Les ferrocifènes sont des composés organométalliques développés par l'équipe du Professeur Jaouen. La première synthèse remonte à la fin du XX^{ème} siècle avec le composé nommé Fc-OHTAM, encore nommé **P15**. Ces molécules organométalliques sont des dérivés de l'anticancéreux appelé tamoxifène. Fc-OHTAM était considéré comme le premier composé organométallique modulateur des récepteurs estrogènes, conférant ainsi des propriétés antiprolifératives contre le cancer du sein Er α +. De plus, il a été vu que ce composé possédait des propriétés cytotoxiques sur le cancer du sein triple négatif Er α -, non retrouvées avec le tamoxifène. Depuis, plus de 300 ferrocifènes ont été synthétisés. Comme expliqué précédemment dans l'état de l'art, des études mécanistiques ont permis d'établir des relations structures-activités sur différents types de cancers résistants selon les ferrocifènes testés. Au regard des différents résultats obtenus, le succinimide-ferrocifène, le **P722**, pourrait être caractérisé de molécule « lead » dans cette famille prometteuse d'organométalliques.

Cependant, l'un des problèmes majeurs de ces molécules est leur grande lipophilie. Ainsi, pour les administrer par voie intraveineuse, l'utilisation d'un vecteur adéquat est nécessaire. Les nanocapsules lipidiques (LNCs), développées par le laboratoire MINT au début du XXI^{ème} siècle, ont démontré être un vecteur de choix pour encapsuler les ferrocifènes (**P5**, **P15**, **P53**, **P722** etc...). En effet, leur structure cœur huileux-écorce PEGylée permet efficacement l'encapsulation de molécules lipophiles (paclitaxel, ferrocifènes etc...).

L'objectif de ce chapitre a été dans un premier temps de déterminer la charge maximale en **P722** pouvant être encapsulée dans les LNCs. Étant donné la faible charge finale obtenue en **P722**, des dérivés du **P722** ont été synthétisés par notre partenaire Feroscan afin d'accroître la lipophilie de la molécule initiale et donc d'augmenter la charge dans la nanocapsule lipidique. Des analyses de diffusion dynamique de la lumière ont été réalisées afin de déterminer le diamètre des LNCs obtenu selon le ferrocifène et la charge initiale introduite. En outre, un résultat inattendu a été obtenu avec deux des ferrocifènes étudiés, le bi-acétyle succinimide **P769** et le (**E**)-mono-acétyle succinimide **P998**. En effet, une forme galénique sans précédent avec un ferrocifène a été obtenue : un gel. Afin de caractériser et de comprendre la formation de ce gel, des études de rhéologie et de tensiométrie pour déterminer la position des différents ferrocifènes ont été réalisées. A ce jour, aucune structure similaire n'avait été obtenue avec ces composés organométalliques ouvrant ainsi la possibilité d'un traitement local. Enfin, ces différents résultats physico-chimiques ont été complétés par des études de viabilité cellulaire, après traitement pendant 72 h, sur les lignées cellulaires SKOV3 de cancer de l'ovaire (cf article '*Physico-chemical characterization of ferrocifen lipid nanocapsules : customized drug delivery systems guided by the molecular structure* »)

et U87MG de glioblastome (cf. complément du chapitre 2), dans le but de vérifier que les modifications chimiques apportées au **P722** ne modifiaient pas l'efficacité de ce dernier.

2. Article soumis dans Langmuir : Physico-chemical characterization of ferrocifen lipid nanocapsules: customized delivery systems guided by the molecular structure

Physico-chemical characterization of ferrocifen lipid nanocapsules: customized drug delivery systems guided by the molecular structure

Pierre Idlas¹, Elise Lepeltier^{1,*}, Guillaume Bastiat¹, Pascal Pigeon², Michael J. McGlinchey³, Nolwenn Lautram¹, Anne Vessières², Gerard Jaouen² and Catherine Passirani¹

¹ Micro et Nanomédecines Translationnelles, MINT, UNIV Angers, INSERM 1066, CNRS 6021, Angers, France

² PSL Chimie Paris Tech, 11 rue P. et M. Curie and Sorbonne Université IPCM, CNRS, UMR 8232, IPCM, Paris, 75005, France

³UCD School of Chemistry and Chemical Biology, University College Dublin, Belfield, Dublin 4, Ireland

* Corresponding author: elise.lepeltier@univ-angers.fr

ABSTRACT

Ferrocifens, lipophilic organometallic complexes, are made of a biologically redox motif [ferrocenyl-ene-p-phenol] conferring to this family very interesting cytotoxic properties. However, because of their high lipophilic nature, formulation stage is required before being administered *in vivo*. In last decades, ferrocifen lipid nanocapsules (LNCs) have been successfully formulated and have demonstrated anticancer properties on multidrug-resistant cancers on several mice models (glioblastoma, breast cancer, metastatic melanoma). A recent family of ferrocifens (succinimide-ferrociphenols) seems to be the most efficient on several resistant cancer cell lines, with IC₅₀ in the nanomolar range, and promising *in vivo* results on murine ovarian cancer models. As LNCs are composed of an oily core (caprylic/capric triglycerides), to modulate succinimide-ferrociphenol lipophilicity could be interesting to improve the drug loading in LNCs. Here, as **P722** drug loading in LNCs was low, **P722** was structurally modified in order to increase its lipophilicity and so the payload in LNCs. Chemical modification led to a series of five new succinimide-ferrocifens. Results confirmed that these slight structural modifications allowed to increase the drug loading in LNCs for all ferrocifens, without any modification of the cytotoxicity on SKOV3 ovarian cancer cell line. Interestingly, encapsulation of two of the ferrocifens, **P769** and **(E)-P998** led to the formation of a gel: it was unprecedented. This phenomenon could be explained by ferrocifen position in LNCs as showed by the decrease of interfacial tension measurements at the water/oil interface. Moreover, results highlighted the importance of the [succinimide-ene-cis-phenyl-acetyl] motif to obtain a gel. Promising perspectives to use these ferrocifen loaded LNC to treat glioblastoma could be concretely imagined by local application of the gel in the cavity after tumour resection.

INTRODUCTION

Nanomedicine is a very active multidisciplinary field with large investments, internationally recognized since notably the Covid-19 vaccination nanoplatform by Pfizer/BioNTech and Moderna. Since the sixties, one of the main objectives of the field is to develop new therapeutic strategies to treat cancers.¹ A lot of progress has been notably done to increase the amount of conventional chemotherapeutic reaching the cancer site, in avoiding healthy tissues, by the use of vectors such as liposomes, polymeric nanoparticles, lipid-prodrug nanoparticles ...²⁻⁵ However, resistance phenomena to classic chemotherapies is too often observed: that is why there is still a need to bring on market new small active molecules to overcome it. In the late 1980s, Prof. Jaouen's team synthesized a new class of bioorganometallic molecules.^{6,7} Among all the organometallic complexes based on a metal ion (iron, ruthenium, osmium, rhodium) tested, ferrocifen family was the most promising.⁸ Ferrocifens, lipophilic organometallic complexes, are made of a biologically redox motif [ferrocenyl-ene-p-phenol]. The first ferrocifen synthesized was a ferrocenyl analog of hydroxytamoxifen, named **P15** or Fc-OH-Tam, showing an anti-estrogenic effect on estrogen receptor-positive (ER+) breast cancer and also a cytotoxic effect on ER- triple negative breast cancer.^{9,10} The cytotoxic behavior was related to the unique redox properties of this molecule. Indeed, several studies highlighted the role of the reversible iron oxidation of the ferrocenyl moiety, leading to an electrophilic quinone methide (QM) and the production of reactive oxygen species (ROS), inducing senescence and/or apoptosis.^{11,12} Over time, structure-activity relationship studies have allowed to elaborate mechanisms of action according to ferrocifen molecular structure.⁸ Recently, another family of ferrocifens, the succinimide one, was synthesized, with a leading compound named **P722 (Figure 1)**.¹³ Compared to previous ferrocifens, **P722** showed an increase of cytotoxicity on several cancer cell lines. This improvement was explained by its atypical lone pair- π interaction between one carbonyl group of the imide and the center of the aromatic QM ring, improving its stability.^{13,14}

However, as for most anticancer drug candidates, ferrocifen compounds are poorly soluble in water, requiring a formulation stage before *in vivo* administration. For two decades, lipid nanocapsules (LNCs) have demonstrated their ability to successfully encapsulate lipophilic drugs such as paclitaxel and ferrocifens.¹⁵⁻¹⁸ LNCs are obtained by a low-energy emulsification method based on a phase-inversion process.¹⁹ They are composed of a liquid oily core and a polyethylene glycol hydroxystearate surfactant shell. Recent studies have highlighted the successful encapsulation of **P722** in LNCs, with promising *in vivo* results on metastatic melanoma, glioblastoma and epithelial ovarian cancer.²⁰⁻²² However, compared to other ferrocifens, drug loading of this compound in LNCs remains particularly weak.

The aim of this study was thus to modify the chemical structure of **P722**, to obtain succinimide-ferrocifens with higher lipophilicity, to finally improve the payload in LNCs. **P722** was structurally modified by leading to 5 new ferrocifens: **P769**, **(E)-P849**, **(Z)-P849**, **(E)-P998** and **(Z)-P998 (Figure 1)**. Interestingly, an unprecedented gel was obtained for **P769** and **(E)-P998**. Viscoelastic properties of the obtained ferrocifen-LNC gel were measured, depending on ferrocifen and particle concentrations. To understand gel formation, tensiometry measurements and kinetic of LNC destabilization were studied. Finally, cell viability experiments on ovarian cancer cell line SKOV3 were performed to verify if chemical modifications on **P722** hampered its efficiency.

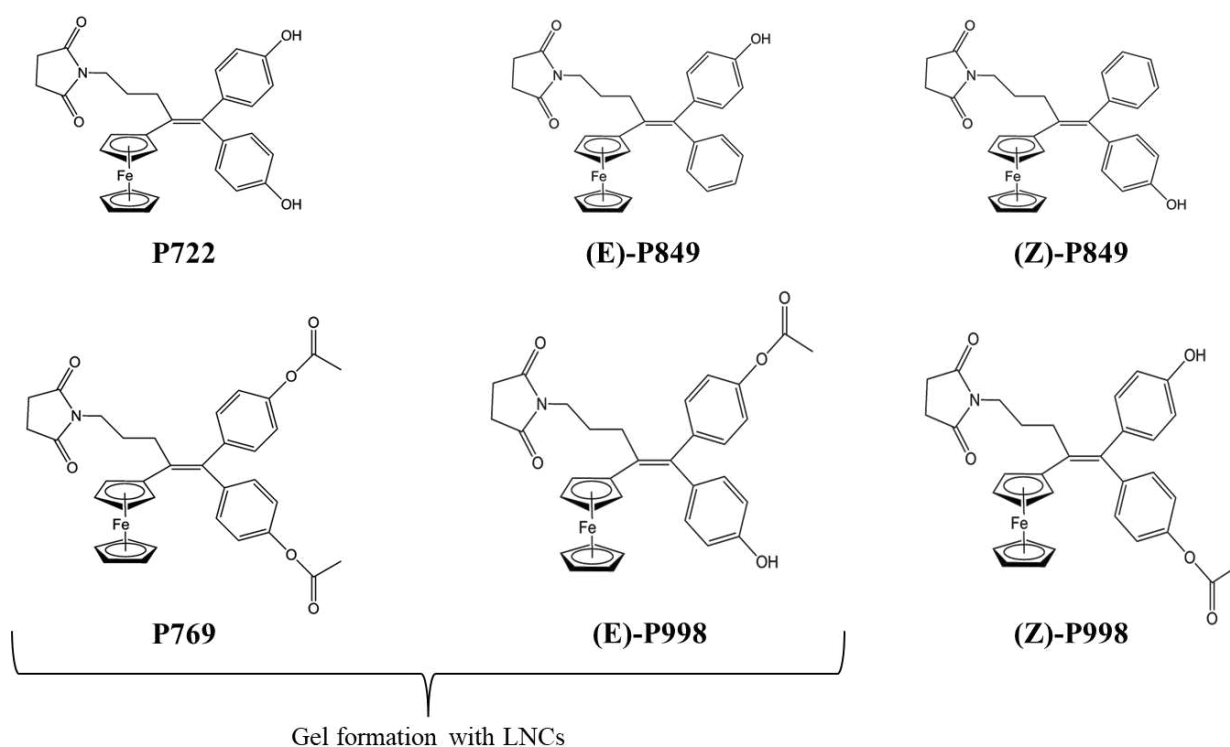


Figure 1: Molecular structure of the different succinimide-ferrocifens used.

EXPERIMENTAL SECTION

Materials. All components of conventional blank LNCs are FDA-approved for parenteral administration. Macrogol 15 hydroxystearate (Kolliphor® HS 15) was purchased from BASF (Germany). Phosphatidylcholine from soybean (Lipoïd S 100) was provided by Lipoïd GmbH (Germany) and caprylic/capric triglycerides (Labrafac® WL 1349) were supplied by Gattefosse (France). Ultra-pure water (UPW) was obtained from a Millipore filtration system. All the other reagents or solvents used (acetonitrile, methanol, dimethyl sulfoxide DMSO) for the chromatography analysis were of analytical grade. Ferrocifens **P722**¹³, **P849**¹⁴, **P769** and **P998** were synthesized and provided by PSL Chimie ParisTech (France), Feroscan SME. Esterase from porcine liver was purchased from Merck (SigmaAdlrlich, Germany).

Preparation of ferrocifen lipid nanocapsules (LNCs). LNCs were prepared using a phase inversion process as thoroughly described in litterature.¹⁹ Briefly, the studied ferrocifen was added with Kolliphor® HS 15 (16.9 % w/w) and Labrafac® WL 1349 (20.7 % w/w) and stirred for 30 min at 60 °C. Then the other compounds (Lipoïd S 100 (1.5 % w/w), NaCl (1.3 % w/w, physiological osmolarity) and UPW (59.6 % w/w) were added and mixed under magnetic stirring at 60°C for 10 min. Three heating-cooling cycles were performed between 90 °C and 60 °C to obtain a phase inversion of the emulsion (O/W emulsion for temperature lower than phase inversion temperature (PIT) and W/O emulsion for temperature higher than PIT). During the third cycle, when the temperature decreased and reached the PIT (78 °C < PIT < 83 °C), ice-cold UPW (31.5 % v/v_{tot}) was added to induce an irreversible shock to obtain the LNCs. Afterward, the suspension was stirred for 10 min under a slow magnetic stirring at room temperature. To finish, the LNC formulation was filtered through 0.2 µm sterile polyethersulfone (PES) membrane (Dutscher, Bernolsheim, France) to remove any unloaded ferrocifen before being stored at 4 °C. In order to show benefits of filtration as separation technique of free ferrocifen, a sedimentation step of unloaded ferrocifen from LNC formulation was performed. Concretely,

formulations were left to rest for 1h after LNC formulation process, before sample preparation for chromatography analysis.

Characterization of LNCs. Average hydrodynamic diameter (Z-average) and polydispersity index (PDI) were determined by dynamic light scattering (DLS) at 25 °C with a backscatter angle of 173° using a Zetasizer Nano ZS system (Malvern Panalytical Ltd, Worcestershire, UK) after a dilution by 6650 of the formulations in UPW. The measured average values were calculated from the correlation functions fitted using an exponential fit (Cumulant approach), based on 3 runs, with more than 10 measurements for each run.

Zeta potential of the nano-systems was measured using the laser Doppler micro-electrophoresis technique by a Zetasizer Nano ZS system (Malvern Panalytical Ltd, Worcestershire, UK). The measured average values were calculated from 3 runs with more than 10 measurements for each run, after a dilution by 100 of the formulations with UPW (pH = 8.3 at 25 °C). Smoluchowski's approximation was used to determine electrophoretic mobility for determination of the zeta potential. The measured average values were calculated from 3 runs, with more than 10 measurements for each run. For Z-average, PDI and zeta potential of P769-LNCs, measurements were performed before gel formation.

Determination of encapsulation efficiency (E.E) and drug loading (D.L). Encapsulation efficiency and drug loading of the ferrocifens were determined using two Ultra-High-performance liquid chromatography (UPLC) methods. A C18 analytical column (ACQUITY UPLC® BEH C18 1.7 µm, 2.1 x 50 mm, Waters, Molsheim, France) was used at 20 °C. Quantification of the encapsulated ferrocifens was obtained by measurement of UV absorbance at λ = 450 nm, after a filtration step through a 0.2 µm pore size filter or by sedimentation to separate the encapsulated from the free ferrocifens. A dissolution step of LNCs was performed before analysis with the optimal solvent or mix of solvents for each ferrocifens. Analysis of the data was performed using Empower 3 software (Waters). For **P722** and the two isomers of **P849**, the C18 column was eluted at a flow rate to 0.2 mL.min⁻¹ with an isocratic method: acetonitrile/water (65/35 v/v). Calibration curves were established (at each analysis) by quantifying the area under the curves (AUCs) of [0.01 – 0.2] mg.mL⁻¹ ferrocifen solutions in blank LNCs dissolved by a 40-fold dilution in methanol/DMSO (90/10 v/v). The loaded LNCs were dissolved by a 40-fold dilution with methanol/DMSO (90/10 v/v) to have **P722** and **P849** concentrations in the appropriate concentration range, and quantification of ferrocifens was performed using the calibration curve. The injection volume was of 5 µL and the retention times were of 1.2 min, 1.9 min and 3.1 min for **P722**, **(Z)-P849** and **(E)-P849** respectively.

For analysis of **P769** and the two isomers of **P998**, the C18 column was eluted at a flow rate of 0.2 mL.min⁻¹ with a gradient of acetonitrile and water (**Table 1**). Calibration curves were established (at each analysis) by quantifying the area under the curves (AUCs) of [0.01 – 0.2] mg.mL⁻¹ ferrocifen solutions in blank LNCs dissolved by a 40-fold dilution in a mix of methanol/acetonitrile/DMSO (45/45/10 v/v/v). The loaded LNCs were dissolved by a 40-fold dilution with methanol/acetonitrile/DMSO (45/45/10 v/v/v) to have **P769** and **P998** concentrations in the appropriate concentration range, and quantification of the samples was performed using the calibration curve. The injection volume was of 5 µL and the retention times were of 3.4 min, 3.0 min and 2.8 min for **P769**, **(Z)-P998** and **(E)-P998**, respectively.

Encapsulation efficiency (E.E, %) of the corresponding ferrocifen into LNCs was calculated using the following equation:

$$E.E (\%) = \frac{(Initial\ ferrocifen\ conc.\ in\ LNCs - unencapsulated\ ferrocifen\ conc.\ in\ LNCs)}{Initial\ ferrocifen\ conc.\ in\ LNCs} \times 100$$

Drug loading of the corresponding ferrocifen into LNCs was calculated using the following equation:

$$D.L \left(\% \frac{w}{w} \right) = \frac{\text{Mass of encapsulated ferrocifen in 1 mL of LNC dispersion}}{m(\text{ferrocifen}) + m(\text{Labrafac}^{\text{®}} \text{ WR 1349}) + m(\text{Kolliphor}^{\text{®}} \text{ HS 15}) + m(\text{Lipoïd S 100})} \times 100$$

Table 1. Gradient elution for analysis of **P769**, **(E)-P998** and **(Z)-P998** with UPLC system.

Time (min)	Flow rate (mL/min)	Phase A: Water/ACN (95/5 v/v) (%)	Phase B: ACN (%)
0	0.2	50	50
0.5	0.2	15	85
4	0.2	15	85
5	0.2	50	50
15	0.2	50	50

Rheological measurements. Viscoelastic properties of gels were measured using a Kinexus[®] rheometer (Malvern Instruments S.A., United Kingdom) with a cone plate geometry (diameter 40 mm, angle 2°) at 20 °C. Linear viscoelasticity domain was first determined by oscillatory strain sweeps at constant frequency of 1 Hz. In this regimen (strain amplitude fixed at 0.1 % for all analyses), the viscoelastic properties: elastic moduli G' and viscous moduli G'', were measured by varying the oscillation frequency (from 0.1 to 10 Hz). Values of G' and G'' were taken at 1 Hz. All these experiments were performed at least three times.

Interfacial tension measurements. Measurements of interfacial tension were performed using a drop tensiometer device (Tracker Teclis, Longessaigne, France). Concretely, a 10 µL rinsing drop of triglyceride (Labrafac[®] WL 1349) was generated with an Exmire microsyringe (Probablo, Paris, France) in an optical glass container filled with a water phase. To keep the volume of the drop constant and so the surface area, piston movements of the syringe were controlled by a stepping motor. Interfacial tension, surface area and volume of the drop were obtained using Laplace equation after analysis of the drop profile recorded in real time (1 measurement each 10 s) for 6 h using a video camera connected to a computer. The triglyceride phase was concentrated with different ferrocifens in the range of [0.1 – 1.6] mg/g of triglyceride. All measurements were performed at least three times, at a temperature of 20.8 ± 0.3 °C.

LNC degradation by esterase. A solution of esterase from porcine liver, at a molar ratio of 1:1 in **P769**, was added respectively to the suspensions of blank LNCs, **P722**-LNCs and **P769**-LNCs at 1.6 mg/mL (eq. 5.6 mg/g). Soon after, samples were put at 37 °C for 96 h. At different time intervals, samples were collected and analysed by DLS to follow the hydrodynamic diameter of LNCs. **P769** hydrolysis was also followed by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC/MS) system (Waters 2695 Separations Module and micromass Quattro micro[™], software Quattro micro, Waters, Molsheim France), with single ion recording (SIR) analysis. Method was developed on an Alliance[®] 2695 system (with a 150 x 2.0 mm, 5 µm Uptisphere C18 5ODB column (Interchim, France). Samples were eluted at 20 °C, at a flow rate of 0.2 mL.min⁻¹ with a gradient of water + 0.1% formic acid/ACN + 0.1% formic acid (**Table 2**). Detection was obtained by measurement of UV absorbance at λ = 450 nm. Retention time for **P769** was 8.6 min, for **(Z)-P998** was 7.8 min and **(E)-P998** was 7.4 min. Then, after the elution through the Uptisphere column, samples were analysed by MS using a SIR mode. **P769**, **(Z)-**

P998 and **(E)-P998** were detected at m/z 620, 578 and 578 respectively. All measurements were performed at least three times.

Table 2. Gradient elution of the LC-MS/MS method for **P769** hydrolysis

Time (min)	Flow rate (mL/min)	Phase A: Water + 0.1 % formic acid (%)	Phase B: ACN + 0.1 % formic acid (%)
0	0.2	50	50
0.5	0.2	15	85
4	0.2	15	85
5	0.2	50	50
15	0.2	50	50

Cell Culture. Ovarian cancer cell line SKOV3 was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) and maintained as recommended. The SKOV3 cell lines were grown in McCoy's 5A Medium, modified with sodium bicarbonate, without L-glutamine and supplemented with 10 % of Fetal Bovine Serum (FBS) and 1 % of penicillin/streptomycin. Cells were maintained in a humid atmosphere at 37 °C with 5 % CO₂. Cells were passaged once they were at about 70 % of confluence.

In vitro activity of free ferrocifens and ferrocifen LNCs. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(-4-sulfo-phenyl)-2H-tetrazolium salt (MTS) assay was used to test the cytotoxicity of free ferrocifens and ferrocifen-LNCs (colorimetric assay based on the conversion of a tetrazolium salt into formazan). For *in vitro* mitochondrial activity, ferrocifen-LNCs at a concentration of 2 mM in ferrocifen were prepared. It was corresponding to a concentration (mg/g of lipophilic excipient) of 3.74 mg/g, 3.63 mg/g, 4.33 mg/g and 4.03 mg/g for **P722**, **P849** (two isomers), **P769** and **P998** (two isomers) respectively.

Briefly, SKOV3 cells were seeded at 2.5 x 10³ cells/well in 96-well plates containing 100 µL growth medium. After 24 h at 37 °C with 5 % CO₂, the medium was removed and cells were treated with the tested ferrocifens and ferrocifen LNCs at 2 mM diluted with McCoy's 5A Medium in order to test 8 concentrations. After 72 h of incubation, treatments were removed and 100 µL per well of a mix MTS + McCoy's 5A Medium was added for 2 h. Absorbance was measured at 490 nm using a spectrophotometric plate reader (SPECTRAMax M2, Molecular Devices, San Jose, USA). The Dose-Response curves were plotted with GraphPad Prism Software and the IC₅₀ values were calculated using the polynomial curves. All experiments were performed at least three times.

Statistical analysis. Results obtained from the experiments were analyzed statistically using GraphPad Prism® software. Mean and standard deviation (SD) were determined, and values are represented as Mean ± SD. Significant differences between means, for all experiments, were analysed using a Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's test for multiple comparisons. Differences were considered statistically significant for p < 0.05.

RESULTS AND DISCUSSION

Physico-chemical characterization of LNC formulations. Encapsulation efficiency was obtained after separation of unloaded ferrocifen by filtration on 0.2 µm (**Figure 2.a**) or by sedimentation (**Figure 2.b**), as its density is higher than the dispersive water phase. From these two techniques of separation, results obtained were in adequation with macroscopic observations made after LNC formulation: an orange precipitation was observed at the bottom of the vial corresponding to unloaded ferrocifen when initial amount of ferrocifen was too high.

More precisely, the encapsulation efficiency (E.E) of the bi-phenol succinimide-ferrocifen **P722** in

LNCs decreased with the initial amount added, from around 100 % of E.E with an initial amount below 7.0 mg/g of lipophilic excipients (**P722** + Labrafac® WL 1346 + Kolliphor® HS 15 + Lipoid S100) (eq. 2 mg/mL of formulation) to values lower than 55 % with an initial amount above 13.9 mg/g (eq. 4 mg/mL of formulation). Maximal drug loading for **P722** was 7.0 mg/g of lipophilic excipients. It was a low amount compared to another potent ferrocifen, **P53**, for which the maximal drug loading was of 43.6 mg/g. It was recently explained by the higher lipophilicity of **P53** compared to **P722**.²² Thus, to improve the drug loading of the succinimide-ferrocifen family in LNCs, some slight structural modification was done on **P722** leading to five new succinimide ferrocifens expected to be more lipophilic: (**E**)-**P849**, (**Z**)-**P849**, **P769**, (**E**)-**P998** and (**Z**)-**P998**.

The solubility experiment performed in caprylic/capric triglyceride (Labrafac® WL 1346) confirmed that these five molecules were more lipophilic than **P722** (Table S1 in supplementary information). Moreover, solubility values also explained encapsulation behaviour of the different ferrocifens. Indeed, for **P849**, (**Z**)-**P849**, more lipophilic than (**E**)-**P849**, had an E.E higher than 90 % whatever the initial amount added whereas the E.E for (**E**)-**P849** decreased with the initial amount added. It might be explained by difference of polarity between the two isomers. Same observation was done with mono-acetyl succinimide-ferrocifen **P998**. (**E**)-**P998** had a good E.E, higher than 90 % whatever the initial amount added, whereas (**Z**)-**P998** had a decrease of its E.E until 60 % for an initial amount of 17.2 mg/g (eq. 5 mg/mL). Finally, E.E obtained from the bi-acetyl succinimide-ferrocifen **P769** were higher than 90 % but it was not possible to determine the E.E above an initial amount of 8.7 mg/g because a gel was obtained (Figure 2).

All hydrodynamic diameters were around 50 nm whatever the initial amount of ferrocifen added. All the PDI measured were below the limit value of 0.2, allowing to consider each ferrocifen-LNCs as a monodisperse suspension. Moreover, whatever the ferrocifen encapsulated, zeta potential of LNCs were not impacted with values below - 5 mV, close to neutrality (Figure S1 in supplementary information). Results obtained were in accordance with previous studies performed in the MINT laboratory.^{18,23,24}

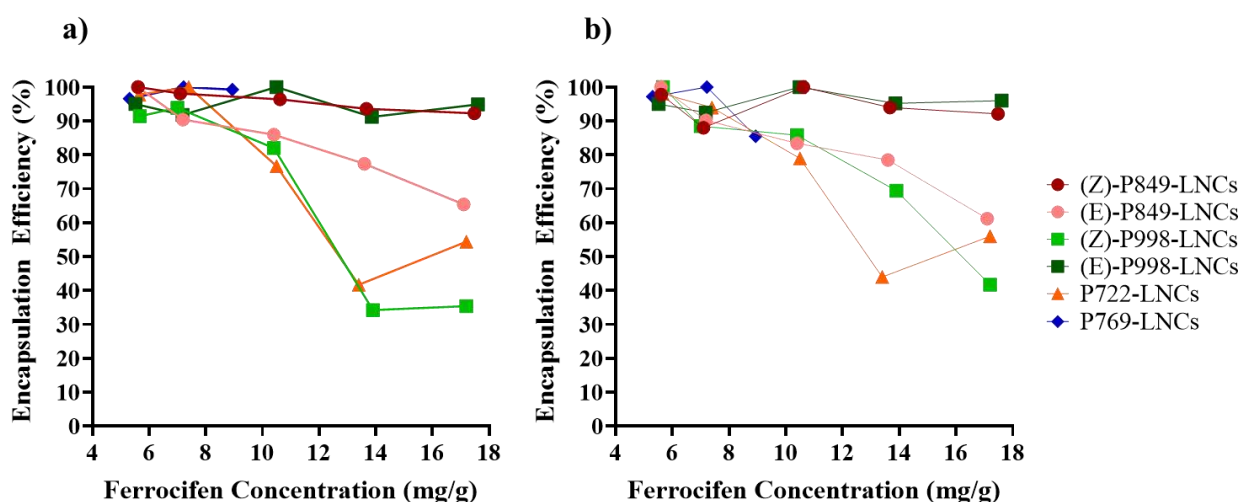


Figure 2: Encapsulation efficiency (E.E) (%) of succinimide-ferrocifen molecules in LNCs according to initial amount of ferrocifens: a) E.E obtained after filtration through 0.2 µm pore size filter; b) E.E obtained after sedimentation of unloaded ferrocifen. Ferrocifen concentration is expressed according to the weight of all lipophilic excipients (ferrocifen + Labrafac® WL 1349 + Kolliphor® HS 15 + Lipoid S100).

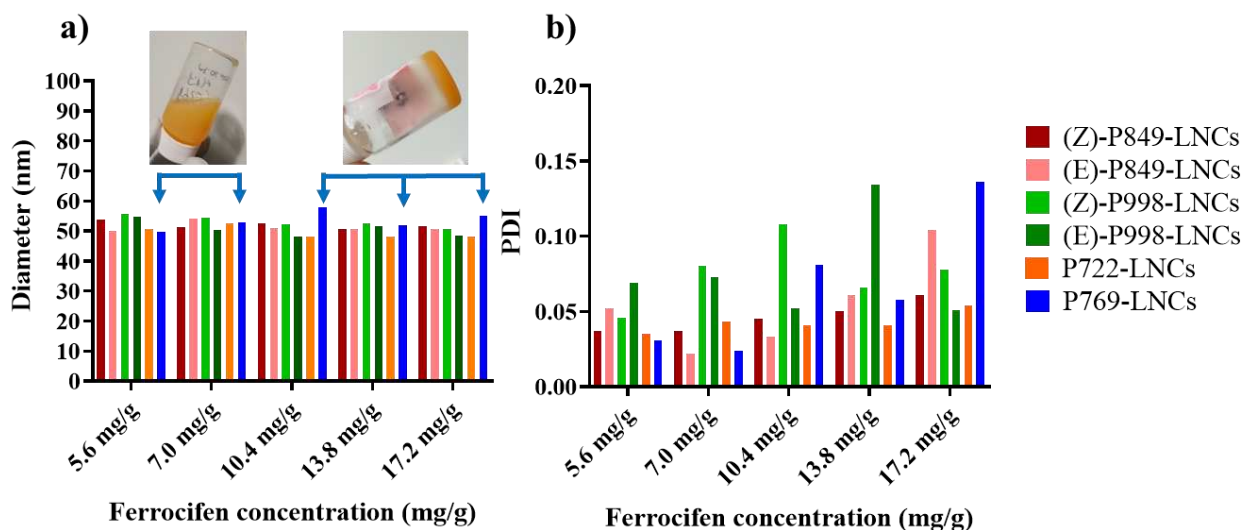


Figure 3: Physico-chemical characteristics of ferrocifen lipid nanocapsules (LNCs) obtained by Dynamic Light Scattering (DLS): a) Hydrodynamic diameter of ferrocifen-LNCs. A gel was obtained for **P769** at 10.4 mg/g, 13.8 mg/g and 17.2 mg/g as shown on the photo; b) Polydispersity index (PDI) of ferrocifen-LNCs. Values for P769-LNCs, from 10.4 mg/g to 17.2 mg/g, were obtained before the formation of the gel. Results are repetitions of three measurements for each sample (n = 1).

Rheological characterisation of acetyl-ferrocifen-LNC gel. As explained previously, a gel was obtained with **P769** for a payload higher than 8.7 mg/g (**Figure 2.a**). Measurement of viscoelastic properties of **P769**-LNC gel, from 10.4 mg/g to 17.2 mg/g, were performed after gel formation (one night at 4 °C). First, the linear viscoelasticity region was determined by amplitude sweep measurements at oscillation frequency of 1 Hz. Linear regime, corresponding to strain-independent elastic moduli (G') and viscous moduli (G''), was identified (**Figure S2** in supplementary information). Then, the viscoelastic properties were measured with frequency sweep from 0.1 to 10 Hz at fixed strain amplitude of 0.1 % (**Figure S2** in supplementary information). For each measurement, G' and G'' values were constant and G' was higher than G'' with $\tan(\delta) = G''/G' < 1$ (**Table S2** in supplementary information). These preliminary results confirmed that this system obtained after encapsulation of **P769** in LNCs (for concentration higher than 10.4 mg/g) can be phenomenologically defined as a gel.²⁵

Then, the influence of **P769** concentration and LNC concentration (number of particle per mL of formulation) on the rheological behaviour of the gel was studied. First, G' and G'' values increased significantly from 17.9 ± 4.4 to 144.4 ± 8.1 Pa for G' and 2.9 ± 1.3 to 28.3 ± 4.4 Pa for G'' when **P769** concentration increased from 10.4 to 17.2 mg/g, respectively (**Figure 4.a**). Even if gel hardness seemed being lost with the decrease of **P769** concentration (from macroscopic observations), **P769**-LNCs gel elasticity was not significantly changed whatever **P769** concentration: 7.9 ± 4.5 , 4.9 ± 1.7 and 5.4 ± 1.2 for **P769** payload of 10.4 mg/g, 13.8 mg/g and 17.2 mg/g, respectively (**Table S2** in supplementary information). The same rheological behaviour was obtained with variation of LNC concentration, for a constant **P769** concentration of 17.2 mg/g. Indeed, when decreasing the concentration in nanoparticles (from 2.72×10^{15} to 6.6×10^{14} LNC/mL), G' and G'' values significantly decreased, from 144.43 ± 8.1 to 13.68 Pa for G' and from 28.3 ± 4.4 to 2.9 ± 1.3 Pa for G'' (**Figure 4.b**). As the results obtained with variation of **P769** concentration, elasticity of the gel was unchanged whatever the LNC concentration (**Table S2** in supplementary information). To conclude on this part, **P769** concentration and LNC concentration are two important parameters to obtain **P769**-LNC gel. It is not the first time that a gel made of LNCs is obtained. Indeed, Moysan *et al.* already described in 2013 a gel made of LNCs loaded with an amphiphilic gemcitabine, modified by a lipid tail. They showed that rheological behaviour was depending on LNC concentration and also on modified-gemcitabine concentration with a constant

elasticity.²⁶ Another article published in 2021 showed also the same characteristic of a gel made of LNCs and an amphiphilic cytidine.²⁷ The gel formation was explained notably by hydrogen bonds between cytidine heads localized at the LNC surface.

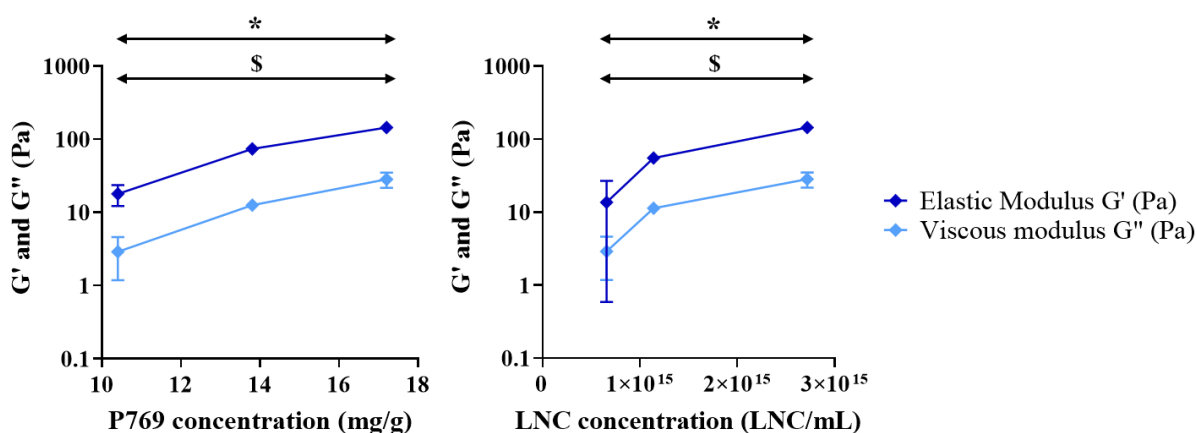


Figure 4: a) Elastic G' (dark blue) and viscous G'' (light blue) moduli according to **P769** concentration, with 2.72×10^{15} LNC/mL ; b) Elastic G' (dark blue) and viscous moduli G'' (light blue) according to nanoparticle concentration, at a **P769** concentration of 17.2 mg/g. G' and G'' values are taken at a strain amplitude of 0.1 % and a frequency of 1 Hz at $T = 20$ °C ($n = 3$, mean \pm SD, *: $p < 0.05$ for elastic modulus, \$: $p < 0.05$ for viscous modulus).

In our study, a **P769** was synthesized with the idea of an esterification of the two alcohol functions to increase the **P722** lipophilicity. This modification allowed to obtain **P769**-LNC gel. To our knowledge, this is the first time that such a structure is obtained with ferrocifen. All studies already performed on ferrocifen-LNCs showed only the obtention of a suspension, compatible for an intravenous administration route, with promising results on several cancers.^{20,28–30} With **P769**-LNC gel, a use as local therapy to treat glioblastoma after tumour resection could be imagined, as ferrocifens already shown efficiency on this cancer.^{31–33} Indeed, Vessières *et al.* showed a large heterogeneity of response to **P722** on Patient-Derived-Cell-Line glioblastoma depending on transcriptomic subtypes.³⁴ A more recent study also highlighted the efficiency of **P722** complexed with cyclodextrines on glioblastoma.²¹ Moreover, **P769** compound was tested on U87MG glioblastoma cell line, with or without LNCs, and the obtained IC_{50} were 67 nM and 46 nM respectively, close to the 27 nM obtained with **P722** alone, after 96 h of treatment.³⁵ Considering all these results together, it could open new opportunities for personalized treatment of glioblastoma.

Then, to check injectability of **P769**-LNC gel, at 17.2 mg/g, rheological measurements were performed after extrusion through 18 G and 26 G needles. Results obtained were compared to the control, without extrusion (**Figure 5**). After extrusion through a 26 G needle, significant differences were obtained on G' and G'' values. Indeed, a decrease was obtained, from 144.4 ± 8.1 to 50.0 ± 15.3 Pa for G' and from 28.3 ± 4.4 to 14.2 ± 4.0 Pa for G'' , without or after extrusion, respectively. However, elasticity and $\tan(\delta)$ remained constant (**Table S2** in supplementary information). After an extrusion through 18 G needle, no significant difference was observed even if a small decrease was obtained from 144.4 ± 8.1 to 90.1 ± 6.5 Pa for G' and from 28.3 ± 4.4 to 18.4 ± 1.4 Pa for G'' , without or after extrusion, respectively. As after extrusion through a 26 G needle, elasticity and $\tan(\delta)$ remained constant (**Table S2** in supplementary information). These results confirmed the injectability of **P769**-gel. The same results were obtained after an extrusion through 18 G needle for modified gemcitabine-LNCs and modified cytidine-LNC hydrogels.^{26,27}

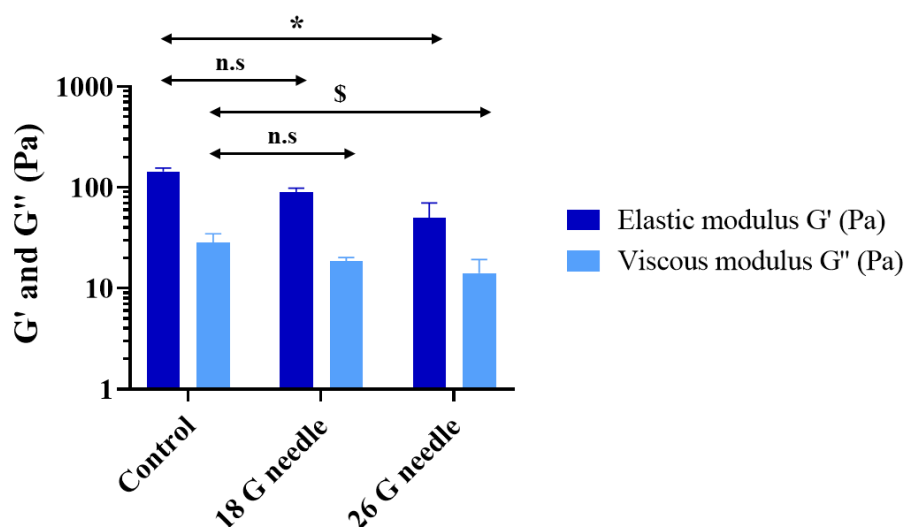


Figure 5: Elastic G' and viscous G'' moduli after extrusion through 18 G and 26 G needles of P769-LNC gel at 17.2 mg/g. G' and G'' values are taken at a strain amplitude of 0.1 % and a frequency of 1 Hz at $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($n = 3$, mean \pm SD; *: $p < 0.05$ for elastic modulus, \$: $p < 0.05$ for viscous modulus).

In using the mono-acetyl succinimide-ferrocifen **P998** (two isomers), an unexpected and interesting phenomenon was observed. Indeed, a gel made of (**E**)-**P998**-LNCs was obtained above a limit concentration, whereas no gelification process was observed with (**Z**)-**P998**-LNCs whatever the ferrocifen concentration. Rheological measurements allowed to show the influence of (**E**)-**P998** concentration on the viscoelastic properties. Indeed, G' and G'' values increased significantly from 14.4 ± 14.1 to 542.0 ± 103.5 for G' and 1.9 ± 1.7 to 108.8 ± 28.6 for G'' when (**E**)-**P998** concentration increased from 17.2 mg/g to 33.9 mg/g, respectively (**Figure 6**). Moreover, above 17.2 mg/g, whatever the (**E**)-**P998** concentration, elasticity and $\tan(\delta)$ remained constant, as for **P769** (**Table S2** in supplementary information).

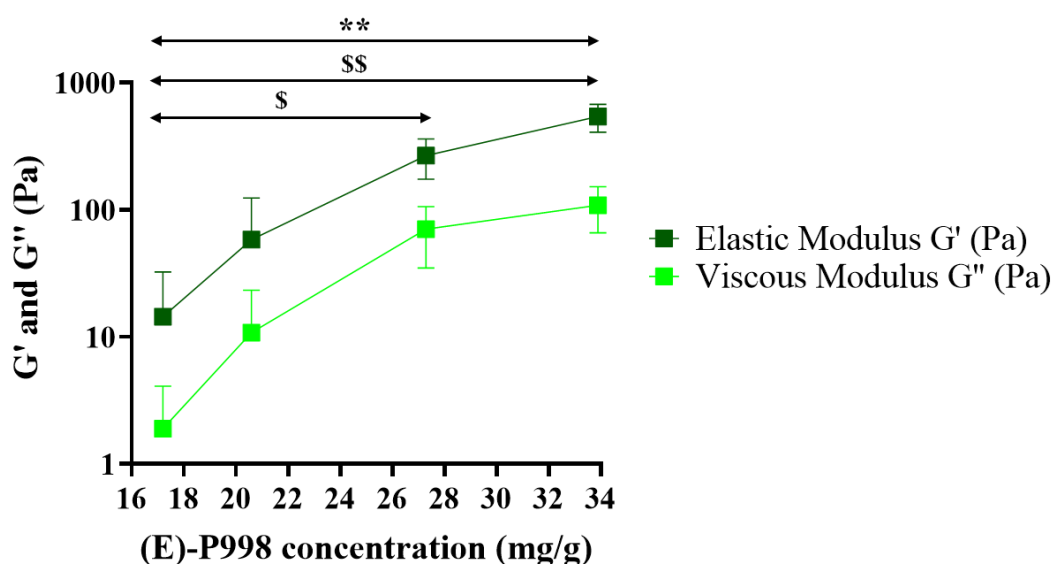


Figure 6: Elastic G' (dark green) and viscous G'' (light green) moduli according to the (**E**)-**P998** concentration. G' and G'' values are taken at a strain amplitude of 0.1 % and a frequency of 1 Hz at $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($3 < n < 5$, mean \pm SD; *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ for elastic modulus, \$: $p < 0.05$, \$\$: $p < 0.01$ for viscous modulus).

The measured complex viscosity according to the oscillation frequency for **(Z)-P998-LNCs**, **(E)-P998-LNCs** and **P769-LNCs** confirmed the macroscopic observations. At a same concentration, 17.2 mg/g, **(Z)-P998-LNCs** showed a constant viscous behaviour whatever the oscillation frequency, whereas a linear decrease of the viscosity was obtained for **(E)-P998-LNCs** (**Figure 7**), characteristic of the shear thinning flow behaviour of gels. A higher concentration in **(E)-P998** was needed to obtain a gel with similar viscoelastic properties compared to **P769** (**Figure 6** and **Figure 7**). It could be explained by the quick isomerisation of **P998** observed leading to a mixture of **(E)-P998** and **(Z)-P998**.

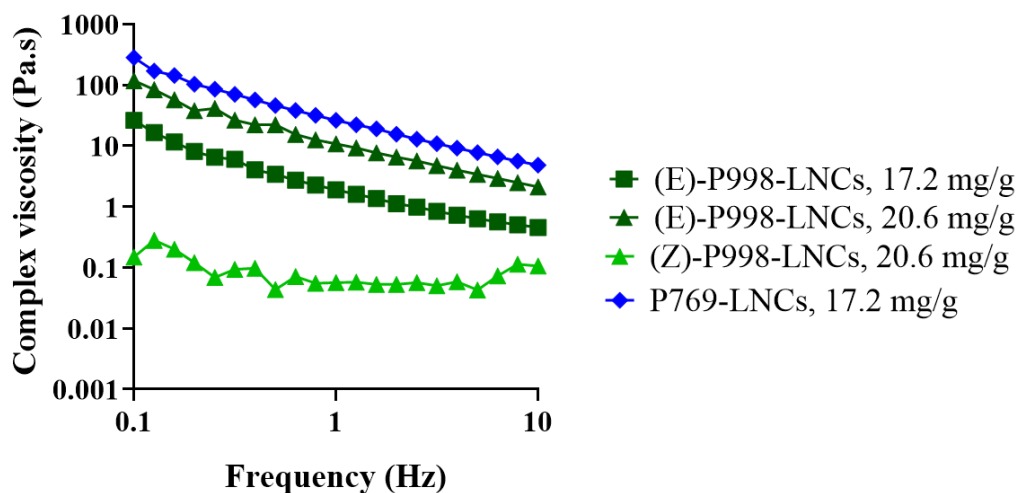


Figure 7: Complex viscosity ($\mu^*(\omega) = G''/\omega$, with G'' the viscous modulus in Pa and ω the oscillation frequency in s^{-1}) according to the oscillation frequency for: **P769** loaded LNCs, 17.2 mg/g (dark blue diamond), **(E)-P998** loaded LNCs, 17.2 mg/g (dark green square), **(E)-P998** loaded LNCs, 20.6 mg/g (dark green triangle) and **(Z)-P998** loaded LNCs, 20.6 mg/g (light green triangle). Strain amplitude of 0.1 %, at $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($3 < n < 5$, mean \pm SD).

These results highlighted the importance of the acetyl position on the succinimide-ferrocifen structure. Having the acetyl group in trans position to the ferrocene moiety seems to be an essential condition to obtain a gel structure. However, it was not the first time that an esterification of the hydroxyl group of ferrocifen was performed. In 2009, Allard *et al.* performed formulations of LNCs loaded with acetyl-ferrocifens (named Fc-diAc), without succinimide moiety, to treat glioblastoma. Whatever the concentration used, no gel was obtained with these ferrocifens.³⁶ Moreover, **P996-LNC** formulations at 17.2 mg/g and 34.4 mg/g in **P996**³⁷ was performed and no gel were obtained at these concentrations (**Figure S3** in supplementary information). **P996** has same alkyl chain length ($(\text{CH}_2)_3$) than **P769** but with a third acetyl function instead of a succinimide function. These results seem to confirm the importance to have a succinimide moiety in trans position to the acetyl group for the gel formation.

Position in the LNCs depending on the molecular structure. To understand the gel formation, interfacial tension measurements were performed using drop tensiometry to determine the ferrocifen position in LNCs. Surface tension, at molecular level, results from the difference in energy between molecules at a fluid interface and in the bulk.³⁸ Here, the followed hypothesis was done: **P769** would be at the surface of LNCs and would act as a surfactant, whereas **P722** and the corresponding monophenol succinimide-ferrocifen **P849** would be encapsulated into the core of the LNCs.—

First of all, interfacial tension of a pendant drop mimicking blank LNCs, **P722-LNCs** and **P769-LNCs** suspensions at the air/water interface was measured (Method description in supplementary information). The surfactant properties of blank LNCs have already been described in literature, leading to a decrease

of the surface tension of air/water interface.³⁹ However, the results obtained in this study did not allow to see any difference of interfacial tension whatever the suspension used (**Figure S4** in supplementary information). It could be explained by the low amount of ferrocifens compared to the amount of hydroxystearate polyethylene glycol, the main surfactant in LNCs.

That is why, a simplified model was used to verify the hypothesis. A triglyceride (Labrafac® WL 1346)-water interface study was performed by measuring interfacial tension of a rising triglyceride drop, with or without ferrocifen, in a bulk water phase. Because of its lowest solubility in triglyceride, no measurement with **P722** could be performed.

P769 showed amphiphilic properties (**Figure 8.a**). Indeed, the interfacial tension significantly decreased with the **P769** concentration, from 22.83 ± 1.21 to 16.45 ± 0.35 mN/m at 0 mg/g and 1.6 mg/g respectively. The same observations were done with the modified-gemcitabine and the modified-cytidine.^{26,27} During the adsorption kinetics, **P769** would move from the Labrafac drop to the Labrafac/water interface and would act as a surfactant. This behaviour was not observed for **P849** as, at a same concentration of 1.0 mg/g, it did not decrease the interfacial tension (**Figure 8.b**). For **P998**, it was more difficult to interpret the results, maybe due to the quick isomerisation of **P998** leading to a mixture of both isomers. Both (**Z**)-**P998** and (**E**)-**P998** led to a small decrease of the interfacial tension, from 22.83 ± 1.21 to 21.28 ± 0.39 and 20.23 ± 0.68 mN/m respectively.

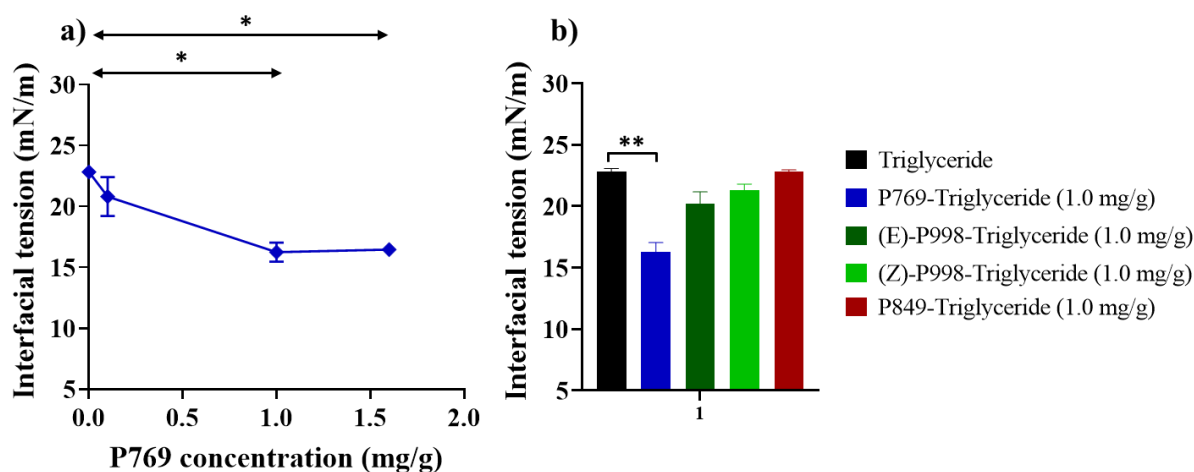


Figure 8: a) Interfacial tension measurements of a 10 μ L triglycerides (Labrafac) drop in contact with a water phase according to **P769** concentration in the oil drop; b) Interfacial tension of a 10 μ L triglyceride drop in contact with a water phase according to the ferrocifens used, at 1.0 mg/g of triglycerides in ferrocifens ($3 < n < 4$, mean \pm SD; *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$).

To confirm results of interfacial tension measurements, a kinetic of LNC destabilisation was performed in presence of esterase at 37 °C. LNCs exhibit a core-shell structure composed of liquid triglyceride core and an amorphous polyethylene glycol hydroxystearate surfactant shell.¹⁹ An esterase should catalyse the hydrolysis of esterified PEGylated surfactant of LNCs, as shown in literature for PEGylated vesicles and PEGylated solid lipid nanoparticles.^{40,41} This “dePEGylation” could result to LNC membrane destabilisation and so an increase of the LNC diameter. Moreover, from the interfacial measurement, **P769** seems to be at the LNC surface. Its acetyl functional group could be predisposed to be hydrolysed by esterase (**Figure S5** in supplementary information). Thus, the possible competitive cleavage of the **P769** acetyl group or of the PEG was followed by DLS and by LC/MS (SIR analysis) (**Figure 9**). Whatever the formulation, as expected, the LNC hydrodynamic diameter was not modified after an incubation with water for 96 h at 37 °C. However, it was possible to see differences in presence of esterase. Indeed, a significant difference was obtained on the **P769**-LNC and the **P722**-LNC diameters with an increase of 7.8 ± 1.7 and 24.6 ± 3.8 % respectively, after 24 h of incubation. After 96 h of

incubation, the same tendency was observed between **P722**-LNCs and blank LNCs. A significant difference was still obtained between **P769**-LNCs and **P722**-LNCs with an increase of LNC diameter of 11.9 ± 1.0 % and 39.2 ± 4.7 respectively. This difference of behaviour with esterase may be associated to a competitive hydrolysis of **P769** and of polyethylene glycol hydroxystearate at the surface of the LNCs, as explained. Indeed, by mass spectrometry, a stability study was performed of **P769**-LNC and the two isomers of **P998** were obtained after 24 h of incubation with esterase, with retention times of 8.63 min, 7.83 min and 7.39 min for **P769**, **(Z)-P998** and **(E)-P998** respectively (**Figure 9.b**).

To study the possible molecular interactions responsible for the gel formation, ethanol, urea and NaCl were added to determine possible Van der Waals, hydrogen or electrostatic interactions, respectively (Method description and **Figure S6** in supplementary information): no difference in terms of rheological properties was observed on **P769**-LNC gel. Hence, from all these results, the followed hypothesis was drawn: **P769** would be at the LNC surface and the possible interaction at the origin of the network could come from interaction between a lone pair of the carbonyl group from the succinimide moiety and the π -electrons from the phenol moiety (**Figure 10**). This possible interaction was already demonstrated to confer a great stability to the corresponding quinone methide of **P722**.¹⁴ However, this phenomenon could not be observed with **P722** as it would be localized in the oily core of LNCs.

Even if some ferrocifens have already been supposed to be at the LNC surface³⁰, it is however the first time that a gel is observed. Indeed, for the ferrocifen named **P15** or Fc-OHTam, the zeta potential, representing the surface charge of the LNCs, became positive: it remained negative with the other ferrocifens (**Figure S1** in supplementary information). This increase of zeta potential was probably due to the positively charged amino moiety in cis-position of the ferrocene moiety for **P15**.³⁰

As for the modified gemcitabine-LNC gel, this **P769**-LNC gel is different by nature from the conventional ones. Indeed, in literature, most nanoparticle-loaded hydrogels are obtained with the use of a natural or synthetic polymer matrix.⁴² In this study, **P769**-LNC gel obtained is polymer-free, only made of the drug loaded nanoparticles, limiting a potential side effect from the polymer, and improving the global drug loading of the system.

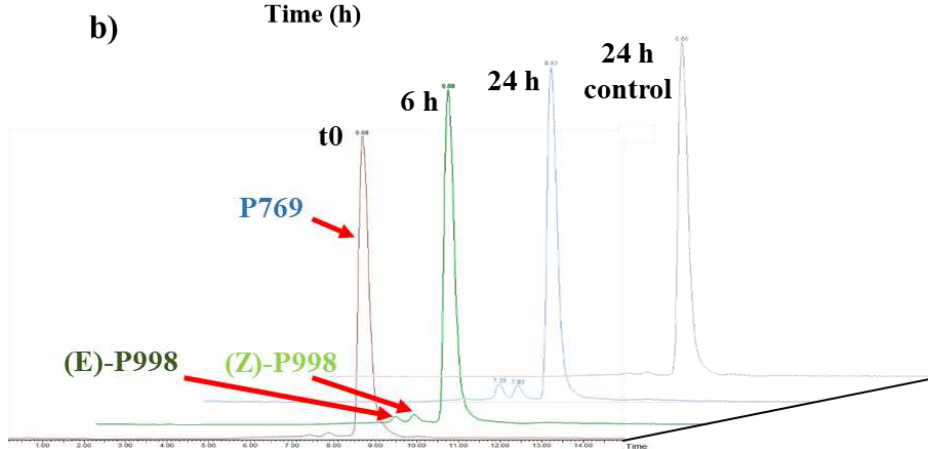
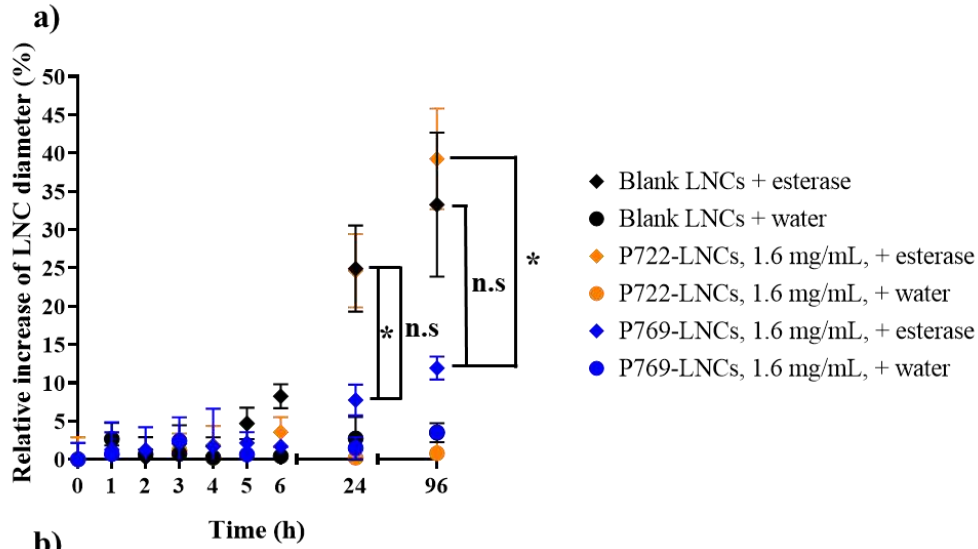


Figure 9: a) Relative increase of LNC diameter in presence of water (circle) or in presence of esterase (diamond) for blank LNCs (black), **P769**-LNCs, 1.6 mg/mL (dark blue) and **P722**-LNCs, 1.6 mg/mL (orange) ($3 < n < 5$), mean \pm SD; *: $p < 0.05$); b) Chromatograms (LC-MS) showing the kinetic of deacetylation of **P769**: t0 (red), t = 6 h (green), t = 24 h (blue) and t = 24 h (dark) for control. **P769** deacetylation led to the mono-acetyl **P998**. The chromatograms have been shifted for better clarity.

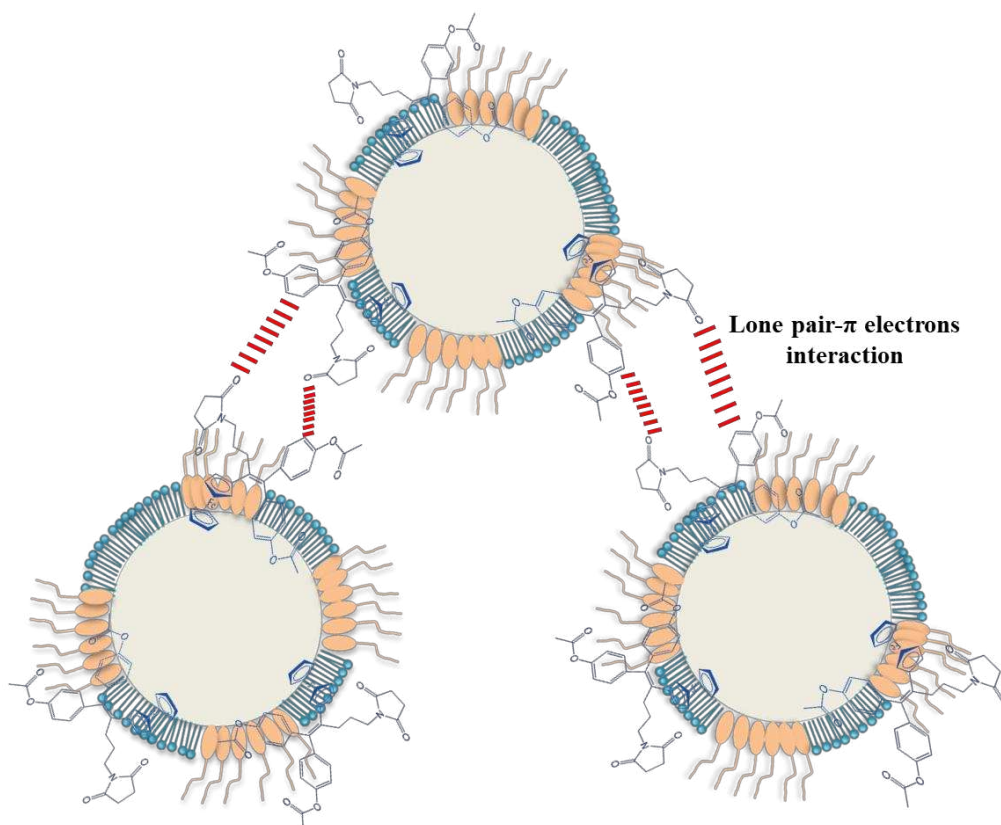


Figure 10: Graphical representation of the possible interaction at the origin of **P769**-LNC gel network. The red dotted line represents the lone pair- π electron interaction between carbonyl group from the succinimide moiety and the π electrons from the phenol moiety.

***In vitro* activity of ferrocifen-LNCs on ovarian SKOV3 cell line.** *In vitro* activity of free ferrocifens and ferrocifen-LNCs suspensions was studied on the ovarian tumour cell line SKOV3 after 72 h of treatment (**Figure 11** and **Figure S7** in supplementary information).

For all the ferrocifen-LNC suspensions, the IC_{50} obtained were in the range of [0.1 – 0.6] μ M, attributed to the ferrocifen action. Indeed, blank LNCs did not show any cytotoxicity effect at the same dilution than for ferrocifen-LNCs, with a corresponding IC_{50} of 368 μ g/mL (**Figure 11**). Moreover, no difference of IC_{50} was observed when the different ferrocifens were free or encapsulated in LNCs, confirming results from literature that LNCs did not alter the ferrocifen efficiency.^{18,20,43} Moreover, it was possible to distinguish two slopes on cell viability depending on ferrocifen concentration. This could be associated to a senescence mechanism at low concentrations, as already described for **P722**²¹ and also for the ansa-ferrocifen **DP1**⁴⁴, followed by an apoptotic mechanism at higher concentrations²¹. Finally, chemical modification performed on the initial **P722** did not significantly hamper its efficiency. For the monophenol-succinimide-ferrocifen, (**Z**)-**P849**, a similar biological activity was indeed already obtained on MDA-MB-231 breast cancer cell line.¹⁴ Moreover, previous studies performed with another bi-acetyl ferrocifen, named Fc-diAc, showed that its activity was the same than with the bi-phenol one, Fc-diOH, suggesting that esterase found in living cells led to a quick hydrolysis of the acetyl groups.^{36,45} Thus, the same event certainly occurs with **P769**, (**E**)-**P998** and (**Z**)-**P998**, to recover the initial **P722**, whatever the position in the LNCs.

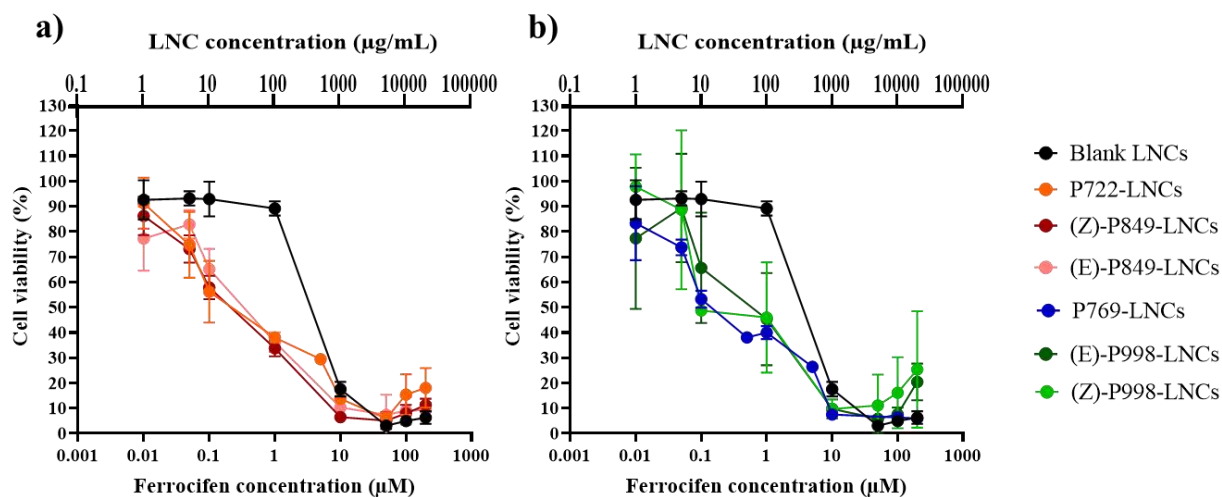


Figure 11: Cell viability of SKOV3 cells after 72 h of treatment with several concentrations of: a) Blank LNCs (black circle), **P722**-LNCs (orange circle), **(Z)-P849**-LNCs (dark red circle) and **(E)-P849**-LNCs (pink circle); b) Blank LNCs (black circle), **P769**-LNCs (dark blue circle), **(E)-P998**-LNCs (dark green circle) and **(Z)-P998**-LNCs (green circle). For each ferrocifen, at equal concentration, same dilution of LNCs was done (n = 3, mean ± SD).

CONCLUSION

In this study, one of the most promising ferrocifen, named **P722**, from the succinimide-ferrocifen family, was first encapsulated in LNCs. Because of its weak drug loading, small chemical structural modifications were performed to increase the lipophilicity of **P722**. These modifications allowed to increase the maximal drug loading in LNCs by a factor of three for some ferrocifens (**(E)-P998** and **(Z)-P849**). Interestingly, the second isomers **(Z)-P998** and **(E)-P849** did not show the same tendency with a decrease of the encapsulation efficiency when drug concentration increased. Another unexpected result was the formation of a gel with two ferrocifens, the bi-acetyl succinimide-ferrocifen **P769** at concentration higher than 10.4 mg/g, and the mono-acetyl succinimide-ferrocifen **(E)-P998** at concentration higher than 17.2 mg/g. The rheological measurements highlighted the injectability of the **P769**-LNC gel using syringe and the importance of the motif [succinimide-ene-cis-phenyl-acetyl] on the drug delivery system obtained. This gel formation was explained by the spatial position of **P769** at the LNC surface, shown by interfacial measurements. To our knowledge, it is the first time that a structure-drug delivery system relationship is showed for ferrocifens. Knowing that ovarian cancer developed mostly metastases in the peritoneal cavity and the great *in vivo* efficiency on several cancer of **P722** (glioblastoma²¹, metastatic melanoma²⁰, ovarian cancer²²), it is giving rise to new opportunities of treatment as local therapies with **P769**-LNCs gel to fight against the glioblastoma or the peritoneal metastatic ovarian cancer.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding author

* Elise Lepeltier: elise.lepeltier@univ-angers.fr

Author contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the SME Feroscan for its supply of ferrocifens and the COST Action STRATAGEM, CA17104. This work was funded by the Agence Nationale de la Recherche (ANR PRCE NaTeMOc N° ANR-19-CE18-0022-01).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest. The authors declare no competing financial interest or personal relationship that could have appeared to influence the work reported in this paper.

REFERENCES

- (1) Couvreur, P. Nanomedicine: From Where Are We Coming and Where Are We Going? *J Control Release* **2019**, *311–312*, 319–321. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.10.020>.
- (2) Uziely, B.; Jeffers, S.; Isacson, R.; Kutsch, K.; Wei-Tsao, D.; Yehoshua, Z.; Libson, E.; Muggia, F. M.; Gabizon, A. Liposomal Doxorubicin: Antitumor Activity and Unique Toxicities during Two Complementary Phase I Studies. *J. Clin. Oncol.* **1995**, *13* (7), 1777–1785. <https://doi.org/10.1200/JCO.1995.13.7.1777>.
- (3) Zhao, M.-D.; Li, J.-Q.; Chen, F.-Y.; Dong, W.; Wen, L.-J.; Fei, W.-D.; Zhang, X.; Yang, P.-L.; Zhang, X.-M.; Zheng, C.-H. Co-Delivery of Curcumin and Paclitaxel by “Core-Shell” Targeting Amphiphilic Copolymer to Reverse Resistance in the Treatment of Ovarian Cancer. *Int J Nanomedicine* **2019**, *14*, 9453–9467. <https://doi.org/10.2147/IJN.S224579>.
- (4) Coppens, E.; Desmaële, D.; Naret, T.; Garcia-Argote, S.; Feuillastre, S.; Pieters, G.; Cailleau, C.; Paul, J.-L.; Prost, B.; Solgadi, A.; Michel, J.-P.; Noiray, M.; Couvreur, P.; Mura, S. Gemcitabine Lipid Prodrug Nanoparticles: Switching the Lipid Moiety and Changing the Fate in the Bloodstream. *Int J Pharm* **2021**, *609*, 121076. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.121076>.
- (5) Huang, S.; Liu, H.; Huang, S.; Fu, T.; Xue, W.; Guo, R. Dextran Methacrylate Hydrogel Microneedles Loaded with Doxorubicin and Trametinib for Continuous Transdermal Administration of Melanoma. *Carbohydr Polym* **2020**, *246*, 116650. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116650>.
- (6) Jaouen, G.; Vessieres, A. Transition Metal Carbonyl Oestrogen Receptor Assay. *Pure Appl. Chem.* **1985**, *57* (12), 1865–1874. <https://doi.org/10.1351/pac198557121865>.
- (7) Jaouen, G.; Vessieres, A.; Top, S.; Ismail, A. A.; Butler, I. S. Metal Carbonyl Fragments as a New Class of Markers in Molecular Biology. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107* (16), 4778–4780. <https://doi.org/10.1021/ja00302a030>.
- (8) Jaouen, G.; Vessières, A.; Top, S. Ferrocifen Type Anti Cancer Drugs. *Chem Soc Rev* **2015**, *44* (24), 8802–8817. <https://doi.org/10.1039/c5cs00486a>.
- (9) Top, S.; Dauer, B.; Vaissermann, J.; Jaouen, G. Facile Route to Ferrocifen, 1-[4-(2-Dimethylaminoethoxy)]-1-(Phenyl-2-Ferrocenyl-but-1-Ene), First Organometallic Analogue of Tamoxifen, by the McMurry Reaction. *Journal of Organometallic Chemistry* **1997**, *541* (1), 355–361. [https://doi.org/10.1016/S0022-328X\(97\)00086-7](https://doi.org/10.1016/S0022-328X(97)00086-7).

- (10) Jaouen, G.; Top, S.; Vessières, A.; Leclercq, G.; Quivy, J.; Jin, L.; Croisy, A. The First Organometallic Antioestrogens and Their Antiproliferative Effects. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series IIC - Chemistry* **2000**, *3* (2), 89–93. [https://doi.org/10.1016/S1387-1609\(00\)00118-3](https://doi.org/10.1016/S1387-1609(00)00118-3).
- (11) Hillard, E.; Vessières, A.; Le Bideau, F.; Plazuk, D.; Spera, D.; Huché, M.; Jaouen, G. A Series of Unconjugated Ferrocenyl Phenols: Prospects as Anticancer Agents. *ChemMedChem* **2006**, *1* (5), 551–559. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200500035>.
- (12) Wang, Y.; Pigeon, P.; Top, S.; McGlinchey, M. J.; Jaouen, G. Organometallic Antitumor Compounds: Ferrocifens as Precursors to Quinone Methides. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2015**, *54* (35), 10230–10233. <https://doi.org/10.1002/anie.201503048>.
- (13) Pigeon, P.; Wang, Y.; Top, S.; Najlaoui, F.; Garcia Alvarez, M. C.; Bignon, J.; McGlinchey, M. J.; Jaouen, G. A New Series of Succinimido-Ferrociphenols and Related Heterocyclic Species Induce Strong Antiproliferative Effects, Especially against Ovarian Cancer Cells Resistant to Cisplatin. *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (20), 8358–8368. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00743>.
- (14) Wang, Y.; Pigeon, P.; Top, S.; Sanz García, J.; Troufflard, C.; Ciofini, I.; McGlinchey, M. J.; Jaouen, G. Atypical Lone Pair- π Interaction with Quinone Methides in a Series of Imido-Ferrociphenol Anticancer Drug Candidates. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2019**, *58* (25), 8421–8425. <https://doi.org/10.1002/anie.201902456>.
- (15) Hureaux, J.; Lagarce, F.; Gagnadoux, F.; Rousselet, M.-C.; Moal, V.; Urban, T.; Benoit, J.-P. Toxicological Study and Efficacy of Blank and Paclitaxel-Loaded Lipid Nanocapsules after i.v. Administration in Mice. *Pharm Res* **2010**, *27* (3), 421–430. <https://doi.org/10.1007/s11095-009-0024-y>.
- (16) Allard, E.; Passirani, C.; Garcion, E.; Pigeon, P.; Vessières, A.; Jaouen, G.; Benoit, J.-P. Lipid Nanocapsules Loaded with an Organometallic Tamoxifen Derivative as a Novel Drug-Carrier System for Experimental Malignant Gliomas. *J Control Release* **2008**, *130* (2), 146–153. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.05.027>.
- (17) Lainé, A.-L.; Clavreul, A.; Rousseau, A.; Tétaud, C.; Vessières, A.; Garcion, E.; Jaouen, G.; Aubert, L.; Guilbert, M.; Benoit, J.-P.; Toillon, R.-A.; Passirani, C. Inhibition of Ectopic Glioma Tumor Growth by a Potent Ferrocenyl Drug Loaded into Stealth Lipid Nanocapsules. *Nanomedicine* **2014**, *10* (8), 1667–1677. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2014.05.002>.
- (18) Karim, R.; Lepeltier, E.; Esnault, L.; Pigeon, P.; Lemaire, L.; Lépinoux-Chambaud, C.; Clere, N.; Jaouen, G.; Eyer, J.; Piel, G.; Passirani, C. Enhanced and Preferential Internalization of Lipid Nanocapsules into Human Glioblastoma Cells: Effect of a Surface-Functionalizing NFL Peptide. *Nanoscale* **2018**, *10* (28), 13485–13501. <https://doi.org/10.1039/c8nr02132e>.
- (19) Heurtault, B.; Saulnier, P.; Pech, B.; Proust, J.-E.; Benoit, J.-P. A Novel Phase Inversion-Based Process for the Preparation of Lipid Nanocarriers. *Pharm. Res.* **2002**, *19* (6), 875–880. <https://doi.org/10.1023/a:1016121319668>.
- (20) Topin-Ruiz, S.; Mellinger, A.; Lepeltier, E.; Bourreau, C.; Fouillet, J.; Riou, J.; Jaouen, G.; Martin, L.; Passirani, C.; Clere, N. P722 Ferrocifen Loaded Lipid Nanocapsules Improve Survival of Murine Xenografted-Melanoma via a Potentiation of Apoptosis and an Activation of CD8+ T Lymphocytes. *Int J Pharm* **2021**, *593*, 120111. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.120111>.
- (21) Najlaoui, F.; Busser, B.; Taiwe, G. S.; Pigeon, P.; Sturm, N.; Giovannini, D.; Marrakchi, N.; Rhouma, A.; Jaouen, G.; Gibaud, S.; De Waard, M. Succinimido-Ferrociphenol Complexed

with Cyclodextrins Inhibits Glioblastoma Tumor Growth In Vitro and In Vivo without Noticeable Adverse Toxicity. *Molecules* **2022**, *27* (14), 4651. <https://doi.org/10.3390/molecules27144651>.

- (22) Idlas, P.; Ladaycia, A.; Némati, F.; Lepeltier, E.; Pigeon, P.; Jaouen, G.; Decaudin, D.; Passirani, C. Ferrocifen Stealth LNCs and Conventional Chemotherapy: A Promising Combination against Multidrug-Resistant Ovarian Adenocarcinoma. *International Journal of Pharmaceutics* **2022**, *626*, 122164. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122164>.
- (23) Huynh, N. T.; Morille, M.; Bejaud, J.; Legras, P.; Vessieres, A.; Jaouen, G.; Benoit, J.-P.; Passirani, C. Treatment of 9L Gliosarcoma in Rats by Ferrociphenol-Loaded Lipid Nanocapsules Based on a Passive Targeting Strategy via the EPR Effect. *Pharm. Res.* **2011**, *28* (12), 3189–3198. <https://doi.org/10.1007/s11095-011-0501-y>.
- (24) Allard, E.; Jarnet, D.; Vessières, A.; Vinchon-Petit, S.; Jaouen, G.; Benoit, J.-P.; Passirani, C. Local Delivery of Ferrociphenol Lipid Nanocapsules Followed by External Radiotherapy as a Synergistic Treatment against Intracranial 9L Glioma Xenograft. *Pharm. Res.* **2010**, *27* (1), 56–64. <https://doi.org/10.1007/s11095-009-0006-0>.
- (25) Almdal, K.; Dyre, J.; Hvidt, S.; Kramer, O. Towards a Phenomenological Definition of the Term ‘Gel.’ *Polymer Gels and Networks* **1993**, *1* (1), 5–17. [https://doi.org/10.1016/0966-7822\(93\)90020-I](https://doi.org/10.1016/0966-7822(93)90020-I).
- (26) Moysan, E.; González-Fernández, Y.; Lautram, N.; Béjaud, J.; Bastiat, G.; Benoit, J.-P. An Innovative Hydrogel of Gemcitabine-Loaded Lipid Nanocapsules: When the Drug Is a Key Player of the Nanomedicine Structure. *Soft Matter* **2014**, *10* (11), 1767–1777. <https://doi.org/10.1039/c3sm52781f>.
- (27) Pitorre, M.; Gazaille, C.; Pham, L. T. T.; Frankova, K.; Béjaud, J.; Lautram, N.; Riou, J.; Perrot, R.; Geneviève, F.; Moal, V.; Benoit, J.-P.; Bastiat, G. Polymer-Free Hydrogel Made of Lipid Nanocapsules, as a Local Drug Delivery Platform. *Materials Science and Engineering: C* **2021**, *126*, 112188. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112188>.
- (28) Huynh, N. T.; Passirani, C.; Allard-Vannier, E.; Lemaire, L.; Roux, J.; Garcion, E.; Vessieres, A.; Benoit, J.-P. Administration-Dependent Efficacy of Ferrociphenol Lipid Nanocapsules for the Treatment of Intracranial 9L Rat Gliosarcoma. *Int J Pharm* **2012**, *423* (1), 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.04.037>.
- (29) Laine, A.-L.; Huynh, N. T.; Clavreul, A.; Balzeau, J.; Béjaud, J.; Vessieres, A.; Benoit, J.-P.; Eyer, J.; Passirani, C. Brain Tumour Targeting Strategies via Coated Ferrociphenol Lipid Nanocapsules. *Eur J Pharm Biopharm* **2012**, *81* (3), 690–693. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.04.012>.
- (30) Lainé, A.-L.; Adriaenssens, E.; Vessières, A.; Jaouen, G.; Corbet, C.; Desruelles, E.; Pigeon, P.; Toillon, R.-A.; Passirani, C. The in Vivo Performance of Ferrocenyl Tamoxifen Lipid Nanocapsules in Xenografted Triple Negative Breast Cancer. *Biomaterials* **2013**, *34* (28), 6949–6956. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.05.065>.
- (31) Bastiancich, C.; Vanvarenberg, K.; Ucakar, B.; Pitorre, M.; Bastiat, G.; Lagarce, F.; Prétat, V.; Danhier, F. Lauroyl-Gemcitabine-Loaded Lipid Nanocapsule Hydrogel for the Treatment of Glioblastoma. *Journal of Controlled Release* **2016**, *225*, 283–293. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.01.054>.
- (32) Bastiancich, C.; Lemaire, L.; Bianco, J.; Franconi, F.; Danhier, F.; Prétat, V.; Bastiat, G.; Lagarce, F. Evaluation of Lauroyl-Gemcitabine-Loaded Hydrogel Efficacy in Glioblastoma Rat Models. *Nanomedicine (Lond)* **2018**, *13* (16), 1999–2013. <https://doi.org/10.2217/nnm-2018-0057>.

- (33) Bastiancich, C.; Bozzato, E.; Luyten, U.; Danhier, F.; Bastiat, G.; Pr  at, V. Drug Combination Using an Injectable Nanomedicine Hydrogel for Glioblastoma Treatment. *Int J Pharm* **2019**, *559*, 220–227. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.01.042>.
- (34) Vessières, A.; Quissac, E.; Lemaire, N.; Alentorn, A.; Domeracka, P.; Pigeon, P.; Sanson, M.; Idbaih, A.; Verreault, M. Heterogeneity of Response to Iron-Based Metallodrugs in Glioblastoma Is Associated with Differences in Chemical Structures and Driven by FAS Expression Dynamics and Transcriptomic Subtypes. *Int J Mol Sci* **2021**, *22* (19), 10404. <https://doi.org/10.3390/ijms221910404>.
- (35) Najlaoui, F.; Pigeon, P.; Aroui, S.; Pezet, M.; Sancey, L.; Marrakchi, N.; Rhouma, A.; Jaouen, G.; De Waard, M.; Busser, B.; Gibaud, S. Anticancer Properties of Lipid and Poly(ϵ -Caprolactone) Nanocapsules Loaded with Ferrocenyl-Tamoxifen Derivatives. *J. Pharm. Pharmacol.* **2018**, *70* (11), 1474–1484. <https://doi.org/10.1111/jphp.12998>.
- (36) Allard, E.; Huynh, N. T.; Vessières, A.; Pigeon, P.; Jaouen, G.; Benoit, J.-P.; Passirani, C. Dose Effect Activity of Ferrocifen-Loaded Lipid Nanocapsules on a 9L-Glioma Model. *Int J Pharm* **2009**, *379* (2), 317–323. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.05.031>.
- (37) Wang, Y.; Pigeon, P.; McGlinchey, M. J.; Top, S.; Jaouen, G. Synthesis and Antiproliferative Evaluation of Novel Hydroxypropyl-Ferrociphenol Derivatives, Resulting from the Modification of Hydroxyl Groups. *Journal of Organometallic Chemistry* **2017**, *829*, 108–115. <https://doi.org/10.1016/j.jorgchem.2016.09.005>.
- (38) Berry, J. D.; Neeson, M. J.; Dagastine, R. R.; Chan, D. Y. C.; Tabor, R. F. Measurement of Surface and Interfacial Tension Using Pendant Drop Tensiometry. *J Colloid Interface Sci* **2015**, *454*, 226–237. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.05.012>.
- (39) Mouzouvi, C. R. A.; Umerska, A.; Bigot, A. K.; Saulnier, P. Surface Active Properties of Lipid Nanocapsules. *PLoS One* **2017**, *12* (8), e0179211. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179211>.
- (40) Xu, H.; Deng, Y.; Chen, D.; Hong, W.; Lu, Y.; Dong, X. Esterase-Catalyzed DePEGylation of PH-Sensitive Vesicles Modified with Cleavable PEG-Lipid Derivatives. *Journal of Controlled Release* **2008**, *130* (3), 238–245. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.05.009>.
- (41) Howard, M. D.; Lu, X.; Rinehart, J. J.; Jay, M.; Dziubla, T. D. Carboxylesterase-Triggered Hydrolysis of Nanoparticle PEGylating Agents. *Langmuir* **2012**, *28* (33), 12030–12037. <https://doi.org/10.1021/la302144r>.
- (42) Pitorre, M.; Gond  , H.; Haury, C.; Messous, M.; Poilane, J.; Boudaud, D.; Kanber, E.; Rossemond Ndombina, G. A.; Benoit, J.-P.; Bastiat, G. Recent Advances in Nanocarrier-Loaded Gels: Which Drug Delivery Technologies against Which Diseases? *J Control Release* **2017**, *266*, 140–155. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.09.031>.
- (43) Resnier, P.; Galopin, N.; Sibiril, Y.; Clavreul, A.; Cayon, J.; Briganti, A.; Legras, P.; Vessières, A.; Montier, T.; Jaouen, G.; Benoit, J.-P.; Passirani, C. Efficient Ferrocifen Anticancer Drug and Bcl-2 Gene Therapy Using Lipid Nanocapsules on Human Melanoma Xenograft in Mouse. *Pharmacol. Res.* **2017**, *126*, 54–65. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.01.031>.
- (44) Bruyère, C.; Mathieu, V.; Vessières, A.; Pigeon, P.; Top, S.; Jaouen, G.; Kiss, R. Ferrocifen Derivatives That Induce Senescence in Cancer Cells: Selected Examples. *J. Inorg. Biochem.* **2014**, *141*, 144–151. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.08.015>.
- (45) Heilmann, J. B.; Hillard, E. A.; Plamont, M.-A.; Pigeon, P.; Bolte, M.; Jaouen, G.; Vessières, A. Ferrocenyl Compounds Possessing Protected Phenol and Thiophenol Groups: Synthesis, X-Ray

Structure, and in Vitro Biological Effects against Breast Cancer. *Journal of Organometallic Chemistry* **2008**, 693 (8), 1716–1722. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2007.12.011>.

Supplementary information

Physico-chemical characterization of ferrocifen lipid nanocapsules: customized drug delivery systems guided by the molecular structure

Pierre Idlas¹, Elise Lepeltier^{1,*}, Guillaume Bastiat¹, Pascal Pigeon², Michael J. McGlinchey³, Nolwenn Lautram¹, Anne Vessières², Gerard Jaouen² and Catherine Passirani^{1,*}

¹ Micro et Nanomédecines Translationnelles, MINT, UNIV Angers, INSERM 1066, CNRS 6021, Angers, France

² PSL Chimie Paris Tech, 11 rue P. et M. Curie and Sorbonne Université IPCM, CNRS, UMR 8232, IPCM, Paris, 75005, France

³UCD School of Chemistry and Chemical Biology, University College Dublin, Belfield, Dublin 4, Ireland

* Corresponding author: elise.lepeltier@univ-angers.fr

EXPERIMENTAL SECTION (Supplementary information)

Solubility study in caprylic/capric triglycerides (Labrafac® WL 1349). Solubility of **P722**, **P769**, the two isomers of **P849** and the two isomers of **P998** was determined as followed: excess amount of ferrocifen were added in vial containing Labrafac® WL 1349. The mixture was put under stirring in water bath heated at 60°C for 90 min. Subsequently, the mixture was then centrifuged at 1,400 g for 5 min. Finally, the supernatants concentration was determined using UPLC method described in the experimental section. The experiment was performed once for each ferrocifen.

Interfacial tension measurements (first method). Measurements of interfacial tension were performed using a drop tensiometer device (Tracker Teclis, Longessaigne, France). First, a 9 µL pendant drop of blank LNCs formulation, **P722**-LNCs formulation at 5.2 mg/g or **P769**-LNCs formulation at 5.2 mg/g, in contact with air, was generated with an Exmire microsyringe (Probablo, Paris, France). To keep the volume of the drop constant and so the surface area, piston movements of the syringe were controlled by a stepping motor. Interfacial tension, surface area and volume of the drop were obtained using the Laplace equation after analysis of the drop profile recorded in real time (1 measurement each 10 s) for 6 h using a video camera connected to a computer. All measurements were performed twice.

Determination of the molecular interactions for the gel formation. **P769**-LNCs at 17.2 mg/g was prepared using the phase inversion process. During the third cycle, when the temperature decreased and reached the PIT (78°C < PIT < 83°C), cold urea aqueous solutions (50, 100, 200 urea/**P769** mol/mol), NaCl solutions (50, 100, 200 NaCl/**P769** mol/mol), or ethanol-water mixtures (50, 100, 200 EtOH/**P769** mol/mol) were added, instead of cold water, to induce the irreversible shock to obtain LNCs. Formulations were stored at 4°C for one night. Gel viscoelastic properties were measured as explained in the experimental section. Elastic moduli G' and viscous moduli G'' , were measured by varying the oscillation frequency (from 0.1 to 10 Hz), using a Kinexus® rheometer (Malvern Instruments S.A, United Kingdom). Values of G' and G'' were taken at 1 Hz. All these experiments were performed twice.

Table S1: Solubility in caprylic/capric triglycerides (Labrafac® WL 1349) of the different succinimide-ferrocifens.

Ferrocifen	Solubility in Labrafac® WL 1349 (mg/g)
P722	0.12
(Z)-P849	5.45
(E)-P849	2.11
P769	4.04
(Z)-P998	0.87
(E)-P998	2.64

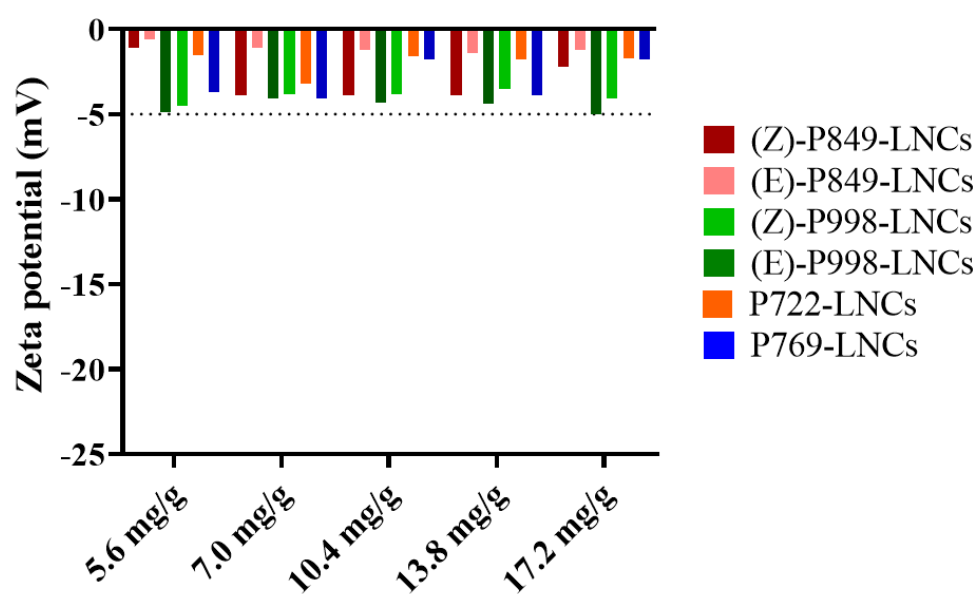


Figure S1: Zeta potential of ferrocifen lipid nanocapsules (LNCs) obtained by the laser Doppler micro-electrophoresis technique. Results are the repetition of three measurement for each sample (n = 1).

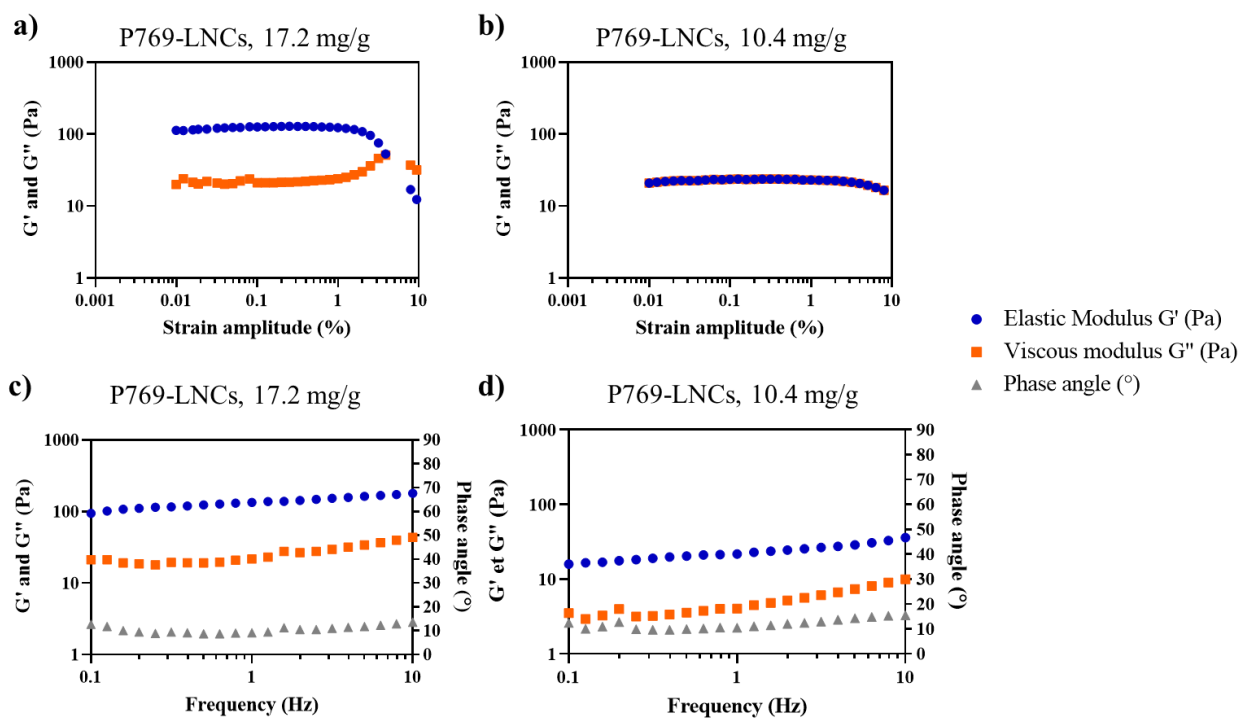
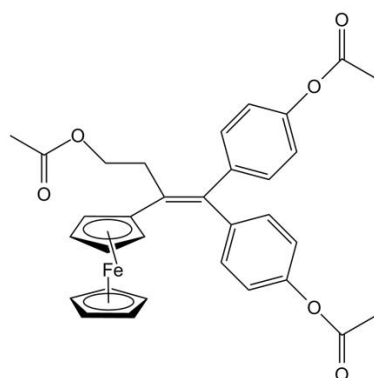


Figure S2: Mechanical properties of **P769-LNC** gel. a) Elastic moduli G' and viscous moduli G'' measured during oscillatory strain sweep experiments, at a constant oscillation frequency of 1 Hz, to determine the linear regime, for **P769-LNCs** at 17.2 mg/g ; b) Elastic moduli G' and viscous moduli G'' measured during oscillatory strain sweep experiments, at a constant oscillation frequency of 1 Hz, to determine the linear regime, for **P769-LNCs** at 10.4 mg/g ; c) Elastic moduli G' and viscous moduli G'' measured during oscillatory frequency sweep experiments, at a constant oscillation strain amplitude of 0.1 % for **P769-LNCs** at 17.2 mg/g ; d) Elastic moduli G' and viscous moduli G'' measured during oscillatory frequency sweep experiments, at a constant oscillation strain amplitude of 0.1 % for **P769-LNCs** at 10.4 mg/g.

Table S2: Rheological properties of the **P769-LNC** and **(E)-P998-LNC** gels (n = 3, mean ± SD).

Gel	P769 concentration (mg/g)	LNC concentration (LNC/mL)	Extrusion	G'/G''	tan(δ)
P769-LNCs	10.4	2.72x10 ¹⁵	No	7.88 ± 4.45	0.17 ± 0.07
	13.8	2.72x10 ¹⁵	No	4.91 ± 1.65	0.17 ± 0.01
	17.2	2.72x10 ¹⁵	No	5.37 ± 1.23	0.20 ± 0.04
	17.2	6.59x10 ¹⁴	No	4.17 ± 1.21	0.26 ± 0.06
	17.2	1.14x10 ¹⁵	No	4.95 ± 0.80	0.21 ± 0.03
	17.2	2.72x10 ¹⁵	No	5.37 ± 1.23	0.20 ± 0.04
	17.2	2.72x10 ¹⁵	18 G needle	4.90 ± 0.16	0.20 ± 0.01
	17.2	2.72x10 ¹⁵	26 G needle	3.49 ± 0.08	0.29 ± 0.01
(E)-P998-LNCs	17.2	2.72x10 ¹⁵	No	5.72 ± 2.02	0.24 ± 0.13
	20.6	2.72x10 ¹⁵	No	5.55 ± 0.61	0.18 ± 0.02
	27.3	2.72x10 ¹⁵	No	4.17 ± 0.83	0.25 ± 0.04
	33.9	2.72x10 ¹⁵	No	5.21 ± 0.70	0.20 ± 0.03



P996



Formulation	Diameter (nm)	PDI	Zeta potential (mV)
P996-LNCs, 17.2 mg/g	52.4	0.054	-6.0
P996-LNCs, 36.4 mg/g	53.0	0.058	-5.7

Figure S3: Molecular structure of **P996** and physico-chemical characterization of **P996-LNCs** at 17.2 mg/g and 36.4 mg/g. No gel was obtained at these concentrations as shown on the photo.

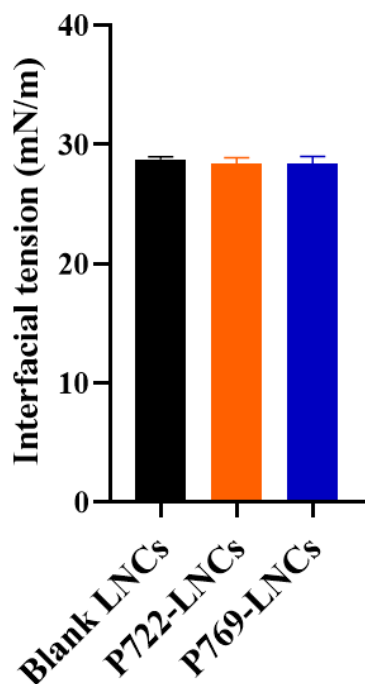


Figure S4: Interfacial tension measurement of a 9 μ L LNC suspension drop, with or without ferrocifen, in contact with air, after 6 h of adsorption kinetic. Ferrocifen concentration was fixed at 5.2 mg/g of lipophilic compounds (n = 2, mean \pm SD).

LNC suspension in presence of porcine liver esterase (PLE)

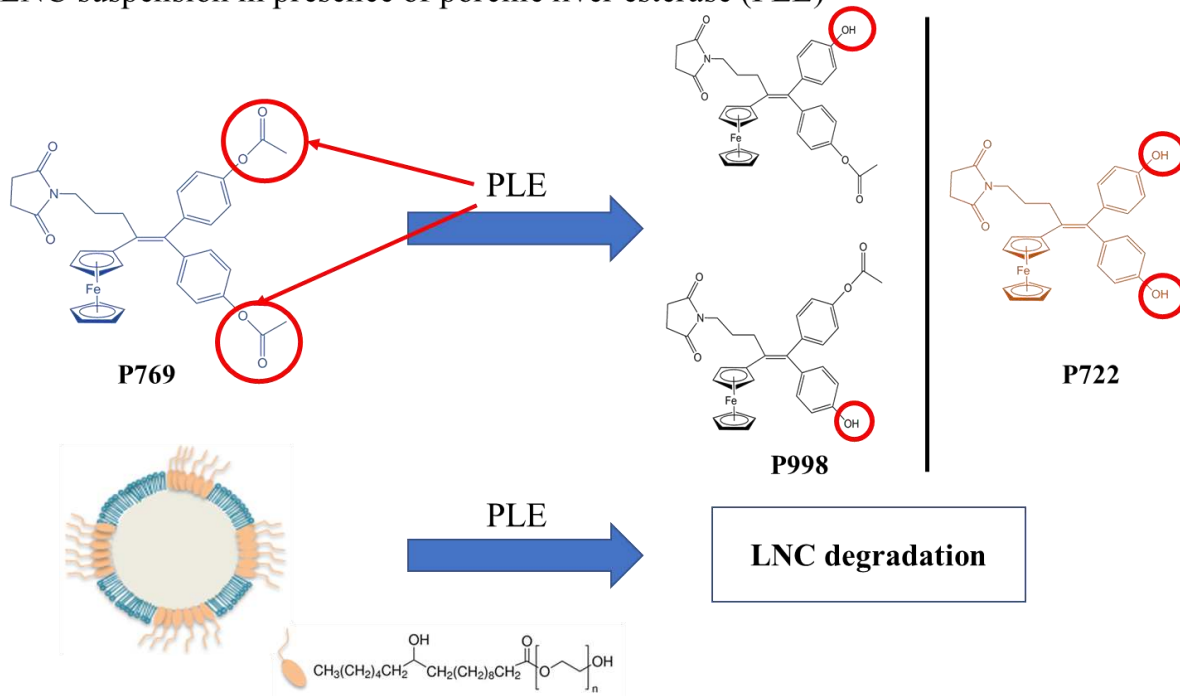


Figure S5: Schematic representation of the possible competitive hydrolysis by esterase between ferrocifen **P769** and polyethylene glycol hydroxystearate from LNC shell.

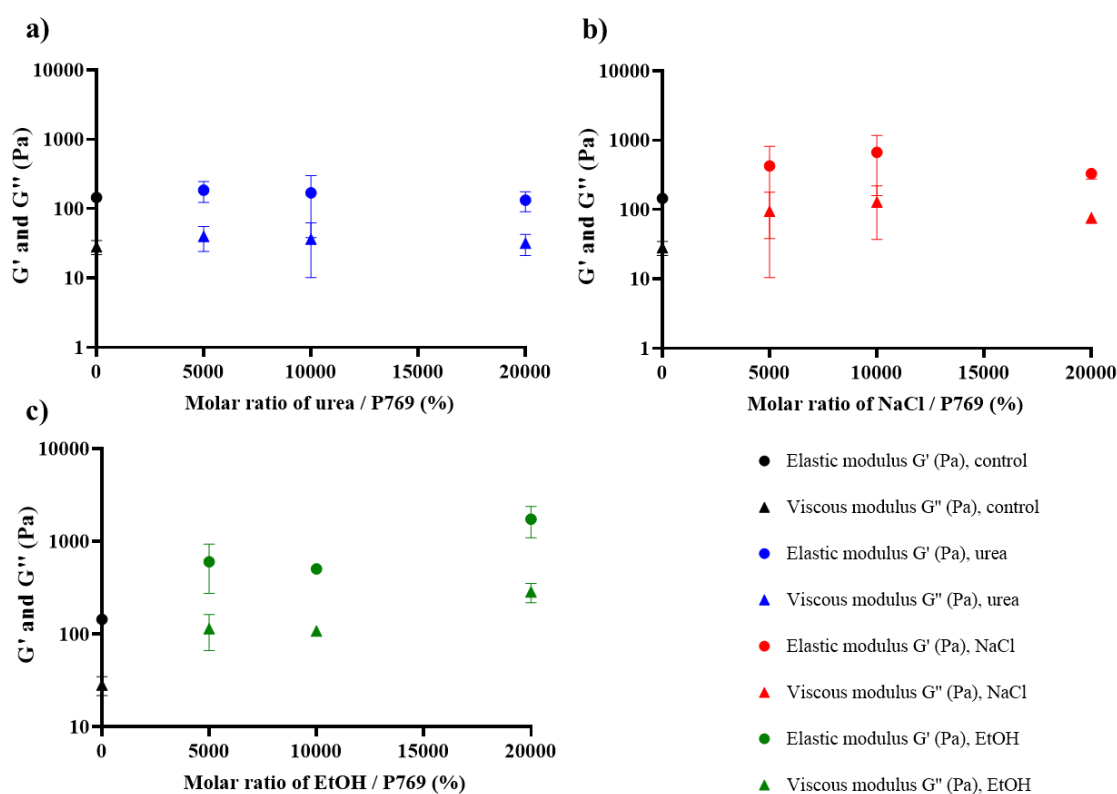


Figure S6: a) **P769**-LNC gel rheological behaviour (elastic G' and viscous G'' moduli), at 17.2 mg/g in **P769**, according to the molar ratio between urea and **P769**; b) **P769**-LNC gel rheological behaviour (elastic G' and viscous G'' moduli), at 17.2 mg/g in **P769**, according to the molar ratio between NaCl and **P769**; c) **P769**-LNC gel rheological behaviour (elastic G' and viscous G'' moduli), at 17.2 mg/g in **P769**, according to the molar ratio between EtOH and **P769** ($n = 2$, mean \pm SD).

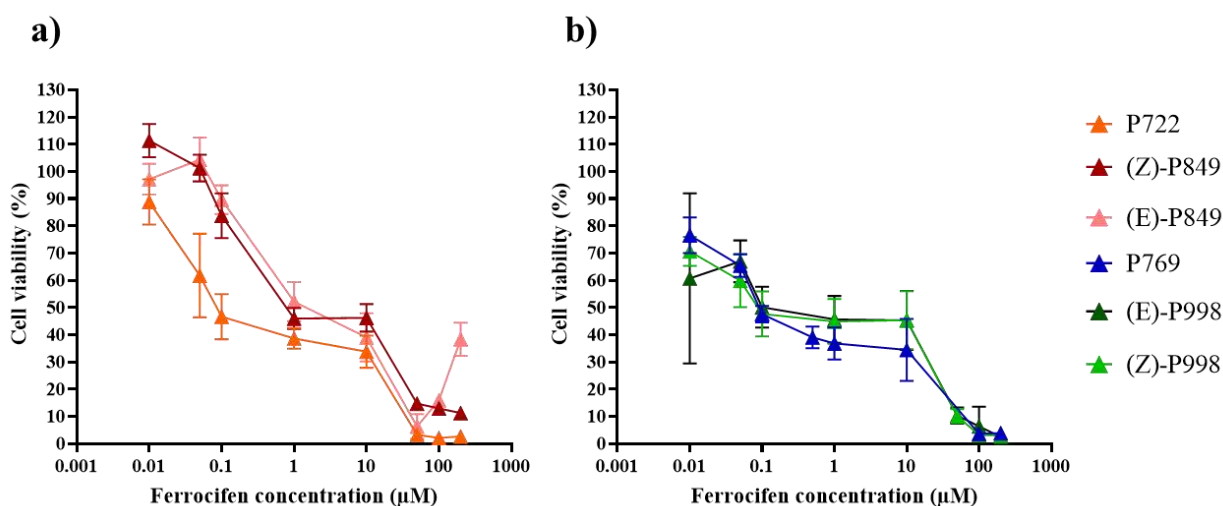


Figure S7: Cell viability of SKOV3 cells after 72 h of treatment with several concentrations of: a) **P722** (orange circle), **(Z)-P849** (dark red circle) and **(E)-P849** (pink circle); b) **P769** (dark blue circle), **(E)-P998** (dark green circle) and **(Z)-P998** (green circle) ($3 < n < 4$, mean \pm SD).

3. Complément au Chapitre 2: Caractérisation physico-chimiques de nanocapsules lipidiques chargées en ferrocifènes

3.1 Matériels et Méthodes

3.1.1 Matériels

Tous les composés des nanocapsules lipidiques sont approuvés par la « Food and Drug Administration » (FDA) pour injection parentérale. L'hydroxystéarate de polyéthylène glycol (nom commercial Kolliphor HS 15) provient de la société BASF (Allemagne). La phosphatidylcholine (nom commercial Lipoïd S 100) est fournie par la société Lipoïd GmbH (Allemagne) et l'acide caprylique/caprique de triglycérides (nom commercial Labrafac® WL 1349) par la société Gattefossé (France). Tous les autres solvants utilisés (acétonitrile, méthanol, DMSO) pour l'analyse chromatographique sont de grade analytique. Les différents ferrocifènes sont synthétisés et fournis par PSL Chimie ParisTech.

3.1.2 Méthodes

a. Stabilité de la formulation P769-LNCs liquide et du gel P769-LNCs, avec ou sans argon

La stabilité du ferrocifène **P769** dans la formulation à 1,5 mg/mL (eq. 5,2 mg/g) et le gel **P769**-LNCs à 5 mg/mL (eq. 17,2 mg/g) a été suivie par UPLC sur une période de 28 jours. De plus, la stabilité du **P769** sur une période de 28 jours a été vérifiée dans le Labrafac® WL 1349 et le Kolliphor HS 15.

Pour vérifier l'influence du dioxygène sur la stabilité des formulations, de l'argon a été mis dans les vials contenant les formulations et ces vials ont ensuite été fermés hermétiquement. A chaque intervalle de temps (0 jours, 2 semaines, 4 semaines), 25 µL de formulation ont été prélevés afin de doser le **P769** par UPLC. La même méthode d'analyse que celle décrite dans l'article «*Physico-chemical characterization of ferrocifen loaded lipid nanocapsules : different drug delivery systems customized, guided by the molecular structure* » a été utilisée. Ces études ont été réalisées trois fois pour les formulations et une fois pour la stabilité dans le Labrafac® WL 1349 et le Kolliphor HS 15.

b. Viabilité cellulaire sur la lignée cellulaire U87MG de glioblastome

La lignée cellulaire U87MG a été fournie par l'« American Type Culture Collection » (ATCC) et cultivée comme recommandé. Le milieu « Eagle's Minimum Essential » a été supplémenté avec 10 % de « Fetal Bovine Serum » (FBS) et 1 % de pénicilline/streptomycine. Les cellules ont été conservées sous atmosphère humide à 37 °C avec 5 % de CO₂.

L'efficacité des ferrocifènes **P722**, **(Z)-P849**, **(E)-P849**, **P769**, **(E)-P998** et **(Z)-P998**, encapsulés ou non dans les LNCs a été évaluée sur les cellules U87MG. Comme pour les tests réalisés sur les cellules SKOV3, les formulations ferrocifène-LNCs ont été préparées à une concentration de 2 mM en ferrocifènes, correspondant à une concentration (mg/g d'excipients lipophiles) de 3,74 mg/g, 3,63 mg/g, 4,33 mg/g et 4,03 mg/g pour **P722**, **P849** (2 isomères), **P769** and **P998** (2 isomères) respectivement. Les LNCs blanches ont aussi été testées. Le test 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-

2-(4-sulfo-phenyl)-2H-tetrazolium salt (MTS) a été utilisé pour détecter les cellules toujours vivantes après traitement. Concrètement, 5000 cellules U87MG dans 100 μ L de milieu ont étéensemencées par puits dans des plaques de 96 puits. Après 24 h d'incubation à 37°C avec 5 % CO₂, le milieu de chaque puits a été retiré et les cellules ont été traitées avec les différents ferrocifènes, encapsulés ou non, dans les LNCs, à 8 concentrations différentes. Après 72 h d'incubation, les traitements ont été retirés et 100 μ L par puits d'un mélange MTS + milieu a été rajouté. Les plaques ont été mises sous incubation pendant 2 h à 37 °C avec 5 % CO₂. L'absorbance a ensuite été mesurée à 490 nm avec un spectrophotomètre (SPECTRAMax M2, Molecular Devices, San Jose, USA). Les graphes Dose-Réponse ont été tracés à l'aide du logiciel GraphPad Prism. Chaque traitement a été réalisé trois fois.

3.2 Résultats et Discussions

3.2.1 Stabilité de la formulation P769-LNCs liquide et du gel P769-LNCs, avec ou sans argon

Un changement de couleur macroscopique ayant été observé seulement pour la formulation **P769**-LNCs à 5,2 mg/g (**Figure 6. a**) après une période de 28 jours, changement non observé avec les autres ferrocifènes, une étude de stabilité du **P769** dans les LNCs, conservés ou non sous argon, a été réalisée par suivi UPLC (**Figure 6. b**)).

Premièrement, il a été observé que le **P769** n'était pas stable au cours du temps dans les LNCs, que ce soit en suspension liquide ou sous forme de gel. En effet, une diminution de 87,4 % et de 71,3 % de la concentration initiale en **P769** a été obtenue respectivement. Même si la diminution semblait un peu moins importante lorsque le **P769** était sous forme de gel, aucune différence significative n'a été obtenue par rapport à la suspension liquide ($P > 0.999$ à + 28 jours entre les groupes **P769**-LNCs, 5,2 mg/g, 4 °C, sans argon et **P769**-LNCs, 17,2 mg/g, 4 °C, sans argon). La forme gel **P769**-LNCs ne permettait donc pas d'éviter une dégradation du **P769** (**Figure 6. b**)).

Ensuite, même si les différences obtenues ne sont pas significatives, une tendance sur la stabilité de **P769** a été observée quant à l'effet de la conservation sous argon des formulations. En effet, pour la suspension liquide, après 28 jours de conservation à 4 °C sous argon, une diminution de 15,3 % de la concentration initiale en **P769** a été obtenue contre 87,4 % pour la suspension liquide conservée sans argon ($P = 0.070$ entre ces deux groupes). Lorsque le **P769** était sous une forme gélifiée et conservé sous argon à 4 °C, une diminution de 11,7 % de la concentration initiale en **P769** était obtenue contre 71,3 % pour le gel **P769**-LNCs conservé sans argon ($P = 0.380$ entre ces deux groupes) (**Figure 6. b**)). Au vu des résultats, si le nombre de répétition avait été augmenté, il aurait été fort probable que les différences deviennent significatives entre la conservation avec ou sans argon.

Dans l'article « *Physico-chemical characterization of ferrocifen loaded lipid nanocapsules : customized drug delivery systems guided by the molecular structure* », les expériences de tensiométrie et de stabilité des LNCs en présence d'estérase ont permis d'avancer que le **P769** se trouvait en surface des LNCs. Les expériences réalisées avec ou sans argon confirment ainsi cette conclusion. En effet, il semblerait que le

P769 au contact du dioxygène se dégrade. Or, si le **P769** avait été encapsulé au cœur des LNCs, il n'y aurait pas ou très peu d'oxydation de cette molécule. Ceci est donc un argument supplémentaire en faveur de la présence du **P769** en surface des LNCs (**Figure 8**).

Enfin, afin de conserver les formulations, suspension liquide ou forme gélifiée, il est nécessaire de les placer sous atmosphère inerte.

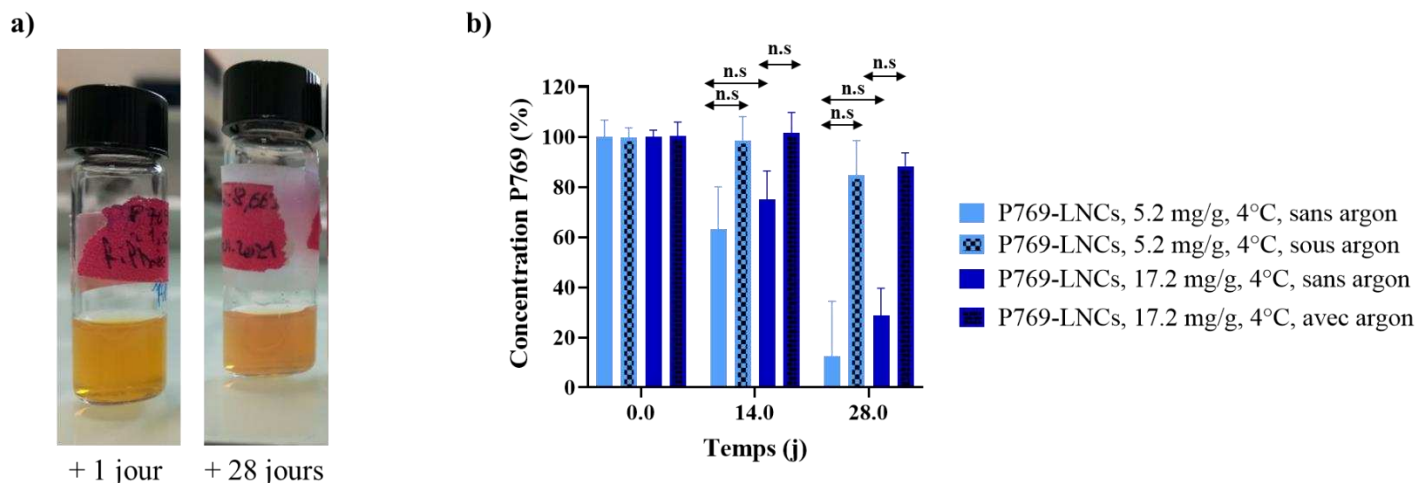


Figure 6. a) Observation macroscopique d'une formulation **P769**-LNCs à 5.2 mg/g à + 1 jours et + 28 jours après formulation ; **b)** Stabilité du **P769** dans les LNCs, en suspension liquide (bleu clair) ou sous forme de gel (bleu foncé), en présence d'argon (motif noir) ou non (pas de motif) ($3 < n < 5$, moyenne \pm écart type). Analyse statistique réalisée en utilisant le test analyse de Kruskal-Wallis avec un test de Dunn pour comparer les groupes entre eux.

Pour compléter ces résultats, une étude de stabilité du **P769** dans les deux principaux constituants des LNCs, le Labrafac® WL 1349 et le Kolliphor HS 15, a été réalisée (**Figure 7**). Des échantillons de concentrations en **P769** à 1,77 mg/mL dans le Kolliphor HS 15 et à 1,56 mg/mL dans le Labrafac® WL 1346 ont été préparés. Comme il est possible de le voir sur la **Figure 7**, le **P769** restait stable dans le Labrafac® WL 1346 sur toute la durée de l'étude, alors que la concentration diminuait de 1,77 mg/mL à 0,43 mg/mL au cours du temps dans le Kolliphor® HS 15. Etant donné que le Kolliphor® HS 15 est le composé constituant la membrane PEGylée des LNCs, ces résultats apportaient une information supplémentaire quant au fait que le **P769** se positionnerait au niveau de la membrane des LNCs et non dans le cœur de triglycérides (**Figure 8**).

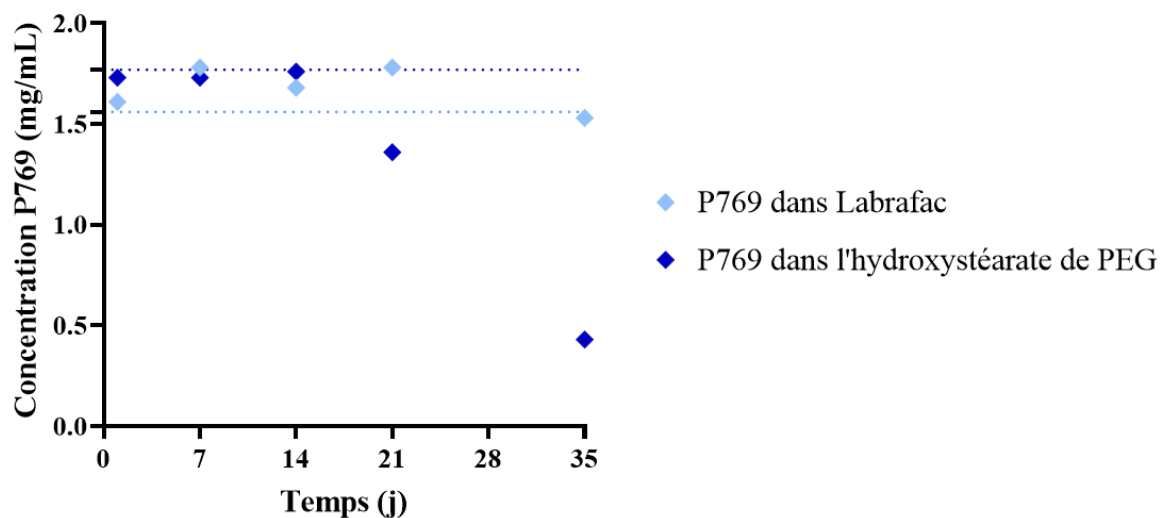


Figure 7. Stabilité du P769 au cours du temps dans le Labrafac® WL 1349 et le Kolliphor® HS 15 (hydroxystéarate de PEG) (n = 1).

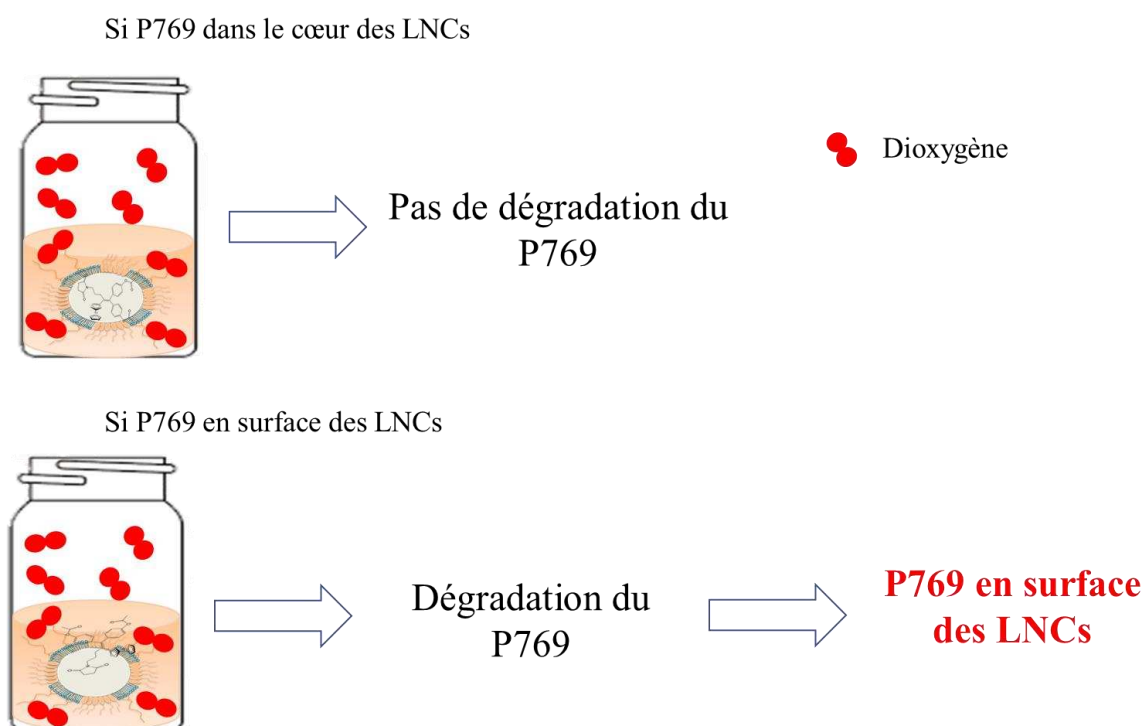


Figure 8. Schéma explicatif sur la stabilité du P769 en présence de dioxygène, confirmant l'hypothèse sur la position du P769 en surface des LNCs.

3.2.2 Viabilité cellulaire des cellules U87MG après traitements avec les différents succinimide-ferrocifènes

L'activité biologique des six succinimide-ferrocifènes a été évaluée sur la lignée cellulaire U87MG de glioblastome (**Figure 9** et **Figure 10**).

Pour les ferrocifènes testés sans LNCs, solubilisés dans le DMSO, les valeurs d'IC₅₀ obtenues ont été de 15 µM pour **P722**, **P769**, (**E**)-**P849**, 20 µM pour (**E**)-**P998** et (**Z**)-**P998** et 60 µM pour (**Z**)-**P849**. Après formulation dans les LNCs, les valeurs d'IC₅₀ ont diminué, passant à 2,8 µM, 1,6 µM, 2,6 µM, 5,3 µM, 2,4 µM et 4,0 µM pour **P722**, (**Z**)-**P849**, (**E**)-**P849**, **P769**, (**Z**)-**P998** et (**E**)-**P998** respectivement. Cette diminution est probablement due aux LNCs elles-mêmes puisqu'une IC₅₀ correspondante de 548 µg/mL (eq. à 4,5 µM en ferrocifène) a été obtenue pour le contrôle LNCs blanches. Cette valeur reste d'ailleurs similaire à celle obtenue sur la lignée cellulaire SKOV3 (368 µg/mL).

A part pour la valeur d'IC₅₀ du (**Z**)-**P849** seule qui est la plus élevée, les valeurs restent similaires pour les 5 autres ferrocifènes, quelle que soit la structure. Cela confirme ce qui avait été observé sur la lignée cellulaire SKOV3 : les modifications chimiques apportées au **P722** n'ont pas entravé son activité biologique.

Ces valeurs d'IC₅₀ restent néanmoins élevées par rapport aux différentes IC₅₀ connues du **P722** sur d'autres lignées cellulaires (très souvent inférieur à 1 µM) ainsi que sur la même lignée cellulaire U87MG pour le même temps de traitement, 72 h.¹ Cependant, en regardant les courbes de viabilité cellulaire (**Figure 9**), il est fort probable que si les cellules avaient été traitées 96 h, les IC₅₀ de 27 nM et 67 nM pour **P722** et **P769** obtenues dans une autre étude sur les cellules U87MG par Najlaoui *et al.* auraient été réobtenues.² D'autre part, un fait intéressant est observé sur les courbes de viabilité cellulaire : une diminution de la viabilité des cellules U87MG est observée à des faibles concentrations en ferrocifènes. En effet, pour **P769** par exemple, l'IC₅₀ est de 15 µM mais pourtant, à la concentration de 10 nM, la viabilité cellulaire des U87MG diminue à 30 %. Ce phénomène est aussi observé dans de moindres proportions pour les deux isomères de **P998** (IC₅₀ = 20 µM pour les deux isomères) avec une viabilité cellulaire des U87MG passant de 85 % et 78 % pour une concentration de 10 µM en (**Z**)-**P998** et (**E**)-**P998** à 63 % et 56 % pour une concentration de 0,1 µM. Ce phénomène de diminution de la viabilité cellulaire des U87MG avec une diminution de la concentration est aussi observé pour le **P722** (IC₅₀ = 15 µM et viabilité cellulaire de 48 % à 0,1 µM) ainsi que pour les deux isomères du **P849**. Ce phénomène peut être expliqué par les deux mécanismes d'action connus des ferrocifènes, la sénescence aux faibles concentrations et l'apoptose, illustré par l'allure des courbes en **Figure 9**, avec une première décroissance de la viabilité cellulaire aux faibles concentrations, un plateau puis une seconde décroissance aux concentrations plus élevées : ce mécanisme avait déjà été observé précédemment avec l'ansa-ferrocifène **DP1** et plus récemment avec le **P722**.^{1,3}

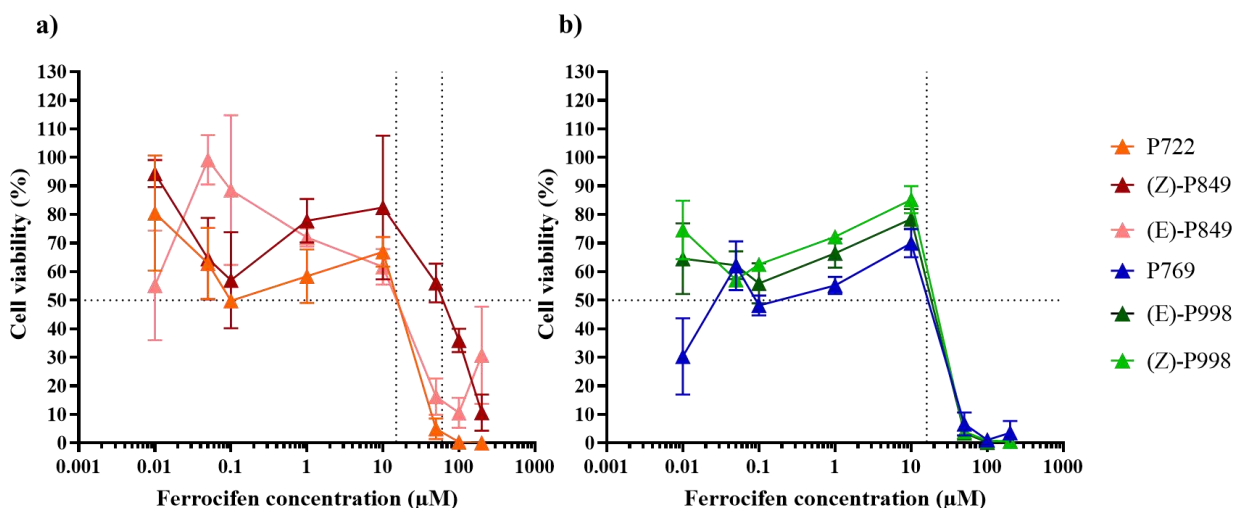


Figure 9. Viabilité des cellules U87MG de glioblastome après 72 h de traitement avec : a) P722 (triangle orange), (Z)-P849 (triangle rouge foncé) et (E)-P849 (triangle rose) ; b) P769 (triangle bleu), (Z)-P998 (triangle vert clair), (E)-P998 (triangle vert foncé) ($n = 3$, moyenne \pm écart type).

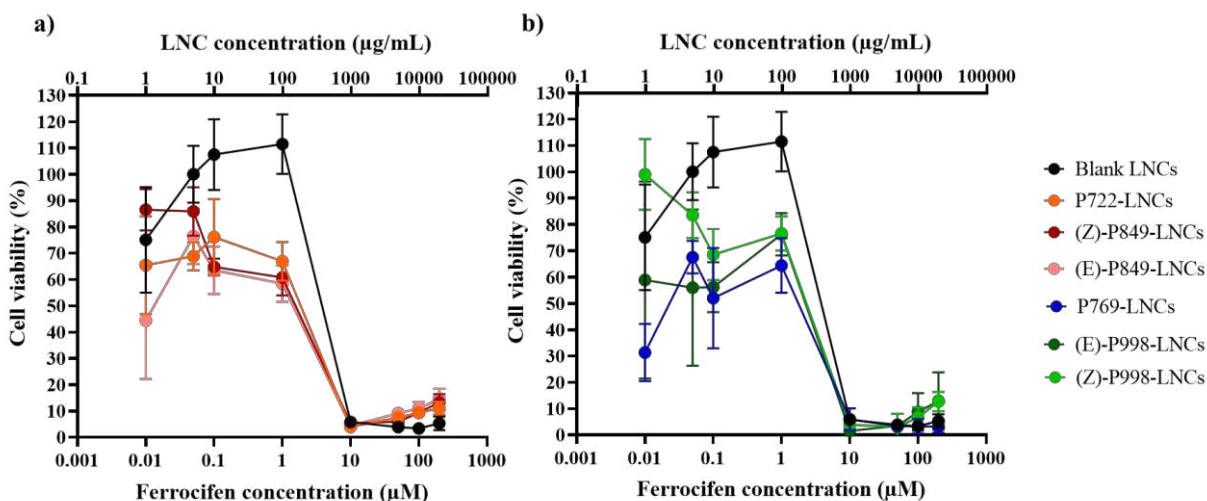


Figure 10. Viabilité des cellules U87MG de glioblastome après 72 h de traitement avec : a) P722-LNCs (cercle orange), (Z)-P849-LNCs (cercle rouge foncé) et (E)-P849-LNCs (cercle rose) ; b) P769-LNCs (cercle bleu), (Z)-P998-LNCs (cercle vert clair), (E)-P998-LNCs (cercle vert foncé) ($n = 3$, moyenne \pm écart type).

3.3 Conclusion

Les résultats présentés sont des compléments à l'article « *Physico-chemical characterization of ferrocifen loaded lipid nanocapsules : different drug delivery systems customized, guided by the molecular structure* ».

Contrairement aux autres ferrocifènes utilisés, il a été vu que le P769 n'était pas stable dans les LNCs au cours du temps et était vraisemblablement oxydé. Afin de surmonter ce problème de stabilité, la

formulation **P769**-LNCs à 5,2 mg/g (suspension) a été mise sous argon. En enlevant le dioxygène, le **P769** dans les LNCs restait plus stable au cours du temps. La stabilité du **P769** était légèrement améliorée lorsque ce dernier était sous forme de gel. Cependant, il paraît évident que pour éviter la dégradation du **P769** au cours du temps, les formulations, en suspension ou sous forme de gel, devront être placées sous atmosphère inerte. Enfin, ces résultats combinés à la stabilité du **P769** dans le Kolliphor® HS 15 ou le Labrafac® WL 1346 confirment la conclusion établie dans l'article «*Physico-chemical characterization of ferrocifen loaded lipid nanocapsules : different drug delivery systems customized, guided by the molecular structure* » : le **P769** se positionnerait au niveau de la membrane PEGylée des LNCs permettant ainsi la formation d'un gel.

Concernant les tests de viabilité cellulaire sur les cellules U87MG, les résultats obtenus confirment la première observation faite sur les cellules SKOV3. Les modifications chimiques apportées au **P722** n'ont pas diminué son activité biologique puisque les valeurs d'IC₅₀ obtenues pour cinq des six ferrocifènes restent identiques.

3.4 Références

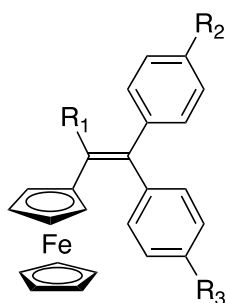
- (1) Najlaoui, F.; Busser, B.; Taïwe, G. S.; Pigeon, P.; Sturm, N.; Giovannini, D.; Marrakchi, N.; Rhouma, A.; Jaouen, G.; Gibaud, S.; De Waard, M. Succinimido-Ferrocidiphenol Complexed with Cyclodextrins Inhibits Glioblastoma Tumor Growth In Vitro and In Vivo without Noticeable Adverse Toxicity. *Molecules* **2022**, *27* (14), 4651. <https://doi.org/10.3390/molecules27144651>.
- (2) Najlaoui, F.; Pigeon, P.; Aroui, S.; Pezet, M.; Sancey, L.; Marrakchi, N.; Rhouma, A.; Jaouen, G.; De Waard, M.; Busser, B.; Gibaud, S. Anticancer Properties of Lipid and Poly(ϵ -Caprolactone) Nanocapsules Loaded with Ferrocenyl-Tamoxifen Derivatives. *J. Pharm. Pharmacol.* **2018**, *70* (11), 1474–1484. <https://doi.org/10.1111/jphp.12998>.
- (3) Bruyère, C.; Mathieu, V.; Vessières, A.; Pigeon, P.; Top, S.; Jaouen, G.; Kiss, R. Ferrocifen Derivatives That Induce Senescence in Cancer Cells: Selected Examples. *J. Inorg. Biochem.* **2014**, *141*, 144–151. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.08.015>.

4. Conclusion

Au début de ce projet de thèse, le premier succinimide-ferrocifène utilisé était le **P722**. Après avoir déterminé la charge maximale qu'il était possible d'encapsuler dans les LNCs, des modifications chimiques du **P722** (acétylation ou réduction du phénol) ont été réalisées. Le but était d'obtenir des dérivés du **P722** plus lipophiles, tout en conservant son activité biologique, afin d'améliorer la charge maximale encapsulable dans les LNCs en vue d'une application *in vivo*. Ainsi, six ferrocifènes ont été utilisés dans cette étude (**P722**, (**Z**)-**P849**, (**E**)-**P849**, **P769**, (**Z**)-**P998** et (**E**)-**P998**). Les résultats obtenus ont mis en évidence une influence de la structure du succinimide-ferrocifène sur l'efficacité d'encapsulation mais aussi sur la forme galénique obtenue (suspension ou gel) (**Tableau 5**). De plus, les tests de viabilité cellulaire réalisés ont permis de confirmer que les modifications chimiques apportées ne modifiaient pas l'activité biologique du **P722** initial. Pour aller plus loin sur le gel **P769**-LNCs, il serait intéressant de le tester *in vivo* sur des modèles murins de xéno greffe orthotopique de cellules de glioblastome.

Pour la suite de ce projet de thèse, développée dans le chapitre suivant, l'efficacité *in vivo* de formulations **P722**-LNCs furtives et **P53**-LNCs furtives, c'est-à-dire ayant du DSPE-PEG₂₀₀₀ post-inséré dans la membrane des LNCs, a été évaluée sur des modèles de tumeurs dérivées de patientes greffées sur souris (« Patient-Derived Xenograft model »), étude effectuée par nos partenaires à l'Institut Curie, en particulier par le Dr. Didier Decaudin et par Fariba Nemati.

Tableau 5. Résumé de la forme thérapeutique obtenue selon la structure du ferrocifène



	R ₁	R ₂	R ₃	Formation d'un gel
P722		OH	OH	Non
P769				Oui (à partir de 8,0 mg/g d'excipients lipophiles)
(E)-P998			OH	Oui (à partir de 17,2 mg/g d'excipients lipophiles)
(Z)-P998		OH		Non
(E)-P849		OH	H	Non
(Z)-P849		H	OH	Non
P81 = P5-diacetate	CH ₃ -CH ₂			Non
P5	CH ₃ -CH ₂	OH	OH	Non
P996				Non

Chapitre 3

Chapitre 3. Evaluation de l'efficacité *in vivo* des formulations furtives de P53-LNCs et de P722-LNCs sur des modèles de tumeurs dérivés de patientes humaines et greffées sur souris

1. Introduction

Le cancer de l'ovaire est le cancer gynécologique le plus mortel. L'Agence Internationale de Recherche contre le cancer estime une augmentation de la mortalité de 48 % entre la période 2020 – 2040. Parmi les différentes origines histologiques de cancer de l'ovaire (stromale, germinale ou épithéliale), le cancer épithélial de l'ovaire est le plus fréquemment rencontré, à hauteur de 90 %, dont 75 % de carcinomes séreux de haut grade. Ils sont la plupart du temps traités par chirurgie cytoréductrice suivie de combinaisons de chimiothérapie à base de taxol et platine (paclitaxel et carboplatine). Cependant, à ce jour, la communauté médicale est en manque de solution de deuxième intention lorsque des résistances à ces traitements surviennent. C'est pour cela qu'il est nécessaire de trouver des nouvelles stratégies ou combinaisons de traitements pour traiter le cancer épithélial de l'ovaire.

D'après les travaux de l'équipe du Dr. Mechta-Grigoriou, le cancer épithélial de l'ovaire peut être sous-défini au regard du métabolisme mitochondrial des cellules cancéreuses. En effet, cette équipe a mis en évidence deux types de métabolismes qui pourraient être à l'origine de résistances :

- Les cellules cancéreuses ayant un métabolisme mitochondrial lié au cycle de Krebs et au métabolisme de la glutamine, dites à « forte phosphorylation oxydative » (High OXPHOS). Ces cellules présentent un stress oxydatif chronique et une sensibilité au carboplatine et au paclitaxel.
- Les cellules cancéreuses ayant un métabolisme mitochondrial lié au métabolisme du glucose, dites à « faible phosphorylation oxydative » (Low OXPHOS). Il a été montré que ces cellules étaient moins sensibles à la chimiothérapie.

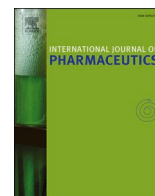
En prenant en compte les résultats obtenus par cette équipe, la stratégie envisagée dans cette partie a été d'utiliser, seule ou en combinaison avec le paclitaxel et le carboplatine, des molécules organométalliques appelées ferrocifènes. Dans le chapitre 1, il a été décrit que ces molécules possédaient un mécanisme d'action particulièrement intéressant, via la formation d'un métabolite actif, la quinone méthide, et la production d'espèces réactives de l'oxygène selon une boucle de rétroaction positive. Ainsi, il est attendu que les ferrocifènes apportés au niveau du site tumoral permettent de sensibiliser les tumeurs dites Low OXPHOS à la chimiothérapie, grâce à la production d'espèces réactives de l'oxygène.

Cette famille de molécules organométalliques étant lipophile, une étape de formulation est nécessaire afin de pouvoir les utiliser *in vivo* : ces molécules ont donc été encapsulées dans des nanocapsules lipidiques (LNCs), développées par le laboratoire MINT. Composés d'un cœur de triglycérides entourés

d'une membrane d'hydroxystéarate de polyéthylène glycol, ces nanovecteurs ont déjà démontré dans le passé leur capacité à encapsuler de nombreuses molécules (paclitaxel, étoposide, ferrocifènes etc...).

Dans cette étude, les ferrocifènes utilisés sont le **P53** et le **P722**. Il a été vu dans la littérature qu'il était possible d'encapsuler ces deux molécules au sein des LNCs. De plus, le chapitre 2 concernant la caractérisation physico-chimique de formulations de nanocapsules lipidiques chargées en ferrocifènes a confirmé qu'il était possible d'encapsuler le **P722** ainsi que ses dérivés mono-phénol (**P849**), mono-acétyle (**P998**) ou bi-acétyle (**P769**). Afin d'apporter des propriétés de furtivité aux LNCs pour éviter les phénomènes d'opsonisation et de reconnaissance par les macrophages, la surface des nanovecteurs a été modifiée en post-insérant dans la membrane un phospholipide PEGylé, le DSPE-PEG₂₀₀₀, selon un procédé bien connu de la littérature et rappelé dans l'état de l'art. Une fois les formulations **P53**-LNCs furtives et **P722**-LNCs furtives préparées, elles ont été envoyées à l'Institut Curie. La toxicité des formulations a d'abord été étudiée. Puis, l'efficacité *in vivo* des formulations a été testée, seule ou en combinaison avec le carboplatine et le paclitaxel, sur des modèles de tumeurs dérivés de patientes et greffés sur souris, dits « Patient-Derived-Xenograft » (PDX), considérés plus proche de la réalité clinique. A noter que les études réalisées avec les formulations **P53**-LNCs furtives ont été réalisées en amont de ce projet ANR.

2. Article publié dans International Journal of Pharmaceutics « Ferrocifen stealth LNCs and conventional chemotherapy : A promising combination against multidrug-resistant ovarian adenocarcinoma



Ferrocifen stealth LNCs and conventional chemotherapy: A promising combination against multidrug-resistant ovarian adenocarcinoma

Pierre Idlas^a, Abdallah Ladaycia^a, Fariba Némati^b, Elise Lepeltier^{a,*}, Pascal Pigeon^c, Gerard Jaouen^c, Didier Decaudin^{b,d}, Catherine Passirani^a

^a Micro et Nanomédecines Translationnelles, MINT, UNIV Angers, INSERM 1066, CNRS 6021, Angers, France

^b Translational Research Department, Laboratory of preclinical Investigation, PSL University, Institut Curie, 26 rue d'Ulm, Paris 75248, France

^c PSL Chimie Paris Tech, 11 rue P. et M. Curie and Sorbonne Université IPCM, CNRS, UMR 8232, IPCM, Paris 75005, France

^d Department of Medical Oncology, Institut Curie, 26 rue d'Ulm, Paris 75248, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Ovarian cancer
Organometallic compound
Multidrug resistance
Patient-Derived Xenograft model
ROS producer molecule
Nanoparticle

ABSTRACT

Ovarian cancer is one of the deadliest epithelial malignancies in women, owing to the multidrug resistance that restricts the success of conventional chemotherapy, carboplatin and paclitaxel. High grade serous ovarian carcinoma can be classified into two subtypes, the chemosensitive High OXPPOS and the Low OXPPOS tumour, less sensitive to chemotherapy. This difference of treatment efficacy could be explained by the redox status of these tumours, High OXPPOS exhibiting a chronic oxidative stress and an accumulation of reactive oxygen species. Ferrocifens, bio-organometallic compounds, are believed to be ROS producers with a good cytotoxicity on ovarian cancer cell lines. The aim of this study was to evaluate the *in vivo* efficacy of ferrocifen stealth lipid nanocapsules on High and Low OXPPOS ovarian Patient-Derived Xenograft models, alone or in combination to standard chemotherapy. Accordingly, two ferrocifens, P53 and P722, were encapsulated in stealth LNCs. The treatment by stealth P722-LNCs in combination with standard chemotherapy induced, with a concentration eight time lower than in stealth P53-LNCs, similar tumour reduction on a Low OXPPOS model, allowing us to conclude that P722 could be a leading ferrocifen to treat ovarian cancer. This combination of treatments may represent a promising synergistic approach to treat resistant ovarian adenocarcinoma.

1. Introduction

Ovarian cancer is the leading cause of death among gynaecological cancers. The International Agency for Research on cancer estimated that ovarian cancer could increase by 37% from 2020 to 2040 with an increase of the mortality of 48%, due especially to late diagnosis and current poor prognosis after standard chemotherapy (Tomorrow, 2022; Matulonis et al., 2016 Aug 25). Therefore, new treatments need to be developed. From histological analysis, three types of ovarian cancer can be characterized: stromal tumours, germ line tumours and epithelial malignancies, corresponding to 90% of ovarian cancers (De Picciotto et al., 2016 May; Cho and Shih, 2009). Among this latter histological group, around 75% of tumours are considered as High-grade serous ovarian carcinoma (HGSOC) (De Picciotto et al., 2016 May). They are currently treated by surgery followed by platinum-based chemotherapy and poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors. However, most of the patients with advanced-stage cancer develop resistance (De Picciotto et al., 2016 May; Cho and Shih, 2009; da Cunha Colombo Bonadio RR,

Fogace RN, Miranda VC, Diz M del PE. Homologous recombination deficiency in ovarian cancer: a review of its epidemiology and management. *Clinics (Sao Paulo) [Internet]*, 2018). Even if cancers were first classified by histological characterization, nowadays it is well known that cancer metabolism heterogeneity is a new hallmark of tumour development (Hanahan, 2022 Jan 12; Gentric et al., 2017 20;26 (9):462–85.). Thus, Prof. Fatima Mechta-Grigoriou's team (Gentric et al., 2019), in using genomics, proteomics and bioenergetic analysis, showed that HGSOC could be characterized into two well-defined subtypes according to their mitochondrial metabolism: i) the High oxidative phosphorylation (High OXPPOS) tumours, which exhibit chronic oxidative stress, accumulation of reactive oxygen species (ROS) and chemosensitivity to carboplatin and paclitaxel, and ii) the Low oxidative phosphorylation (Low OXPPOS) tumours with a chemoresistance to the current treatments. This same team also highlighted the positive impact of causing oxidative stress to the Low OXPPOS tumours, as it could sensitize them to the chemotherapeutic treatment.

The use of anticancer organometallic molecules such as ferrocifens

* Corresponding author.

<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122164>

Received 6 June 2022; Received in revised form 22 July 2022; Accepted 29 August 2022

Available online 8 September 2022

0378-5173/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

may therefore be appropriate. Indeed, since their first synthesis in the late 90 s, ferrocifens, whose main series are ferrocenyl analogs of hydroxytamoxifen, ansa-ferrocenyl analogs and ferrociphenols, showed very interesting antiproliferative, cytotoxic and immunologic effects on several multi-resistance cancer cell lines (Jaouen et al., 2000 Apr 1; Michard et al., 2008 Nov; Topin-Ruiz et al., 2021 Jan). The cytotoxic effect of ferrocifens was related to the unique redox properties of this organometallic family (reversible iron oxidation to the ferrocenyl moiety) leading to formation of reactive electrophile quinone methide (QM) able to interact with biological targets, and to generate ROS by a positive feedback loop (Hillard et al., 2006 May; Wang et al., 2015 Aug 24).

Among all the ferrocifens synthesized, the 4-ferrocenyl-5,5-bis(Cho and Shih, 2009; da Cunha Colombo Bonadio RR, Fogace RN, Miranda VC, Diz M del PE. Homologous recombination deficiency in ovarian cancer: a review of its epidemiology and management. Clinics (Sao Paulo) [Internet]., 2018; Hanahan, 2022 Jan 12; Gentric et al., 2017 20;26(9):462–85.; Gentric et al., 2019; Jaouen et al., 2000 Apr 1; Michard et al., 2008 Nov; Topin-Ruiz et al., 2021 Jan; Hillard et al., 2006 May; Wang et al., 2015 Aug 24; Wang et al., 2018 Jan 7; Pigeon et al., 2017 Oct 26; Lollo et al., 2018 Oct; Najlaoui et al., 2018 Nov; Buriez et al., 2008 Sep 19; Idlas et al., 2021 May 11; Karim et al., 2018 Jul 19; Lainé et al., 2014 Aug; Huynh et al., 2011 Dec; Morille et al., 2010 Jan; Decaudin, 2011 Oct; Laurent et al., 2013 Jun; Reyat et al., 2012 Jan 16; Gao et al., 2015 Nov; Izumchenko et al., 2017 Oct 1; Pigeon et al., 2014 Jul; Heurtault et al., 2002 Jun; Resnier et al., 2017 Dec; Grusso et al., 2015 Oct; Wang et al., 2019; Vonarbourg et al., 2006 Aug; Huynh et al., 2012 Feb 14; Wang et al., 2016 22;55(35):10431–4.; Citta et al., 2014 Nov 13; Scalcon et al., 2016; Arnér and Holmgren, 2006 Dec 1; Arnér, 2017; Cole et al., 2016 May 18; Mohell et al., 2015 Jun; Jaouen et al., 2015 Dec 21; Bougherara et al., 2017 Nov 21; Harris et al., 2019 Feb; Qi et al., 2017 Dec 18; Yang et al., 2015 Feb 17; Hoarau et al., 2004 Oct; Lacoeyille et al., 2007 Nov 1; Ballot et al., 2006 May)-pent-4-en-1-ol, designated P53, and the N-[4-ferrocenyl-5,5-bis(Cho and Shih, 2009; da Cunha Colombo Bonadio RR, Fogace RN, Miranda VC, Diz M del PE. Homologous recombination deficiency in ovarian cancer: a review of its epidemiology and management. Clinics (Sao Paulo) [Internet]., 2018; Hanahan, 2022 Jan 12; Gentric et al., 2017 20;26(9):462–85.; Gentric et al., 2019; Jaouen et al., 2000 Apr 1; Michard et al., 2008 Nov; Topin-Ruiz et al., 2021 Jan; Hillard et al., 2006 May; Wang et al., 2015 Aug 24; Wang et al., 2018 Jan 7; Pigeon et al., 2017 Oct 26; Lollo et al., 2018 Oct; Najlaoui et al., 2018 Nov; Buriez et al., 2008 Sep 19; Idlas et al., 2021

May 11; Karim et al., 2018 Jul 19; Lainé et al., 2014 Aug; Huynh et al., 2011 Dec; Morille et al., 2010 Jan; Decaudin, 2011 Oct; Laurent et al., 2013 Jun; Reyat et al., 2012 Jan 16; Gao et al., 2015 Nov; Izumchenko et al., 2017 Oct 1; Pigeon et al., 2014 Jul; Heurtault et al., 2002 Jun; Resnier et al., 2017 Dec; Grusso et al., 2015 Oct; Wang et al., 2019; Vonarbourg et al., 2006 Aug; Huynh et al., 2012 Feb 14; Wang et al., 2016 22;55(35):10431–4.; Citta et al., 2014 Nov 13; Scalcon et al., 2016; Arnér and Holmgren, 2006 Dec 1; Arnér, 2017; Cole et al., 2016 May 18; Mohell et al., 2015 Jun; Jaouen et al., 2015 Dec 21; Bougherara et al., 2017 Nov 21; Harris et al., 2019 Feb; Qi et al., 2017 Dec 18; Yang et al., 2015 Feb 17; Hoarau et al., 2004 Oct; Lacoeyille et al., 2007 Nov 1; Ballot et al., 2006 May)-pent-4-enyl]succinimide, P722, have proven to be the most efficient *in vitro* on carboplatin-resistant ovarian cancer cell lines, with IC₅₀ below 0.4 μM, and thus could be suitable molecules to treat the Low OXPHOS HGSOC (Wang et al., 2018 Jan 7; Pigeon et al., 2017 Oct 26) (Fig. 1.a)).

To perform *in vivo* studies by systemic administration, the issue of the high lipophilicity of P53 and P722 (log P > 4) was overcome by using nanocarriers. In parallel to other nanocarriers such as poly(ϵ -caprolactone) nanocapsules or cyclodextrins, lipid nanocapsules (LNCs), a core-shell nanovector composed of an oily core and a PEGylated surfactant shell, allowed an encapsulation of these organometallic molecules with a good yield due to its oily core (Najlaoui et al., 2018 Nov; Buriez et al., 2008 Sep 19; Idlas et al., 2021 May 11) (Fig. 1.b)). Indeed, P53-LNCs and P722-LNCs had already been formulated and evaluated *in vivo* on multidrug resistant cancers such as glioblastoma and metastatic melanoma, confirming the choice of this nanovector and the biological efficiency of these two ferrocifen LNCs (Topin-Ruiz et al., 2021 Jan; Karim et al., 2018 Jul 19). Also, in order to improve their chance of avoiding opsonization and recognition by the mononuclear phagocyte system after a systemic administration, the surface of the LNCs was shaped by adding a PEGylated phospholipid, DSPE-PEG₂₀₀₀. These stealth nanocarriers have already shown an improved accumulation at the tumour site, according to the so-called Enhanced Permeation Effect (EPR effect) (Lainé et al., 2014 Aug; Huynh et al., 2011 Dec; Morille et al., 2010 Jan).

However, the effectiveness of a new treatment demonstrated on animal models is too often far removed from clinical reality and is dependent on the *in vivo* model selected. To deal with this problem, preclinical investigation can be done on well advanced, better characterized and more reproducible Patient Derived Xenograft (PDX) models,

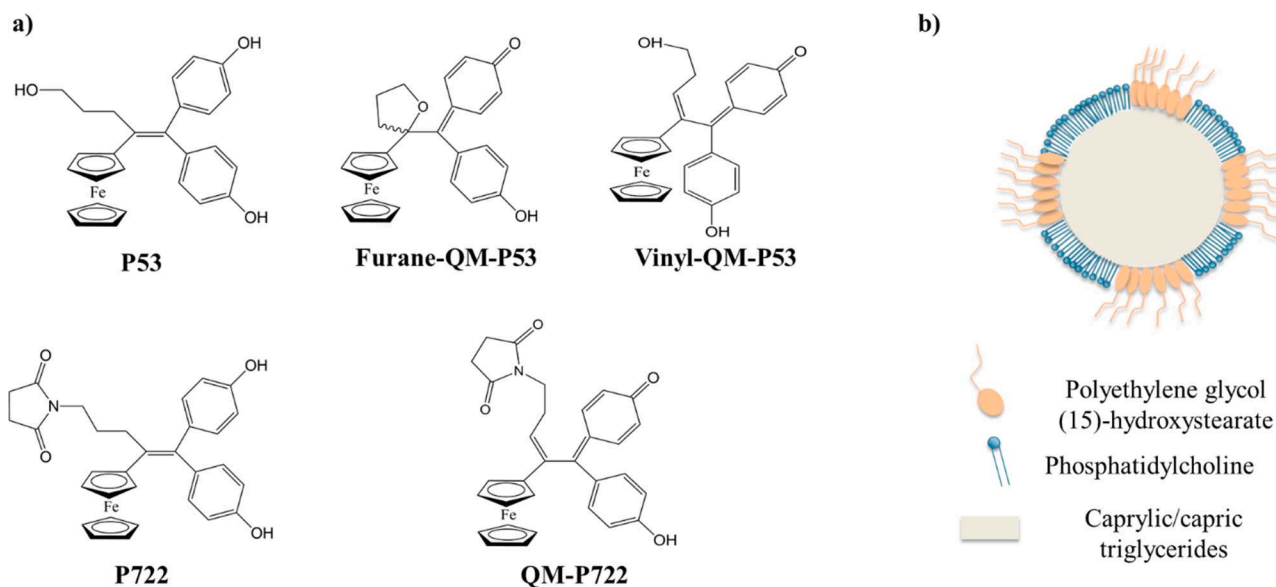


Fig. 1. a) Molecular structures of P53 (Pigeon et al., 2014 Jul) and P722 (Pigeon et al., 2017 Oct 26) ferrocifens and their corresponding quinone methides (QM). Two QM can be obtained from P53 (a furane-QM-P53 and a vinyl-QM-P53); b) Schematic structure of a lipid nanocapsule (LNC).

known to be more representative of the human patient tumour micro-environment and to mimic the clinical situation (Decaudin, 2011 Oct). Indeed, the stability of the genomic and gene expression profiles of PDXs in mice at first transplantation and during the *in vivo* maintenance of the model, are key relevant characteristics of this approach (Laurent et al., 2013 Jun; Reyat et al., 2012 Jan 16). Moreover, several studies showed that PDX models allowed a more accurate assessment of therapeutic efficiency than cell line models (Gao et al., 2015 Nov; Izumchenko et al., 2017 Oct 1).

The aim of this study was to evaluate the efficiency of ferrocifen stealth LNCs on High Grade and Low Grade serous ovarian cancer in mice bearing PDX, in combination or not with the current standard chemotherapy treatment of carboplatin and paclitaxel. To achieve this goal, ferrocifen-LNCs were formulated and characterized. The surface decoration by addition of a PEGylated phospholipid in order to obtain stealth nanocarriers was also performed. *In vivo* studies were first performed by systemic delivery of P53-LNCs on three High OXPPOS PDX models (OV10, OV16 and OV26) and three Low OXPPOS models (OV21, OV25 and OV54). The stealth P53-LNCs and stealth P722-LNCs were then tested on the two Low OXPPOS PDX models (OV21 and OV54), where chemotherapy was expected to be potentialized by ferrocifen-LNCs.

2. Materials and methods

2.1. Chemical materials

All components of blank LNCs, meaning non-loaded LNCs, are FDA-approved for parenteral injection. Macrogol 15 hydroxystearate (Kolliphor® HS 15) was purchased from BASF (Germany). Phosphatidylcholine from soybean (Lipoid S 100) was provided by Lipoid GmbH (Germany) and caprylic/capric triglycerides (Labrafac® WR 1349) were supplied by Gattefosse (France). Ultra-pure water (UPW) was obtained from a Millipore filtration system. Otherwise, all the reagents or solvents used (acetonitrile, methanol, ethanol, DMSO) for the chromatography analysis were of analytical grade. P53 and P722 ferrocifens were synthesized and provided by PSL Chimie ParisTech (France) according to Pigeon et al. (Pigeon et al., 2017 Oct 26; Pigeon et al., 2014 Jul). 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-2000] (DSPE-mPEG₂₀₀₀) (Mean Molecular Weight (MMW) = 2805 g/mol) was purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA).

2.2. Preparation of blank LNCs

Blank LNCs were prepared by a phase inversion process as comprehensively described in the literature (Heurtault et al., 2002 Jun). Firstly, all the excipients, Kolliphor® HS 15 (16.9 % w/w), Lipoid S 100 (1.5 % w/w), Labrafac® WR 1349 (20.7 % w/w), NaCl (1.3 % w/w, with respect to physiological osmolarity) and UPW (59.6 % w/w) were mixed under magnetic stirring at 60 °C for 10 min. Three heating-cooling cycles were performed between 90 °C and 60 °C to obtain the emulsion phase inversion (O/W emulsion for temperature lower than phase inversion temperature (PIT) and W/O emulsion for temperature higher than PIT). During the third cycles, when the temperature decreased and reached the PIT (78 °C < PIT < 83 °C), ice-cold UPW (31.5 % v/v_{tot}) was added to induce an irreversible shock and to finally obtain the LNCs. The suspension was then stirred for 10 min under slow magnetic stirring at room temperature. To finish, the LNC formulation was filtrated through 0.2 µm sterile polyethersulfone (PES) membrane to remove any aggregates and to sterilize for intravenous injection before storage at 4 °C.

2.3. Preparation of P53-LNCs

In order to formulate P53-LNC, ethanol was used (0.01 % V/V_{tot}) in order to improve the dispersion of P53 (powder form) in Labrafac. The

solvent was then evaporated via argon flow, followed by addition of the other excipients. The same phase inversion process was then performed, and finally the P53-LNC formulation was filtrated through 0.2 µm sterile PES membrane and stored at 4 °C.

2.4. Preparation of P722-LNCs

In order to formulate P722-LNC, P722 (powder form) was added with Kolliphor® HS 15 and Labrafac® WR 1349 and stirred for 30 min at 60 °C. Then the other excipients (Lipoid S 100, NaCl and UPW) were added and the three heating-cooling cycles of the phase inversion process were applied. The obtained P722-LNCs were filtrated through 0.2 µm sterile PES membrane and stored at 4 °C.

2.5. Post-insertion by DSPE-PEG₂₀₀₀

The PEGylated phospholipid used was the 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-2000] (DSPE-mPEG₂₀₀₀). To obtain stealth LNCs, this polymer was post-inserted at the LNC surface at the concentration of 5 mM, as previously described (Resnier et al., 2017 Dec). Briefly, the DSPE-mPEG₂₀₀₀ (powder form) was added to blank LNCs, P53-LNCs or P722-LNCs, put under magnetic stirring at 30 °C for 4 h and then quenched for 1 min in an ice bath. All stealth formulations were then filtrated through sterile PES membrane and stored at 4 °C.

2.6. Characterization of the lipid nanocapsules

Average hydrodynamic diameter and polydispersity index (PDI) were determined by the dynamic light scattering technique at 25 °C with a backscatter angle of 173° using a Zetasizer Nano ZS system (Malvern Instrument Ltd, UK) after optimum dilution of the formulations in UPW. The measured average values were calculated from 3 runs, with >10 measurements for each run.

Zeta potential of the nano-systems was measured using the laser Doppler micro-electrophoresis technique by a Zetasizer Nano ZS system (Malvern Instrument Ltd, UK). The measured average values were calculated from 3 runs with >10 measurements for each run, after a dilution by 100 of the formulations with UPW (pH = 8.3 at 25 °C). Smoluchowski's approximation was used to determine electrophoretic mobility for determination of the zeta potential. For size, PDI and zeta potential, results shown in Table 1 are the average of at least three formulations (n > 3).

Drug loading and encapsulation efficiency (E.E) for each ferrocifen (P53 and P722) were determined using Ultra-High-performance liquid chromatography (UPLC) methods. A C18 analytical column (Waters, France) was used at 20 °C. For each molecule, the quantification of encapsulated ferrocifens was obtained by a UV detector at λ = 450 nm, after the filtration step on 0.2 µm and a dissolution of LNCs with the optimal solvent described below. Analysis of the data was performed using Empower 3 software (Waters).

For P53-LNCs, C18 column was eluted at a flow rate to 0.2 mL.min⁻¹ with ethanol and water (80/20 v/v). Calibration curves were established (at each analysis) by quantifying the area under the curves (AUCs) of [0.4 – 2] mg.mL⁻¹ P53 solutions in ethanol. The LNCs were dissolved by a 10-fold dilution in ethanol and quantification of the P53 was performed using the calibration curve. Injection volume was 2 µL and retention time of P53 was 0.7 min.

For P722-LNCs, C18 column was eluted at a flow rate to 0.2 mL.min⁻¹ with acetonitrile and water (65/35 v/v). Calibration curves were established (at each analysis) by quantifying the area under the curves (AUCs) of [0.025 – 0.125] mg.mL⁻¹ P722 solutions in blank LNCs dissolved by a 40-fold dilution in methanol/DMSO (90/10 v/v). The LNCs were broken by a 40-fold dilution with methanol/DMSO (90/10 v/v) and the quantification of the P722 was performed using the calibration curve. Injection volume was 5 µL and retention time of P722 was 1.2

Table 1

Physico-chemical characteristics (size, PDI, zeta potential, drug loading and encapsulation efficiency) of blank LNCs, stealth LNCs with or without P53 and P722.

Formulation	Hydrodynamic diameter (nm)	PDI	Zeta Potential (mV)	Drug loading (% w/w)	Encapsulation efficiency (E.E) (%)
Blank LNCs	53.6 ± 1.0	0.05 ± 0.01	-2.7 ± 1.3	–	–
Stealth blank LNCs	60.7 ± 2.3	0.06 ± 0.01	-18.3 ± 1.8	–	–
P53-LNCs	46.0 ± 0.8	0.05 ± 0.01	-1.8 ± 0.1	2.73	> 97 %
Stealth P53-LNCs	49.1 ± 0.2	0.10 ± 0.01	-20.8 ± 0.1	4.36	> 96 %
P722-LNCs	50.9 ± 0.2	0.06 ± 0.01	-1.7 ± 0.8	0.56	> 95 %
Stealth P722-LNCs	57.2 ± 1.0	0.06 ± 0.01	-18.1 ± 0.4	0.56	> 95 %

min.

Encapsulation efficiency (E.E, %) of the corresponding ferrocifen in LNCs was calculated using the following equation:

$$E.E(\%) = \frac{(Total\ ferrocifen\ conc.\ in\ LNC - unencapsulated\ ferrocifen\ conc.\ in\ LNC)}{Initial\ drug\ conc.\ in\ LNC} \times 100$$

Drug loading of the corresponding ferrocifen in LNCs was calculated using the following equation:

$$D.L(\%w/w) = \frac{Mass\ of\ encapsulated\ ferrocifen\ in\ 1\ mL\ of\ LNC\ dispersion}{m(ferrocifen) + m(Labrafac®WR1349) + m(Kolliphor®HS15) + m(LipoidS100)} \times 100$$

2.7. In vivo study on Patient-Derived Xenograft models

PDX models of High Grade serous ovarian carcinoma tumours were established at the Institut Curie (Paris, France) with patient consent, according to the relevant national law on the protection of participants in biomedical research.

Briefly, tumour fragments from patients were grafted into the interscapular fat pad, a highly vascularized area, of 6-week-old-female Swiss nude mice under avertin anaesthesia. After two to twelve months of development, the tumours were retained and cut into three new fragments in order to be grafted again in three nude mice. This step was repeated three times to reach tumour stability.

Six models derived from six different patients were selected: three High OXPHOS models (OV10, OV16 and OV26) and three Low OXPHOS models (OV21, OV25 and OV54). The genomic analysis, homologous repair deficiency (HRD) – homologous repair proficiency (HRP) status and the mitochondrial metabolism of the six models were well described in the literature (Gentric et al., 2019; Gruosso et al., 2015 Oct). The protocol for the treatment of mice was adapted over time according to the results obtained with the first formulation tested, P53-LNCs.

In all experiments, LNCs, P53-LNCs or P722-LNCs were injected intravenously at 5 mL/kg of mice, twice per week, by tail-vein or retro-orbital injections. Conventional chemotherapies, carboplatin and paclitaxel, were administered intraperitoneally at 10 mL/kg, every 2 weeks for the preliminary study and every 3 weeks for the second part of the study. The control groups were treated intravenously with NaCl 0.9 %.

- Preliminary study

As a preliminary study, a formulation of P53-LNCs at a drug loading

of 2.73 % (w/w) was first evaluated on the three High OXPHOS models (OV10, OV16 and OV26) and the three Low OXPHOS models (OV21, OV25 and OV54). Mice were divided into eight random groups in

accordance with the eight different treatments or combination of treatments to be tested ($3 \leq n \leq 5$ mice per group). Administration of conventional chemotherapy was performed at a dose of 66 mg/kg for

carboplatin and a dose of 30 mg/kg for paclitaxel. Blank and P53-LNCs at 2.73 % (w/w) were injected at full dose (38 mg of P53/kg) and half dose (19 mg of P53/kg, obtained by dilution). Blank and P53-LNCs were administered alone or in combination with the conventional chemotherapy for the study. Details of the protocol of treatment are summarized in Table 2.

- Second part of the study

For the second part of the study, two PDX models were selected, according to the results obtained above: the Low OXPHOS models OV21 and the OV54.

Stealth P53-LNCs at a maximum drug loading of 4.36 % (w/w) were

Table 2

Summary of the different groups treated by P53-LNCs at 2.73 % (w/w) alone or in combination with conventional chemotherapy (carboplatin and paclitaxel). Carboplatin and paclitaxel were intraperitoneally injected once every two weeks at full dose (66 mg/kg and 30 mg/kg respectively). Blank or P53-LNCs were intravenously administered twice per week at full dose FD (38 mg/kg) or half dose HD (19 mg/kg).

Treatment	Composition	Dose of anticancer drug (mg/kg)
Control	NaCl 0.9 %	–
B-LNCs	Full dose, blank LNCs	eq. 38*
FD P53-LNCs	Full dose, P53-LNCs	38
HD P53-LNCs	Half dose (by dilution), P53-LNCs	19
Cpt + TAX	Carboplatin + paclitaxel	66 + 30
B-LNCs + Cpt + TAX	Blank LNCs + carboplatin + paclitaxel	eq. 38* + 66 + 30
FD P53-LNCs + Cpt + TAX	Full dose P53-LNCs + carboplatin + paclitaxel	38 + 66 + 30
HD P53-LNCs + Cpt + TAX	Half dose P53-LNCs + carboplatin + paclitaxel	19 + 66 + 30

Table 3

Summary of the different groups of treatment by stealth P53-LNCs at 4.36 % (w/w) alone or in combination with conventional chemotherapy (carboplatin and paclitaxel). Carboplatin and paclitaxel were intraperitoneally injected once every three weeks at half dose (33 mg/kg and 15 mg/kg respectively). Stealth blank LNCs and stealth P53-LNCs were intravenously administered twice per week at full dose FD (65 mg/kg) and half dose HD (32.5 mg/kg).

Treatment	Composition	Dose of anticancer drug (mg/kg)
Control	Control (NaCl 0.9 %)	–
FD S-B-LNCs	Full dose, stealth blank LNCs	eq. 65*
HD S-B-LNCs	Half dose, stealth blank LNCs	eq. 32.5
FD P53-S-LNCs	Full dose, stealth P53-LNCs	65
HD P53-S-LNCs	Half dose, stealth P53-LNCs	32.5
Cpt + TAX	Half dose, Carboplatin + paclitaxel	33 + 15
FD S-B-LNCs + Cpt + TAX	Full dose, stealth blank LNCs + carboplatin + paclitaxel	eq. 65 + 33 + 15
HD S-B-LNCs + Cpt + TAX	Half dose, stealth blank LNCs + carboplatin + paclitaxel	eq. 32.5 + 33 + 15
FD P53-S-LNCs + Cpt + TAX	Full dose, stealth P53-LNCs + carboplatin + paclitaxel	eq. 65 + 33 + 15
HD P53-S-LNCs + Cpt + TAX	Half dose, stealth P53-LNCs + carboplatin + paclitaxel	eq. 32.5 + 33 + 15

Table 4

Relative tumour volume ($[RTV] = V_n/V_0$, n corresponding to the end of experiment) and tumour growth inhibition ($[TGI] = 100 - (RTVt/RTVc \times 100)$) after different treatments, summarized in Table 3, on the two Low OXPHOS model OV21 and OV54.

Treatment	RTV (%) (day 19)	TGI (%) (day 19)
OV54 Control	39.5	0.0
FD S-B-LNCs	28.4	28.2
HD S-B-LNCs	22.0	44.3
FD P53-S-LNCs	32.5	17.9
HD P53-S-LNCs	36.4	7.8
Cpt + TAX	27.9	29.4
FD S-B-LNCs + Cpt + TAX	14.4	63.5
HD S-B-LNCs + Cpt + TAX	19.8	50.0
FD P53-S-LNCs + Cpt + TAX	17.2	56.4
HD P53-S-LNCs + Cpt + TAX	23.7	40.0
	RTV (%) (day 26)	TGI (%) (day 26)
OV21 Control	15.2	0.0
FD S-B-LNCs	11.6	23.7
HD S-B-LNCs	13.6	10.8
FD P53-S-LNCs	10.8	28.9
HD P53-S-LNCs	11.9	21.6
Cpt + TAX	8.2	46.3
FD S-B-LNCs + Cpt + TAX	9.5	37.8
HD S-B-LNCs + Cpt + TAX	10.1	33.5
FD P53-S-LNCs + Cpt + TAX	5.8	61.9
HD P53-S-LNCs + Cpt + TAX	12.8	15.6

evaluated. The mice were divided in ten random groups in accordance with the ten different treatments or combination of treatments to be tested ($5 \leq n \leq 8$ mice per group). Administration of conventional chemotherapy was performed at half dose for both chemotherapy, carboplatin (33 mg/kg) and paclitaxel (15 mg/kg) in order to highlight the potential effect of the ferrocifen suspensions. The stealth blank and P53-LNCs at 4.36 % (w/w) were injected at full dose (65 mg of P53/kg) and half dose (32.5 mg of P53/kg mouse, obtained by dilution), alone or in combination with the conventional chemotherapy. Details of the treatment protocol are summarized in Table 3.

Stealth P722-LNCs at a maximum drug loading of 0.56 % (w/w) were then evaluated. The mice were divided in six random groups in accordance with the different treatments or combination of treatments to be tested ($5 \leq n \leq 7$ mice per group). Administration of conventional chemotherapy was performed at half dose for both carboplatin (33 mg/kg) and paclitaxel (15 mg/kg). The stealth blank and P722-LNCs at 0.56 % (w/w) were injected at a dose of 8 mg of P722/kg, alone or in

Table 5

Summary of the different groups after treatment by stealth P722-LNCs at 0.56 % (w/w) alone or in combination with conventional chemotherapy (carboplatin and paclitaxel). Carboplatin and paclitaxel were intraperitoneally injected once every three weeks at half dose HD (33 mg/kg and 15 mg/kg respectively). Stealth blank and stealth P722-LNCs were intravenously administered twice per week at a dose of 8 mg/kg.

Treatment	Composition	Dose of anticancer drug (mg/kg)
Control	Control (NaCl 0.9 %)	–
S-B-LNCs	Stealth blank LNCs	eq. 8*
P722-S-LNCs	Stealth P722-LNCs	8
Cpt + TAX	Half dose, carboplatin + paclitaxel	33 + 15
S-B-LNCs + Cpt + TAX	Stealth blank LNCs + carboplatin + paclitaxel	eq. 8 + 33 + 15
P722-S-LNCs + Cpt + TAX	Stealth P722-LNCs + carboplatin + paclitaxel	8 + 33 + 15

eq. 8* indicates that the same concentration in excipients than the full dose stealth P722-LNCs was administered.

Table 6

Relative tumour volume ($[RTV] = V_n/V_0$, n corresponding to the end of experiment) and tumour growth inhibition ($[TGI] = 100 - (RTVt/RTVc \times 100)$) after different treatments, summarized in Table 3, on the two Low OXPHOS model OV21 and OV54.

Treatments	RTV (%) (day 15)	TGI (%) (day 15)
OV54 Control	14.4	0.0
S-B-LNCs	14.9	-3.4
P722-S-LNCs	17.5	-21.6
Cpt + TAX	13.3	8.0
S-B-LNCs + Cpt + TAX	9.9	31.5
P722-S-LNCs + Cpt + TAX	11.3	21.7
	RTV (%) (day 22)	RTV (%) (day 22)
OV21 Control	8.9	0.0
S-B-LNCs	12.3	-38.4
P722-S-LNCs	10.4	-16.9
Cpt + TAX	10.1	-13.7
S-B-LNCs + Cpt + TAX	7.9	11.0
P722-S-LNCs + Cpt + TAX	4.7	47.7

combination with the conventional chemotherapy. Details of the treatment protocol are summarized in Table 4.

Mice bearing tumours with a volume from 50 to 150 mm³ were individually identified and randomly assigned to the control or treatment groups. Tumour growth was assessed twice a week by measuring two perpendicular diameters of tumours using a calliper. Individual mouse tumour volume was calculated as follows, $V = a \times b^2/2$, with a the major diameter and b the minor diameter. The tumour volume evolution at day n (V_n) was expressed as relative tumour volume (RTV) according to the following formula: $RTV = V_n/V_0$ with V_0 being the initial volume at time of inclusion.

Antitumour activity was evaluated according to tumour growth inhibition (TGI), calculated according to the following formula: $TGI\% = 100 - (RTVt/RTVc \times 100)$, where $RTVt$ is the median RTV of treated mice and $RTVc$ is the median RTV of controls, both at a given time point when the antitumour effect was optimal. A meaningful biological effect was defined as a TGI of at least 50%. Statistical significance of differences observed between the individual RTV corresponding to the treated mice and control groups was calculated by the two-tailed Mann-Whitney test. Growth delay index was calculated as the time required to reach the same RTV in the treated and control groups, at a RTV of 2.

Moreover, an overall response rate (ORR) was calculated for each treated mouse as follows: $[(RTVt/mRTVc)]$, where $RTVt$ is the relative tumour volume of the treated mouse and $mRTVc$ is the median relative tumour volume of the corresponding control group at the end of treatment. $[(RTVt/mRTVc) - 1]$ for each treated mouse was then calculated: a tumour was considered to be responding to treatment if $[(RTVt/mRTVc) - 1]$ was below

–0.5.

All *in vivo* experimental procedures were specifically approved by the ethics committee of the Institut Curie CEEA-IC #118 (Authorization APAFiS# 25870–2020060410487032-v1 given by National Authority) in compliance with the international guidelines.

3. Results and discussion

3.1. Physico-chemical properties of LNC suspensions

LNCs were prepared by a phase-inversion process as previously described (Heurtault et al., 2002 Jun). The different ferrocifens (P53 and P722) were added at the beginning of the process. The P53 drug loading was set first at 2.73 % (w/w) for conventional LNCs and reaching its maximal value at 4.36 % (w/w) for stealth LNCs with an encapsulation efficiency (E.E) higher than 95 % for both formulations. For the P722, the maximal drug loading was 0.56 % (w/w) with an E.E also higher than 95 %. The difference in drug loading between these ferrocifens may be explained by the lipophilicity of the molecules as reported in the literature. Indeed, P53 has a logPo/w higher than P722 (4.2 and 4.0 respectively) (Pigeon et al., 2017 Oct 26), meaning that P53 is 1.6 times more lipophilic than P722. It might also be correlated to the 3D structure of P722 in which the phenol in trans position to ferrocene would be less lipophilic than the *trans*-one in P53. By analogy to the quinone methide from P722, the succinimide from P722 could modify the electronic environment of the phenol due to the π -stacking and so modify the lipophilicity of the hydroxyl group (Wang et al., 2019).

LNC hydrodynamic diameters, polydispersity indexes (PDI) and zeta potentials are given in Table 1. Whichever the ferrocifen used and whatever the initial amount added, monodispersed formulations were obtained: PDIs ≤ 0.1 . Blank LNCs, P53-LNCs and P722-LNCs had a hydrodynamic diameter of 53.6 ± 1.0 nm, 46.0 ± 0.8 nm and 50.9 ± 0.2 nm with a zeta potential of -2.7 ± 1.3 mV, -1.8 ± 0.1 mV and -1.7 ± 0.8 mV respectively, close to neutrality. After the post-insertion of the PEGylated phospholipid DPSE-PEG₂₀₀₀ at a concentration of 5 mM, a slight increase of the diameters was observed (variation between 6 % and 12 % according to the formulations), followed by a clear decrease of the zeta potential (values lower than -18.0 mV). This classical decrease of the zeta potential after surface decoration by a PEG shell is explained by the electrical dipole of the PEG moiety (Vonarbourg et al., 2006 Aug).

The formulations of the P53 and P722 ferrocifens were thus successful and in accordance with the previous studies performed in the same research laboratory (Topin-Ruiz et al., 2021 Jan; Karim et al., 2018 Jul 19).

3.2. Preliminary *in vivo* studies of P53-LNCs on the different PDX models

In order to test the efficacy of the formulated P53-LNCs in ovarian cancer, three high OXPPOS PDX models (OV10, OV16 and OV26) and three low OXPPOS PDX model (OV21, OV25 and OV54) were treated. Different groups were formed: a control group treated with saline solution (NaCl 0.9 %), and groups treated with different concentrations of blank LNCs, P53-LNCs, chemotherapy, and combination of chemotherapy with P53-LNCs at full dose and half dose (Table 2). eq. 38* indicates that the same concentration in excipients than the full dose P53-LNCs was administered.

First, tolerance to the treatments was evaluated. The results obtained showed the absence of a significant weight loss of the treated groups, indicating a good tolerance of the different treatments by the mice (Figure S2. in supplementary information).

The chemotherapy treatment, applied on three High OXPPOS (OV10, OV16 and OV26) and three Low OXPPOS (OV21, OV25 and OV54) ovarian cancer models, showed a better response on the High OXPPOS models confirming the results of Mechta Gregouriou et al. (Gentric et al., 2019) (Fig. 2.a and Figure S3 in supplementary information). Indeed, on the last day of measurement (last day where all animals are alive in all groups), chemotherapy “CPT + TAX” (Table 2) led to a significant tumour growth inhibition (TGI) of above 90 % compared to NaCl 0.9 % “control” (Table 2) whatever the High OXPPOS model used, whereas on the Low OXPPOS models OV21 and OV25, a TGI of only 61 %, still significant was obtained with chemotherapy “CPT + TAX” compared to NaCl 0.9 % (Fig. 2.b and Figure S3. in supplementary information). Moreover, whatever the model used, Full Dose P53-LNCs “FD P53-LNCs” and Half Dose P53-LNCs “HD P53-LNCs” (Table 2) did not impact the tumour growth compared to chemotherapy “CPT + TAX”. Hence, it was hypothesized that the majority of P53-LNCs could not reach the tumour site due to rapid recognition by the mononuclear phagocyte system. Indeed, even if the surface of the LNCs is composed of PEG moieties, the steric hindrance from these short chains of PEG (15 PEG monomer units) might not be efficient to avoid the opsonization phenomenon. That is why, for the rest of the project, the formulations were modified by adding a longer PEGylated phospholipid, with 45 PEG monomer units, in order to confer stealth properties to the formulation (Karim et al., 2018 Jul 19; Resnier et al., 2017 Dec).

Furthermore, no difference was obtained between standard chemotherapy “CPT + TAX” and in combination with P53-LNCs “FD P53-LNCs + CPT + TAX” (Table 2) on the three High OXPPOS and two Low OXPPOS models (OV54 and OV25) (Fig. 2 and Figure S3. in supplementary information). For the Low OXPPOS model OV21, a significant

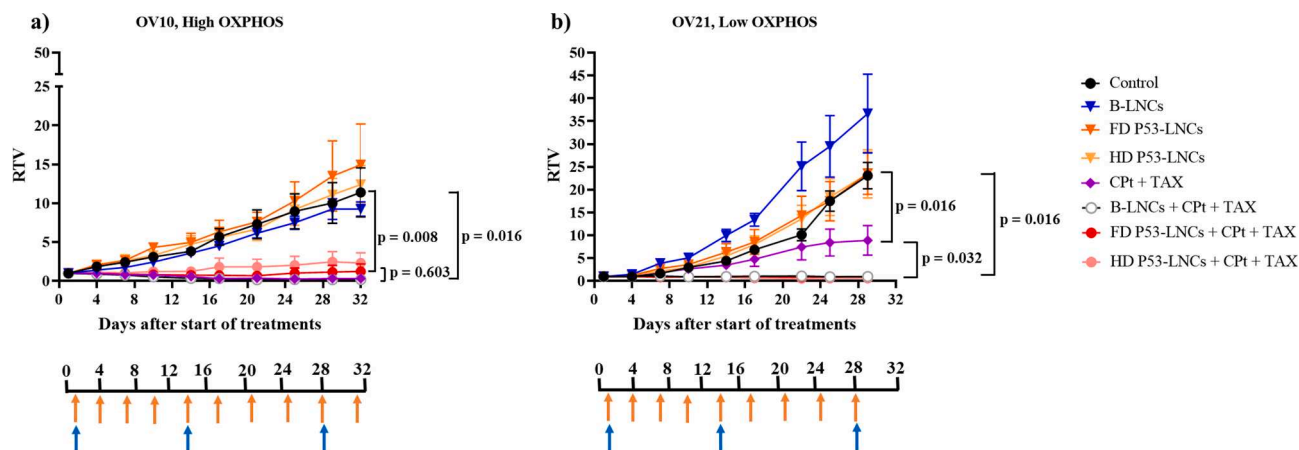


Fig. 2. Tumour growth curves (relative tumour volumes [RTV] = V_n/V_0 as a function of time) of: a) High OXPPOS model OV10 and b) Low OXPPOS model OV21 after different treatments, summarized in Table 2. Timelines indicated days of treatment injection for P53-LNCs or blank LNCs (orange arrow) and for chemotherapies (blue arrow). Data are means \pm SEM ($3 \leq n \leq 5$ mice per group). Statistical analysis was performed with a Mann-Whitney test to compare two groups each other. Data were considered significant for $p < 0.05$.

decrease in RTV of 90 % was observed between “FD P53-LNCs + Cpt + TAX” and “Cpt + TAX”. However, the same biological response is observed with the treatment “B-LNCs + Cpt + TAX”.

Thus, for further studies, the dose of carboplatin and paclitaxel was reduced by half with intraperitoneal injection once every three weeks instead of once every two weeks and the P53 payload in LNCs increased to 4.36 % (the highest possible) in order to highlight the biological effect of the ferrocifen-LNCs. Finally, only the low OXPPOS model OV21 and OV54 were used for further experiments, as they were the most resistant to chemotherapy.

3.3. In vivo activity of stealth P53-LNCs on the selected PDX models

eq. 65* indicates that the same concentration in excipients than the full dose stealth P53-LNCs was administered.

In order to test the efficacy of the formulated stealth P53-LNCs in

ovarian cancer, two PDX models of the Low OXPPOS subtypes of ovarian cancer (OV21 and OV54) were chosen. Different groups were formed: a control group treated with saline solution (NaCl 0.9 %), and groups treated with different concentrations of blank LNCs, stealth P53-LNCs, chemotherapy, and combination of chemotherapy with stealth P53-LNCs at full dose and half dose (Table 3).

First, tolerance studies were performed. As in the preliminary experiment with P53-LNCs, the absence of a significant weight loss of the treated groups was observed, indicating a good tolerance of the different treatments by the mice (Figure S4.a in supplementary information).

On the Low OXPPOS model OV54, the stealth P53-LNCs at full dose or half dose (“FD P53-S-LNCs” and “HD P53-S-LNCs”) and chemotherapy “Cpt + TAX” did not impact the tumour growth compared to NaCl 0.9 % “control”, with a TGI of 17.9 %, 7.8 % and 29.4 % respectively (Fig. 3.a and Table 4). When combining stealth P53-LNCs with

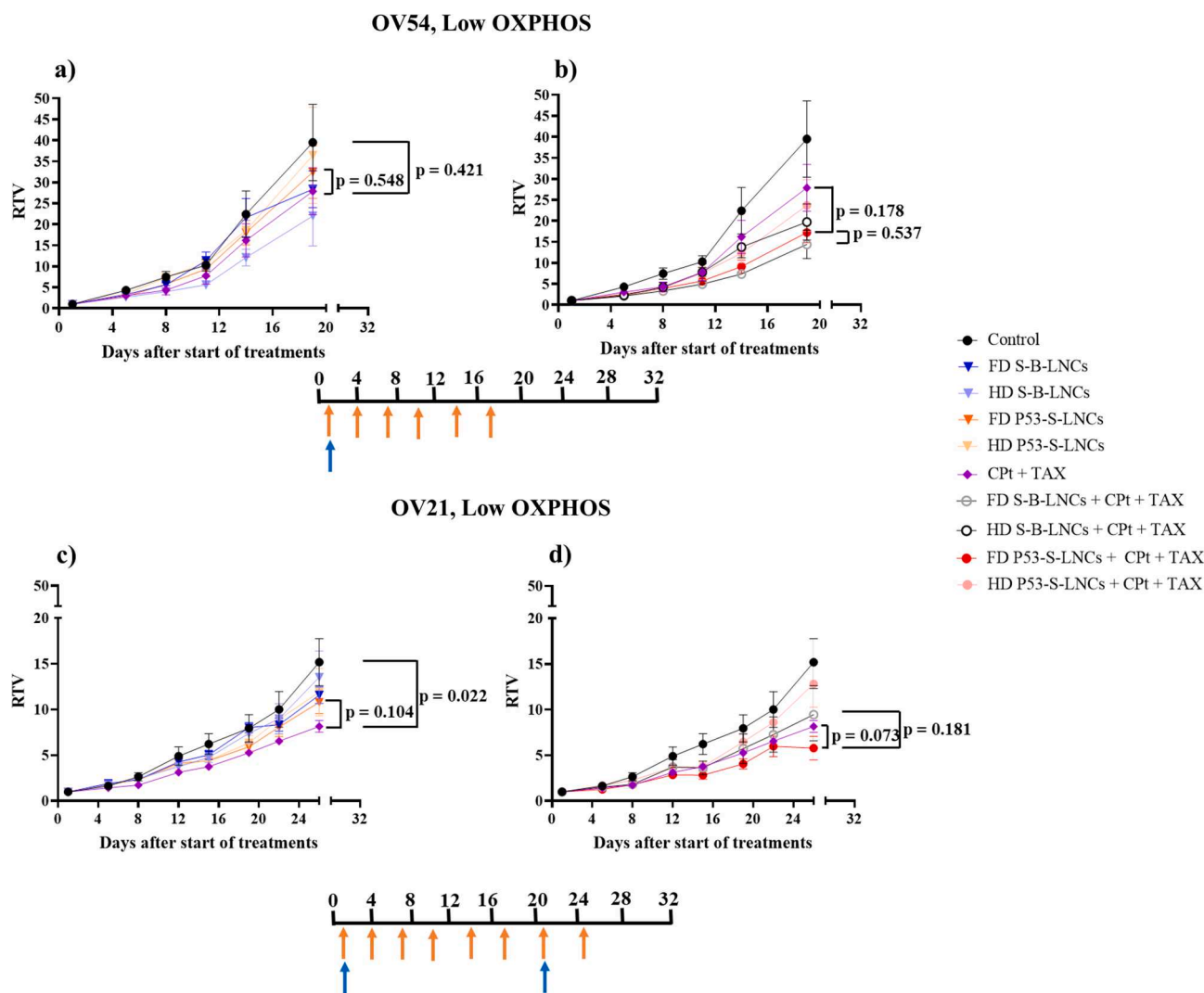


Fig. 3. a) Comparison of the RTV as a function of time of the Low OXPPOS model OV54 treated by stealth blank LNCs “FD S-B-LNCs” (blue triangle), stealth P53-LNCs “FD P53-S-LNCs” (orange triangle) and chemotherapy “Cpt + TAX” (purple diamond); b) Comparison of the RTV as a function of time of the Low OXPPOS model OV54 treated with the combination of stealth blank LNCs and chemotherapy “FD S-B-LNCs + Cpt + TAX” (empty grey circle), combination of stealth P53-LNCs and chemotherapy “FD P53-S-LNCs + Cpt + TAX” (red circle) and chemotherapy “Cpt + TAX” (purple diamond); c) Comparison of the RTV as a function of time of the Low OXPPOS model OV21 treated with stealth blank LNCs “FD S-B-LNCs” (blue triangle), stealth P53-LNCs “FD P53-S-LNCs” (orange triangle) and chemotherapy “Cpt + TAX” (purple diamond); d) Comparison of the RTV as a function of time of the Low OXPPOS model OV21 treated with the combination of stealth blank LNCs and chemotherapy “FD S-B-LNCs + Cpt + TAX” (empty grey circle), combination of stealth P53-LNCs and chemotherapy “FD P53-S-LNCs + Cpt + TAX” (red circle) and chemotherapy “Cpt + TAX” (purple diamond). Timelines indicated days of treatment injection for P53-LNCs or blank LNCs (orange arrow) and for chemotherapies (blue arrow). Data are means ± SEM (5 ≤ n ≤ 8 mice per group). Statistical analysis was performed with a Mann-Whitney test to compare two groups each other. Data were considered significant for p < 0.05.

carboplatin and paclitaxel “FD P53-S-LNCs + Cpt + TAX”, a TGI of 56.4 % was obtained but it was not possible to conclude if this efficiency was due to P53 as a TGI of 63.54 % was obtained with combination of stealth blank LNCs and chemotherapy “FD S-B-LNCs + Cpt + TAX” (Fig. 3.b and Table 4). These results underline the fact that the excipients of the LNC itself can produce a biological response: indeed, due to their lipid nature, blank LNCs could enhance the internalization of carboplatin and paclitaxel in the cell cytoplasm by destabilizing the cell membrane. This potential adjuvant effect of blank LNCs will be tested in further studies.

On the Low OXPPOS model OV21, the stealth P53-LNCs at full dose or half dose (“FD P53-S-LNCs” and “HD P53-S-LNCs”) did not improve the biological response, compared to chemotherapy “Cpt + TAX”. Indeed, a TGI around 25 % at day 26 was obtained with “FD P53-S-LNCs” and “HD P53-S-LNCs” compared to NaCl 0.9 % “control” whereas a significant TGI of 46 % at day 26 was obtained with chemotherapy “Cpt + TAX” compared to “control” (Fig. 3.c and Table 4). Interestingly, the combination of stealth P53-LNCs with chemotherapy “FD P53-S-LNCs + Cpt + TAX” improved the efficacy with a significant TGI of 61.9 % compared to NaCl 0.9 % “control”. Contrary to the Low OXPPOS model OV54, the observed improvement could be due to the encapsulated P53 itself. Indeed, a TGI of 37.8 % was obtained after treatment by the combination of the stealth blank LNCs and chemotherapy “S-B-LNCs

+ Cpt + TAX”, whereas a TGI of 46 % was obtained after the chemotherapy itself “Cpt + TAX”. Moreover, the obtained results showed a good tendency to improve the anticancer effect of chemotherapy when associated with stealth P53-LNCs “FD P53-S-LNCs + Cpt + TAX” with a decrease of 29 % on the RTV compared to chemotherapy “Cpt + TAX” (Fig. 3.d and Table 4). Another way to express the efficacy of the different treatments consists in using the probability of regression curves. These curves are drawn as theoretical survival curves, where the death of a mouse corresponds to the time to reach the doubling of tumour volume (RTV = 2). The results showed a slight, but not significant, improvement in the time to reach RTV = 2 with the combination of the stealth P53-LNCs and chemotherapy “FD P53-S-LNCs + Cpt + TAX” (Fig. 4.b) compared to chemotherapy “Cpt + TAX”, with a median survival of 9.25 days and 8.75 days respectively.

To finish, combining results from the two Low OXPPOS models allowed to express the Overall Response Rate. The combination of stealth P53-LNCs and chemotherapy “FD P53-S-LNCs + Cpt + TAX” improved significantly the quality of response compared to chemotherapy “Cpt + TAX”, with an ORR lower than -0.5 for 69 % and 18 % of treated mice respectively (p = 0.0218) (Fig. 5). However, it was difficult to conclude about the benefit of P53 as 67 % of treated mice with combination of stealth blank LNCs and chemotherapy “FD S-B-LNCs +

OV21, Low OXPPOS, stealth P53-LNCs

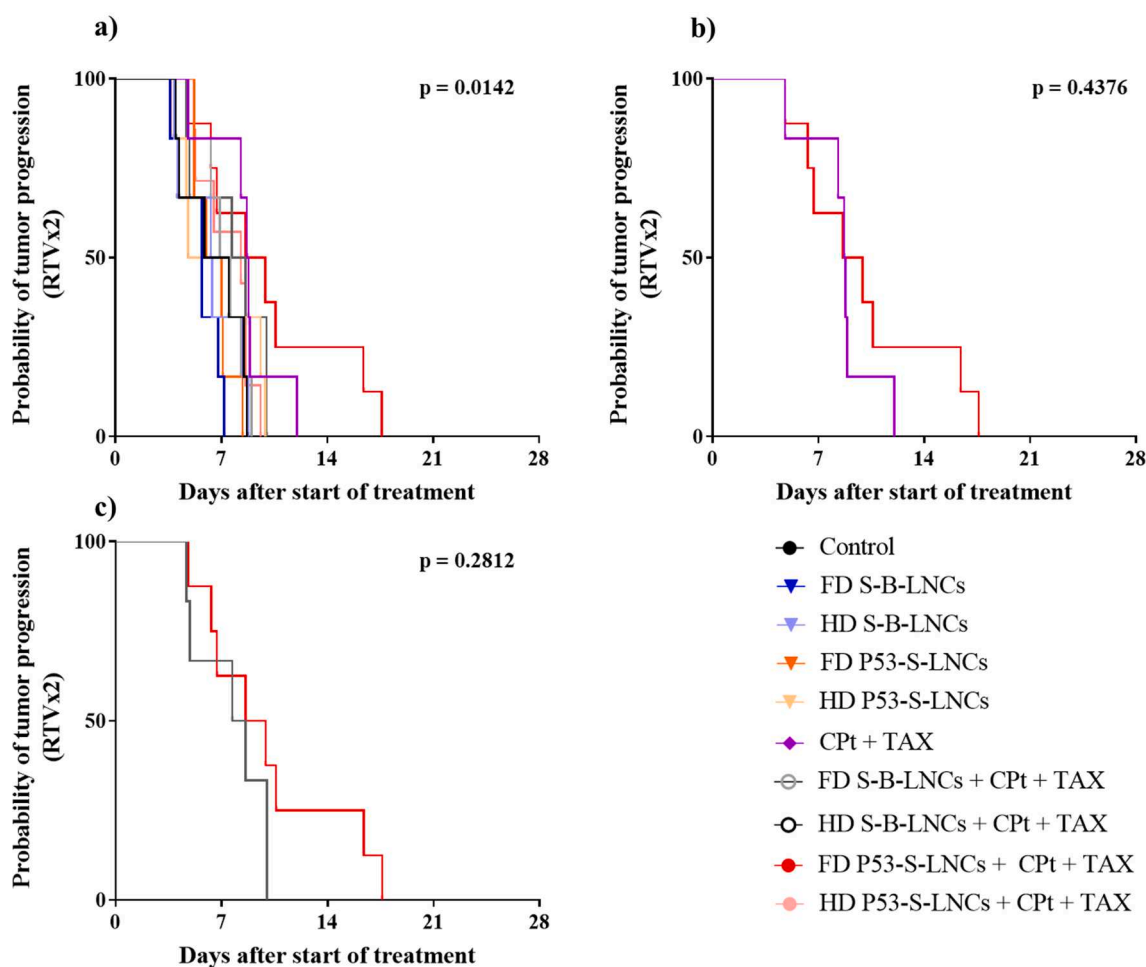


Fig. 4. a) Probability of tumour progression to reach the doubling of tumour volume (RTVx2) (Kaplan-Meier curves) on Low OXPPOS model OV21 after different treatments, summarized in Table 3; b) Comparison of the Kaplan Meier curves obtained on the Low OXPPOS model OV21 with chemotherapy “Cpt + TAX” (purple line) and the combination stealth P53-LNCs and chemotherapy “FD P53-S-LNCs + Cpt + TAX” (red line); c) Comparison of the Kaplan Meier curves obtained on the Low OXPPOS model OV21 with the combination stealth blank LNCs and chemotherapy “FD S-B-LNCs + Cpt + TAX” (grey line) and the combination stealth P53-LNCs and chemotherapy “FD P53-S-LNCs + Cpt + TAX” (red line). Statistical analysis was performed with the Log-rank (Mantel-Cox) test. Data were considered significant for $p < 0.05$.

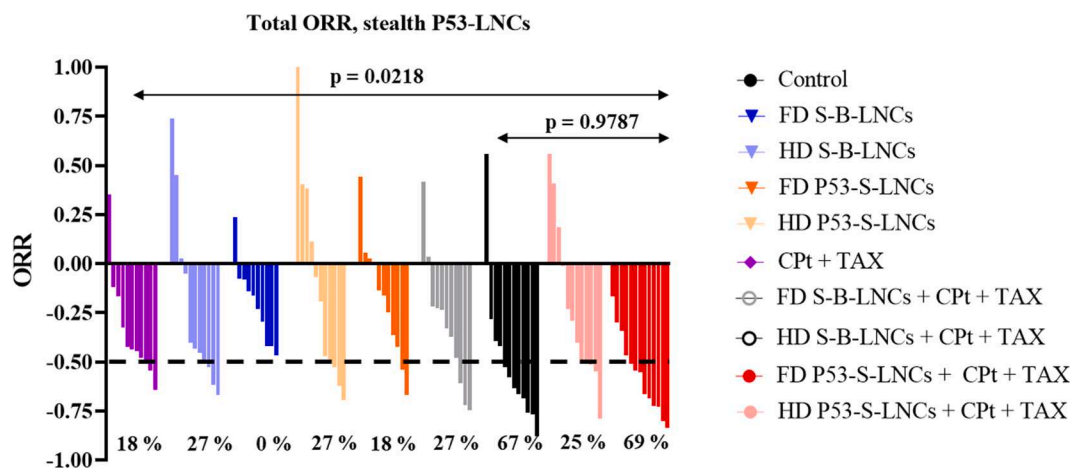


Fig. 5. Overall Response Rate (ORR) of mice from the two Low OXPPOS models, OV21 and OV54, treated with or without P53. Treatments are summarized in Table 3. The ORR was defined as the relative tumour volume variation (RTVV) of each treated mouse calculated from the following formula $[(Vt/Vc)-1]$, where Vt is the volume of the treated mouse and Vc the median volume of the corresponding control group at a time corresponding to the end of treatment.

CPt + TAX” also showed an ORR lower than -0.5 ($p = 0.9787$).

3.4. *In vivo* activity of stealth P722-LNCs on the selected PDX models

The antitumour activity of stealth P722-LNCs was assessed *in vivo* on two Low OXPPOS PDX models (OV21 and OV54). The formulation was administered intravenously twice a week, alone or followed by treatment by carboplatin and paclitaxel (once every three weeks). First, tolerance studies were performed, and the results obtained did not show any significant weight loss in the treated groups, indicating again a good tolerance by the mice of the different treatments (Figure S4.b in supplementary information).

RTV evolution on the two Low OXPPOS model, OV21 and OV54, is shown in Fig. 6.

On the Low OXPPOS model OV54 (Fig. 6.a and 6.b and Table 6), the stealth P722-LNCs “P722-S-LNCs” and chemotherapy “CpT + TAX” did not impact the tumour growth compared to NaCl 0.9 % “control”. When combining stealth P722-LNCs with carboplatin and paclitaxel “P722-S-LNCs + CPy + TAX”, a TGI of 21.7 % was obtained but again, it was not possible to conclude that this efficacy was due to P722 as a TGI of 31.5 % was obtained after treatment by the combination of stealth blank LNCs and chemotherapy “S-B-LNCs + CPT + TAX”. On this model, no antitumour effect was obtained whatever the treatment.

On the Low OXPPOS model OV21, no antitumour activity was induced by chemotherapy, stealth blank LNCs and stealth P722-LNCs (“CpT + TAX”, “S-B-LNCs” and “P722-S-LNCs” respectively, Table 6). In contrast, the combination of chemotherapy and stealth P722-LNCs “P722-S-LNCs + CPT + TAX” showed a tumour growth inhibition of 54 % on the tumour volume compared to carboplatin and paclitaxel alone “CpT + TAX”, similar to what obtained with the combination of stealth P53-LNCs and chemotherapy (46 %, “FD P53-S-LNCs + CPT + TAX”, Table 4). This represents a real improvement given that the dose in P722 was eight times smaller than the concentration in P53 (8 mg/kg versus 65 mg/kg). Moreover, one mouse showed a complete remission after the combination of chemotherapy and stealth P722-LNCs and another one presented a large decrease of its tumour volume until 70 days ($RTV < 0.2$), as shown in Fig. 7.a. Finally, tumoral evolution probability curves showed that the time to reach RTV2 increased significantly when mice were treated with the combination of chemotherapy and stealth P722-LNCs “P722-S-LNCs + CPT + TAX” compared to chemotherapy alone “CpT + TAX” ($p = 0.0322$), with a median survival of 12.2 days and 9.55 days respectively (Fig. 7.b). Even if the results were not significant ($p = 0.1849$) between combination of stealth blank LNCs and chemotherapy “S-B-LNCs + CPT + TAX” and

combination of stealth P722 and chemotherapy “P722-S-LNCs + CPT + TAX” (median survival of 10.65) (Fig. 7.c and Table 4), a clear trend could be seen, indicating that the efficacy observed could be due to the ferrocifen P722 itself. Finally, it was also an improvement compared to the median survival of 9.25 days obtained with the combination of stealth P53-LNCs and chemotherapy “FD P53-S-LNCs + CPT + TAX” (Table 3).

Next, combining results from the two Low OXPPOS models allowed to express the Overall Response Rate. The combination of stealth P722-LNCs and chemotherapy “P722-S-LNCs + CPT + TAX” improved significantly the quality of response compared to chemotherapy “CPT + TAX”, with an ORR lower than -0.5 for 54 % and 8 % of treated mice respectively ($p = 0.0472$) (Fig. 8). For the combination of stealth blank LNCs and chemotherapy “S-B-LNCs + CPT + TAX”, 33 % of mice responders were obtained. Even if the percentage of mice responders was lower for combination of stealth P722-LNCs and chemotherapy “P722-S-LNCs + CPT + TAX” (54 %) compared to combination of stealth P53-LNCs and chemotherapy “FD P53-S-LNCs + CPT + TAX” (69 %), it was possible to conclude about the benefit of P722, as the concentration was eight times smaller than for P53 formulations. One complete remission was even obtained with “P722-S-LNC + CPT + TAX” treatment.

Improvement in the antitumour activity of the treatment combining chemotherapy and stealth P722-LNCs (“P722-S-LNCs + CPT + TAX”, Table 6), compared to the treatment combining chemotherapy and stealth P53-LNCs (“FD P53-S-LNCs + CPT + TAX”, Table 4) could be explained by the IC_{50} values, often lower in various cell lines for the P722 than for the P53: for example, on the ovarian cancer SKOV3 and A2780 cell lines or the breast cancer MDA-MB-231 cell line (Pigeon et al., 2017 Oct 26). This better efficiency *in vitro* and *in vivo* might be due to the greater stability of the quinone methide (QM) obtained from P722 compared to the one obtained from P53. Indeed, P722-QM had a half-life in acetone of about 10 days compared to 30 h for P53-QM, due to a surprising intramolecular lone-pair- π interaction between the oxygen of the succinimide ring and the phenol in the trans position (Wang et al., 2019). This extra stabilizing lone pair- π interaction is unprecedented and possibly provides an explanation for the exceptional cytotoxicity of P722, with IC_{50} in the nanomolar range. Therefore, it is thought that P722-QM could more easily react with biological targets such as thioredoxin reductase (TrxR) and glutathione compared to other ferrocifens already tested (Wang et al., 2016 22;55(35):10431–4.; Citta et al., 2014 Nov 13; Scalcon et al., 2016). Indeed, its electrophilicity would allow it to react with the nucleophilic selenocysteine located in the active site of thioredoxin reductase TrxR via a Michael addition. TrxR, an enzyme of the Trx system involved in redox regulation, is often

OV54, Low OXPPOS

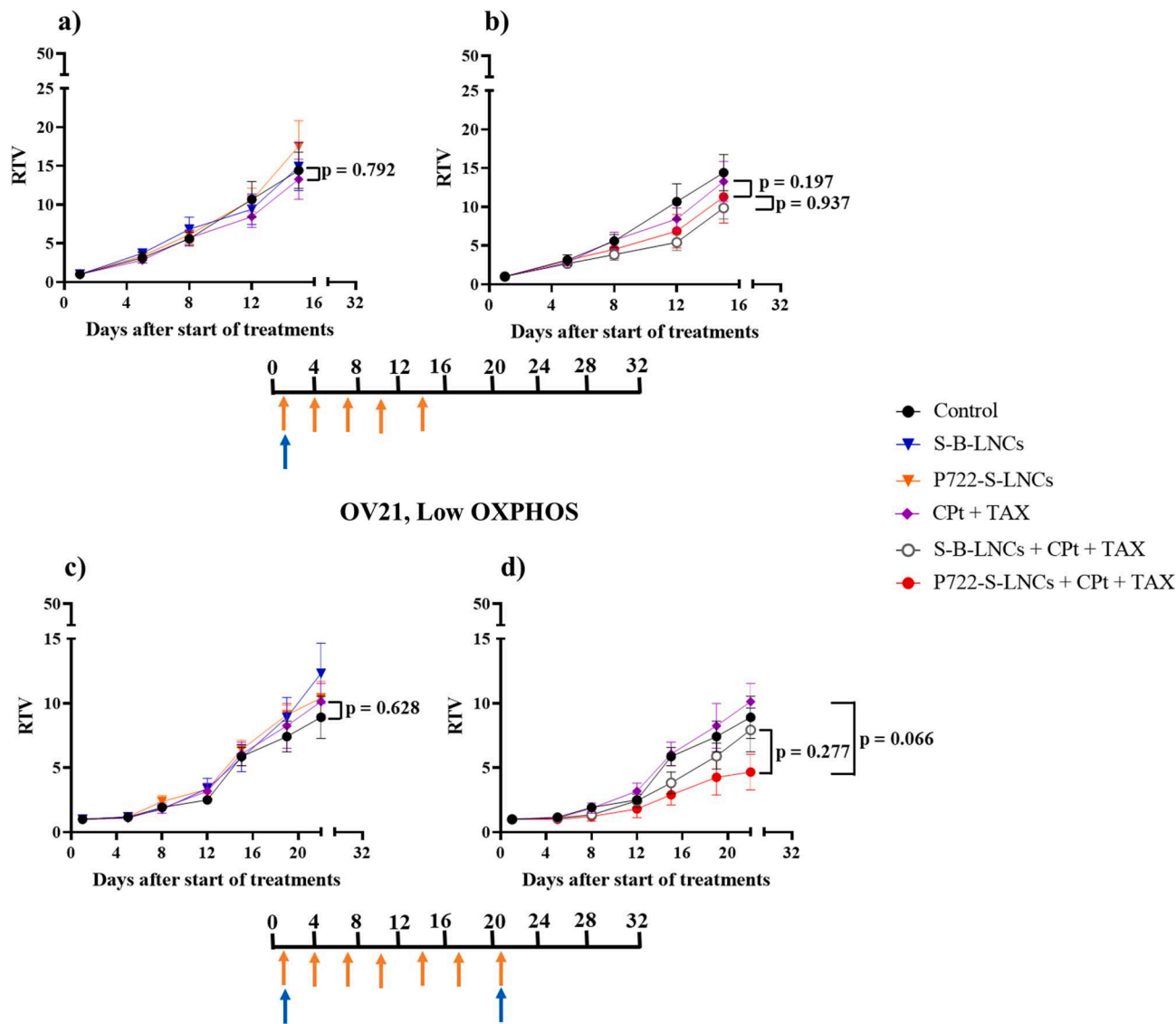


Fig. 6. a) Comparison of the RTV as a function of time of the Low OXPPOS model OV54 treated with stealth blank LNCs “S-B-LNCs” (blue triangle), stealth P722-LNCs “P722-S-LNCs” (orange triangle) and chemotherapy “Cpt + TAX” (purple diamond); b) Comparison of the RTV as a function of time of the Low OXPPOS model OV54 treated with combination of stealth blank LNCs and chemotherapy “S-B-LNCs + Cpt + TAX” (empty grey circle), stealth P722-LNCs and chemotherapy “P722-S-LNCs + Cpt + TAX” (red circle) and chemotherapy “Cpt + TAX” (purple diamond); c) Comparison of the RTV as a function of time of the Low OXPPOS model OV21 treated with stealth blank LNCs “S-B-LNCs” (blue triangle), stealth P722-LNCs “P722-S-LNCs” (orange triangle) and chemotherapy “Cpt + TAX” (purple diamond); d) Comparison of the RTV as a function of time of the Low OXPPOS model OV21 treated with combination of stealth blank LNCs and chemotherapy “S-B-LNCs + Cpt + TAX” (empty grey circle), stealth P722-LNCs and chemotherapy “P722-S-LNCs + Cpt + TAX” (red circle) and chemotherapy “Cpt + TAX” (purple diamond). Timelines indicated days of treatment injection for P53-LNCs or blank LNCs (orange arrow) and for chemotherapies (blue arrow). Data are means ± SEM (5 ≤ n ≤ 7 mice per group). Statistical analysis was performed with a Mann-Whitney test to compare two groups each other. Data are considered significant for p < 0.05.

expressed in cancer cells. Inhibition of the TrxR could counteract the ability of the tumour cell to defend itself against oxidative stress (Arner and Holmgren, 2006 Dec 1; Arner, 2017). Since QM is known as a Michael acceptor, it might be also associated with the reactivation of the tumour suppressor gene TP53, for which mutation is identified in 96 % of ovarian High-Grade-Serous Carcinoma (Cole et al., 2016 May 18). Indeed, it was shown that APR-246, a clinical-stage compound that reactivates the mutant gene TP53, was able to sensitize a cisplatin-resistant ovarian cancer cell line to cisplatin by inhibiting intracellular free glutathione, a protein known in redox regulation, and to increase chemoresistance to platinum therapy (Mohell et al., 2015 Jun). Furthermore, these studies highlighted the role of ROS in ovarian cancer. ROS are essential to initiate the oxidation of Fe(II) to Fe(III) leading

to ROS production in a positive feedback loop and so to higher ROS content in tumour cells (Jaouen et al., 2015 Dec 21). So, it may be possible, as anticipated, that an increase in oxidative stress occurs due to the action of ferrocifen in the Low OXPPOS model OV21, leading to increased sensitivity to carboplatin and paclitaxel as for the High OXPPOS models (Gentric et al., 2019).

It is not the first time that treatment with ferrocifen LNCs, alone or in combination, have shown better *in vivo* efficiency compared to FDA-approved conventional drugs. Indeed, in 2017, Resnier et al. evidenced, on a metastatic melanoma model, higher decrease of the tumour volume after ferrocifen-LNC treatment than for dacarbazine, a chemotherapeutic molecule currently used commercially to treat melanoma (Resnier et al., 2017 Dec). Other studies highlighted antitumour effects

OV21, Low OXPPOS, stealth P722-LNCs

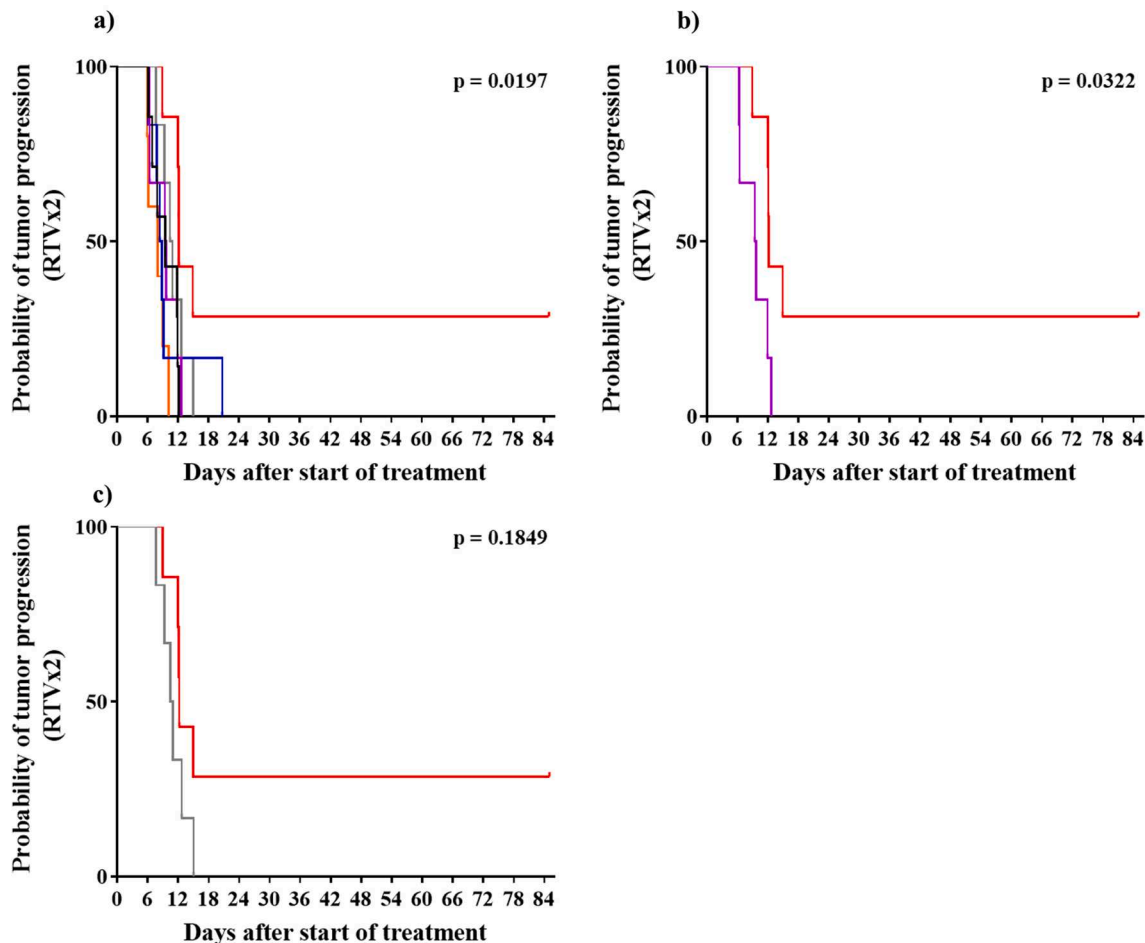


Fig. 7. a) Probability of tumour progression to reach the doubling of tumour volume (RTVx2) (Kaplan-Meier curves) on Low OXPPOS model OV21 after different treatments, summarized in Table 5; b) Comparison of the Kaplan Meier curves obtained on the Low OXPPOS model OV21 with chemotherapy “Cpt + TAX” (purple line) and combination of stealth P722-LNCs and chemotherapy “P722-S-LNCs + Cpt + TAX” (red line); c) Comparison of the Kaplan Meier curves obtained on the Low OXPPOS model OV21 with combination of stealth blank LNCs and chemotherapy “S-B-LNCs + Cpt + TAX” (grey line) and combination of stealth P722-LNCs and chemotherapy “P722-S-LNCs + Cpt + TAX” (red line). Statistical analysis was performed with the Log-rank (Mantel-Cox) test. Data were considered significant for $p < 0.05$.

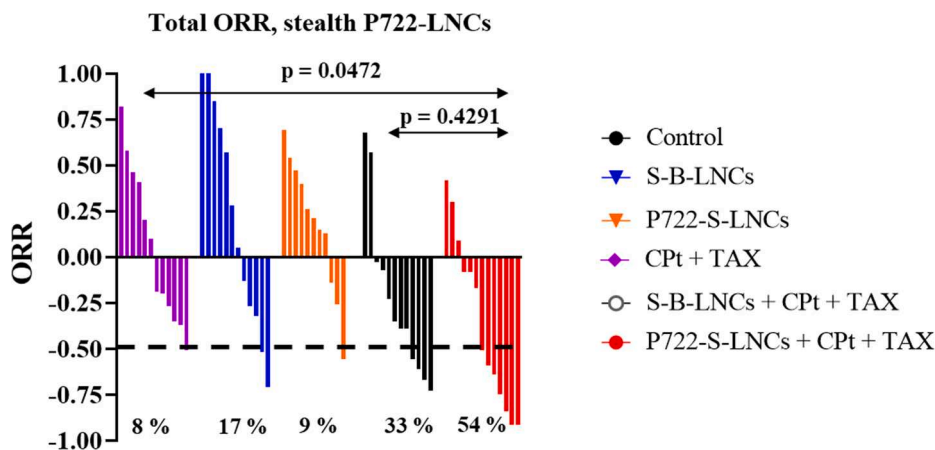


Fig. 8. Overall Response Rate (ORR) of mice from the two Low OXPPOS models, OV21 and OV54, treated with or without P722. Treatments are summarized in Table 4. The ORR was defined as the relative tumour volume variation (RTVV) of each treated mouse calculated from the following formula $[(V_t/V_c)-1]$, where V_t is the volume of the treated mouse and V_c the median volume of the corresponding control group at a time corresponding to the end of treatment.

of different therapies tested on the PDX ovarian cancer model. For example, Bougherara *et al.* showed the potential benefit of targeting anti-Müllerian hormone type II receptor (AMHRII) by combining 3C23K, a humanized monoclonal antibody, with standard chemotherapy (Bougherara *et al.*, 2017 Nov 21). Moreover, Harris *et al.* showed that targeting the HER2 tyrosine-protein kinase receptor by using pertuzumab, a humanized monoclonal antibody, improved the response to standard chemotherapy (carboplatin and paclitaxel) (Harris *et al.*, 2019 Feb). In another study, Qi *et al.* reported that nanoparticle-drug conjugates of monomethyl auristatin E (MMAE), a highly potent toxin, improved the tumour growth inhibition compared to cisplatin (Qi *et al.*, 2017 Dec 18). These studies showed that several strategies could be used to treat ovarian cancer. However, to our knowledge, it is the first time that a treatment with a ROS producer molecule such as ferrocifen potentialized chemotherapy on such advanced preclinical models (Mohell *et al.*, 2015 Jun; Yang *et al.*, 2015 Feb 17), known to be closer to clinical reality (Decaudin, 2011 Oct).

4. Conclusion

Ovarian cancer can be classified according to its mitochondrial metabolism, the High OXPHOS ovarian cancer showing a chemosensitivity to standard chemotherapy and the Low OXPHOS ovarian cancer showing a chemoresistant (Gentric *et al.*, 2019). The objective of this work was to evaluate the efficiency *in vivo* of ferrocifen LNCs, alone or in combination with carboplatin and paclitaxel, on advanced PDX ovarian adenocarcinoma models. Two ferrocifens, P53 and P722, known for their high *in vitro* efficiency on several multidrug-resistant cancer cell lines like ovarian cancer, were encapsulated in LNCs. First, the surface modification of LNCs by the PEGylated phospholipids DSPE-PEG₂₀₀₀ and the increase of P53 payload in LNCs revealed a potentialization of the combination of stealth P53-LNCs and standard chemotherapy. Then, the use of stealth P722-LNCs in combination with chemotherapy showed a similar therapeutic response (reduction around 50 % of the tumour volume). However, P722 concentration was eight times smaller than P53 (8 mg/kg versus 65 mg/kg) and one mouse was even in complete remission. This dose reduction constitutes an expected improvement which could lead to a decrease in side effects and toxicity. For further studies, it could be interesting to evaluate the potential adjuvant effect of LNCs. Some previous studies highlighted the benefits of using stealth LNCs compared to conventional one. Indeed, Hoarau *et al.* demonstrated a blood half-life of 8 h and 1 h for stealth LNCs and conventional LNCs respectively, with a renal and splenic clearance (Hoarau *et al.*, 2004 Oct; Lacoueille *et al.*, 2007 Nov 1; Ballot *et al.*, 2006 May). Years later, Lainé *et al.* confirmed that stealth LNCs exhibited a higher circulation time in blood than conventional one, allowing a better accumulation in tumour site, as shown by Morille *et al.* without any hepatic damage (Lainé *et al.*, 2014 Aug; Morille *et al.*, 2010 Jan).

Nevertheless, this study confirmed the potential therapeutic interest of ferrocifen stealth LNCs in combination with chemotherapy in PDX models, known to be more representative of the tumour microenvironment of human patients. This is opening the way to potent new organometallic anticancer drug candidates for the treatment of chemoresistant cancers.

CRedit authorship contribution statement

Pierre Idlas: Formal analysis, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Abdallah Ladaycia:** Formal analysis, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Fariba Némati:** Formal analysis, Writing – review & editing. **Elise Lepeltier:** Conceptualization, Methodology, Supervision, Writing – review & editing. **Pascal Pigeon:** Conceptualization, Methodology. **Gerard Jaouen:** Conceptualization, Methodology, Writing – review & editing. **Didier Decaudin:** Conceptualization, Methodology, Supervision, Writing – review & editing. **Catherine Passirani:** Conceptualization, Methodology, Supervision,

Writing – review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper: [Catherine Passirani reports financial support was provided by French National Research Agency. Pierre Idlas, Elise Lepeltier, Catherine Passirani reports equipment, drugs, or supplies was provided by SME Feroscan. Pierre Idlas, Catherine Passirani, Elise Lepeltier reports administrative support was provided by COST Action STRATAGEM, CA17104].

Acknowledgements

The authors would like to thank the SME Feroscan for its supply of ferrocifens and COST Action STRATAGEM, CA17104. This work was funded by the Agence Nationale de la Recherche (ANR PRCE NaTeMOC N° ANR-19-CE18-0022-01).

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122164>.

References

- Cancer Tomorrow [Internet]. [cited 2022 Apr 21]. Available from: https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype?type=1&sexes=0&mode=population&group_populations=1&multiple_populations=1&multiple_cancers=0&cancers=25&populations=903_904_905_908_909_935&single_unit=10000.
- Matulonis, U.A., Sood, A.K., Fallowfield, L., Howitt, B.E., Sehoul, J., Karlan, B.Y., 2016 Aug 25. Ovarian cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2 (1), 1–22.
- De Picciotto, N., Cacheux, W., Roth, A., Chappuis, P.O., Labidi-Galy, S.I., 2016 May. Ovarian cancer: Status of homologous recombination pathway as a predictor of drug response. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 101, 50–59.
- Cho, K.R., Shih, I.M., 2009. Ovarian cancer. *Annu. Rev. Pathol.* 4, 287–313.
- da Cunha Colombo Bonadio RR, Fogace RN, Miranda VC, Diz M del PE. Homologous recombination deficiency in ovarian cancer: a review of its epidemiology and management. *Clinics (Sao Paulo)* [Internet]. 2018 [cited 2020 Apr 8];73(Suppl 1). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6096977/>.
- Hanahan, D., 2022 Jan 12. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*. 12 (1), 31–46.
- Gentric G, Mieulet V, Mechta-Grigoriou F. Heterogeneity in Cancer Metabolism: New Concepts in an Old Field. *Antioxid Redox Signal*. 2017 20;26(9):462–85.
- Gentric, G., Kieffer, Y., Mieulet, V., Goundiam, O., Bonneau, C., Nemat, F., et al., 2019. PML-Regulated Mitochondrial Metabolism Enhances Chemosensitivity in Human Ovarian Cancers. *Cell Metab.* 08;29(1):156–173.e10.
- Jaouen, G., Top, S., Vessières, A., Leclercq, G., Quivy, J., Jin, L., et al., 2000 Apr 1. The first organometallic antioestrogens and their antiproliferative effects. *Comptes Rendus de l'Académie des Sci. - Series IIC - Chem.* 3 (2), 89–93.
- Michard, Q., Jaouen, G., Vessières, A., Bernard, B.A., 2008 Nov. Evaluation of cytotoxic properties of organometallic ferrocifens on melanocytes, primary and metastatic melanoma cell lines. *J Inorg Biochem.* 102 (11), 1980–1985.
- Topin-Ruiz, S., Mellinger, A., Lepeltier, E., Bourreau, C., Fouillet, J., Riou, J., et al., 2021 Jan. p722 ferrocifen loaded lipid nanocapsules improve survival of murine xenografted-melanoma via a potentiation of apoptosis and an activation of CD8+ T lymphocytes. *Int. J. Pharm.* 25 (593), 120111.
- Hillard, E., Vessières, A., Le Bideau, F., Plazuk, D., Spera, D., Huché, M., et al., 2006 May. A series of unconjugated ferrocenyl phenols: prospects as anticancer agents. *ChemMedChem.* 1 (5), 551–559.
- Wang, Y., Pigeon, P., Top, S., McGlinchey, M.J., Jaouen, G., 2015 Aug 24. Organometallic antitumor compounds: ferrocifens as precursors to quinone methides. *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* 54 (35), 10230–10233.
- Wang, Y., Dansette, P.M., Pigeon, P., Top, S., McGlinchey, M.J., Mansuy, D., et al., 2018 Jan 7. A new generation of ferrociphenols leads to a great diversity of reactive metabolites, and exhibits remarkable antiproliferative properties. *Chem. Sci.* 9 (1), 70–78.
- Pigeon, P., Wang, Y., Top, S., Najlaoui, F., Garcia Alvarez, M.C., Bignon, J., et al., 2017 Oct 26. A new series of succinimido-ferrociphenols and related heterocyclic species induce strong antiproliferative effects, especially against ovarian cancer cells resistant to cisplatin. *J. Med. Chem.* 60 (20), 8358–8368.
- Lollo, G., Ullio-Gamboa, G., Fuentes, E., Matha, K., Lautram, N., Benoit, J.P., 2018 Oct. *In vitro* anti-cancer activity and pharmacokinetic evaluation of curcumin-loaded lipid nanocapsules. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 1 (91), 859–867.
- Najlaoui, F., Pigeon, P., Aroui, S., Pezet, M., Sancey, L., Marrakchi, N., et al., 2018 Nov. Anticancer properties of lipid and poly(ϵ -caprolactone) nanocapsules loaded with ferrocenyl-tamoxifen derivatives. *J. Pharm. Pharmacol.* 70 (11), 1474–1484.

- Buriez, O., Heldt, J.M., Labbé, E., Vessières, A., Jaouen, G., Amatore, C., 2008 Sep 19. Reactivity and Antiproliferative Activity of Ferrocenyl-Tamoxifen Adducts with Cyclodextrins against hormone-independent breast-cancer cell lines. *chemistry – A. Eur. J.* 14 (27), 8195–8203.
- Idlas, P., Lepeltier, E., Jaouen, G., Passirani, C., 2021 May 11. Ferrocifen Loaded Lipid Nanocapsules: a promising anticancer medication against multidrug resistant tumors. *Cancers (Basel)*. 13 (10), 2291.
- Karim, R., Lepeltier, E., Esnault, L., Pigeon, P., Lemaire, L., Lépinoux-Chambaud, C., et al., 2018 Jul 19. Enhanced and preferential internalization of lipid nanocapsules into human glioblastoma cells: effect of a surface-functionalizing NFL peptide. *Nanoscale*. 10 (28), 13485–13501.
- Lainé, A.L., Gravier, J., Henry, M., Sancey, L., Béjaud, J., Pancani, E., et al., 2014 Aug. Conventional versus stealth lipid nanoparticles: formulation and in vivo fate prediction through FRET monitoring. *J Control Release*. 28 (188), 1–8.
- Huynh, N.T., Morille, M., Bejaud, J., Legras, P., Vessières, A., Jaouen, G., et al., 2011 Dec. Treatment of 9L gliosarcoma in rats by ferrociphenol-loaded lipid nanocapsules based on a passive targeting strategy via the EPR effect. *Pharm. Res.* 28 (12), 3189–3198.
- Morille, M., Montier, T., Legras, P., Carmoy, N., Brodin, P., Pitard, B., et al., 2010 Jan. Long-circulating DNA lipid nanocapsules as new vector for passive tumor targeting. *Biomaterials*. 31 (2), 321–329.
- Decaudin, D., 2011 Oct. Primary human tumor xenografted models ('tumorgrafts') for good management of patients with cancer. *Anticancer Drugs*. 22 (9), 827–841.
- Laurent, C., Gentien, D., Piperno-Neumann, S., Némati, F., Nicolas, A., Tesson, B., et al., 2013 Jun. Patient-derived xenografts recapitulate molecular features of human uveal melanomas. *Mol. Oncol.* 7 (3), 625–636.
- Royal, F., Guyader, C., Decraene, C., Lucchesi, C., Auger, N., Assayag, F., et al., 2012 Jan 16. Molecular profiling of patient-derived breast cancer xenografts. *Breast Cancer Res.* 14 (1), R11.
- Gao, H., Korn, J.M., Ferretti, S., Monahan, J.E., Wang, Y., Singh, M., et al., 2015 Nov. High-throughput screening using patient-derived tumor xenografts to predict clinical trial drug response. *Nat. Med.* 21 (11), 1318–1325.
- Izumchenko, E., Paz, K., Ciznadija, D., Sloma, I., Katz, A., Vasquez-Dunddel, D., et al., 2017 Oct 1. Patient-derived xenografts effectively capture responses to oncology therapy in a heterogeneous cohort of patients with solid tumors. *Ann. Oncol.* 28 (10), 2595–2605.
- Pigeon, P., Görmén, M., Kowalski, K., Müller-Bunz, H., McGlinchey, M.J., Top, S., et al., 2014 Jul. Atypical McMurry Cross-Coupling Reactions Leading to a New Series of Potent Antiproliferative Compounds Bearing the Key [Ferrocenyl-Ene-Phenol] Motif. *Molecules*. 19 (7), 10350–10369.
- Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Proust, J.E., Benoit, J.P., 2002 Jun. A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. *Pharm. Res.* 19 (6), 875–880.
- Resnier, P., Galopin, N., Sibiril, Y., Clavreul, A., Cayon, J., Briganti, A., et al., 2017 Dec. Efficient ferrocifen anticancer drug and Bcl-2 gene therapy using lipid nanocapsules on human melanoma xenograft in mouse. *Pharmacol. Res.* 126, 54–65.
- Gruosso, T., Garnier, C., Abelanet, S., Kieffer, Y., Lemesre, V., Bellanger, D., et al., 2015 Oct. MAP3K8/TPL-2/COT is a potential predictive marker for MEK inhibitor treatment in high-grade serous ovarian carcinomas. *Nat. Commun.* 12 (6), 8583.
- Wang, Y., Pigeon, P., Top, S., Sanz García, J., Troufflard, C., Ciofini, I., et al., 2019. Atypical Lone Pair- π Interaction with Quinone Methides in a Series of Imido-Ferrociphenol Anticancer Drug Candidates. *Angew Chem Int Ed Engl.* 17;58(25): 8421–5.
- Vonarbourg, A., Passirani, C., Saulnier, P., Benoit, J.P., 2006 Aug. Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems. *Biomaterials*. 27 (24), 4356–4373.
- Huynh, N.T., Passirani, C., Allard-Vannier, E., Lemaire, L., Roux, J., Garcion, E., et al., 2012 Feb 14. Administration-dependent efficacy of ferrociphenol lipid nanocapsules for the treatment of intracranial 9L rat gliosarcoma. *Int. J. Pharm.* 423 (1), 55–62.
- Wang Y, Richard MA, Top S, Dansette PM, Pigeon P, Vessières A, et al. Ferrocenyl Quinone Methide-Thiol Adducts as New Antiproliferative Agents: Synthesis, Metabolic Formation from Ferrociphenols, and Oxidative Transformation. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2016 22;55(35):10431–4.
- Citta, A., Folda, A., Bindoli, A., Pigeon, P., Top, S., Vessières, A., et al., 2014 Nov 13. Evidence for Targeting Thioredoxin Reductases with Ferrocenyl Quinone Methides. A possible molecular basis for the antiproliferative effect of hydroxyferrocifens on cancer cells. *J Med Chem.* 57 (21), 8849–8859.
- Scalcon, V., Citta, A., Folda, A., Bindoli, A., Salmain, M., Ciofini, I., et al., 2016. Enzymatic oxidation of ansa-ferrocifen leads to strong and selective thioredoxin reductase inhibition in vitro. *J. Inorg. Biochem.* 165, 146–151.
- Arné, E.S.J., Holmgren, A., 2006 Dec 1. The thioredoxin system in cancer. *Seminars in Cancer Biol.* 16 (6), 420–426.
- Arné, E.S.J., 2017. Targeting the Selenoprotein Thioredoxin Reductase 1 for Anticancer Therapy. *Adv. Cancer Res.* 136, 139–151.
- Cole, A.J., Dwight, T., Gill, A.J., Dickson, K.A., Zhu, Y., Clarkson, A., et al., 2016 May 18. Assessing mutant p53 in primary high-grade serous ovarian cancer using immunohistochemistry and massively parallel sequencing. *Sci. Rep.* 6 (1), 26191.
- Mohell, N., Alfredsson, J., Fransson, Å., Uustalu, M., Byström, S., Gullbo, J., et al., 2015 Jun. APR-246 overcomes resistance to cisplatin and doxorubicin in ovarian cancer cells. *Cell Death Dis.* 6 (6).
- Jaouen, G., Vessières, A., Top, S., 2015 Dec 21. Ferrocifen type anti cancer drugs. *Chem. Soc. Rev.* 44 (24), 8802–8817.
- Bougherara, H., Némati, F., Nicolas, A., Massonnet, G., Pugnère, M., Ngô, C., et al., 2017 Nov 21. The humanized anti-human AMHRII mAb 3C23K exerts an anti-tumor activity against human ovarian cancer through tumor-associated macrophages. *Oncotarget.* 8 (59), 99950–99965.
- Harris, F.R., Zhang, P., Yang, L., Hou, X., Leventakos, K., Weroha, S.J., et al., 2019 Feb. Targeting HER2 in patient-derived xenograft ovarian cancer models sensitizes tumors to chemotherapy. *Mol. Oncol.* 13 (2), 132–152.
- Qi, R., Wang, Y., Bruno, P.M., Xiao, H., Yu, Y., Li, T., et al., 2017 Dec 18. Nanoparticle conjugates of a highly potent toxin enhance safety and circumvent platinum resistance in ovarian cancer. *Nat. Commun.* 8 (1), 2166.
- Yang, X., Lyer, A.K., Singh, A., Choy, E., Hornicek, F.J., Amiji, M.M., et al., 2015 Feb 17. MDR1 siRNA loaded hyaluronic acid-based CD44 targeted nanoparticle systems circumvent paclitaxel resistance in ovarian cancer. *Sci. Rep.* 5 (1), 8509.
- Hoarau, D., Delmas, P., David, S., Roux, E., Leroux, J.C., 2004 Oct. Novel long-circulating lipid nanocapsules. *Pharm. Res.* 21 (10), 1783–1789.
- Lacoeuille, F., Hindre, F., Moal, F., Roux, J., Passirani, C., Couturier, O., et al., 2007 Nov 1. In vivo evaluation of lipid nanocapsules as a promising colloidal carrier for paclitaxel. *Int. J. Pharm.* 344 (1–2), 143–149.
- Ballot, S., Noiret, N., Hindré, F., Denizot, B., Garin, E., Rajerison, H., et al., 2006 May. ^{99m}Tc/¹⁸⁸Re-labelled lipid nanocapsules as promising radiotracers for imaging and therapy: formulation and biodistribution. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 33 (5), 602–607.

Supplementary Information

Ferrocifen stealth LNCs and conventional chemotherapy: a promising combination against multidrug-resistant ovarian adenocarcinoma

Pierre Idlas¹, Abdallah Ladaycia¹, Fariba Némati², Elise Lepeltier^{1*}, Pascal Pigeon³, Gerard Jaouen³, Didier Decaudin^{2,4} and Catherine Passirani¹

¹ Micro et Nanomédecines Translationnelles, MINT, UNIV Angers, INSERM 1066, CNRS 6021, Angers, France

² Translational Research Department, Laboratory of preclinical Investigation, PSL University, Institut Curie, 26 rue d'Ulm, Paris 75248, France

³ PSL Chimie Paris Tech, 11 rue P. et M. Curie and Sorbonne Université IPCM, CNRS, UMR 8232, IPCM, Paris, 75005, France

⁴ Department of Medical Oncology, Institut Curie, 26 rue d'Ulm, Paris 75248, France

*corresponding author

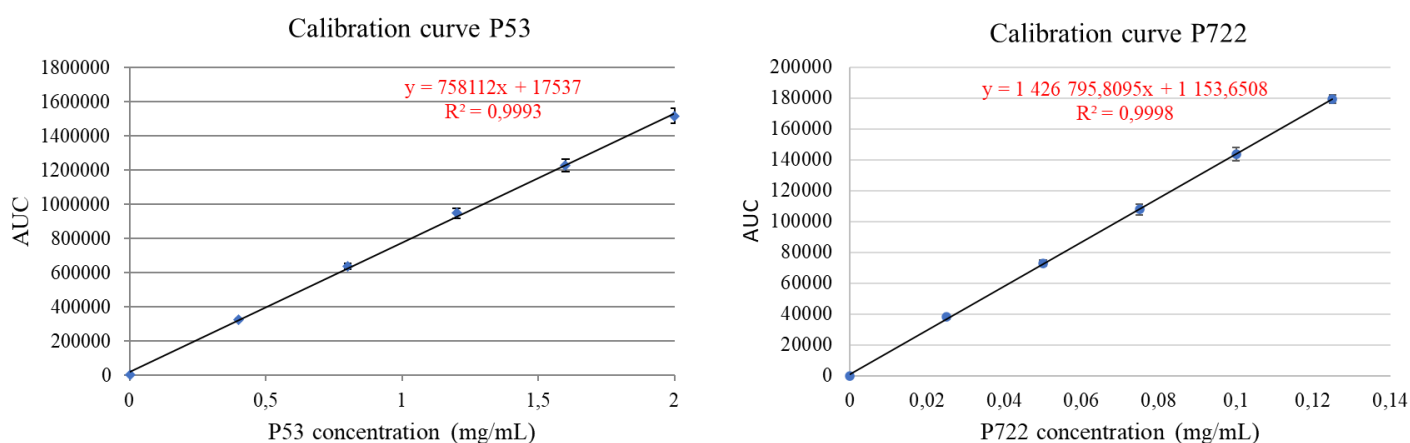


Figure S1. Calibration curve obtained by UPLC method for P53 and for P722 ($n = 3 \pm SD$).

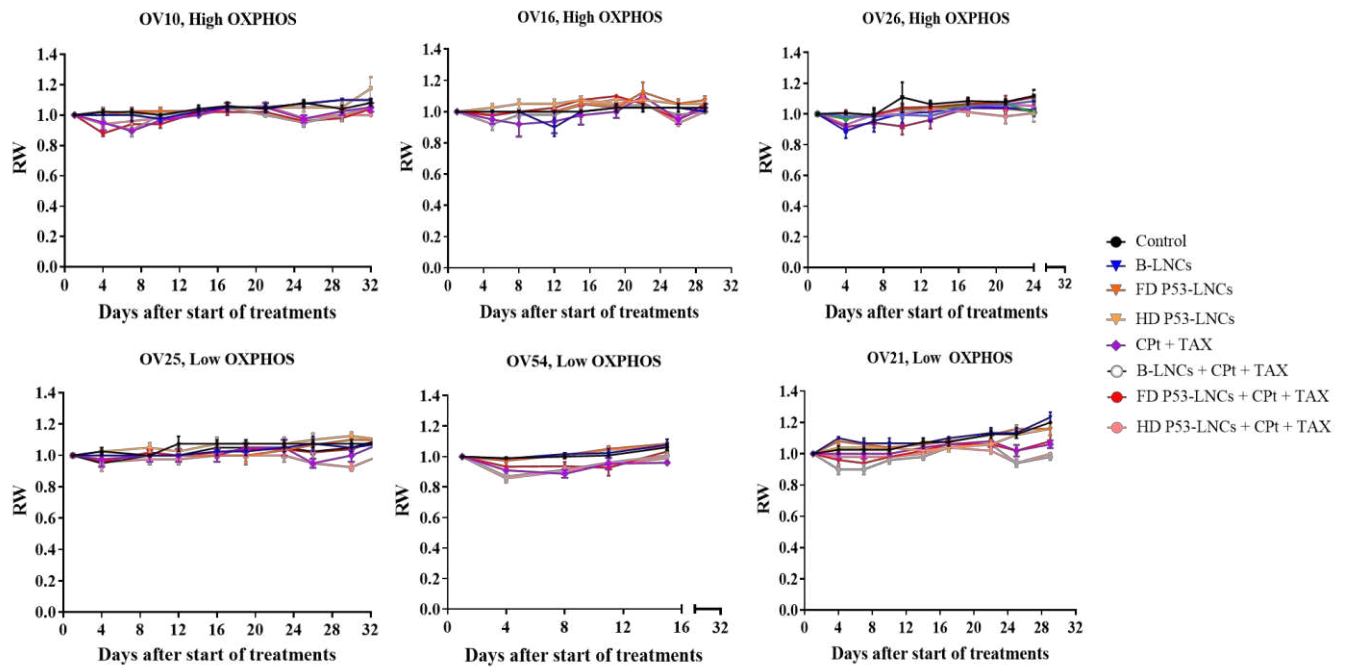


Figure S2. Relative weight (RW) of mice over time after the different treatments, summarized in **Table 2**. Data are means \pm SEM ($3 \leq n \leq 5$ mice per group).

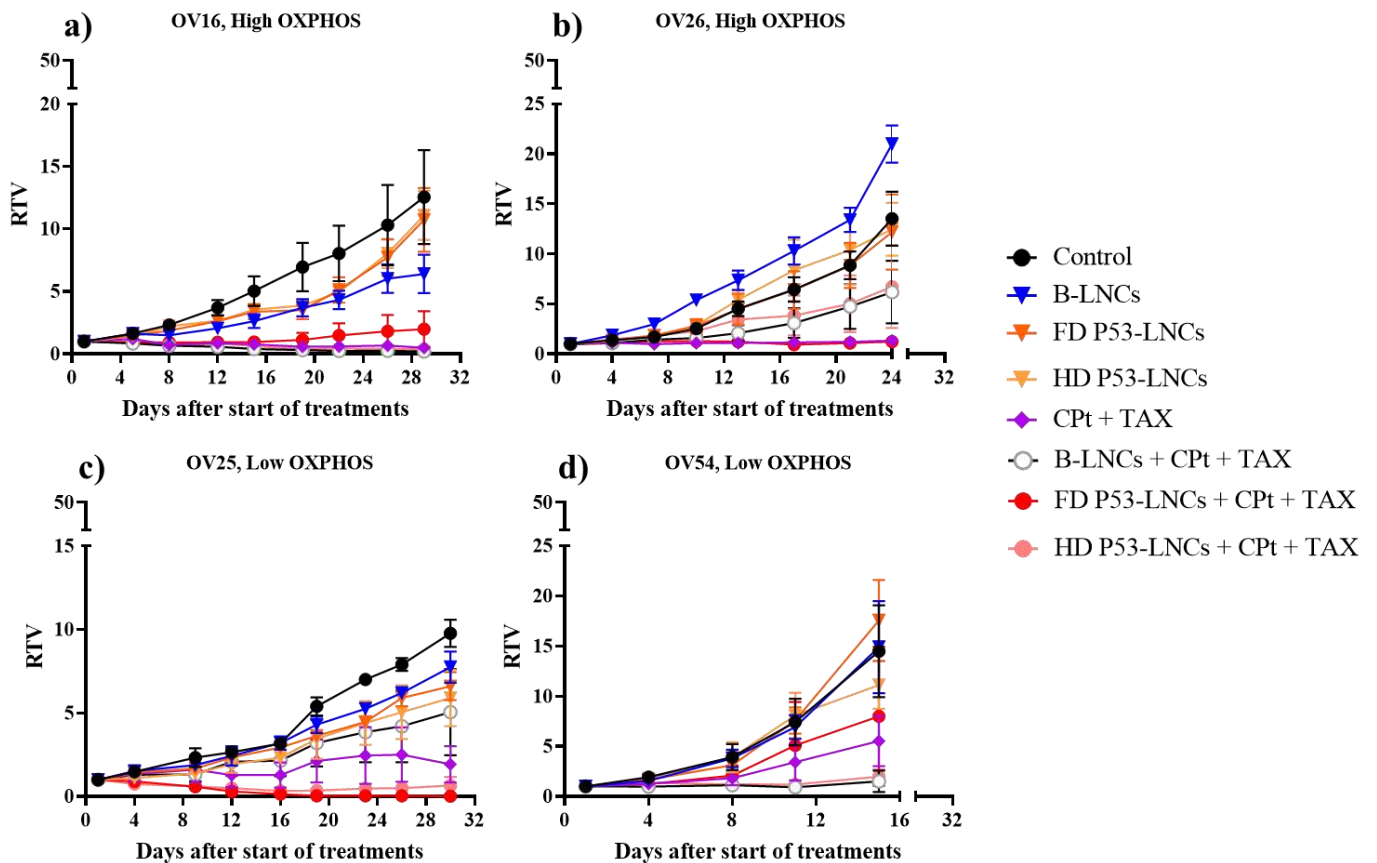


Figure S3. Tumour growth curves (relative tumour volumes $[RTV] = V_t/V_0$ as a function of time) after treatment with blank LNCs, P53-LNCs, standard chemotherapy (carboplatin and paclitaxel) and association of chemotherapy with blank LNCs and P53-LNCs. a) For the High OXPPOS model OV16; b) For the High OXPPOS model OV26;

c) For the Low OXPPOS model OV25; d) For the Low OXPPOS model OV54. **Table 2** summarizes the different treatments. Data are means \pm SEM ($5 \leq n \leq 8$ mice per group).

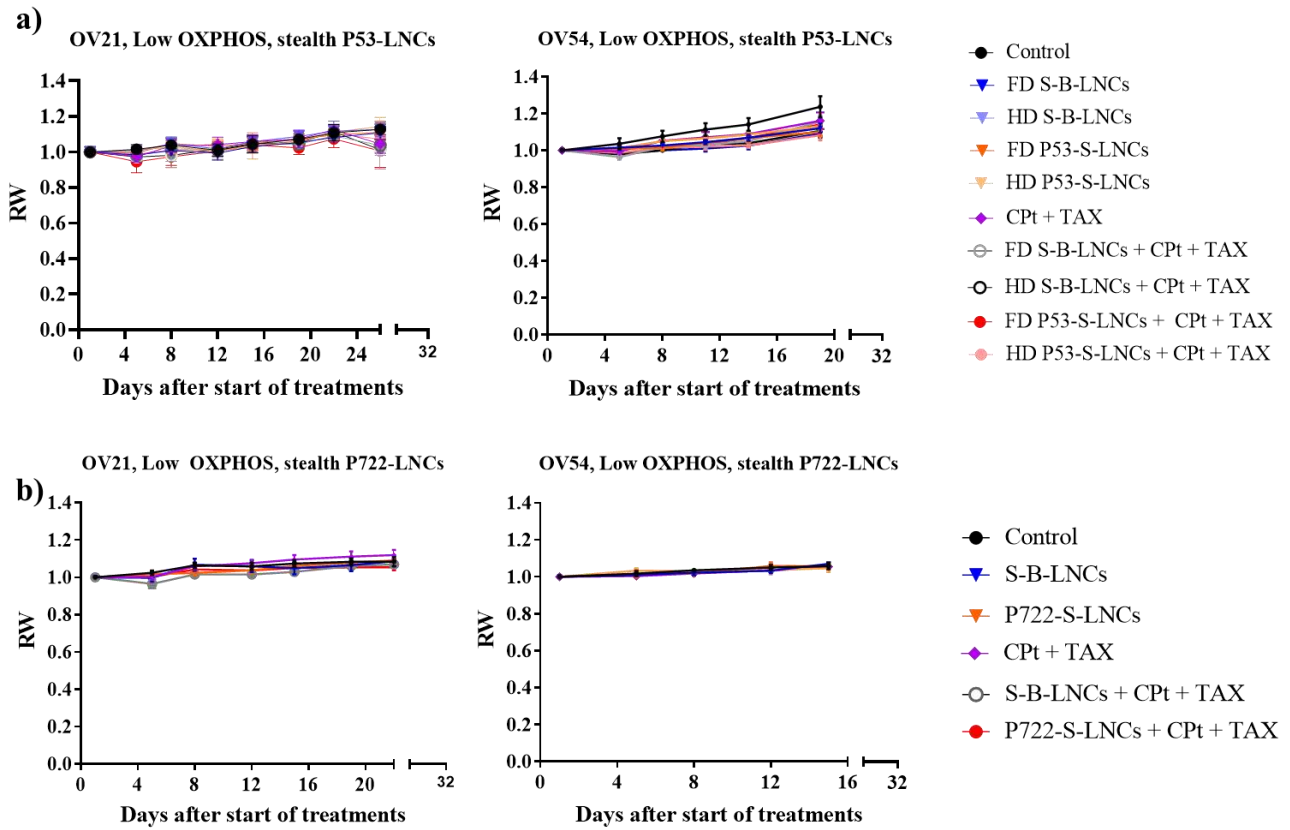


Figure S4. Relative weight (RW) of mice with time after the different treatments tested: a) RW evolution of mice after treatment by stealth P53-LNCs on the two selected Low OXPPOS models, OV21 and OV54. **Table 3** summarizes the different treatments; b) RW evolution of mice after treatment by stealth P722-LNCs on OV21 and OV54. **Table 5** describes the different treatments. Data are means \pm SEM ($5 \leq n \leq 7$ mice per group).

3. Conclusion

Cette étude a débuté avant ce projet de thèse, lors de la thèse d'Abdallah Ladaycia, avec les formulations **P53**-LNCs conventionnelles et **P53**-LNCs furtives à une concentration maximale de 13 mg/mL (équivalent à 43,6 mg/g d'excipients lipophiles). Par la suite, des formulations **P722**-LNCs furtives à 1,6 mg/mL (équivalent à une charge maximale de 5,6 mg/g d'excipients lipophiles) ont été préparées et envoyées à l'Institut Curie. Les différentes formulations ont été administrées par voie intraveineuse en traitement seul ou en combinaison avec le carboplatine (33 mg/kg de souris) et le paclitaxel (15 mg/kg de souris), injectés en intrapéritonéale, pour étudier l'efficacité sur des modèles « PDX » de cancer de l'ovaire greffés sur des souris. Les derniers tests d'efficacité avec les formulations ferrocifène-LNCs furtives ont été réalisés sur deux modèles dit « Low OXPPOS », modèle OV21 et modèle OV54.

Cette étude *in vivo* a permis de mettre en évidence que le ferrocifène **P722** pouvait être considéré comme la molécule « lead » de la famille des ferrocifènes. En effet, la combinaison de traitement **P722**-LNCs furtives (8 mg/kg) et chimiothérapie conventionnelle (carboplatine et paclitaxel) a permis d'obtenir une réduction tumorale significativement plus importante qu'avec la chimiothérapie conventionnelle seule, sur le modèle « Low OXPPOS » OV21, avec une souris en rémission complète et une autre présentant un volume tumoral très faible et constant (RTV < 0,05) pendant 70 jours.

Afin d'aller plus loin et de cibler spécifiquement les cellules cancéreuses ovariennes, la formulation **P722**-LNCs sera fonctionnalisée en ajoutant à la surface des LNCs un peptide pénétrant, spécifique des tumeurs de l'ovaire. Cette étude sera décrite dans le chapitre suivant.

Chapitre 4

Chapitre 4. Modification de surface des nanocapsules lipidiques par greffage d'un peptide pénétrant spécifique des cellules cancéreuses de l'ovaire et évaluation de la cinétique d'internalisation cellulaire

1. Introduction

Dans le chapitre 3 concernant l'évaluation *in vivo* de formulations furtives de **P53**-LNCs et de **P722**-LNCs sur des modèles de tumeurs ovariennes dérivées de patientes humaines et greffées sur souris, il a été montré que la formulation **P722**-LNCs furtives, injectée à 8 mg/kg de souris et associée à la chimiothérapie conventionnelle (carboplatine et paclitaxel), permettait de potentialiser cette dernière. En effet, le taux de réponse globale des souris à la combinaison de traitement **P722**-LNCs furtives, carboplatine et paclitaxel, a été amélioré significativement par rapport à la chimiothérapie seule. De plus, une souris était en rémission complète et une autre possédait un volume tumoral très faible pendant 70 jours après l'utilisation de cette combinaison de traitements. Ce résultat prometteur a été obtenu avec une formulation possédant des propriétés de furtivité due à la présence d'un phospholipide PEGylé, le DSPE-PEG₂₀₀₀. Comme expliqué dans l'introduction générale, l'utilisation de composés PEGylés permet d'éviter en partie les phénomènes d'opsonisation par répulsion stérique, après injection intraveineuse. Cela favorise ainsi l'accumulation du nano-système administré au niveau du site tumoral, phénomène plus connu sous le nom d'effet « EPR ». Cette stratégie a été nommée « ciblage passif » par la communauté scientifique. Cependant, utiliser cette stratégie ne permet pas de cibler spécifiquement les cellules tumorales et donc de réduire les effets de toxicité sur les cellules saines. Ainsi, utiliser des molécules permettant de reconnaître préférentiellement des cibles surexprimées à la surface des cellules cancéreuses pourrait permettre de réaliser un ciblage actif. La dernière partie de ce projet de thèse repose sur cette idée.

Dans l'état de l'art, les peptides pénétrants ont été décrits. Ces peptides, dont la chaîne d'acides aminés ne dépasse pas 30 résidus, possèdent des propriétés d'internalisation cellulaire particulièrement remarquables. Ces peptides sont utilisés pour décorer notamment la surface des nanoparticules. De plus, certains peptides pénétrants peuvent aussi reconnaître préférentiellement des récepteurs cellulaires surexprimés. C'est notamment le cas du peptide TLS. En effet, les auteurs d'une étude publiée en 2013 dans le journal *Biotechnology Letter* ont mis en évidence que la séquence TLSGAFELSRDK possédait des propriétés de ciblage de la lignée cellulaire SKOV3 de cancer de l'ovaire. Cela a été attribué au motif RDK en position C-Ter du peptide, permettant d'interagir avec les protéoglycanes, surexprimés à la surface des cellules cancéreuses ovariennes, par rapport aux cellules saines. De plus, ce peptide posséderait des propriétés cytotoxiques, par un mécanisme d'apoptose.

Ainsi, le but de cette dernière partie a été de modifier la surface des **P722**-LNCs, utilisées lors de l'étude d'efficacité *in vivo*, par le peptide pénétrant TLS. L'adsorption du peptide TLS à la surface des **P722**-LNCs a d'abord été étudiée, mais sans succès. Une stratégie de décoration de la surface via une addition de Michael entre un thiol et un maléimide a donc ensuite été réalisée.

Dans un premier temps, le peptide CTLS a été synthétisé par synthèse de Merrifield assistée par microondes, en stratégie Fmoc, purifié puis caractérisé. La cystéine a été rajoutée en position N-Ter de la séquence TLGAFELSRDK afin de laisser la position C-Ter accessible. Ensuite, comme pour obtenir les **P722**-LNCs furtives, le phospholipide DSPE-PEG₂₀₀₀-Maléimide a été post-inséré dans la membrane des LNCs afin de permettre l'addition de Michael avec le soufre provenant de la cystéine du peptide CTLS. Le greffage covalent a été vérifié par analyse RMN ainsi que par analyse chromatographique, de manière indirecte. A noter que le peptide CTLS a été greffé aux concentrations de 1 mM et 3 mM. Ces formulations **P722**-LNCs-CTLS ont ensuite été caractérisées par diffusion dynamique de la lumière pour obtenir le diamètre, le PDI ainsi que le potentiel zêta des **P722**-LNCs modifiées. Le comportement dans le sang, *in vitro*, des différentes formulations obtenues a été étudié en regardant l'activation du système du complément, groupe de protéines connues dans l'élimination de pathogènes (immunité innée). Enfin, une cinétique d'internalisation des différentes formulations a été réalisée par cytométrie en flux sur les lignées cellulaires SKOV3 de cancer de l'ovaire et U87MG de glioblastome afin de vérifier la capacité de ciblage supposée des cellules du cancer de l'ovaire.

2. Cell penetrating peptide functionalized lipid nanocapsules to specifically target ovarian cancer cell: an *in vitro* study

Cell penetrating peptide functionalized lipid nanocapsules to specifically target ovarian cancer cell: an *in vitro* study

Pierre Idlas¹, Elise Lepeltier^{1,*}, Benjamin Siegler³, Milad Baroud¹, Nolwenn Lautram¹, Gerard Jaouen² and Catherine Passirani¹

¹ Micro et Nanomédecines Translationnelles, MINT, UNIV Angers, INSERM 1066, CNRS 6021, Angers, France

² PSL Chimie Paris Tech, 11 rue P. et M. Curie and Sorbonne Université IPCM, CNRS, UMR 8232, IPCM, Paris,75005, France

³PIAM, Univ Angers, Université Bretagne Loire, Faculté des Sciences, Angers, France

* Corresponding author: elise.lepeltier@univ-angers.fr

ABSTRACT

High grade serous ovarian cancer (HGSOV) is the deadliest gynaecological malignancies due mainly to multidrug resistance to standard chemotherapy treatment, carboplatin and paclitaxel. Some studies highlighted the role of oxidative stress on HGSOV and classification according to mitochondrial oxidative phosphorylation was underlined discerning the chemosensitive “High OXPHOS” tumour and the less chemosensitive “Low OXPHOS” tumour. Ferrocifen, a bio-organometallic compound, is a ROS producer and have shown promising cytotoxicity on different multi-drug resistant cancer cell lines (glioblastoma, breast cancer, metastatic melanoma, ovarian cancer). However, in order to be administered *in vivo*, a formulation step is required. Lipid nanocapsules (LNCs) seems to be an efficient nanoparticle to encapsulate and to deliver ferrocifens due to its oily core. Recently, our team already obtained promising *in vivo* results on Low OXPHOS patient derived xenograft (PDX) ovarian cancer model treated with a combination of stealth **P722**-LNCs and classical chemotherapy.

To go further, the aim of this study was to modify the surface of **P722**-LNCs by adding an ovarian tumour targeting cell penetrating peptide (CPP), CTLS, in order to increase specifically the internalization in cancer cells and to reduce potential toxicity on healthy cells. After a solid-phase peptide synthesis (SPPS) via a Fmoc strategy, CTLS peptide was covalently bond, at concentrations of 1 mM and 3 mM, to the surface of **P722**-LNCs via a thiol-maleimide conjugation. ¹H NMR, 2D NMR, UPLC chromatography analysis and zeta potential increase confirmed the surface decoration of LNCs by CTLS peptide. Complement protein consumption stayed low and showed similar behaviour between stealth **P722**-LNCs and **P722**-LNCs-CTLS-3mM. However, cell internalization of CTLS modified **P722**-LNCs was not cell-dependant as no significant differences were obtained between ovarian cancer cell line SKOV3 and glioblastoma cancer cell line U87MG. Nevertheless, it might be possible that a final concentration of 3 mM in CTLS enhance the endosomal escape. **P722**-LNCs-CTLS-3mM will thus be soon tested *in vivo* on Low OXPHOS PDX ovarian cancer model.

1. Introduction

Ovarian cancer is the seventh most common cancer in women and the eighth most common cause of cancer death. Among the gynaecological cancers, this cancer is the deadliest¹. The origin can come from mutations of different type of cells: stromal, germline and epithelial cells. The epithelial malignancy (epithelial ovarian cancer) is the most widespread counting for 90 % of ovarian cancer, with 75 % considered as high-grade serous ovarian carcinoma (HGSOC)². It is often detected at late stage (stage III or stage IV), with metastases in the peritoneal cavity, according to classification of the Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO)^{2,3}. Thus, HGSOC is associated with poor prognosis. The standard treatment consists of a debulking surgery followed by chemotherapy of paclitaxel and carboplatin. However, tumour recurrence and resistance developed to current chemotherapy are too often met³. Even if new medicines were approved recently by the Food and Drug Administration (FDA) such as PARP inhibitor⁴ and monoclonal antibody bevacizumab³, there is still an urgent need to find new molecules and to develop new strategies to treat HGSOC.

Over the last two decades, Pr. Jaouen and his team have developed a new class of organometallic compounds, named ferrocifens. The chemical structure of this family is derived from a well-known anticancerous compound: hydroxytamoxifen. Since the first discovery, over 200 hundreds ferrocifens have been synthesized and some of them have shown very interesting anticancer properties on several multidrug resistant cancer cell lines such as glioblastoma, triple negative breast cancer, metastatic melanoma and ovarian cancer, with IC₅₀ often in micromolar range^{5,6}. It can be explained by their multiple mechanisms of action. Indeed, due to their redox properties (reversible iron Fe²⁺/Fe³⁺ oxidation), ferrocifens behave as ROS-producing agent. Moreover, the redox properties give rise to formation of a selective electrophilic quinone methide (QM) able to react with biological target like thioredoxin reductase or DNA^{7,8}. Nowadays, the most potent sub-family of ferrocifens seems to be the succinimide one, with its leading compound, the N-[4-ferrocenyl-5,5-bis(4-hydroxyphenyl)-pent-4-enyl]succinimide, called **P722**. Indeed, several *in vitro* and *in vivo* studies highlighted the potential effect of **P722** on metastatic melanoma⁹ and ovarian cancer¹⁰, probably due to higher stability of its quinone methide¹¹. However, because of their high lipophilicity, ferrocifens are insoluble in water, requiring a formulation stage before an *in vivo* systemic administration.

Nanoparticles appear as promising strategies for drug delivery in the context of cancer treatment, like ovarian cancer¹². They can improve bioavailability of hydrophobic drugs, pharmacokinetic and biodistribution leading to an increase of therapeutic index (pharmacological efficacy versus toxicity)¹³. Moreover, in modifying their surface, nanoparticles can specifically target the tumour site¹⁴. Among all nanocarriers, lipid nanocapsules (LNCs) seems to be efficient to encapsulate lipophilic drugs such as ferrocifens⁶. Indeed, LNCs, obtained by a phase-inversion process, are made of a triglyceride core and a PEGylated surfactant shell¹⁵. Moreover, due to the elasticity of its shell¹⁶, LNC surface can be easily modified by post-insertion of PEGylated phospholipid, DSPE-PEG₂₀₀₀, to confer stealth properties and

to enhance accumulation into the tumour microenvironment via the Enhanced Permeation and Retention (EPR) effect^{17,18}. Promising results have been obtained using this strategy with ferrocifen loaded stealth LNCs^{9,19,20}. Additionally, it is also possible to modify LNC surface with molecules as aptamers, antibodies or cell-penetrating peptides (CPP) in order to target the tumour site. For example, Béduneau *et al.* did a post-insertion of DSPE-PEG₂₀₀₀-Maleimide into LNCs surface in the interest of covalent grafting, by a thiol-maleimide conjugation, an antibody Fab' fragment²¹. In another example, Karim *et al.* modified LNC surface by adsorption of a CPP, called NFL-TBS-40-63, in order to target glioblastoma cells²². Thus, several strategies can be imagined using LNCs as nanomedicine.

In a previous study, our team already obtained an *in vivo* significant improvement of therapeutic response via the association of conventional chemotherapy (carboplatin and paclitaxel) with stealth **P722**-LNCs on a Low OXPHOS Patient-Derived-Xenograft model.²³ Based on these promising results, a new strategy was developed by modifying LNC surface with a CPP.

CPP are short peptide made of maximum 30 amino acids with the capacity to ubiquitously cross cellular membranes²⁴. They can transport a variety of covalently or non-covalently linked cargoes such as drugs, proteins, and nanoparticles with ability to enhance their intracellular delivery²⁵. However, most of well-known CPP (penetratin, TAT₄₀₋₆₀) are not specific to cancer cells. That is why since few years, specific tumour targeting cell penetrating peptides are used to modify nanovectors²⁶.

In this study, in order to enhance internalization of **P722**-LNCs in ovarian cancer cells and to avoid a potential toxicity on healthy cells, LNC surface was covalently modified by adding a tumour targeting cell penetrating peptide, named TLS²⁷. This peptide, made of 12 amino acids (TLSGAFELSRDK), was reported to bind preferentially to SKOV3 cells due to its basic residue RDK in C-Ter position. Moreover, the authors showed a therapeutic action of this TLS peptide, inducing apoptosis by down regulation of the pro-apoptotic transcription factor Bcl-2, with a synergistic effect associated with doxorubicin. Concretely, a post-insertion of DSPE-PEG₂₀₀₀-Maleimide was performed at LNC surface. Then, to conjugate the TLS to the Maleimide via a Michael addition, a slight modification of TLS N-Ter position was first done by adding a cysteine residue. The covalent bond between thiol from the cysteine residue and the maleimide function was confirmed by NMR. Then, TLS effect on the physico-chemical characteristics of LNCs was studied. Moreover, complement protein consumption experiments for conventional **P722**-LNCs, stealth **P722**-LNCs, **P722**-LNCs-Maleimide and CTLS modified **P722**-LNCs was performed to check their behaviour in plasma. To finish, *in vitro* kinetic internalisation was performed on two different cell lines, ovarian cancer SKOV3 cell line and glioblastoma U87MG cell line, in order to verify the potential specificity of the CTLS modified **P722**-LNCs to ovarian cancer.

2. Material and methods

2.1. Materials

All components of conventional blank LNCs are FDA-approved for parenteral administration. Macrogol 15 hydroxystearate (Kolliphor® HS 15) was purchased from BASF (Germany). Phosphatidylcholine from soybean (Lipoïd S 100) was provided by Lipoïd GmbH (Germany) and caprylic/capric triglycerides (Labrafac® WL 1349) were supplied by Gattefosse (France). Ultra-pure water (UPW) was obtained from a Millipore filtration system. All the other reagents or solvents used (acetonitrile, methanol, DMSO) for the chromatography analysis were of analytical grade. All Fmoc protected amino acid derivatives, hexafluorophosphate (HBTU), dimethylformamide (DMF) and piperidine were purchased from Iris Biotech GmbH (Germany). Phenol was provided by Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Diethyl ether was purchased from Biosolve Chimie SARL (France). Trifluoroacetic acid (TFA), triisopropylsilane (TIS), N-methyl-2-pyrrolidone (NMP) and diisopropylethylamine (DIEA) were obtained from Thermo Fischer Scientific (Eugene, Oregon, USA). Ferrocifen **P722** was synthesized according to Pigeon *et al*¹⁰ and provided by PSL Chimie ParisTech (Paris, France), Feroscan SME.

1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-2000] (DSPE-mPEG₂₀₀₀) and 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[maleimide(polyethylene glycol)-2000] (DSPE-PEG₂₀₀₀-Maleimide) were purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA) and Broadpharm (San Diego, USA).

Normal human serum (NHS) was provided by the « Etablissement Français du Sang » (Angers, France). Sheep erythrocytes were purchased from Atlantis (Voulmentin, France). Hemolysin was purchased from Orgentec GmbH (Mainz, Germany).

1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindodicarbocyanine Perchlorate (DiD) was purchased from Thermo Fischer Scientific (Eugene, Oregon, USA). Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (with or without calcium chloride and magnesium chloride), Minimum Essential Medium Eagle and McCoy's 5A Medium, modified with sodium bicarbonate, without L-glutamine were purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany).

2.2. Synthesis of peptide TLS and CTLS, purification and characterization

Cysteine modified N-Ter TLS (CTLS, M = 1425 g/mol) was synthesized by 9-fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) solid phase peptide synthesis method (**Figure S1** in supplementary information). Concretely, amino acids were coupled one by one from the C-Ter to the N-Ter on a Rink Amid MBHA resin (0.69 mmol/g) using an automated microwave peptide synthesizer (CEM, Orsay, France). The first step was to prepare the resin in DMF and stirred it for 2 h at room temperature in order to swell it. Amino acid derivatives were solubilized at 0.2 M in DMF. First step of synthesis is Fmoc deprotection of resin by a 20 % piperidine/DMF (v/v) deprotection solvent. Then Fmoc amino acid

derivatives were added one by one by a standard cycle of deprotection-washing-coupling-washing: amino acid (5 eq.), HBTU in DMF (4.5 eq.) and DIEA in NMP (10 eq.). These steps were performed under a microwave assisted system. At the end of the synthesis, resin was put in syringe, washed three times with methanol and dried under vacuum to eliminate traces of solvents. Subsequently, in order to cleave the synthesized peptide from resin and to remove the lateral chain protection groups on each amino acid, a cleavage cocktail was added in the syringe. A mix of TFA/phenol/water/TIS (88/5/5/2 v/v/v/v) was added followed by a stirring step for 4 h at 37 °C. After the cleavage step, the crude peptide was precipitated in cold diethyl ether and then centrifuged for 30 min at 4 °C and 2000 rpm. To finish, diethyl ether supernatant was removed, and the crude peptide was put under argon in order to remove diethyl ether traces. Then a solubilisation in water/ACN (70/30 v/v) was performed before a freeze-drying step.

Purification of crude peptide was done using a semi-preparative reversed phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) (Waters, France). Concretely, CTLS peptide was solubilized in water/CAN (70/30 v/v) at 10 mg/mL. The solution was vortexed, incubated for 1 h at 37 °C and filtered through a 0.22 µm filter. Then, crude solubilized CTLS was eluted at room temperature, using an XBridge BEH C18 Prep column (250 x 30 mm) with 5 µm particle and 130 Å pore size, at a flow rate of 30 mL/min with a gradient of water 0.1 % TFA/ACN 0.1 % TFA (**Table 1**). Detection was obtained by measurement of UV absorbance at $\lambda = 214$ nm. Retention time for CTLS peptide was of 13.5 min. After collected corresponding product, a freeze-drying step was performed in order to obtain solid form of CTLS. A final yield of 24 % and a purity higher than 95 % were obtained.

Table 1. Gradient elution for the purification of CTLS peptide with a semi-preparative reversed phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC).

Time (min)	Flow rate (mL/min)	Phase A: Water + 0.1 % TFA (%)	Phase B: ACN + 0.1 % TFA (%)
0	30	95	5
15	30	63	37
20	30	10	90
25	30	95	5
32	30	95	5

Characterization of CTLS peptide was performed via an LC-MS/MS method. The method was developed on an Alliance® 2695 system (Waters) with a 150 x 2.0 mm, 5 µm Uptisphere C18 5ODB column (Interchim, France). Purified solid CTLS peptide was solubilized in Water/ACN (95/5) at 1 mg/mL. Purified peptide was eluted at 30 °C, at a flow rate of 0.2 mL/min with a gradient of water + 0.1 % formic acid/ACN + 0.1 % formic acid (**Table 2**). Detection was obtained by measurement of UV

absorbance at $\lambda = 214$ nm. Retention time for CTLS peptide was of 10.0 min. Then, after the elution through the column, CTLS peptide went into a Guattro Micro® triple quadrupole mass spectrometer (Waters, France). Products ionization was performed by an electrospray in positive ion mode in the m/z 200 – 2000 range (**Figure S2** in supplementary information for LC chromatogram and mass spectra).

Table 2. Gradient elution of the LC-MS/MS method for the characterization of CTLS peptide.

Time (min)	Flow rate (mL/min)	Phase A: Water + 0.1 % formic acid (%)	Phase B: ACN + 0.1 % formic acid (%)
0	0.2	95	5
1	0.2	95	37
10	0.2	30	70
11	0.2	30	70
12	0.2	95	5
15	0.2	95	5

2.3. Formulation of lipid nanocapsules

Preparation of blank LNCs

Blank LNCs were formulated by a phase inversion process as already described in literature.²³ Kolliphor® HS15 (16.9 % w/w), Labrafac® WL 1349 (20.7 % w/w), Lipoïd S 100 (1.5 % w/w), NaCl (1.3 % w/w, in respect with the physiological osmolarity) and UPW (59.6 % w/w) were added in a vial and put under magnetic stirring at 60 °C for 10 min. Then, three heating cooling cycles were performed between 90 °C and 60 °C in order to switch between O/W emulsion for temperature lower than phase inversion temperature (PIT) and W/O emulsion for temperature higher than PIT. During the last cooling step, when temperature reached the PIT (78 °C < PIT < 83 °C), ice-cold UPW (31.5 % v/v_{tot}) was added to induce irreversible shock and form blank LNCs. Suspension was then stirred for 10 min at room temperature. Finally, LNCs formulation was filtrated through 0.2 µm sterile PES membrane and stored at 4 °C.

Preparation of P722-LNCs

Concretely, **P722** (powder form) was added in order to have a final concentration of 5.6 mg/g of lipophilic excipients (**P722** + Kolliphor® HS15 + Labrafac® WL 1349 + Lipoïd S100). First, **P722** was mixed with Kolliphor® HS15 and Labrafac® WL 1349 and stirred for 30 min at 60 °C. Subsequently, the other components (Lipoïd S 100, NaCl and UPW) were added and the three heating cooling cycles of phase inversion process were performed. **P722**-LNCs formulation was filtrated through 0.2 µm sterile PES membrane and stored at 4 °C.

Preparation of fluorescent LNCs (P722-LNCs-DiD)

DiD was first solubilized in acetone at 2 mg/mL. DiD was added at a concentration of 0.1 % (w/w_{Labrafac}) with **P722**, Kolliphor® HS15 and Labrafac in a vial. Final concentration in **P722** was fixed at 3.74 mg/g of lipophilic excipients (eq. to 2 mM). Mixture was put under stirring at for 30 min at 60 °C. Then the other components (Lipoid S 100, NaCl and UPW) were added and the three heating cooling cycles of phase inversion process were performed. **P722-LNCs-DiD** was filtrated through 0.2 µm sterile PES membrane and stored at 4 °C.

2.4. Post-insertion of DSPE-PEG₂₀₀₀ and DSPE-PEG₂₀₀₀-Maleimide

The PEGylated phospholipid used was either 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-2000] (DSPE-mPEG₂₀₀₀) or 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[maleimide(polyethylene glycol)-2000] (DSPE-PEG₂₀₀₀-Maleimide). In previous study, the stealth **P722-LNCs** were obtained as followed.²³ DSPE-mPEG₂₀₀₀ was added to **P722-LNCs** formulation, put under magnetic stirring at 30 °C for 4 h and then quenched for 1 min in an ice bath. Final concentration of DSPE-PEG₂₀₀₀ was fixed at 5 mM.

For the post-insertion of DSPE-PEG₂₀₀₀-Maleimide to the surface of blank LNCs, **P722-LNCs** and **P722-LNCs-DiD**, same protocol was used (**Figure 1**). Final concentration was fixed at 5 mM, corresponding to 1650 maleimide functions per LNC in theory (number of LNCs determined by Nanoparticle tracking analysis (NTA)) (**Figure S3** in supplementary information).

All these formulations were then filtrated through 0.2 µm sterile PES membrane and stored at 4 °C.

2.5. Surface modification of LNCs with CTLS peptide

Covalent grafting of CTLS peptide at blank LNCs-Maleimide surface, **P722-LNCs-Maleimide** surface and **P722-LNCs-DiD-Maleimide** was performed by a Michael addition of the thiol group from cysteine residue in N-Ter position of CTLS peptide and the reactive maleimide from DSPE-PEG₂₀₀₀-Maleimide. Concretely, purified CTLS (powder form) was added to blank LNCs-Maleimide, **P722-LNCs-Maleimide** and **P722-LNCs-DiD-Maleimide** at a molar ratio of 3:5 and 1:5 in DSPE-PEG₂₀₀₀-Maleimide (eq. to 990 and 330 CTLS peptides per LNC in theory). Then, reaction mixtures were put under inert atmosphere to avoid formation of disulfide bond between CTLS molecules. Reaction was then performed for 90 min at 37 °C under magnetic stirring (**Figure 1**).

As a control, reaction between DSPE-PEG₂₀₀₀-Maleimide and CTLS peptide in water was performed at a molar ratio of 3:5 in DSPE-PEG₂₀₀₀-Maleimide. Final product was then analysed by ¹H NMR and two-dimensional NMR (2D NMR) in deuterated DMSO.

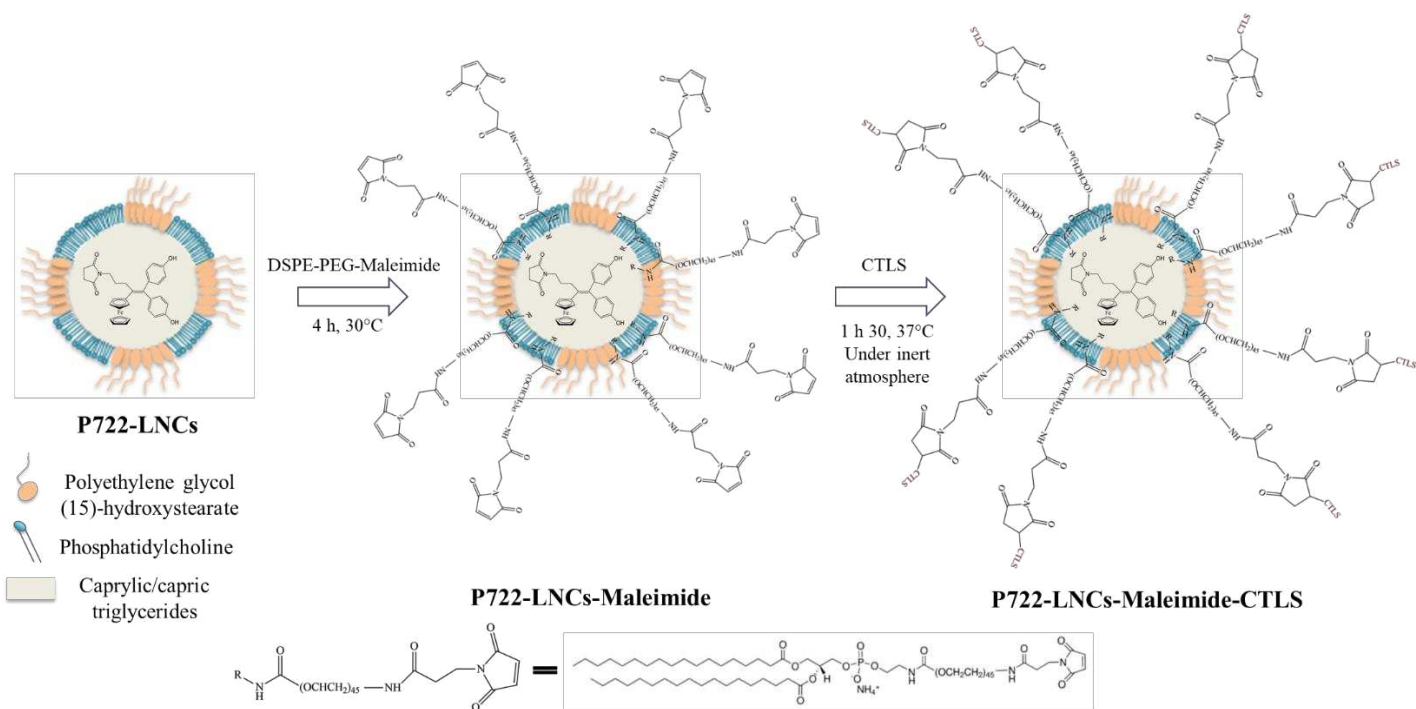


Figure 1. Steps of surface modification of LNCs by CTLS peptide and corresponding structures of the LNCs.

2.6. Characterization of the different formulations

Characterization of conjugation between CTLS peptide and DSPE-PEG₂₀₀₀-Maleimide

Blank LNCs-Maleimide and blank LNCs-CTLS-3mM were analysed by ¹H NMR and 2D NMR in deuterated DMSO. A dialysis step was performed for 24 h at 37 °C in UPW for LNCs-CTLS-3mM using a Float-A-Lyzer G2 Dialysis Device, MWCO 100 kD (Merck KGaA, Germany) and the dialysed formulation was analysed by ¹H NMR and 2D NMR in deuterated DMSO.

Moreover, indirect proof of conjugation between CTLS peptide and DSPE-PEG₂₀₀₀-Maleimide was performed using an Ultra-High-performance liquid chromatography (UPLC) system. A C18 analytical column (ACQUITY UPLC® BEH C18 1.7 μm, 2.1 x 50 mm, Waters, France) was used at 30 °C. Concretely, **P722-LNCs-CTLS-1mM** and **P722-LNCs-CTLS-3mM** were dissolved by a 40-fold dilution in methanol/DMSO (90/10 v/v). As a control, CTLS peptide was prepared at 3 mM in a mixture of blank LNCs dissolved by a 40-fold dilution in methanol/DMSO (90/10 v/v). This CTLS solution was then diluted by a 40-fold dilution with the same mixture. Samples were eluted in the C18 column at a flow rate of 0.2 mL/min with a gradient of water + 0.1 % TFA/ACN + 0.1 % TFA (**Table 3**). CTLS detection was obtained by measurement of UV absorbance at λ = 214 nm. Retention time for CTLS was of 5.25 min (**Figure S5** in supplementary information for UPLC chromatograms).

Table 3. Gradient elution of the UPLC method used for qualitative analysis of CTLS peptide in formulations and quantification of **P722** for encapsulation efficiency (E.E).

Time (min)	Flow rate (mL/min)	Phase A: Water + 0.1 % TFA (%)	Phase B: ACN + 0.1 % TFA (%)
0	0.2	95	5
7	0.2	30	70
8	0.2	30	70
9	0.2	95	5
15	0.2	95	5

Determination of encapsulation efficiency (E.E) and drug loading (D.L) in P722

Encapsulation efficiency and drug loading in **P722** were determined using the same UPLC method described above. Detection of **P722** was obtained by UV absorbance measurement at $\lambda = 450$ nm. Calibration curve was established (at each analysis) by quantifying the area under the curves (AUCs) of [0.01 – 0.2] mg/mL **P722** solutions in blank LNCs dissolved by a 40-fold dilution in methanol/DMSO (90/10 v/v). After a filtration step through a 0.2 μ m pore size filter, **P722**-LNCs, **P722**-LNCs-Maleimide, **P722**-LNCs-CTLS-3mM and **P722**-LNCs-CTLS-1mM were dissolved by a 40-fold dilution with methanol/DMSO (90/10 v/v) to have **P722** concentration in the appropriate concentration range. Quantification of **P722** was obtained using the calibration curve. Injection volume was of 10 μ L and **P722** retention time was of 8.15 min. Analysis of the data was performed using Empower 3 software (Waters).

Encapsulation efficiency (E.E, %) of **P722** into LNCs was calculated using the following equation:

$$E.E (\%) = \frac{(\text{Initial ferrocifen conc. in LNCs} - \text{unencapsulated ferrocifen conc. in LNCs})}{\text{Initial ferrocifen conc. in LNCs}} \times 100$$

Drug loading of **P722** into LNCs was calculated using the following equation:

$$D.L \left(\% \frac{w}{w} \right) = \frac{\text{Mass of encapsulated ferrocifen in 1 mL of LNC dispersion}}{m(\text{ferrocifen}) + m(\text{Labrafac® WR 1349}) + m(\text{Kolliphor® HS 15}) + m(\text{Lipoïd S 100})} \times 100$$

Physico-chemical characterization of LNCs

Average hydrodynamic diameter (Z-average) and polydispersity index (PDI) were determined by dynamic light scattering (DLS) at 25 °C with a backscatter angle of 173 ° using a Zetasizer Nano ZS system (Malvern Instrument Ltd, UK) after a dilution by 6650 of the formulations in UPW. The

measured average values were calculated from 3 runs, with more than 10 measurements for each run. Zeta potential of the nano-systems was measured using the laser Doppler micro-electrophoresis technique by a Zetasizer Nano ZS system (Malvern Instrument Ltd, UK). The measured average values were calculated from 3 runs with more than 10 measurements for each run, after a dilution by 100 of the formulations with UPW (pH = 8.3 at 25 °C). Smoluchowski's approximation was used to determine electrophoretic mobility for determination of the zeta potential. For Z-average, PDI and zeta potential, results shown in **Table 4** are the average of three formulations (n = 3).

LNC concentration (number of LNCs per mL of formulation) was determined using a Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) system, NanoSight NS300 (Malvern Instruments Ltd, United Kingdom). Blank LNCs, stealth blank LNCs, **P722**-LNCs and stealth **P722**-LNCs were diluted by a factor of 2.10^6 in UPW and were infused in the sample chamber using a syringe pump at a 30 μ L/min flow rate. A 405 nm laser was used to illuminate the LNCs and their Brownian motion was recorded in five videos of 60 s by the camera of the device. Then, NTA software (NTA 3.2 Dev Build 3.2.16) analysed the recordings by tracking the motion of LNCs and calculated the number of LNCs in the different samples ($4 < n < 5$) (**Figure S3** in supplementary information).

Fluorescence characterization of P722-LNCs-DiD

Fluorescence of formulation **P722**-LNCs-DiD, **P722**-LNCs-DiD-Maleimide, **P722**-LNCs-DiD-CTLS-1mM and **P722**-LNCs-DiD-CTLS-3mM were assessed using a spectrofluorometer FluoroMax-4 (HORIBA Scientific, Japan). Formulations were diluted by a factor 2.10^5 in UPW before fluorescence analysis. Excitation wavelength was fixed at 644 nm for DiD dye and the emission fluorescence spectrum was recorded between 600 nm and 800 nm.

2.7. Complement consumption assay (CH50 assay)

Complement consumption was assessed in normal human serum (NHS) by measuring the residual hemolytic capacity of the complement system after contact with nanoparticles. The technique consisted in determining the amount of serum able to lyse 50 % of a fixed number of sensitized sheep erythrocytes with rabbit anti-sheep erythrocyte antibodies (CH50). The CH50 unit consumption by **P722**-LNCs, stealth **P722**-LNCs, **P722**-LNCs-Maleimide, **P722**-LNCs-CTLS-3mM and **P722**-LNCs-CTLS-3mM, dialysed for 24 h, was compared by plotting the percentage of CH50 unit consumption as a function of surface area of the different LNCs (**Figure 4**).

2.8. Cell culture

Ovarian cancer cell line SKOV3 and glioblastoma cancer cell line U87MG were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) and maintained as recommended. SKOV3 cell lines were grown in McCoy's 5A Medium, modified with sodium bicarbonate, without L-

glutamine and supplemented with 10 % of Fetal Bovine Serum (FBS) and 1 % of penicillin/streptomycin. U87MG were grown in Eagle's Minimum Essential Medium supplemented with 10 % of FBS and 1 % of penicillin/streptomycin. Cells were maintained in a humid atmosphere at 37 °C with 5 % CO₂.

2.9. Kinetic of **P722**-LNC internalization in SKOV3 cells and U87MG cells.

Kinetics of internalization of the formulation **P722**-LNCs-DiD, **P722**-LNCs-DiD-Maleimide, **P722**-LNCs-DiD-CTLS-1mM and **P722**-LNCs-DiD-CTLS-3mM was assessed by flow cytometry using the BD FACSCanto™ II flow cytometer (Biosciences, New Jersey, USA).

Briefly, cells were seeded in 6-well plates at 1.5×10^5 SKOV3 cells per well and 2.5×10^5 U87 MG cells per well. The 6-well plates were maintained in a humid atmosphere at 37 °C with 5 % CO₂ for 48 h. Media in each well were changed after 24 h of incubation. Then, SKOV3 cells and U87MG cells were treated with **P722**-LNCs-DiD, **P722**-LNCs-DiD-Maleimide, **P722**-LNCs-DiD-CTLS-1mM and **P722**-LNCs-DiD-CTLS-3mM, diluted 200 fold in order to have final concentration of 10 µM in **P722**, corresponding to 1,200 µg/mL in LNCs. Treatments were performed for 1 h, 6 h and 24 h. After treatment, cells were washed once with Dulbecco's Phosphate Buffered (PBS) without calcium and magnesium and detached with Trypsin-EDTA by incubating for 4 min. Then, media were added to inhibit trypsin effect and cells were centrifuged at 250 g for 3 min. The supernatant was removed and dispersion of cells pellet was performed with cold PBS with calcium and magnesium. Cells were centrifuged again at 250 g for 3 min and cells pellet was dispersed again with cold PBS. Finally, cells were analysed by a flow cytometer with 10 000 events per condition. Experiment was performed in triplicate (n=3) on SKOV3 cells and in duplicate (n=2) on U87MG cells

2.10. Statistical analysis

Results obtained from experiments were analysed statistically using GraphPad Prism® software. Mean and standard deviation (SD) were determined. Values are represented as Mean ± SD. Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's test for multiple comparisons was applied. Differences were considered statistically significant for $p < 0.05$.

3. Results and Discussions

3.1. Physico-chemical characterization

Covalent grafting of CTLS peptide to DSPE-PEG₂₀₀₀-Maleimide

Maleimide-thiol chemistry has been often used for the design of peptide-decorated drug delivery systems.^{21,28–30} In this study, cysteine modified N-Ter TLS (CTLS) peptide was chosen in order to formulate ovarian cancer targeting LNCs. First, maleimide-thiol conjugation was performed in water at a molar ratio 3:5 between CTLS peptide and DSPE-PEG₂₀₀₀-Maleimide. After 90 min of reaction under nitrogen, the reaction mixture was then analysed by ¹H NMR and 2D NRM. 2D NMR spectra of CTLS peptide, DSPE-PEG₂₀₀₀-Maleimide and DSPE-PEG₂₀₀₀-Maleimide + CTLS are shown on **Figure 2**. A characteristic chemical shift of a -CH-S- bond was observed for the mixture DSPE-PEG₂₀₀₀-Maleimide + CTLS (**Figure 2**).³¹ Indeed, correlation between protons and carbons was found for chemical shift between 3 and 4.2 ppm for ¹H signals and between 30 and 50 ppm for ¹³C carbon signals. Same signals was observed for the blank LNCs-CTLS-3mM formulation with or without dialyse for 24 h (corresponding to a molar ration 3:5 between CTLS peptide and DSPE-PEG₂₀₀₀-Maleimide) (**Figure 3** and **Figure S4** in supplementary information). It is thus possible to affirm that thiol conjugation occurred with DSPE-PEG₂₀₀₀-Maleimide at LNCs surface. Finally, results obtained by UPLC chromatography could confirm this affirmation as no signals from CTLS after covalent grafting, at 1 mM or 3 mM, were obtained compared to control CTLS sample (**Figure S5** in supplementary information).

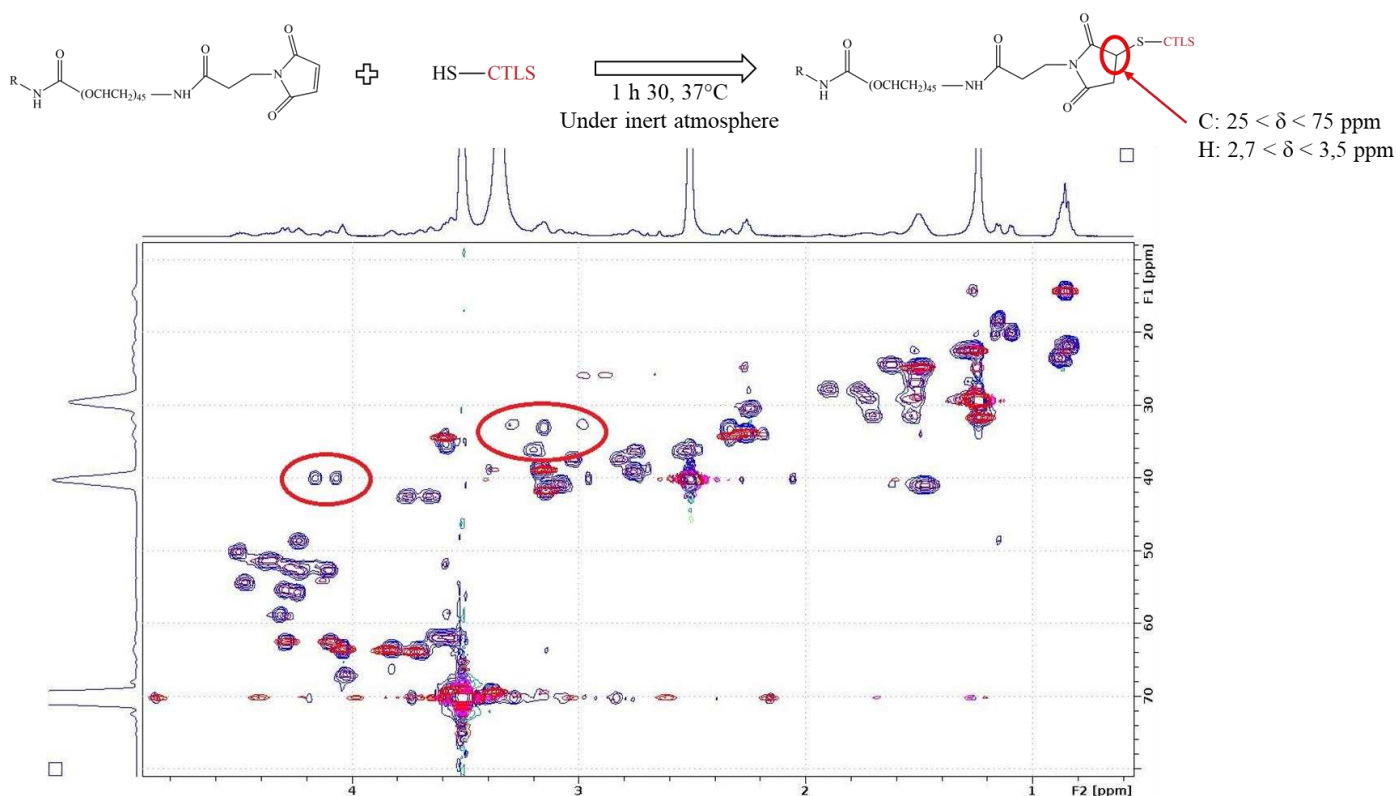


Figure 2. 2D NMR spectra obtained for CTLS peptide (purple spectrum), DSPE-PEG₂₀₀₀-Maleimide (red spectrum) and DSPE-PEG₂₀₀₀-Maleimide + CTLS (blue spectra). The red circles show the chemical shift characteristic of a -CH-S- bond.

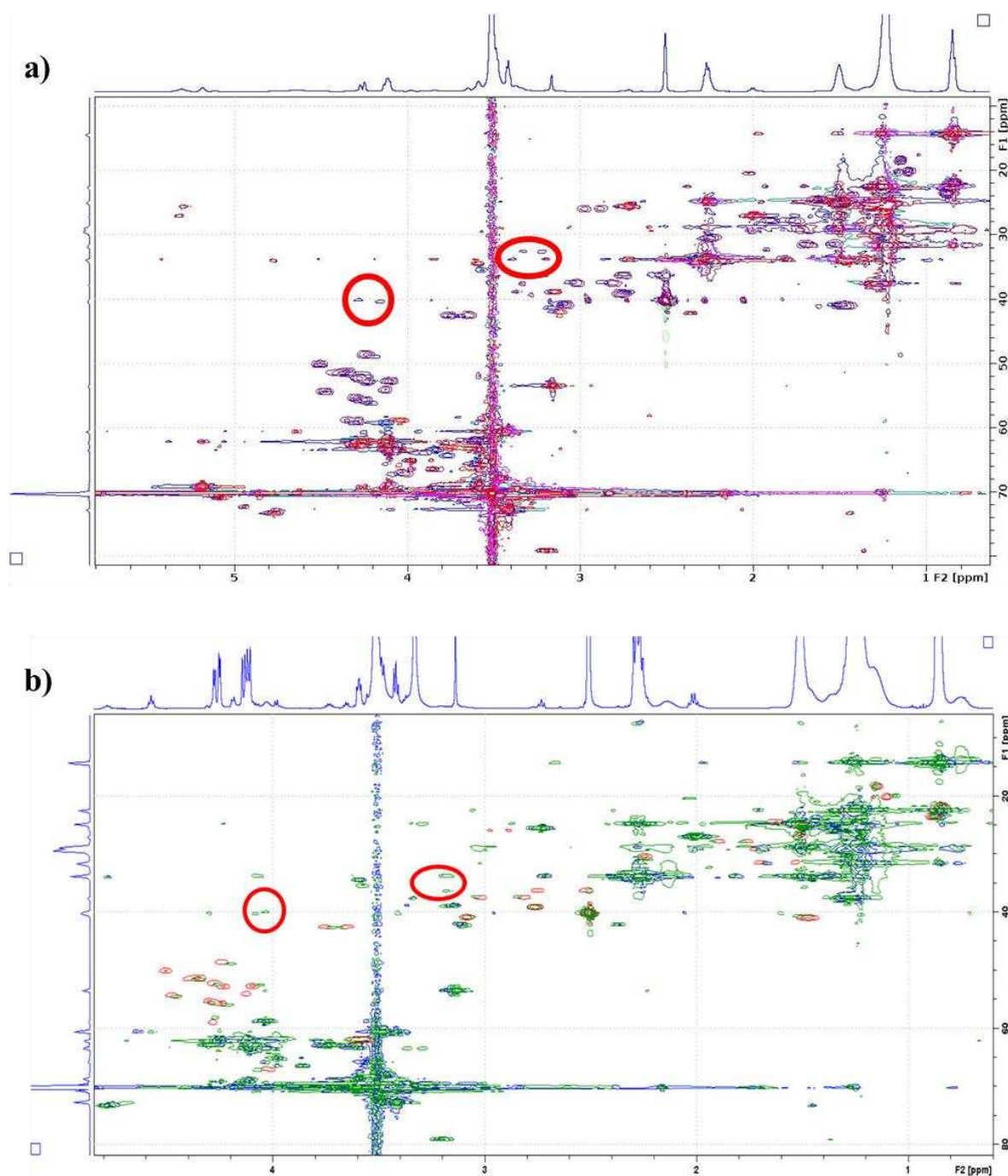


Figure 3. 2D NMR spectra obtained for: **a)** CTLS peptide (purple spectrum), blank LNC-Maleimide (red spectrum), blank LNC-Maleimide-CTLS-3mM without dialysis (blue spectrum); **b)** CTLS peptide (red spectrum), blank LNC-Maleimide (blue spectrum) and blank LNC-Maleimide-CTLS-3mM dialysed for 24 h in UPW (green spectrum). The red circles show the chemical shifts characteristic of a -CH-S- bond.

Physico-chemical characterization of LNCs

Particle hydrodynamic diameter, polydispersity index (PDI), zeta potential, drug loading and encapsulation efficiency of the different formulations are shown on **Table 4**, **Table S1** and **Table S2**. First, the encapsulation of **P722** in LNCs was obtained with a maximum final drug loading of 0.56 % (eq. 1.6 mg/mL), as previously obtained²³. A Z-average of 49.3 ± 0.6 nm for **P722**-LNCs and 52.5 ± 0.1 nm for blank LNCs were characterized, with a PDI lower than 0.2 showing the monodispersity of formulations. Zeta potentials for **P722**-LNCs and blank LNCs were considered as neutral (values around -5 mV). After post-insertion of the PEGylated phospholipid DSPE-PEG₂₀₀₀-Maleimide at a final concentration of 5 mM, a slight increase was observed on the hydrodynamic diameter for **P722**-LNCs-Maleimide compared to **P722**-LNCs followed by a decrease of zeta potential, from -3.4 ± 0.6 mV for **P722**-LNCs to -17.0 ± 0.7 mV for **P722**-LNCs-Maleimide. Same behaviour was observed after post-insertion of DSPE-PEG₂₀₀₀ for stealth **P722**-LNCs (**Table 4**). As described in literature, this decrease in zeta potential is explained by the electrical dipole from the ethylene glycol moiety and by the length of the PEGylated chain (45 PEG monomer units).^{23,32} Finally, no significant difference was observed on the LNC concentration (number of LNCs per mL of formulation) after post-insertion of DSPE-PEG₂₀₀₀ suggesting that the post-insertion process at 30 °C for 4 h did not impact integrity of LNCs. The same protocol was used for the DSPE-PEG₂₀₀₀-Maleimide post-insertion with the same result. The diameter increase observed after a post-insertion has been classically reported in literature with LNCs.²¹ Interestingly, covalent grafting of CTLS peptide at a molar ratio 3:5 and 1:5 in DSPE-PEG₂₀₀₀-Maleimide modified the zeta potential values (**Table 4**). Indeed, an increase was observed depending on CTLS concentration. Zeta potential for **P722**-LNCs-Maleimide, **P722**-LNCs-CTLS-1mM and **P722**-LNCs-CTLS-3mM were -17.0 ± 0.7 mV, -14.0 ± 0.9 and -7.2 ± 1.6 mV respectively. This significant increase in zeta potential for **P722**-LNCs-CTLS-3mM could be explained by positive charges from arginine R and lysine K amino acids in CTLS peptide sequence. Similar variation of surface charge was reported on several studies after adsorption or covalent grafting of CPP at the surface of nanoparticle.^{22,33,34} For example, Karim *et al.* showed an increase in zeta potential of LNCs, also depending on peptide concentration, after adsorption of NFL-TBS-40-63 peptide.²² Moreover, Yin *et al.* obtained an increase of zeta potential of their superparamagnetic NPs after covalent grafting of WSG peptide using carbodiimide chemistry.³⁴ After a dialysis for 24 h, a decrease in zeta potential occurred both for **P722**-LNCs-Maleimide, **P722**-LNCs-CTLS-1mM and **P722**-LNCs-CTLS-3mM. Differences in zeta potential were not anymore significant but values from CTLS modified LNCs were still higher than for LNCs-Maleimide (-19.4 ± 2.9 for **P722**-LNCs-CTLS-3mM and -23.3 ± 0.2 for **P722**-LNCs-Maleimide) (**Table S1** in supplementary information). It might be possible that this decrease is related to a change of DSPE-PEG-Maleimide conformation, from mushroom to brush conformation, leading to rearrangement of spatial position of ethylene oxide units and so a change in global dipolar moment³⁵.

Same results were obtained on physico-chemical characterization of blank LNCs (**Table S2** in supplementary information) and **P722-LNC-DiD** (**Table S3** in supplementary information). Finally, the zeta potential values obtained for each CTLS modified LNCs, combining with NMR results, allowed to confirm the successful covalent grafting of CTLS peptide at the LNC surface.

Table 4. Physico-chemical characteristics (hydrodynamic diameter, PDI, zeta potential, drug loading and encapsulation efficiency) of the different formulations. Data are means \pm SD (n = 3). Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA 1F) followed by a Dunn's test for multiple comparisons between zeta potential values of **P722-LNCs-Maleimide**, **P722-LNCs-CTLS 1 mM**, **P722-LNCs-CTLS 3 mM** (*: P < 0.05).

Formulation	Hydrodynamic diameter (nm)	PDI	Zeta Potential (mV)	Drug loading (% w/w)	Encapsulation efficiency (E.E) (%)
P722-LNCs	49.3 \pm 0.6	0.05 \pm 0.01	-3.4 \pm 0.6	0.56	> 95 %
Stealth P722-LNCs	57.2 \pm 1.0	0.06 \pm 0.01	-18.1 \pm 0.4	0.56	> 95 %
P722-LNCs-Maleimide	60.7 \pm 0.6	0.12 \pm 0.02	-17.0 \pm 0.7	0.56	> 95 %
P722-LNCs-CTLS-1mM	66.3 \pm 1.6	0.14 \pm 0.01	-14.0 \pm 0.9	0.56	> 95 %
P722-LNCs-CTLS-3mM	67.5 \pm 3.2	0.15 \pm 0.03	-7.2 \pm 1.6*	0.56	> 95 %

3.2. Complement consumption (CH50) by different **P722-LNCs** formulation

In vitro complement activation was evaluated using the CH50 method. The method consist in the evaluation of the consumption of the entire complement system, known to be responsible of opsonization of nanoparticles^{32,36}. Results are shown in **Figure 4**. Excepted for **P722-LNCs-Maleimide** formulation, all formulations had a weak complement consumption. Indeed, for **P722-LNCs**, stealth **P722-LNCs**, **P722-LNCs-CTLS-3mM** with or without dialysis, complement consumption were below 15 % whatever the surface area of LNCs per mL of NHS. For the formulation **P722-LNCs-Maleimide**, the percentage of CH50 unit consumption increased up to 70 % with the surface area of LNCs per mL of NHS. This result indicated that this formulation possesses an activating surface and would be removed quickly from bloodstream. This phenomenon could be explained by the presence of the reactive maleimide function. Indeed, as a Michael acceptor, the maleimide function could react via a Michael addition with thiol from plasmatic protein³⁷, leading to the recognition by the mononuclear phagocytic system (MPS).

The low complement consumption of **P722-LNCs**, stealth **P722-LNCs** and **P722-LNCs-CTLS-3mM** could be associated with the physico-chemical characteristics of formulations. Indeed, for conventional **P722-LNCs** and stealth **P722-LNCs**, the PEGylated shell from PEG hydroxystearate (PEG chain length

of 15 units) and the post-insertion of DSPE-PEG₂₀₀₀ (PEG chain length of 45 units) could confer stealth properties to LNCs as it has already been shown previously^{20,38,39}. Then, it is well known that the complement consumption is proportional to the nanoparticle size and to zeta potential value³². For the **P722**-LNCs-CTLS-3mM, even if an increase in zeta potential and size were obtained compared to **P722**-LNCs-Maleimide, the complement activation was not altered by the presence of CTLS peptide at LNCs surface. Moreover, according to the data obtained after dialysis, it gave another evidence of the covalent grafting of CTLS peptide with Maleimide function at LNCs surface as the formulation after dialysis showed the same behaviour than the non-dialysis one. The maleimide function from DSPE-PEG₂₀₀₀-Maleimide was thus still protected by CTLS peptide, preventing interactions between the reactive maleimide group and plasmatic proteins.

Finally, it is very interesting that same behaviour was obtained *in vitro* between stealth **P722**-LNCs and **P722**-LNCs-CTLS-3mM. Indeed, in a previous study, stealth **P722**-LNCs already proved their biological benefits, associated with carboplatin and paclitaxel, after an *in vivo* intravenous administration on high grade serous ovarian cancer Low OXPLOS PDX mice model.²³ In theory, formulation **P722**-LNCs-CTLS-3mM should not be quickly eliminated from the bloodstream by the MPS which should allow them, as for stealth **P722** LNCs, to reach their target and act effectively thanks to the peptide action.

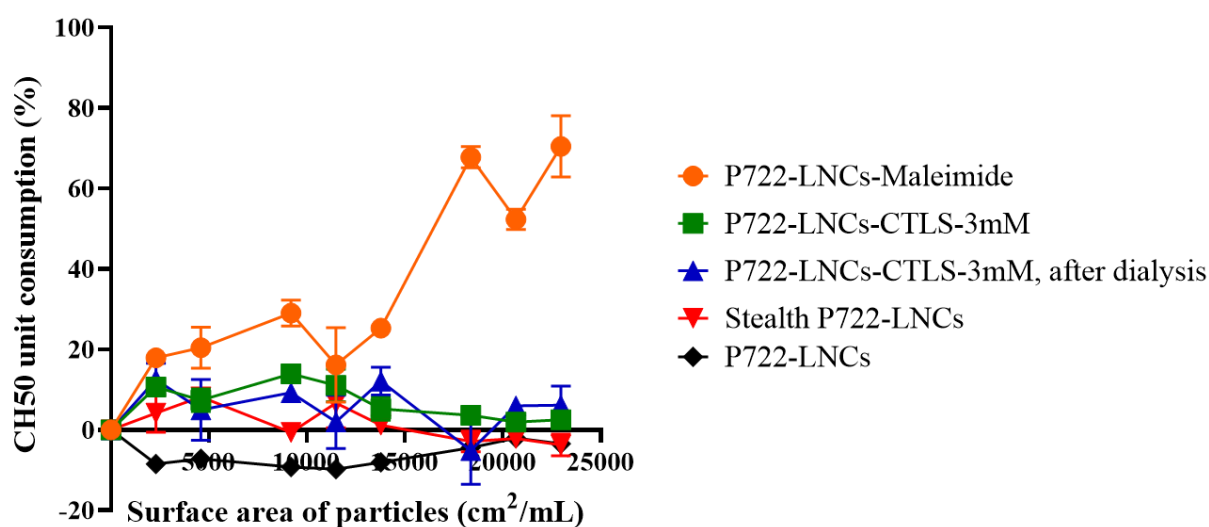


Figure 4. Complement consumption at 37 °C by **P722**-LNCs (black diamond), stealth **P722**-LNCs (red triangle), **P722**-LNCs-CTLS-3mM after dialysis (blue triangle), **P722**-LNCs-CTLS-3mM (Green square) and **P722**-LNCs-Maleimide (orange circle).

3.3. Kinetic of **P722**-LNCs internalization in SKOV3 cells and U87MG cells

The LNC concentration used for the cellular uptake studies was 1.2 mg/mL corresponding to a concentration of 10 μ M in **P722** whatever the formulation tested. The concentration in CTLS peptide was 5 μ M and 15 μ M for **P722**-LNCs-DiD-CTLS-1mM and **P722**-LNCs-DiD-CTLS-3mM

respectively. At these concentrations, CTLS peptide and **P722** were not cytotoxic after 24 h of treatment on SKOV3 cells (**Figure S6** in supplementary information).

First, fluorescence of the formulations used, **P722-LNCs-DiD**, **P722-LNCs-DiD-Maleimide**, **P722-LNCs-DiD-CTLS-1mM** and **P722-LNCs-DiD-CTLS-3mM** was measured (**Figure S7** in supplementary information). No quenching phenomenon was observed.

Then, SKOV3 cells and U87MG cells were incubated with these formulations for 1 h, 6 h and 24 h. U87MG cells were chosen as control to check the potential specificity of CTLS on ovarian cancer: as an element of comparison, it was shown previously that less than 20 % of U87MG cells were positive to DiA after 24 h of treatment with blank LNCs-DiA.²² First, there is a time dependency for LNCs cellular uptake in each cell line (**Figure 5**). Indeed, percentage of DiD-positive cells increased with time. For SKOV3 cells, whatever the formulations (**P722-LNCs-DiD**, **P722-LNCs-DiD-Maleimide**, **P722-LNCs-DiD-CTLS-1mM** and **P722-LNCs-DiD-CTLS-3mM**), LNCs uptake was about 20 % after 1 h of incubation and above 80 % after 24 h (**Figure 5.a**). For U87MG cells, results shown cellular uptake about 45 % after 1 h and above 90 % after 24 h, whatever the formulations used (**Figure 5. b**). Results obtained on U87MG cells for conventional LNCs (**P722-LNCs-DiD**) were different from the one obtained in literature.²² This difference could come from experimental condition differences (number of cells seeding for example) as it is well known that it can affect CPP activity.²⁴ Moreover, the use of CTLS peptide did not allow to enhance the internalization of LNCs on SKOV3 cells. Indeed, even if a slight decrease was observed on the percentage of DiD positive cells with **P722-LNCs-DiD-CTLS-3mM**, whatever the incubation time, no significant differences were obtained between the formulations. Same results were obtained on U87MG cells. So, the targeting capacity of CTLS peptide on ovarian cancer was not demonstrated. However, on the two cell lines, the median of fluorescence after 6 h and 24 h of incubation, was lower with **P722-LNCs-DiD-CTLS-3mM** (**Figure 6**). Indeed, on SKOV3 cells, median of fluorescence was 7682, 7774 and 4640 for **P722-LNCs-DiD**, **P722-LNCs-DiD-CTLS-1mM** and **P722-LNCs-DiD-3mM** respectively, after 24 h (**Figure 6.a**). On U87MG cells, median of fluorescence was 9053, 7711 and 6908 for **P722-LNCs-DiD**, **P722-LNCs-DiD-CTLS-1mM** and **P722-LNCs-DiD-3mM** respectively, after 24 h (**Figure 6.b**). It might be possible that the positive charge from CTLS peptide enhance endosomal escape after cellular uptake. This enhancement would lead to a quicker release and degradation of DiD dye and so a lower fluorescence intensity finally measured.⁴⁰ So, even if results were not significant, using CTLS modified LNCs at final concentration of 3 mM in CTLS could enhance release of LNCs in cytosol.

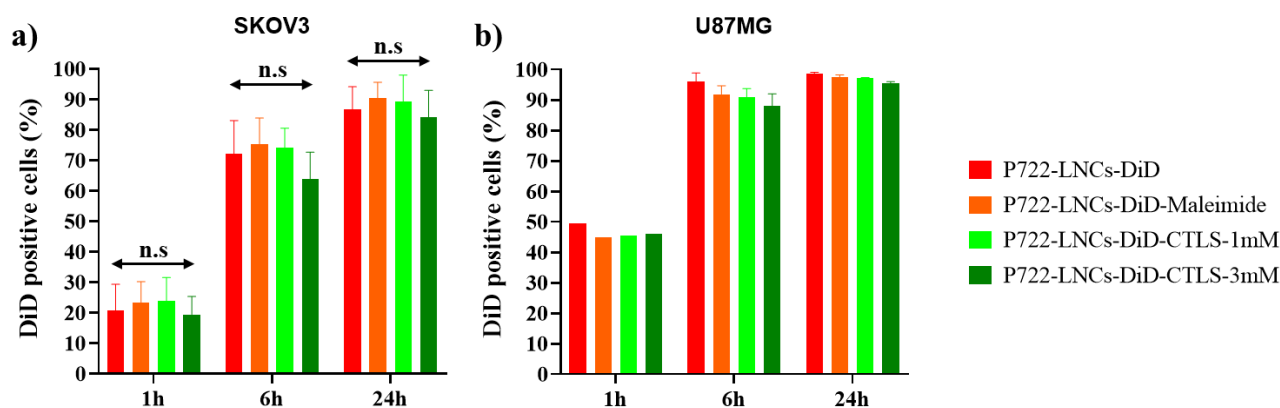


Figure 5. Internalization kinetics at 37 °C of **P722-LNCs-DiD** (in red), **P722-LNCs-DiD-Maleimide** (in orange), **P722-LNCs-DiD-CTLS-1mM** (in light green) and **P722-LNCs-DiD-CTLS-3mM** (in dark green) after incubation for 1 h, 6 h and 24 h on : **a)** SKOV3 cells ; **b)** U87MG cells. Results were obtained by flow cytometry and were presented according to the percentage of DiD positive cells. Experiments were performed in triplicate on SKOV3 cells and in duplicate on U87MG cells.

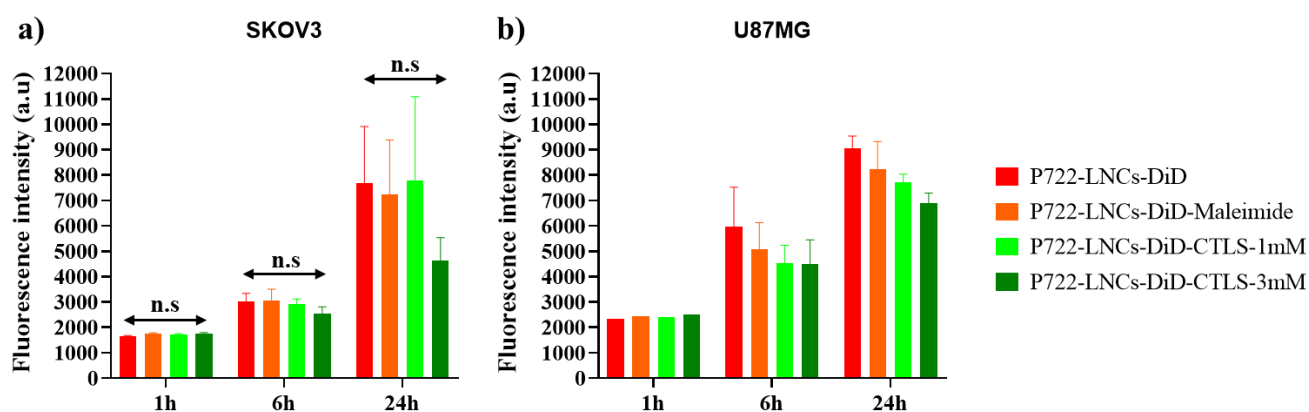


Figure 6. Internalization kinetics at 37°C of **P722-LNCs-DiD** (in red), **P722-LNCs-DiD-Maleimide** (in orange), **P722-LNCs-DiD-CTLS-1mM** (in light green) and **P722-LNCs-DiD-CTLS-3mM** (in dark green) after incubation for 1 h, 6 h and 24 h on: **a)** SKOV3 cells ; **b)** U87MG cells. Results were obtained by flow cytometry and were presented according to the median of fluorescence of DiD positive cells. Experiments were performed in triplicate on SKOV3 cells and in duplicate on U87MG cells.

4. Conclusion

In this study, the surface of **P722-LNCs** at 5.6 mg/g of lipophilic excipient was modified by adding a cell penetrating peptide, CTLS. First, CTLS peptide was synthesized by solid-phase peptide synthesis via a Fmoc strategy, purified and characterized by NMR and LC/MS chromatography. In order to perform a covalent grafting of the peptide at the surface of **P722-LNCs**, a PEGylated phospholipid DSPE-PEG₂₀₀₀-Maleimide was post-inserted in LNC membrane. Covalent grafting of CTLS peptide to

the maleimide function was then performed at two concentrations: 1 mM and 3 mM. ¹H NMR and 2D NMR confirmed the successful covalent grafting of CTLS peptide. It was indirectly confirmed by UPLC method with an absence of CTLS signal after the decoration process and by the significant increase of zeta potential of LNCs with CTLS concentration compared to non-modified LNCs. More interestingly, complement consumption experiment showed no activation of the protein complement by **P722**-LNCs-CTLS-3mM as for stealth **P722**-LNCs, a formulation that already showed promising *in vivo* therapeutic activities on high grade serous epithelial ovarian cancer (HGSOC). However, internalization kinetic on SKOV3 cells and U87MG cells did not show significant differences in cellular uptake using CTLS modified **P722**-LNCs compared to non-modified formulations. Nevertheless, the lower median fluorescence intensity observed using **P722**-LNCs-CTLS-3mM could come from the positive charges of CTLS, improving endosomal escape of LNCs and so the release in cytosol. To go further, **P722**-LNCs-CTLS-3mM will be tested *in vivo* on Patient-Derived Xenograft (PDX) model of high grade serous ovarian cancer (HGSOC).

References

- (1) Lisio, M.-A.; Fu, L.; Goyeneche, A.; Gao, Z.; Telleria, C. High-Grade Serous Ovarian Cancer: Basic Sciences, Clinical and Therapeutic Standpoints. *International Journal of Molecular Sciences* **2019**, *20* (4), 952. <https://doi.org/10.3390/ijms20040952>.
- (2) Torre, L. A.; Trabert, B.; DeSantis, C. E.; Miller, K. D.; Samimi, G.; Runowicz, C. D.; Gaudet, M. M.; Jemal, A.; Siegel, R. L. Ovarian Cancer Statistics, 2018. *CA Cancer J Clin* **2018**, *68* (4), 284–296. <https://doi.org/10.3322/caac.21456>.
- (3) Matulonis, U. A.; Sood, A. K.; Fallowfield, L.; Howitt, B. E.; Sehouli, J.; Karlan, B. Y. Ovarian Cancer. *Nat Rev Dis Primers* **2016**, *2* (1), 1–22. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.61>.
- (4) Papa, A.; Caruso, D.; Strudel, M.; Tomao, S.; Tomao, F. Update on Poly-ADP-Ribose Polymerase Inhibition for Ovarian Cancer Treatment. *J Transl Med* **2016**, *14*, 267. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-1027-1>.
- (5) Jaouen, G.; Vessières, A.; Top, S. Ferrocifen Type Anti Cancer Drugs. *Chem Soc Rev* **2015**, *44* (24), 8802–8817. <https://doi.org/10.1039/c5cs00486a>.
- (6) Idlas, P.; Lepeltier, E.; Jaouen, G.; Passirani, C. Ferrocifen Loaded Lipid Nanocapsules: A Promising Anticancer Medication against Multidrug Resistant Tumors. *Cancers (Basel)* **2021**, *13* (10), 2291. <https://doi.org/10.3390/cancers13102291>.
- (7) Hillard, E.; Vessières, A.; Le Bideau, F.; Plazuk, D.; Spera, D.; Huché, M.; Jaouen, G. A Series of Unconjugated Ferrocenyl Phenols: Prospects as Anticancer Agents. *ChemMedChem* **2006**, *1* (5), 551–559. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200500035>.
- (8) Wang, Y.; Pigeon, P.; Top, S.; McGlinchey, M. J.; Jaouen, G. Organometallic Antitumor Compounds: Ferrocifens as Precursors to Quinone Methides. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2015**, *54* (35), 10230–10233. <https://doi.org/10.1002/anie.201503048>.
- (9) Topin-Ruiz, S.; Mellinger, A.; Lepeltier, E.; Bourreau, C.; Fouillet, J.; Riou, J.; Jaouen, G.; Martin, L.; Passirani, C.; Clere, N. P722 Ferrocifen Loaded Lipid Nanocapsules Improve Survival of Murine Xenografted-Melanoma via a Potentiation of Apoptosis and an Activation of CD8+ T Lymphocytes. *Int J Pharm* **2021**, *593*, 120111. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.120111>.
- (10) Pigeon, P.; Wang, Y.; Top, S.; Najlaoui, F.; Garcia Alvarez, M. C.; Bignon, J.; McGlinchey, M. J.; Jaouen, G. A New Series of Succinimido-Ferrociphenols and Related Heterocyclic Species Induce Strong Antiproliferative Effects, Especially against Ovarian Cancer Cells Resistant to Cisplatin. *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (20), 8358–8368. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00743>.
- (11) Wang, Y.; Pigeon, P.; Top, S.; Sanz García, J.; Troufflard, C.; Ciofini, I.; McGlinchey, M. J.; Jaouen, G. Atypical Lone Pair- π Interaction with Quinone Methides in a Series of Imido-Ferrociphenol Anticancer Drug Candidates. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2019**, *58* (25), 8421–8425. <https://doi.org/10.1002/anie.201902456>.
- (12) Wang, Z.; Meng, F.; Zhong, Z. Emerging Targeted Drug Delivery Strategies toward Ovarian Cancer. *Adv Drug Deliv Rev* **2021**, *178*, 113969. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.113969>.
- (13) Couvreur, P. Nanomedicine: From Where Are We Coming and Where Are We Going? *J Control Release* **2019**, *311–312*, 319–321. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.10.020>.

- (14) Danhier, F. To Exploit the Tumor Microenvironment: Since the EPR Effect Fails in the Clinic, What Is the Future of Nanomedicine? *J Control Release* **2016**, *244* (Pt A), 108–121. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.11.015>.
- (15) Heurtault, B.; Saulnier, P.; Pech, B.; Proust, J.-E.; Benoit, J.-P. A Novel Phase Inversion-Based Process for the Preparation of Lipid Nanocarriers. *Pharm. Res.* **2002**, *19* (6), 875–880. <https://doi.org/10.1023/a:1016121319668>.
- (16) Heurtault, B.; Saulnier, P.; Pech, B.; Proust, J. E.; Benoît, J. P. Properties of Polyethylene Glycol 660 12-Hydroxy Stearate at a Triglyceride/Water Interface. *Int J Pharm* **2002**, *242* (1–2), 167–170. [https://doi.org/10.1016/s0378-5173\(02\)00144-8](https://doi.org/10.1016/s0378-5173(02)00144-8).
- (17) Perrier, T.; Saulnier, P.; Fouchet, F.; Lautram, N.; Benoît, J.-P. Post-Insertion into Lipid NanoCapsules (LNCs): From Experimental Aspects to Mechanisms. *Int J Pharm* **2010**, *396* (1–2), 204–209. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.06.019>.
- (18) Lainé, A.-L.; Gravier, J.; Henry, M.; Sancey, L.; Béjaud, J.; Pancani, E.; Wiber, M.; Texier, I.; Coll, J.-L.; Benoit, J.-P.; Passirani, C. Conventional versus Stealth Lipid Nanoparticles: Formulation and in Vivo Fate Prediction through FRET Monitoring. *J Control Release* **2014**, *188*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.05.042>.
- (19) Huynh, N. T.; Passirani, C.; Allard-Vannier, E.; Lemaire, L.; Roux, J.; Garcion, E.; Vessières, A.; Benoit, J.-P. Administration-Dependent Efficacy of Ferrociphenol Lipid Nanocapsules for the Treatment of Intracranial 9L Rat Gliosarcoma. *Int J Pharm* **2012**, *423* (1), 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.04.037>.
- (20) Lainé, A.-L.; Adriaenssens, E.; Vessières, A.; Jaouen, G.; Corbet, C.; Desruelles, E.; Pigeon, P.; Toillon, R.-A.; Passirani, C. The in Vivo Performance of Ferrocenyl Tamoxifen Lipid Nanocapsules in Xenografted Triple Negative Breast Cancer. *Biomaterials* **2013**, *34* (28), 6949–6956. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.05.065>.
- (21) Béduneau, A.; Saulnier, P.; Hindré, F.; Clavreul, A.; Leroux, J.-C.; Benoit, J.-P. Design of Targeted Lipid Nanocapsules by Conjugation of Whole Antibodies and Antibody Fab' Fragments. *Biomaterials* **2007**, *28* (33), 4978–4990. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.05.014>.
- (22) Karim, R.; Lepeltier, E.; Esnault, L.; Pigeon, P.; Lemaire, L.; Lépinoux-Chambaud, C.; Clere, N.; Jaouen, G.; Eyer, J.; Piel, G.; Passirani, C. Enhanced and Preferential Internalization of Lipid Nanocapsules into Human Glioblastoma Cells: Effect of a Surface-Functionalizing NFL Peptide. *Nanoscale* **2018**, *10* (28), 13485–13501. <https://doi.org/10.1039/c8nr02132e>.
- (23) Idlas, P.; Ladacyia, A.; Némati, F.; Lepeltier, E.; Pigeon, P.; Jaouen, G.; Decaudin, D.; Passirani, C. Ferrocifen Stealth LNCs and Conventional Chemotherapy: A Promising Combination against Multidrug-Resistant Ovarian Adenocarcinoma. *International Journal of Pharmaceutics* **2022**, *626*, 122164. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122164>.
- (24) Bechara, C.; Sagan, S. Cell-Penetrating Peptides: 20 Years Later, Where Do We Stand? *FEBS Lett.* **2013**, *587* (12), 1693–1702. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.04.031>.
- (25) Tashima, T. Intelligent Substance Delivery into Cells Using Cell-Penetrating Peptides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2017**, *27* (2), 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.11.083>.
- (26) Liu, R.; Li, X.; Xiao, W.; Lam, K. S. Tumor-Targeting Peptides from Combinatorial Libraries. *Adv Drug Deliv Rev* **2017**, *110–111*, 13–37. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.05.009>.

- (27) Ma, C.; Yin, G.; You, F.; Wei, Y.; Huang, Z.; Chen, X.; Yan, D. A Specific Cell-Penetrating Peptide Induces Apoptosis in SKOV3 Cells by down-Regulation of Bcl-2. *Biotechnol. Lett.* **2013**, *35* (11), 1791–1797. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1263-x>.
- (28) Ji, S.; Zhu, Z.; Hoye, T. R.; Macosko, C. W. Maleimide Functionalized Poly(ϵ -Caprolactone)-Block-Poly(Ethylene Glycol) (PCL-PEG-MAL): Synthesis, Nanoparticle Formation, and Thiol Conjugation. *Macromolecular Chemistry and Physics* **2009**, *210* (10), 823–831. <https://doi.org/10.1002/macp.200900025>.
- (29) Dasa, S. S. K.; Diakova, G.; Suzuki, R.; Mills, A. M.; Gutknecht, M. F.; Klibanov, A. L.; Slack-Davis, J. K.; Kelly, K. A. Plectin-Targeted Liposomes Enhance the Therapeutic Efficacy of a PARP Inhibitor in the Treatment of Ovarian Cancer. *Theranostics* **2018**, *8* (10), 2782–2798. <https://doi.org/10.7150/thno.23050>.
- (30) Béduneau, A.; Hindré, F.; Clavreul, A.; Leroux, J.-C.; Saulnier, P.; Benoit, J.-P. Brain Targeting Using Novel Lipid Nanovectors. *J Control Release* **2008**, *126* (1), 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.11.001>.
- (31) Pretsch, E.; Bühlmann, P.; Affolter, C. *Structure Determination of Organic Compounds*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2000. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-04201-4>.
- (32) Vonarbourg, A.; Passirani, C.; Saulnier, P.; Benoit, J.-P. Parameters Influencing the Stealthiness of Colloidal Drug Delivery Systems. *Biomaterials* **2006**, *27* (24), 4356–4373. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.03.039>.
- (33) Jie, L.-Y.; Cai, L.-L.; Wang, L.-J.; Ying, X.-Y.; Yu, R.-S.; Zhang, M.-M.; Du, Y.-Z. Actively-Targeted LTVSPWY Peptide-Modified Magnetic Nanoparticles for Tumor Imaging. *Int J Nanomedicine* **2012**, *7*, 3981–3989. <https://doi.org/10.2147/IJN.S33593>.
- (34) Yin, J.; Yao, D.; Yin, G.; Huang, Z.; Pu, X. Peptide-Decorated Ultrasmall Superparamagnetic Nanoparticles as Active Targeting MRI Contrast Agents for Ovarian Tumors. *ACS Appl Mater Interfaces* **2019**, *11* (44), 41038–41050. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b14394>.
- (35) Vonarbourg, A.; Saulnier, P.; Passirani, C.; Benoit, J.-P. Electrokinetic Properties of Noncharged Lipid Nanocapsules: Influence of the Dipolar Distribution at the Interface. *Electrophoresis* **2005**, *26* (11), 2066–2075. <https://doi.org/10.1002/elps.200410145>.
- (36) Owens, D. E.; Peppas, N. A. Opsonization, Biodistribution, and Pharmacokinetics of Polymeric Nanoparticles. *Int J Pharm* **2006**, *307* (1), 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.10.010>.
- (37) Yorulmaz Avsar, S.; Jackman, J. A.; Kim, M. C.; Yoon, B. K.; Hunziker, W.; Cho, N.-J. Immobilization Strategies for Functional Complement Convertase Assembly at Lipid Membrane Interfaces. *Langmuir* **2017**, *33* (29), 7332–7342. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b01465>.
- (38) Vonarbourg, A.; Passirani, C.; Saulnier, P.; Simard, P.; Leroux, J. C.; Benoit, J. P. Evaluation of Pegylated Lipid Nanocapsules versus Complement System Activation and Macrophage Uptake. *J Biomed Mater Res A* **2006**, *78* (3), 620–628. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30711>.
- (39) Morille, M.; Montier, T.; Legras, P.; Carmoy, N.; Brodin, P.; Pitard, B.; Benoît, J.-P.; Passirani, C. Long-Circulating DNA Lipid Nanocapsules as New Vector for Passive Tumor Targeting. *Biomaterials* **2010**, *31* (2), 321–329. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.044>.
- (40) Balzeau, J.; Pinier, M.; Berges, R.; Saulnier, P.; Benoit, J.-P.; Eyer, J. The Effect of Functionalizing Lipid Nanocapsules with NFL-TBS.40-63 Peptide on Their Uptake by Glioblastoma Cells. *Biomaterials* **2013**, *34* (13), 3381–3389. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.01.068>.

Supplementary information

CTLS peptide (CTLSGAFELSRDK)

M = 1425 g/mol

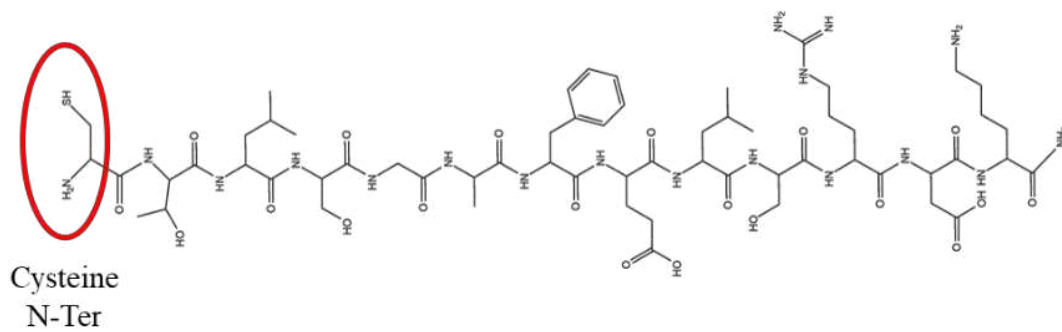


Figure S1. Chemical structure of CTLS.

CTLS peptide (CTLSGAFELSRDK)

M = 1425 g/mol

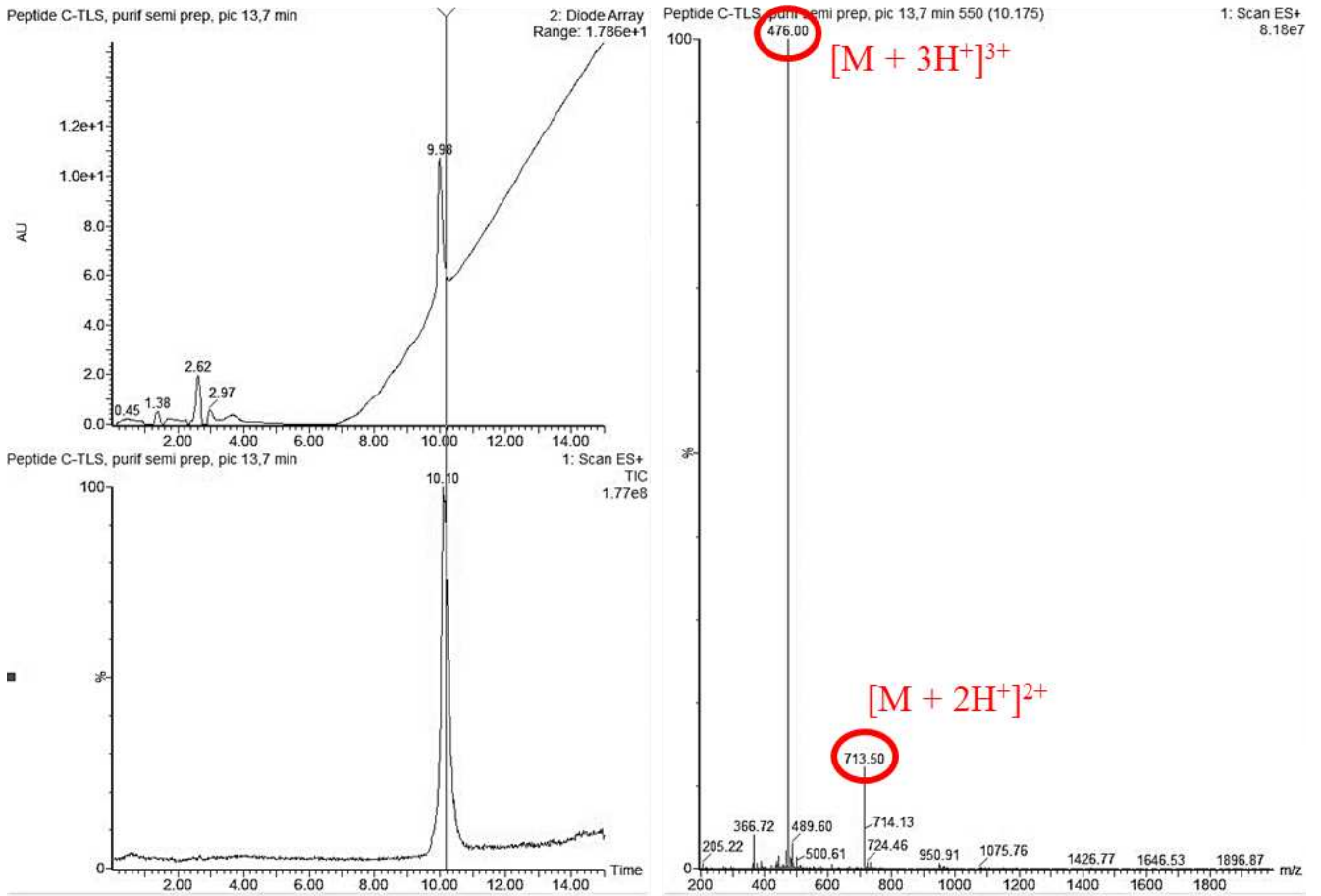


Figure S2. LC chromatograms (on the left) and mass spectra (on the right) of purified CTLS peptide

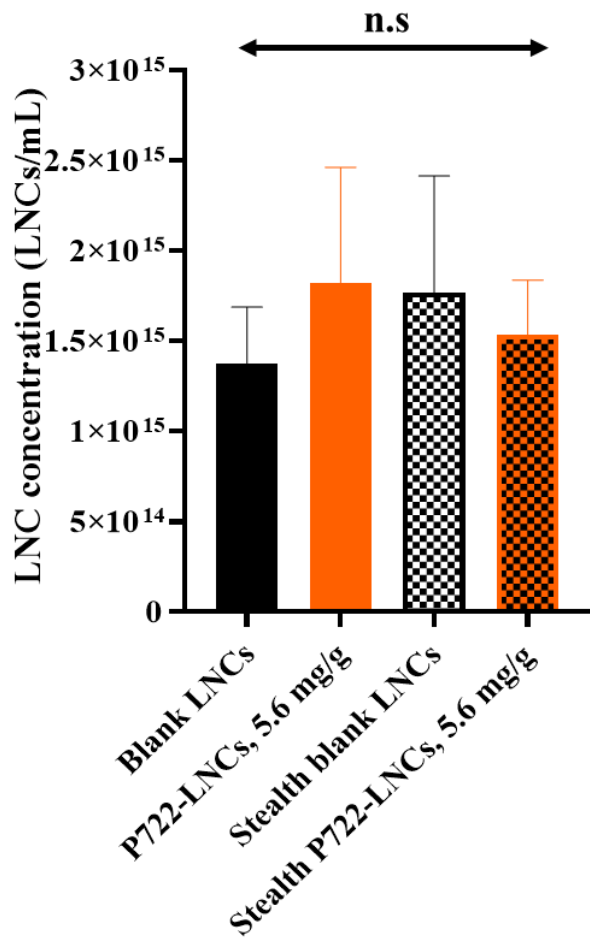


Figure S3. LNC concentration (number of LNCs per mL of formulation) determined by NTA for blank LNCs (in black), P722-LNCs (in orange), stealth blank LNCs (in white with checkerboard) and stealth P722-LNCs (in orange with checkerboard) ($4 < n < 5$).

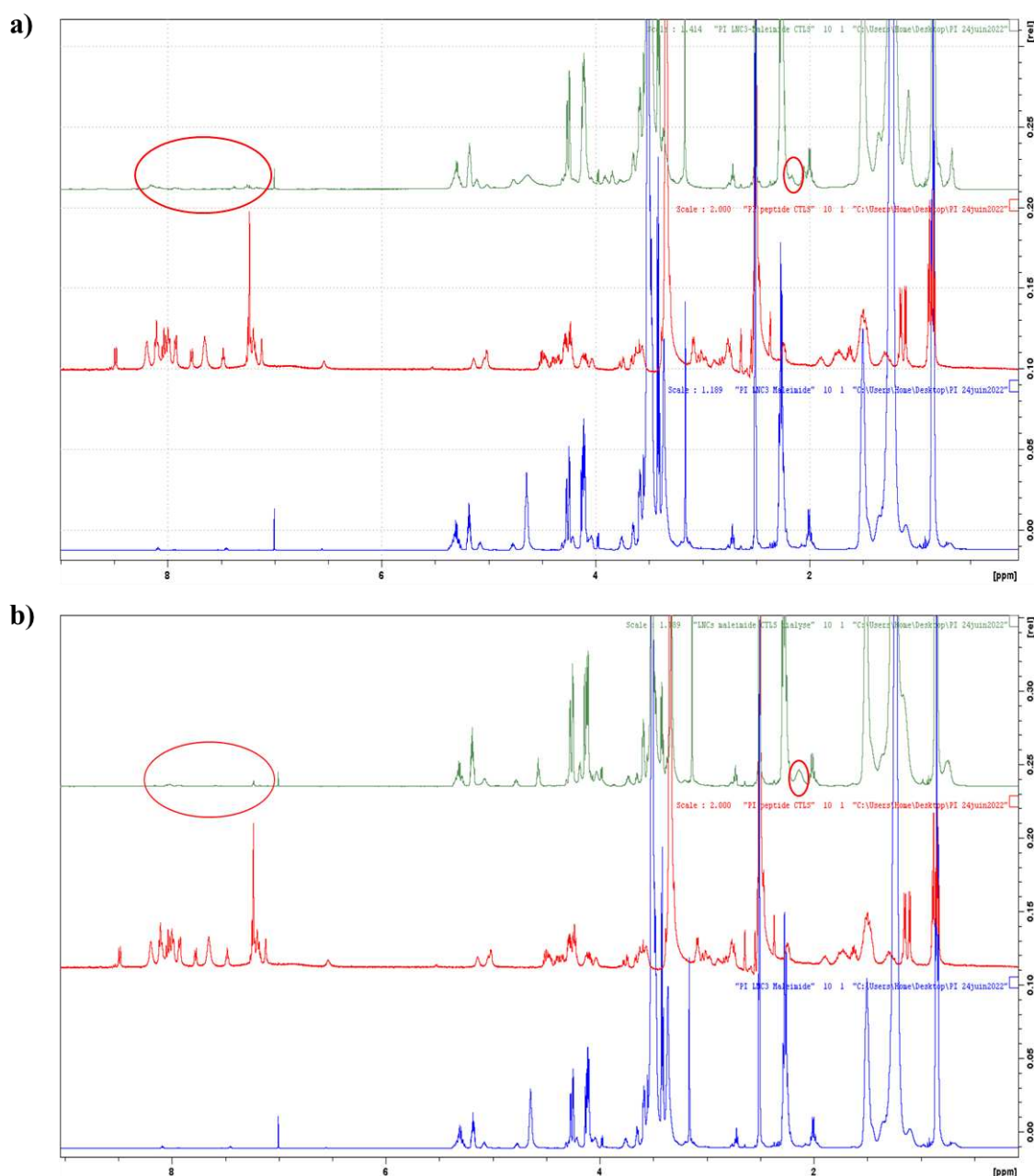


Figure S4. ^1H NMR spectra obtained in DMSO- d_6 for: **a)** CTLS peptide (red spectrum), blank LNC-Maleimide (blue spectrum), blank LNC-Maleimide-CTLS-3mM without dialysis (green spectrum); **b)** CTLS peptide (red spectrum), blank LNC-Maleimide (blue spectrum) and blank LNC-Maleimide-CTLS-3mM dialysed for 24 h in UPW (green spectrum). Red circles show characteristic chemical shift from CTLS peptide.

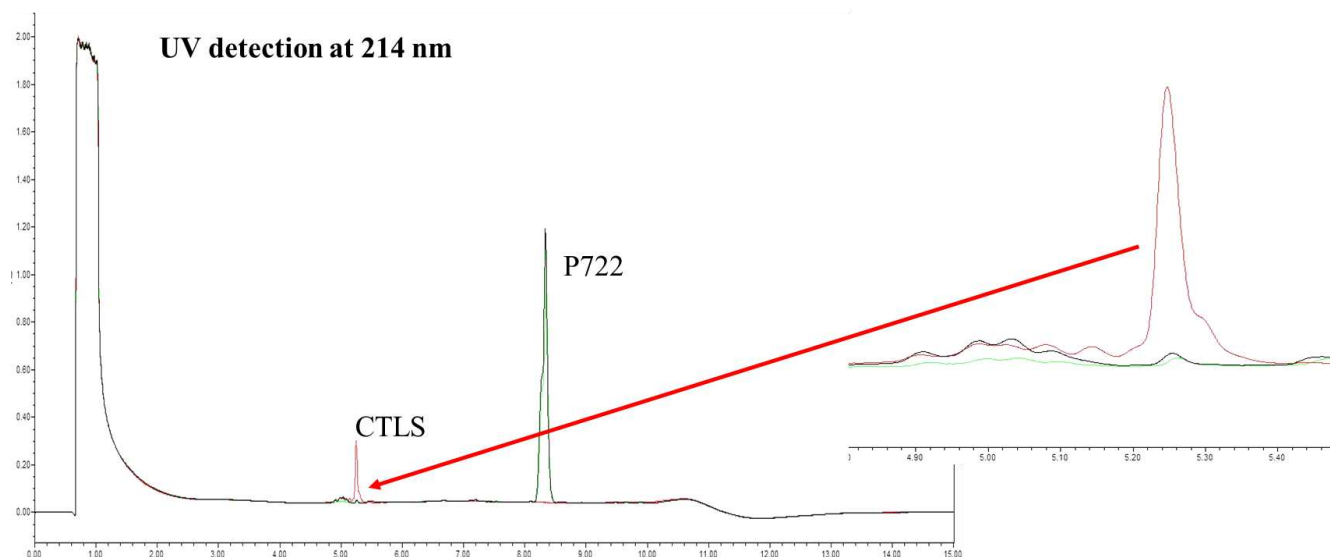


Figure S5. UPLC chromatograms of CTLS peptide at 3 mM diluted by a factor 40 in a mixture of blank LNCs dissolved by a 40-fold dilution in methanol/DMSO (90/10 v/v) (red chromatogram), **P722**-LNCs-CTLS-3mM diluted 40-fold in methanol/DMSO (90/10 v/v) (black chromatogram) and **P722**-LNCs-CTLS-1mM diluted 40-fold in methanol/DMSO (90/10 v/v) (green chromatogram).

Table S1. Physico-chemical characteristics (hydrodynamic diameter, PDI, zeta potential) of formulations **P722**-LNCs-Maleimide, **P722**-LNCs-CTLS-1mM and **P722**-LNCs-CTLS-3mM, dialysed for 24 h in water at 37 °C. Data are means \pm SD (n = 3). Statistical analysis were performed using one-way analysis of variance (ANOVA 1F) followed by a Dunn's test for multiple comparisons between zeta potential values of **P722**-LNCs-Maleimide, **P722**-LNCs-CTLS-1mM, **P722**-LNCs-CTLS-3mM.

Formulation	Hydrodynamic diameter (nm)	PDI	Zeta Potential (mV)
P722 -LNCs-Maleimide, dialysed 24 h	59.3 \pm 1.5	0.10 \pm 0.03	-23.3 \pm 0.2
P722 -LNCs-CTLS-1mM, dialysed 24 h	66.4 \pm 0.2	0.15 \pm 0.01	-22.0 \pm 1.4 (n.s)
P722 -LNCs-CTLS-3mM, dialysed 24 h	69.6 \pm 3.5	0.14 \pm 0.01	-19.4 \pm 2.9 (n.s)

Table S2. Physico-chemical characteristics (hydrodynamic diameter, PDI, zeta potential) of blank LNCs, blank LNCs-Maleimide, blank LNCs-CTLS-1mM and blank LNCs-CTLS-3mM, with or without dialysed for 24 h in water at 37 °C. Data are means \pm SD (1 < n < 3).

Formulation	Hydrodynamic diameter (nm)	PDI	Zeta Potential (mV)
Blank LNCs	52.5 \pm 0.1	0.07 \pm 0.02	-3.2 \pm 0.8
Blank LNCs-Maleimide	66.4 \pm 2.9	0.14 \pm 0.01	-17.2 \pm 0.6
Blank LNCs-CTLS-1mM	74.3	0.16	-13.1
Blank LNCs-CTLS-3mM	68.4 \pm 7.8	0.15 \pm 0.05	-8.6 \pm 1.9
Blank LNCs-CTLS-1mM, dialysed 24 h	75.9	0.22	-17
Blank LNCs-CTLS-3mM, dialysed 24 h	78	0.24	-12.6

Table S3. Physico-chemical characteristics (hydrodynamic diameter, PDI, zeta potential) of fluorescent formulation **P722**-LNCs-DiD, **P722**-LNCs-DiD-Maleimide, **P722**-LNCs-DiD-CTLS-1mM and **P722**-LNCs-DiD-CTLS-3mM (n=1).

Formulation	Hydrodynamic diameter (nm)	PDI	Zeta Potential (mV)
P722 -LNCs-DiD	55.4	0.160	-1.5
P722 -LNCs-DiD-Maleimide	65.0	0.159	-15.3
P722 -LNCs-DiD-CTLS-1mM	68.5	0.150	-13.2
P722 -LNCs-DiD-CTLS-3mM	71.7	0.138	-6.6

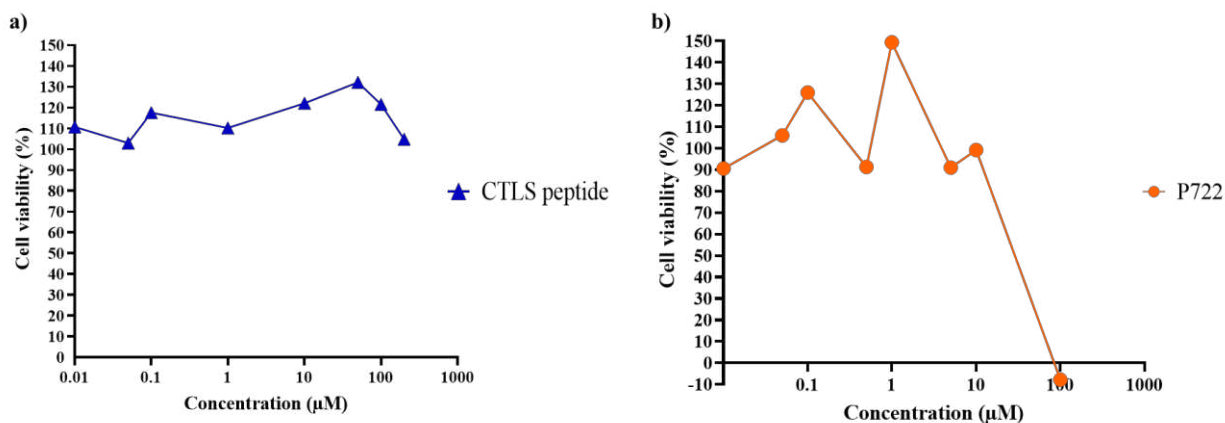


Figure S6. Cell viability on SKOV3 cells after 24 h of treatment with several concentrations of: **a)** CTLS peptide (diluted in DMSO) ; **b)** P722 (diluted in DMSO). Results were obtained using a MTS test after incubation for 2 h. Absorbance was measured at 490 nm using a spectrophotometer plate reader (SPECTRAMax M2, Molecular Devices, San Jose, USA). SKOV3 cells were seeded at 10,000 cells/well in 96-well plates for 24 h, at 37 °C with 5 % CO₂. Then cells were treated for 24 h with different concentration in CTLS and P722. Experiments were performed once for each molecule (n = 1).

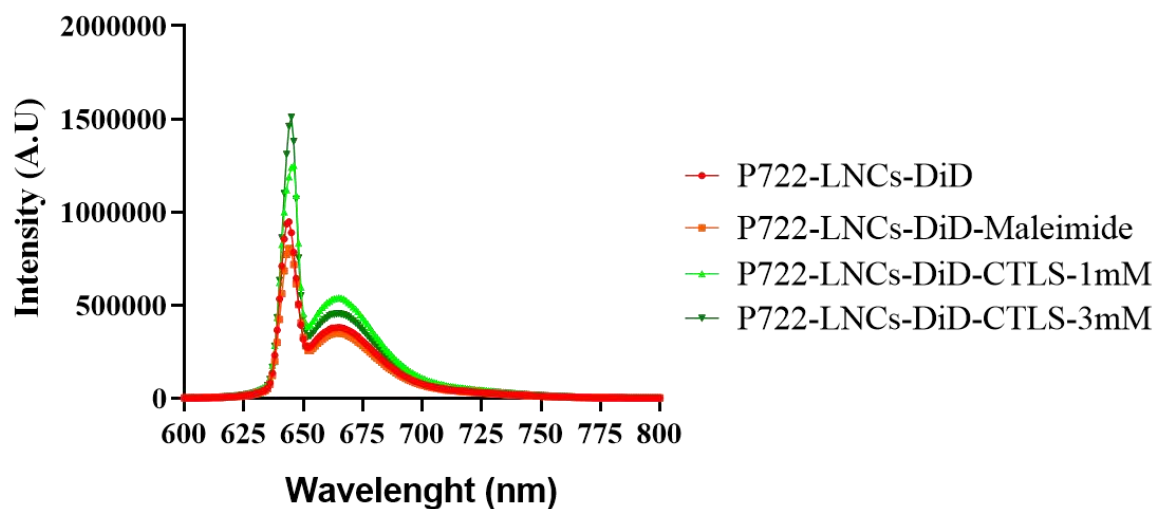


Figure S7. Fluorescence spectrum of **P722-LNCs-DiD** (in red), **P722-LNCs-DiD-Maleimide** (in orange), **P722-LNCs-DiD-CTLS-1mM** (in light green) and **P722-LNCs-DiD-CTLS-3mM** (in dark green). Results were obtained using a spectrofluorometer FluoroMax-4 (HORIBA Scientific, Japan).

3. Conclusion

Cette étude consistait à formuler des LNCs chargées en **P722**, à 5,6 mg/g d'excipients lipophiles (eq. 1,6 mg/mL) dont la surface serait modifiée par l'ajout d'un peptide pénétrant ciblant spécifiquement les cellules cancéreuses ovariennes. Après avoir synthétisé sur support solide le peptide CTLS en stratégie Fmoc, purifié et caractérisé, le peptide a été greffé covalamment à la surface des **P722**-LNCs-Maléimide selon une addition de Michael. La RMN ¹H et 2D a permis de vérifier la présence de déplacements chimiques caractéristiques d'une liaison C-S. Le greffage du peptide CTLS a aussi été observé indirectement par chromatographie et par zétamétrie avec une augmentation significative du potentiel zêta parallèlement à la concentration en peptide CTLS. De manière intéressante, la formulation **P722**-LNCs-CTLS-3mM n'a montré aucune activation des protéines du complément, tout comme la formulation **P722**-LNCs furtives déjà testées *in vivo* précédemment, avec un résultat prometteur. Cependant, la capacité de ciblage spécifique du cancer de l'ovaire par les **P722**-LNCs-CTLS n'a pas été démontrée. En effet, la cinétique d'internalisation réalisée sur les cellules SKOV3 et U87MG n'a montré aucune différence significative entre les deux lignées cellulaires. Il en a été de même entre les différentes formulations, que ce soit avec ou sans peptide CTLS. Néanmoins, il est possible d'avancer que le peptide CTLS n'empêche pas l'internalisation des **P722**-LNCs dans le cytoplasme des cellules.

Pour aller plus loin, il serait intéressant de vérifier *in vitro* si un effet synergique est obtenu après traitement des cellules avec le **P722** et le peptide CTLS. En effet, les auteurs de l'article sur le peptide TLS avait mis en évidence une synergie entre la doxorubicine et le peptide. Enfin, même si la capacité de ciblage du peptide ne semble pas fonctionner dans notre étude *in vitro*, étant donné l'effet cytotoxique publié de TLS, les formulations **P722**-LNCs-CTLS seront tout de même testées *in vivo* sur les modèles « PDX » Low OXPPOS OV21 et OV54.

Discussion Générale

Discussion Générale

1. Résumé des travaux

Le cancer de l’ovaire est le 7^{ème} cancer le plus fréquent et le 8^{ème} cancer le plus mortel chez la femme, dans le monde (Lisio et al. 2019). Parmi les cancers gynécologiques, celui-ci reste la principale cause de mortalité. Ces cancers sont classifiés histologiquement selon trois familles : les cancers épithéliaux de l’ovaire ; les cancers d’origine stromale ; les cancers d’origine germinale. Les cancers épithéliaux de l’ovaire restent les plus fréquents, dont 75 % sont des carcinomes séreux de haut grade (Matulonis et al. 2016). Ces carcinomes sont régulièrement diagnostiqués à un stade avancé selon la classification FIGO, ce qui rend la prise en charge et les traitements difficiles. Le traitement de référence consiste en une chirurgie de cytoréduction suivie d’une association de chimiothérapies (carboplatine et paclitaxel) (Matulonis et al. 2016). Malgré une réponse initiale au traitement, des phénomènes de résistance à la chimiothérapie apparaissent très souvent, entraînant inexorablement le décès des patientes.

Afin de proposer de nouvelles alternatives, l’équipe du Dr. Mechta-Grigoriou de l’Institut Curie s’est intéressée au rôle du stress oxydant dans la sensibilité des carcinomes séreux de haut grade à la chimiothérapie conventionnelle (Gruosso et al. 2015 ; Batista, Gruosso, and Mechta-Grigoriou 2013). Dans une étude publiée en 2019 dans *Cell Metabolism*, cette même équipe a mis en évidence qu’une classification selon le métabolisme mitochondrial des cellules cancéreuses était possible, favorisant ou non la réponse à la chimiothérapie (Gentric et al. 2019). Ainsi, deux sous-types de carcinomes séreux de haut grade ont été observés : les tumeurs séreuses de haut grade dites « High OXPHOS » ayant un stress oxydatif chronique et étant sensibles à la chimiothérapie ; les tumeurs séreuses de haut grade dites « Low OXPHOS » présentant peu de stress oxydant et étant *in fine* peu sensibles à la chimiothérapie. L’idée de ce projet a été de proposer une alternative thérapeutique, seule ou en combinaison avec la chimiothérapie classique, en utilisant une molécule générant des espèces réactives de l’oxygène (ROS) afin de permettre une sensibilisation des tumeurs dites « Low OXPHOS » à la chimiothérapie. Pour atteindre cet objectif, les ferrocifènes, famille de molécules bio-organométalliques ayant des propriétés cytotoxiques particulièrement intéressantes *in vitro* sur plusieurs lignées cancéreuses résistantes (glioblastome, mélanome métastatique, cancer du sein triple négatif), semblent pouvoir répondre à notre objectif (Jaouen, Vessières, and Top 2015). En effet, la capacité des ferrocifènes à produire des ROS au niveau cellulaire a déjà été mise en évidence dans des études précédentes (Citta et al. 2014; Scalcon et al. 2017). Cependant, du fait de leur nature hydrophobe, ces molécules doivent être formulées dans des nano-systèmes afin de pouvoir être administrées par voie intraveineuse. Plusieurs études ont démontré la capacité des LNCs, souvent rendues furtives par ajout d’un phospholipide PEGylé, à encapsuler une charge en ferrocifènes suffisamment importante pour obtenir des résultats d’efficacité *in vivo* intéressants sur des cancers multi-résistants (Lainé et al. 2013; Huynh et al. 2011; Topin-Ruiz et al.

2021).

Ainsi, dans ce projet, la famille de ferrocifènes la plus récente, ayant un groupement succinimide, a été utilisée et formulée dans les LNCs : une concentration inhibitrice CI_{50} particulièrement faible *in vitro* du **P722** sur des lignées cellulaires de cancer de l’ovaire résistantes à la carboplatine avait été observée (Pigeon et al. 2017). Les travaux réalisés au cours de cette thèse peuvent ainsi être divisés en trois parties.

La première partie des travaux, présentée dans le Chapitre 2, comporte l’étude physico-chimique approfondie de formulations de LNCs chargées en succinimide-ferrocifènes. Le premier succinimide-ferrocifène encapsulé dans les LNCs a été le **P722**. La charge maximale de **P722** encapsulée, obtenue par UPLC, était de 7,0 mg/g d’excipients lipophiles (eq. à 2 mg/mL), ce qui pouvait être considéré comme faible par rapport à d’autres ferrocifènes déjà utilisés précédemment. Ainsi, afin d’augmenter la charge maximale encapsulable dans les LNCs, des dérivés du **P722** ont été synthétisés, par le Dr. Pascal Pigeon, pour rendre la molécule plus lipophile. 5 nouveaux ferrocifènes ont ainsi été étudiés : le (**Z**)-**P849**, le (**E**)-**P849**, le **P769**, le (**Z**)-**P998** et le (**E**)-**P998**. La plus grande lipophilie de ces molécules par rapport au **P722** a été vérifiée par UPLC, après solubilisation dans les triglycérides composant le cœur des LNCs, le Labrafac® WL 1349. De façon intéressante, le comportement de ces molécules en formulation a été différent, notamment entre les isomères de **P849** et les isomères de **P998**. En effet, les isomères (**Z**)-**P849** et (**E**)-**P998** s’encapsulaient mieux dans les LNCs que les isomères (**E**)-**P849** et (**Z**)-**P998**, nous donnant une première information sur le rôle de l’organisation spatiale des ferrocifènes sur leur comportement en formulation. Par ailleurs, à partir d’une certaine charge en **P769** et (**E**)-**P998**, une nouvelle forme galénique, jamais observée auparavant avec les ferrocifènes, a été obtenue : un gel. Après une caractérisation rhéologique de ces gels en fonction de la concentration en ferrocifènes et du nombre de LNCs dans les formulations, les études de tensiométrie notamment ont démontré le caractère amphiphile du **P769** et, dans une moindre mesure, du (**E**)-**P998**. Cette amphiphilie permettrait à ces deux molécules de se positionner au niveau de la membrane des LNCs, générant ainsi des interactions entre les différentes LNCs et expliquant l’obtention d’un gel, à partir d’une certaine concentration. Ces résultats démontrent l’importance d’avoir un groupement succinimide en position *cis* d’un groupement acétyle sur les ferrocifènes pour obtenir une forme galénique gélifiée. Cette étude a permis l’écriture d’un article qui sera soumis dans le journal *Langmuir*.

La deuxième partie des travaux, présentée dans le Chapitre 3, a consisté à étudier l’efficacité *in vivo* de formulations ferrocifène-LNCs sur des modèles PDX murins « High OXPHOS » et « Low OXPHOS » de cancers épithéliaux séreux de haut grade de l’ovaire. Les deux ferrocifènes étudiés étaient le **P53**, ayant une fonction alcool à la place de la fonction succinimide, et le **P722**. Les expériences avec le **P53**, d’abord encapsulé dans des LNCs conventionnelles puis dans des LNCs furtives, ont débuté en amont de ce projet ANR, pendant la thèse du Dr. Abdallah Ladaycia. Les expérimentations *in vivo* ont été réalisées par l’Institut Curie, avec le Dr. Didier Decaudin et la Dr. Fariba Nemati, qui ont développé les modèles PDX murins utilisés.

Tout d'abord, dans une première expérience, les résultats démontrés par l'équipe du Dr. Mechta-Grigoriou sur la sensibilité ou non à la chimiothérapie des tumeurs « High OXPHOS » et « Low OXPHOS » ont été revérifiés. De plus, lors de cette expérience, il a été observé que la formulation de **P53**-LNCs conventionnelles, à 27,3 mg/g d'excipients lipophiles en **P53**, n'induisait pas de réduction du volume tumoral des souris significative, en traitement seul ou en association avec le carboplatine et le paclitaxel, par rapport à la chimiothérapie seule.

Dans une deuxième expérience, la formulation de **P53**-LNCs furtives, à 43,6 mg/g d'excipients lipophiles, a été réalisée. Cette formulation a ensuite été testée, seule ou en combinaison avec le carboplatine et le paclitaxel, sur deux modèles « Low OXPHOS », OV21 et OV54. Comme pour la formulation **P53**-LNCs conventionnelles, les **P53**-LNCs furtives, injectées deux fois par semaine n'ont montré aucune réduction significative du volume tumoral par rapport au groupe contrôle (NaCl 0,9 %) sur les deux modèles OV21 et OV54. Cependant, la combinaison **P53**-LNCs furtives / carboplatine / paclitaxel a montré des résultats prometteurs puisqu'une réduction du volume tumoral plus importante que pour la chimiothérapie seule a été obtenue sur les deux modèles. De plus, un éventuel effet thérapeutique des LNCs blanches furtives (sans **P53**) a été observé puisque, sur le modèle OV54, la diminution du volume tumoral la plus importante a été obtenue avec la combinaison LNCs blanches furtives / carboplatine / paclitaxel. Enfin, le taux de réponse global des souris aux traitements a été significativement amélioré avec la combinaison **P53**-LNCs furtives / carboplatine / paclitaxel comparativement à la chimiothérapie seule.

Pour la troisième expérience, le **P53** a été remplacé par le **P722** pour lequel une meilleure activité biologique avait été observée *in vitro* sur plusieurs lignées cellulaires de cancer de l'ovaire (Pigeon et al. 2017). Le **P722** a été encapsulé, à une concentration de 5,6 mg/g d'excipients lipophiles, dans des LNCs furtives. La formulation **P722**-LNCs furtives a été testée seule ou en combinaison avec le carboplatine et le paclitaxel, sur les deux mêmes modèles Low OXPHOS, OV21 et OV54. Les résultats obtenus ont confirmé ce qui avait été observé avec la formulation **P53**-LNCs. Tout d'abord, la formulation seule **P722**-LNCs n'a pas permis d'induire une réduction du volume tumoral significative par rapport au groupe contrôle (NaCl 0,9 %). La combinaison **P722**-LNCs furtives / carboplatine / paclitaxel a montré la même tendance qu'avec **P53**-LNCs / carboplatine / paclitaxel : une réduction tumorale plus importante qu'avec la chimiothérapie seule, sur les deux modèles Low OXPHOS, a été observée. Cette combinaison de traitement a même permis d'obtenir une souris en rémission complète et une autre avec un volume tumoral très faible pendant 70 jours, ce qui n'avait pas été obtenu avec le **P53**, sur le modèle OV21. Enfin, le taux de réponse globale des souris a aussi été amélioré significativement avec la combinaison **P722**-LNCs furtives / carboplatine / paclitaxel. Ces résultats sont d'autant plus intéressants qu'ils ont été obtenus avec une concentration 8 fois plus faible en **P722** par rapport au **P53**. Cela a permis de confirmer les premières promesses du **P722**, en tant que ferrocifène « lead », observées *in vivo* sur le mélanome métastatique (Topin-Ruiz et al. 2021). A noter que le même phénomène d'effet des LNCs blanches furtives a été ré-obtenu sur le modèle OV54.

Enfin, même si aucune analyse de toxicité sur les différents organes n'a été réalisée, il est à noter qu'aucune souris traitée par les différentes combinaisons n'a montré de signes de souffrance et de perte de masse après administration par voie intraveineuse des formulations. Ces résultats, d'autant plus prometteurs qu'ils ont été obtenus sur des modèles PDX murins considérés comme plus proches d'une réalité clinique (Decaudin 2011), ont été publiés en 2022 dans le journal *International Journal of Pharmaceutics* (Idlas et al. 2022).

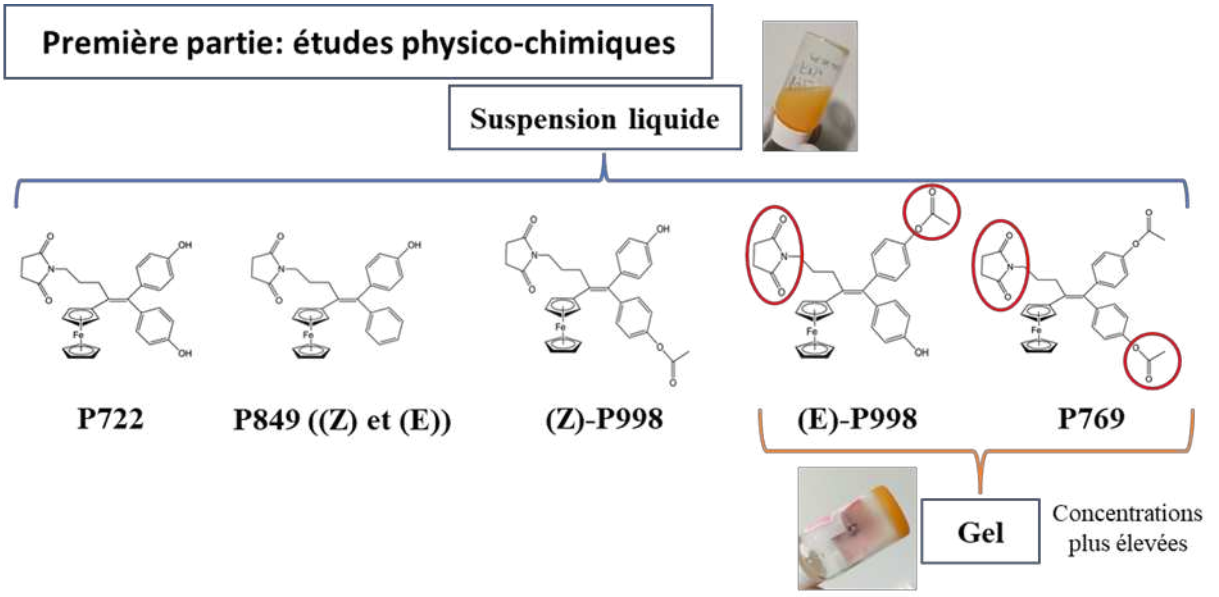
La troisième partie des travaux, présentée dans le Chapitre 4, a concerné la fonctionnalisation de surface des LNCs par greffage covalent d'un peptide pénétrant ciblant potentiellement spécifiquement les cellules cancéreuses de l'ovaire. Dans l'étude *in vivo* réalisée précédemment, les **P722**-LNCs étaient rendues furtives par la post-insertion du DSPE-PEG₂₀₀₀ à la surface des LNCs. Cette stratégie reposait donc sur l'effet « EPR » qui permet l'accumulation des nano-systèmes au niveau du site tumoral, nommé « ciblage passif ». Cependant cette stratégie ne permet pas de limiter les risques de toxicité sur les cellules saines. L'utilisation de peptides pénétrants ciblant spécifiquement des récepteurs surexprimés à la surface des cellules cancéreuses permettrait de réaliser un « ciblage actif ». Le peptide pénétrant utilisé dans cette dernière partie est nommé TLS. C'est un peptide composé de 12 acides aminés (TLSGAFELSRDK) ayant des propriétés de ciblage de la lignée cellulaire de cancer de l'ovaire SKOV3 et des propriétés cytotoxiques, d'après les auteurs de l'étude publiée en 2013 (Ma, Yin, You, et al. 2013). La décoration de la surface par ce peptide des **P722**-LNCs, à 5,6 mg/g d'excipients lipophiles et des LNCs blanches a été réalisée par un greffage covalent via une réaction thiol/maléimide.

Dans un premier temps, le peptide TLS a été modifié par l'ajout d'un résidu cystéine, portant une fonction thiol sur sa chaîne latérale, en position N-Ter, afin d'apporter un site suffisamment nucléophile. Ce nouveau peptide a été appelé CTLS. Le peptide CTLS a été synthétisé sur support solide en stratégie Fmoc. Il a ensuite été purifié par HPLC semi-préparative puis caractérisé par LC/MS et RMN du proton. Puis, afin d'obtenir un site très électrophile à la surface des **P722**-LNCs et des LNCs blanches, une post-insertion du DSPE-PEG₂₀₀₀-maléimide a été réalisée selon le même procédé que pour le DSPE-PEG₂₀₀₀. L'augmentation du diamètre mais surtout la diminution du potentiel zêta des LNCs, due aux dipôles négatifs apparents apportés par les chaînes de PEG, a permis de confirmer la post-insertion du DSPE-PEG₂₀₀₀-Maléimide.

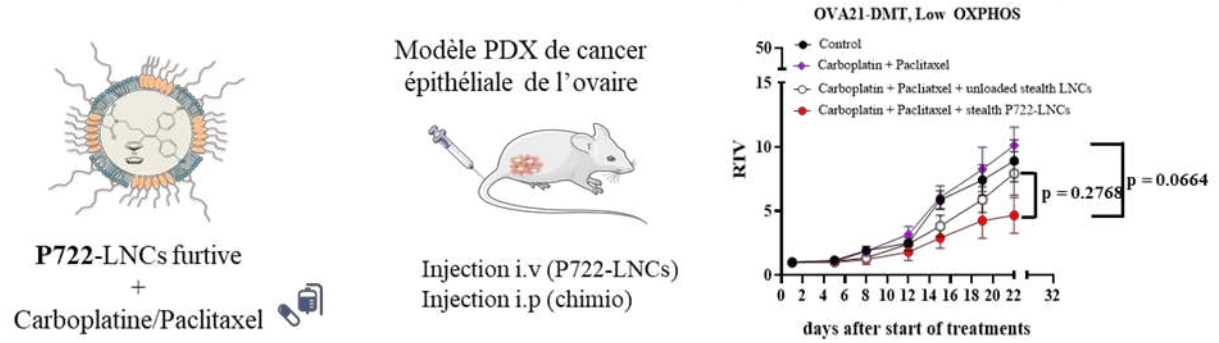
Le greffage covalent a ensuite été réalisé entre le peptide CTLS et la fonction maléimide, à deux concentrations en peptide CTLS : 1 mM et 3 mM. Les analyses ¹H RMN et 2D ont montré l'obtention de déplacements chimiques caractéristiques d'une liaison -C-S-C. Le greffage covalent du peptide à la surface des LNCs a également été confirmé indirectement par la valeur du potentiel zêta. En effet, après le greffage, le potentiel zêta des LNCs a augmenté significativement avec la concentration en peptides CTLS. Ceci a été attribué à la charge globale positive du peptide CTLS. De plus, durant ces travaux, il a aussi été démontré que la formulation **P722**-LNCs-CTLS-3mM n'activait pas les protéines du complément responsables de l'opsonisation des nanoparticules, tout comme la formulation **P722**-LNCs

furtives, un prérequis important quant à une potentielle administration *in vivo* de cette formulation. Enfin, la capacité de ciblage des formulations **P722-LNCs-CTLS-1mM** et **P722-LNCs-CTLS-3mM** a été étudiée par cytométrie en flux sur la lignée cellulaire ovarienne SKOV3 et sur la lignée cellulaire de glioblastome U87MG (contrôle). La cinétique d'internalisation sur les lignées cellulaires SKOV3 et U87MG, après traitement pendant 1 h, 6 h et 24 h par les différentes formulations **P722-LNCs**, décorées en surface ou non par CTLS, n'a pas démontré une amélioration de l'internalisation cellulaire grâce au peptide pénétrant. Plus précisément, sur la lignée cellulaire SKOV3, aucune différence n'a été observée entre les formulations **P722-LNCs** décorées ou non par le peptide CTLS. Néanmoins, même si la capacité de ciblage du peptide CTLS n'a pas été démontrée, il semblerait que le peptide CTLS n'empêche pas l'internalisation cellulaire et ce peptide pourrait même peut-être favoriser l'échappement à l'endosome des **P722-LNCs** lorsqu'une concentration finale de 3 mM en CTLS est utilisée.

Les principaux résultats obtenus lors de ce projet ANR sont résumés graphiquement sur la **Figure 11**.



Seconde partie: études *in vivo*



Résultats *in vivo* prometteurs

Troisième partie: fonctionnalisation de surface par un peptide pénétrant

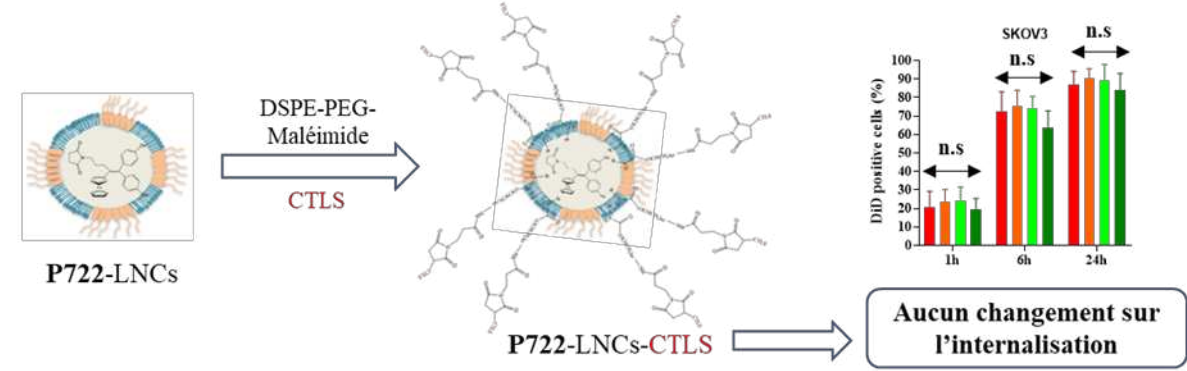


Figure 11. Résumé des principaux résultats obtenus lors de projet ANR.

2. Amélioration des formulations

Les LNCs développées et brevetées par le laboratoire au début des années 2000, sont composées d'un cœur de triglycérides entouré d'une membrane de lipides PEGylés, le polyéthylène glycol (PEG) hydroxystéarate (Kolliphor® HS 15) (Heurtault et al. 2002). Le Kolliphor® HS 15 est l'un des principaux constituants de la LNC, à hauteur de 16,9 % (w/w_{total}) afin d'obtenir des LNCs de diamètre 50 nm. Cette quantité de PEG augmente après la post-insertion d'un phospholipide PEGylé, le DSPE-PEG₂₀₀₀, utilisé dans certaines applications uniquement, afin de les rendre furtives. Le PEG est un polymère hydrophile de choix, couramment utilisé dans le monde des nanomédicaments car il crée une gêne stérique permettant d'éviter les phénomènes d'opsonisation et ainsi d'augmenter *in fine* le temps de circulation des nanoparticules dans le sang (Shi et al. 2022; Nogueira et al. 2020). Cependant, il a été observé dans la littérature que l'utilisation du PEG pouvait présenter plusieurs inconvénients. Cette molécule est un composé exogène à l'organisme, biocompatible mais non biodégradable. De plus, ce polymère se trouvant dans de nombreux produits de la vie quotidienne (nourriture, cosmétiques...), l'organisme humain a développé des anticorps contre le PEG et une réponse immunitaire de l'organisme à ce polymère a été caractérisée, provoquant une accélération de la clairance du médicament après une deuxième injection (Ishida et al. 2006; Ishida and Kiwada 2008). Une autre étude publiée en 2022 a montré que des nanoparticules PEGylées entraînaient une réponse inflammatoire au niveau des cellules endothéliales vasculaires (Tehrani et al. 2022). Enfin, celui-ci pourrait éventuellement être à l'origine de réactions allergiques, provoquant notamment des chocs anaphylactiques. En effet, des très faibles cas de chocs anaphylactiques ont été observés (< 0,1 %), principalement chez les femmes, après la vaccination au COVID-19 avec les vaccins à ARN messager développés par Pfizer-BioNTech et Moderna, dont une partie de la structure est composée de phospholipides PEGylés (CDCMMWR 2021; Kuehn 2021; Schoenmaker et al. 2021). Ainsi, remplacer au minimum le DSPE-PEG₂₀₀₀ par un autre polymère, apportant aussi des propriétés de furtivité, dans les formulations **P722**-LNCs pourrait devenir une nécessité. Tout comme avec le DSPE-PEG₂₀₀₀, l'ajout d'un autre polymère amphiphile pourrait se faire via un procédé de post-insertion, dans les mêmes conditions opératoires (ajout du polymère post-formulation des **P722**-LNCs, puis agitation pendant 4 h à 30 °C). Même si initialement, il avait été montré que le polymère devait posséder une double chaîne aliphatique pour être post-inséré dans la membrane des LNCs (Perrier et al. 2010), il semblerait que cela ne soit pas nécessaire puisque d'autres études plus récentes ont démontré la post-insertion possible de polymères synthétiques ou naturels n'ayant qu'une chaîne aliphatique pour partie lipophile (Pautu et al. 2021; Hirsjärvi et al. 2013). Par exemple, Pautu *et al.* ont réalisé la post-insertion de plusieurs copolymères, apportant des propriétés de furtivité ainsi que de pH-sensibilité, répondant ainsi à l'environnement légèrement plus acide des tumeurs. Le copolymère était composé d'une chaîne aliphatique de 18 carbones et d'une partie hydrophile composée de N-vinylpyrrolidone (NVP) et de vinylimidazole (Vim) (Pautu et al. 2021). Le N-vinylpyrrolidone permet d'apporter des propriétés de furtivité en améliorant le temps de demi-vie

dans le sang des nanoparticules (Kaneda et al. 2004). Le vinylimidazole, monomère basique se protonant et devenant cationique dans un environnement acide, est utilisé pour obtenir des nanoparticules répondant à un *stimulus* endogène (variation de pH dans l'organisme) (Zavala-Lagunes et al. 2016). Ainsi dans l'étude de Pautu *et al.*, les auteurs ont montré que la post-insertion dans la membrane des LNCs du polymère C₁₈H₃₂-P(NVP₂₁-co-Vim₁₅), composé de 21 unités de N-vinylpyrrolidone et de 15 unités vinylimidazole, était possible et protégeait les LNCs des phénomènes d'opsonisation tout en améliorant l'internalisation cellulaire à un pH légèrement acide. Ces résultats ont été obtenus avec une concentration finale de 1 mM en polymères, contre 5 mM classiquement utilisés avec le DSPE-PEG₂₀₀₀, réduisant ainsi la quantité injectée en polymère dans l'organisme. Ainsi, envisager une post-insertion de ce polymère au niveau de la membrane des **P722**-LNCs permettrait d'obtenir des formulations **P722**-LNCs ayant des propriétés de furtivité et répondant à l'environnement tumoral. Sachant que les cellules cancéreuses surexpriment certains phospholipides, comme la phosphatidylsérine chargée négativement (Virani et al. 2018), provoquant ainsi une différence de charge négative entre les cellules cancéreuses et les cellules saines, les **P722**-LNCs ainsi modifiées pourraient être internalisées préférentiellement dans les cellules cancéreuses ovariennes, permettant d'améliorer la quantité de **P722** dans le cytosol de ces cellules cancéreuses.

Un autre polymère connu de la littérature, conférant également des propriétés de furtivité aux nanoparticules, est la polysarcosine, étudiée notamment par l'équipe du Pr. Matthias Barz. En effet, ce polymère présente l'avantage d'être biodégradable, étant composé de sarcosine endogène à l'organisme, et confère des propriétés de furtivité meilleures que les composés PEGylés, tout en réduisant la réponse immunitaire et inflammatoire de l'organisme (Nogueira et al. 2020; Weber et al. 2016; 2018). Cependant, contrairement au polymère pH-sensible C₁₈H₃₂-P(NVP₂₁-co-Vim₁₅), utiliser des polysarcosines ne permettrait pas d'obtenir des **P722**-LNCs répondant au pH de l'environnement tumoral.

Pour répondre à une stratégie de ciblage actif des cellules cancéreuses ovariennes, une autre idée serait d'utiliser un autre peptide pénétrant. En effet, même si la formulation **P722**-LNCs-CTLS-3mM sera étudiée prochainement *in vivo* sur les modèles PDX Low OXPPOS OV21 et OV54, il pourrait être envisagé d'utiliser un autre peptide pénétrant et de fonctionnaliser les **P722**-LNC selon le même procédé. La capacité de ciblage de ces nouvelles formulations pourrait être étudiée par cytométrie en flux, avec l'étude de la cinétique d'internalisation, et par microscopie confocale afin de confirmer les résultats obtenus. Ce nouveau candidat peptide pénétrant pourrait être le peptide WSG auquel un résidu cystéine serait rajouté en position N-Ter pour permettre le greffage covalent au DSPE-PEG₂₀₀₀-Maleimide post-inséré dans la membrane des **P722**-LNCs. Ce peptide WSG, peptide pénétrant composé de 12 acides aminés (WSGPGVWGASVK), a été identifié par la même équipe de recherche ayant publié sur le peptide TLS (Ma, Yin, Yan, et al. 2013). Dans cette étude, la capacité du peptide WSG à se lier aux cellules cancéreuses ovariennes SKOV3 et A2780 via les récepteurs aux intégrines $\alpha 9\beta 1$ a été mise en évidence. Les intégrines sont une famille de glycoprotéines surexprimées à la surface des cellules

cancéreuses ovariennes et impliquées notamment dans la métastase tumorale (Cho and Shih 2009; Dhaliwal and Shepherd 2022). Cette équipe a montré que le peptide WSG aurait des propriétés anti-métastatiques et le greffage covalent de ce peptide, par chimie du carbodiimide, à la surface de nanoparticules super-paramagnétiques a donné des résultats très intéressants, *in vitro* et *in vivo*, sur sa capacité à cibler les cellules cancéreuses ovariennes (Pu et al. 2014; Yin et al. 2019). Les méthodes expérimentales utilisées avec le peptide CTLS pourraient donc être transposées directement au peptide CWSG (synthèse, purification, identification) afin de décorer la surface des LNCs. Pour aller plus loin, il serait intéressant de rajouter un polymère apportant des propriétés de furtivité dont la longueur de chaîne serait plus longue que celle du DSPE-PEG₂₀₀₀-Maleimide, afin de protéger le peptide d'une dégradation enzymatique potentielle après administration intraveineuse. Ce polymère devrait avoir la propriété d'être clivable au pH tumoral afin de déprotéger le peptide une fois que **P722**-LNCs auraient atteint le site tumoral. Par exemple, il serait possible de post-insérer le polymère suivant : PEG₃₀₀₀-hydrazone-PE, le lien hydrazone étant une liaison clivable dans l'environnement légèrement acide des tumeurs. Dans une étude publiée en 2012, Koren *et al.* ont formulé des liposomes dont la surface avait été modifiée avec le peptide pénétrant TAT. Afin de le protéger d'une dégradation enzymatique, le polymère PEG₂₀₀₀-hydrazone-PE a été rajouté. Les résultats ont montré qu'avec cette protection, à pH physiologique, le peptide TAT n'était pas déprotégé alors qu'à un pH = 5, le peptide TAT était déprotégé après clivage de l'hydrazone. Cette stratégie de protection vraiment intéressante pour notre formulation demanderait cependant d'ajouter une étape de synthèse et purification du polymère pH-sensible.

Au cours de cette thèse, l'adsorption physico-chimique du peptide TLS n'a pas été concluante. Néanmoins cette stratégie de fonctionnalisation simple pourrait être étudiée à nouveau, à condition d'apporter une charge négative en surface des LNCs. Par exemple, il serait possible d'ajouter du cholestérol de sulfate de sodium, un stéroïde anionique, qui pourrait s'insérer dans la membrane des LNCs et amener la charge négative nécessaire à l'adsorption par interaction électrostatique des peptides. Cependant, cela demanderait de déterminer le ratio (m/m_{LNC}) nécessaire en stéroïde tout en conservant une structure des LNCs stable au cours du temps.

Enfin, afin d'être spécifique des cellules cancéreuses ovariennes, une autre cible serait la glycoprotéine CD44 très largement surexprimée à la surface de ces cellules cancéreuses (Gao et al. 2015). Dans la littérature, il a été démontré que l'acide hyaluronique, polysaccharide hydrophile chargé négativement à pH physiologique, était un ligand de CD44 et plusieurs études ont mis en évidence la capacité de ciblage tumoral de nanoparticules composées d'acide hyaluronique (Shariati et al. 2020; L. Wang and Jia 2016). La post-insertion dans la membrane des LNCs a déjà été réalisée précédemment avec des polysaccharides modifiés par une chaîne lipidique, comme le chitosane et le dextrane (Hirsjärvi et al. 2013). Dans un premier temps, il faudrait greffer une chaîne lipidique, par exemple la phosphatidyléthanolamine DSPE, à l'acide hyaluronique, via la chimie du carbodiimide (Saadat et al. 2014). Une fois le composé purifié (dialyse) puis caractérisé, une post-insertion pourrait être réalisée dans la membrane des **P722**-LNCs, à différentes concentrations en acide hyaluronique modifié. La

capacité de ciblage de ces nouvelles formulations pourrait ensuite être confirmée par cytométrie en flux et par microscopie confocale.

3. Etudes mécanistiques *in vitro*

L'idée générale de ce projet ANR était d'utiliser une molécule générant des espèces réactives de l'oxygène (ROS) afin de permettre une sensibilisation des tumeurs dites « Low OXPHOS » à la chimiothérapie classiquement utilisée en clinique. Les résultats *in vivo* obtenus sur les modèles PDX Low OXPHOS de cancer de l'ovaire ont montré un effet significatif du traitement **P722**-LNCs / carboplatine / paclitaxel sur la réduction tumorale. Ces résultats étant très prometteurs, il serait maintenant nécessaire de déterminer *in vitro* s'il existe un effet synergétique entre la combinaison carboplatine / paclitaxel et le **P722**, et si cet effet provient bien d'un stress oxydant généré par le **P722**. Cela serait tout à fait probable puisqu'il a été vu dans la littérature que le carboplatine et le paclitaxel avaient une activité accrue en présence de ROS (Kleih et al. 2019; Bragado et al. 2007; Yang et al. 2011). Il faudrait tout d'abord déterminer la valeur d'IC₅₀ du carboplatine et du paclitaxel sur la lignée cellulaire SKOV3 après 72 h de traitement. Cette lignée semble la plus intéressante car elle présente une résistance au carboplatine et est considérée comme ayant un métabolisme « Low OXPHOS » (Gentric et al. 2019). Il faudrait aussi traiter les cellules SKOV3 en faisant varier la concentration en carboplatine / paclitaxel et en ajoutant une concentration constante en **P722** (à des concentrations inférieures ou égales à l'IC₅₀ de 80 nM du **P722**). Cela permettrait de mettre en évidence une synergie potentielle entre le **P722** et la chimiothérapie conventionnelle. Enfin, afin de vérifier que cet effet de synergie pourrait venir d'une augmentation cellulaire des ROS grâce au **P722**, il serait intéressant de doser les ROS avant et après traitement en **P722** dans les cellules SKOV3.

Plusieurs études ont mis en évidence aussi le rôle des ferrocifènes, notamment de **DP1** et **P15** (cf. revue bibliographique « Ferrocifen loaded lipid nanocapsules : a promising anticancer medication against multidrug resistant tumors ») en tant qu'inhibiteur des thioredoxines réductases présentes dans le cytosol des cellules (TrxR) (Scalcon et al. 2016; 2017). Cette propriété est d'autant plus intéressante que le système des thioredoxines joue un rôle dans la progression tumorale. L'équipe du Pr. Arnér du Karolinska Institute (Suède) s'est beaucoup intéressée à la TrxR1, qui pourrait être une cible thérapeutique dans le traitement du cancer (Arnér and Holmgren 2006; Arnér 2017; 2020). A ce jour, parmi tous les ferrocifènes étudiés jusqu'alors, il semblerait que **P15** inhibe le plus efficacement la TrxR1 et cela s'expliquerait par la stabilité relative de son métabolite actif, la quinone méthide qui réagit avec la TrxR. Or, dans une étude publiée en 2019, il a été démontré que la quinone méthide du **P722** avait une stabilité inégalée (plus d'une semaine dans l'acétone), due à une interaction intramoléculaire entre les électrons π du cycle aromatique en position *cis* du succinimide, et les électrons d'un doublet non liant de l'oxygène sur la fonction succinimide (Y. Wang et al. 2019) (**Figure 12**). Ainsi, il serait intéressant de déterminer si le **P722** possède des propriétés inhibitrices de la TrxR1. Cette étude est déjà

en cours de réalisation au laboratoire MINT dans le cadre d'un projet ANR appelé Ferrothioered en lien avec la start-up Feroscan. La propriété des ferrocifènes à inhiber la TrxR1 s'explique par la capacité de la quinone méthide, composé électrophile accepteur de Michael, à réagir avec des molécules biologiques nucléophiles comme les TrxR. Cette propriété permet de faire un parallèle avec une molécule, APR-246 connue comme modulateur épigénétique pouvant réactiver la protéine mutante p53 exprimée par la mutation du gène TP53 (Zhang et al. 2018). En effet, APR-246 est une prodrogue formant un métabolite électrophile actif, une quinuclidinone, considéré comme un accepteur de Michael également (**Figure 12**). Ce métabolite peut se lier covalamment aux résidus de la cystéine de la protéine mutante p53 ainsi que sur ceux présents dans la séquence du glutathion et des thioredoxines réductases (Zhang et al. 2018; Lambert et al. 2009; Mohell et al. 2015). Une étude publiée en 2015 a d'ailleurs montré que APR-246 permettait de resensibiliser les cellules cancéreuses ovariennes au cisplatine, dont plus de 95 % présentent des mutations du gène TP53 (Mohell et al. 2015). Dans cette même étude, les résultats obtenus *in vivo* sont très similaires à ceux obtenus dans notre étude sur les modèles PDX Low OXPPOS de cancer de l'ovaire. Les auteurs attribuaient cela aux propriétés connues du composé APR-246. De plus, comme évoqué dans la partie « état de l'art » sur le cancer de l'ovaire, un essai clinique PiSARRO (NCT02098343) sur des cancers de l'ovaire séreux de haut grade a confirmé que APR-246 pouvait surmonter la résistance au carboplatine. Ainsi, il serait intéressant d'étudier si la quinone méthide du **P722** permettrait de réactiver la protéine mutante p53, expliquant la re-sensibilisation observée au carboplatine / paclitaxel.

Enfin, concernant l'internalisation cellulaire des **P722**-LNCs, il serait intéressant de déterminer via quels mécanismes ces nanoparticules s'internalisent dans les cellules SKOV3. En effet, étudier ce mécanisme permettrait de prédire les différentes barrières biologiques à surmonter par le vecteur, une fois internalisé par la cellule. Par exemple, dans le cas d'une endocytose dépendante des clathrines, le nanovecteur devra échapper à l'endosome et au lysosome, organelles ayant un pH très acide et pouvant dégrader le vecteur et son contenu.

Dans notre projet, les études d'internalisation ont été réalisées à 37 °C. Afin de pouvoir différencier un mécanisme d'endocytose d'une translocation directe, il faudrait refaire ces expériences en incubant les plaques à 4 °C, pour diminuer très fortement l'endocytose, mécanisme énergie-dépendant. Enfin, afin de distinguer le mécanisme d'internalisation précis, des inhibiteurs des différentes voies d'internalisation pourront être utilisés : la méthyl- β -cyclodextrine (M β CD) pour inhiber à la fois l'endocytose médiée par les cavéolines et les clathrines ; le 5-(*N,N*-diméthyl) amiloride (DAM) pour inhiber la macropinocytose ; la chlorpromazine pour bloquer la voie par les clathrines ; le Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) pour inhiber la voie par les cavéoles (Karim et al. 2018).

Bien que les mécanismes d'internalisation varient en fonction de la cellule étudiée, dans la littérature, il a été rapporté que les LNCs s'internalisaient principalement via un processus d'endocytose sur plusieurs lignées cellulaires : U87MG (glioblastome) (Karim et al. 2018), B16F10 (mélanome) (Pautu et al. 2021) ; SK-Mel 28 (mélanome) (Pautu et al. 2021), MDA-MB-231 (cancer du sein) (Valsalakumari et

al. 2021) et MDA-MB-468 (cancer du sein) (Valsalakumari et al. 2021). Il est fort probable que ce même mécanisme soit observé avec les **P722**-LNCs. En revanche, après la décoration en surface par le peptide TLS ou WSG, le mécanisme d'internalisation sera très probablement modifié. En effet, il est souvent observé que les nanoparticules fonctionnalisées par un peptide suivent le mécanisme d'internalisation du peptide en question. Par exemple, pour le peptide TLS, les auteurs ont montré que l'internalisation se faisait via un mécanisme d'endocytose (Ma, Yin, You, et al. 2013), ce qui correspondrait au mécanisme principalement emprunté par les LNCs.

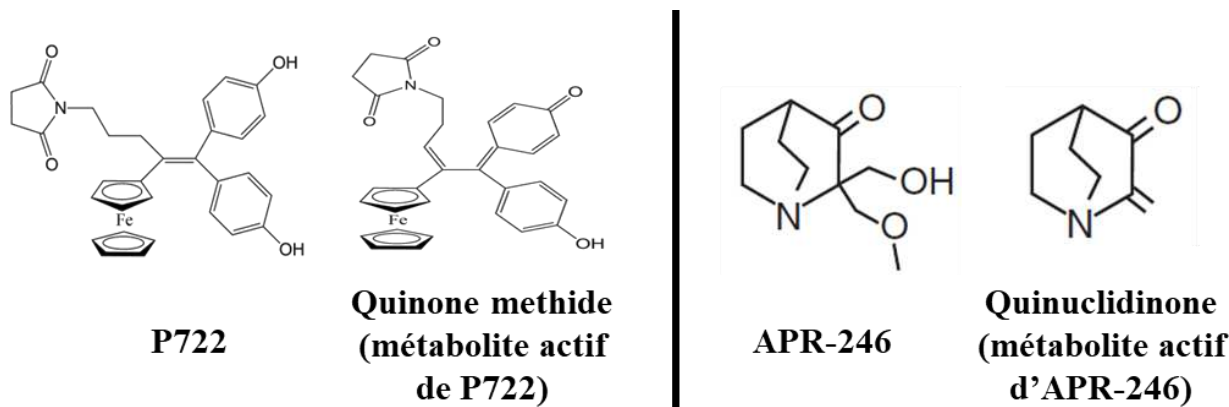


Figure 12. Structure du **P722** et de son métabolite actif (à gauche) ; Structure d'**APR-246** et de son métabolite actif (à droite).

4. Etudes *in vivo*

Les formulations **P722**-LNCs furtives ont montré des résultats *in vivo* très encourageants sur des modèles PDX Low OXPHOS de cancer de l'ovaire. Comme expliqué précédemment, les formulations **P722**-LNCs-CTLS-3mM seront testées prochainement sur ces mêmes modèles par l'Institut Curie. De plus, il a été observé lors de ces expériences un potentiel effet thérapeutique des LNCs blanches elles-mêmes en combinaison avec le carboplatine et le paclitaxel. Cela a amené à formuler l'hypothèse suivante : les LNCs, de par leur structure lipophile, pourraient favoriser l'internalisation cellulaire du carboplatine et du paclitaxel, en déstabilisant la membrane cellulaire. Les LNCs blanches pourraient donc être utilisées avec la chimiothérapie en traitement adjuvant. Des expériences *in vivo* vont être réalisées par l'Institut Curie. Les modèles PDX choisis cette fois-ci seront des modèles « High OXPHOS », en rémission après une première chimiothérapie mais rechutant après un certain temps : ceci est malheureusement très souvent la réalité clinique chez les patientes. Concrètement, une fois les rémissions complètes obtenues, les souris seraient séparées de façon aléatoire en différents groupes : un groupe contrôle sans traitement ; un autre groupe recevant carboplatine et paclitaxel ; un dernier groupe recevant une combinaison LNC blanches / carboplatine / paclitaxel. Cela pourrait mettre en évidence l'intérêt de combiner LNC blanches et chimiothérapie classique à retarder la rechute voire à l'éradiquer,

comparée à la chimiothérapie seule.

Une autre idée serait de tester le gel **P769-LNCs**, à 17.2 mg/g d'excipients lipophiles en **P769**. En effet, dans le Chapitre 2 sur l'étude physico-chimique, il a été observé que le **P769** conservait la même efficacité thérapeutique *in vitro* que le **P722**, sur les lignées cellulaires SKOV3 et U87MG. Sachant que le cancer épithélial de l'ovaire séreux de haut grade métastase principalement au niveau du péritoine, il serait intéressant d'appliquer le gel **P769-LNCs** en intrapéritonéale, après une chirurgie cytoréductrice. Sans utiliser cette fois-ci des modèles PDX, un modèle animal simplifié pourrait être imaginé. Une injection de cellules SKOV3 pourrait être réalisée en intrapéritonéale, chez la souris. Lorsque le volume tumoral aurait atteint un certain volume, une chirurgie serait réalisée pour retirer la tumeur, puis une application locale du gel **P769-LNCs** serait effectuée. Ensuite, un cycle de traitement avec le carboplatine et le paclitaxel par voie intraveineuse pourrait être réalisé. Cette étude permettrait de vérifier si le gel **P769-LNCs** peut présenter une action sur les cellules cancéreuses résiduelles présentes dans le péritoine et permettre d'éviter ainsi éventuellement des rechutes chez les patientes.

Pour poursuivre avec cette idée, en sortant du cadre d'une application pour le cancer de l'ovaire, le gel **P769-LNCs** pourrait être étudié sur des modèles murins de glioblastome. Le glioblastome est la tumeur du cerveau la plus agressive et la plus mortelle. En première lieu, environ 70 % des patients reçoivent une chirurgie cytoréductrice, laissant place à une cavité dans laquelle se trouvent toujours des cellules cancéreuses résiduelles. Un traitement local a été approuvé par la FDA au début des années 2000, le Gliadel® (C. Bastiancich et al. 2016). Cependant, malgré l'application de cet implant, beaucoup de rechutes ont été rapportées. Ainsi, connaissant les propriétés cytotoxiques particulièrement importantes du **P722** et **P769** sur les cellules de glioblastome (Najlaoui et al. 2018; Vessières et al. 2021), il pourrait être envisagé d'appliquer localement, dans la cavité cérébrale, le gel **P769-LNCs** pour traiter les cellules résiduelles (**Figure 13**). Cette expérience a déjà été réalisée par le Dr. Guillaume Bastiat avec des gels ayant une structure similaire au gel **P769-LNCs**, ces gels étant composés de LNCs chargées en gemcitabine modifiée par une chaîne lipidique de 12 carbones. Les résultats obtenus ont montré une capacité de ces gels à retarder les phénomènes de récurrence, tout en améliorant la survie des souris (C. Bastiancich et al. 2016; C. Bastiancich et al. 2018).

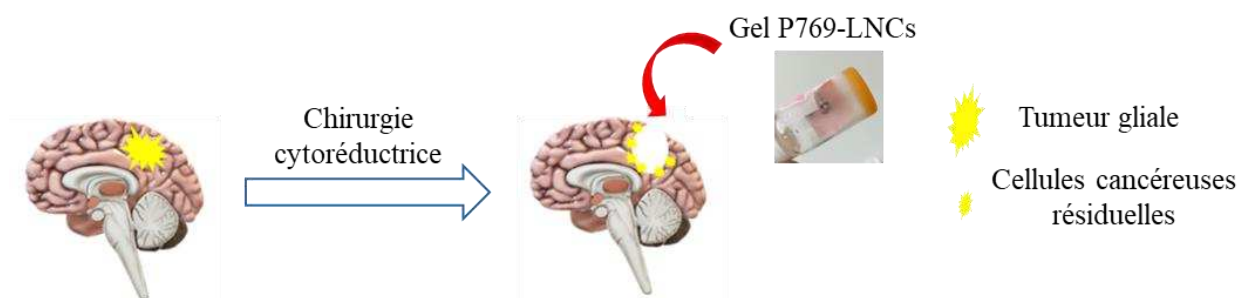


Figure 13. Schéma explicatif de l'application du gel **P769-LNCs** pour traiter les cellules gliales résiduelles après chirurgie cytoréductrice d'une tumeur gliale.

5. Références

- Arnér, Elias S. J. 2017. 'Targeting the Selenoprotein Thioredoxin Reductase 1 for Anticancer Therapy'. *Advances in Cancer Research* 136: 139–51. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2017.07.005>.
- . 2020. 'Chapter 31 - Perspectives of TrxR1-Based Cancer Therapies'. In *Oxidative Stress*, edited by Helmut Sies, 639–67. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818606-0.00031-6>.
- Arnér, Elias S. J., and Arne Holmgren. 2006. 'The Thioredoxin System in Cancer'. *Seminars in Cancer Biology*, The Thioredoxin System in Cancer, 16 (6): 420–26. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2006.10.009>.
- Bastiancich, C., K. Vanvarenberg, B. Ucakar, M. Pitorre, G. Bastiat, F. Lagarce, V. Préat, and F. Danhier. 2016. 'Lauroyl-Gemcitabine-Loaded Lipid Nanocapsule Hydrogel for the Treatment of Glioblastoma'. *Journal of Controlled Release* 225 (March): 283–93. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.01.054>.
- Bastiancich, Chiara, Laurent Lemaire, John Bianco, Florence Franconi, Fabienne Danhier, Veronique Préat, Guillaume Bastiat, and Frederic Lagarce. 2018. 'Evaluation of Lauroyl-Gemcitabine-Loaded Hydrogel Efficacy in Glioblastoma Rat Models'. *Nanomedicine (London, England)* 13 (16): 1999–2013. <https://doi.org/10.2217/nnm-2018-0057>.
- Batista, L., T. Gruosso, and F. Mechta-Grigoriou. 2013. 'Ovarian Cancer Emerging Subtypes: Role of Oxidative Stress and Fibrosis in Tumour Development and Response to Treatment'. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 45 (6): 1092–98. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.03.001>.
- Bragado, Paloma, Alejandro Armesilla, Augusto Silva, and Almudena Porras. 2007. 'Apoptosis by Cisplatin Requires P53 Mediated P38 α MAPK Activation through ROS Generation'. *Apoptosis* 12 (9): 1733–42. <https://doi.org/10.1007/s10495-007-0082-8>.
- CDCMMWR. 2021. 'Allergic Reactions Including Anaphylaxis After Receipt of the First Dose of Pfizer-BioNTech COVID-19 Vaccine — United States, December 14–23, 2020'. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report* 70. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7002e1>.
- Cho, Kathleen R., and le-Ming Shih. 2009. 'Ovarian Cancer'. *Annual Review of Pathology* 4: 287–313. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.4.110807.092246>.
- Citta, Anna, Alessandra Folda, Alberto Bindoli, Pascal Pigeon, Siden Top, Anne Vessières, Michèle Salmain, Gérard Jaouen, and Maria Pia Rigobello. 2014. 'Evidence for Targeting Thioredoxin Reductases with Ferrocenyl Quinone Methides. A Possible Molecular Basis for the Antiproliferative Effect of Hydroxyferrocifens on Cancer Cells'. *Journal of Medicinal Chemistry* 57 (21): 8849–59. <https://doi.org/10.1021/jm5013165>.
- Decaudin, Didier. 2011. 'Primary Human Tumor Xenografted Models ('tumorgrafts') for Good Management of Patients with Cancer'. *Anti-Cancer Drugs* 22 (9): 827–41. <https://doi.org/10.1097/CAD.0b013e3283475f70>.
- Dhaliwal, Dolly, and Trevor G. Shepherd. 2022. 'Molecular and Cellular Mechanisms Controlling Integrin-Mediated Cell Adhesion and Tumor Progression in Ovarian Cancer Metastasis: A Review'. *Clinical & Experimental Metastasis* 39 (2): 291–301. <https://doi.org/10.1007/s10585-021-10136-5>.

- Gao, Yan, Rosemary Foster, Xiaoqian Yang, Yong Feng, Jacson K. Shen, Henry J. Mankin, Francis J. Hornicek, Mansoor M. Amiji, and Zhenfeng Duan. 2015. 'Up-Regulation of CD44 in the Development of Metastasis, Recurrence and Drug Resistance of Ovarian Cancer'. *Oncotarget* 6 (11): 9313–26. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3220>.
- Gentric, Géraldine, Yann Kieffer, Virginie Mieulet, Oumou Goundiam, Claire Bonneau, Fariba Nemati, Ilse Hurbain, et al. 2019. 'PML-Regulated Mitochondrial Metabolism Enhances Chemosensitivity in Human Ovarian Cancers'. *Cell Metabolism* 29 (1): 156-173.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.09.002>.
- Grusso, Tina, Camille Garnier, Sophie Abelanet, Yann Kieffer, Vincent Lemesre, Dorine Bellanger, Ivan Bieche, et al. 2015. 'MAP3K8/TPL-2/COT Is a Potential Predictive Marker for MEK Inhibitor Treatment in High-Grade Serous Ovarian Carcinomas'. *Nature Communications* 6 (October): 8583. <https://doi.org/10.1038/ncomms9583>.
- Heurtault, Béatrice, Patrick Saulnier, Brigitte Pech, Jacques-Emile Proust, and Jean-Pierre Benoit. 2002. 'A Novel Phase Inversion-Based Process for the Preparation of Lipid Nanocarriers'. *Pharmaceutical Research* 19 (6): 875–80. <https://doi.org/10.1023/a:1016121319668>.
- Hirsjärvi, Samuli, Sandrine Dufort, Guillaume Bastiat, Patrick Saulnier, Catherine Passirani, Jean-Luc Coll, and Jean-Pierre Benoît. 2013. 'Surface Modification of Lipid Nanocapsules with Polysaccharides: From Physicochemical Characteristics to in Vivo Aspects'. *Acta Biomaterialia* 9 (5): 6686–93. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.01.038>.
- Huynh, Ngoc Trinh, Marie Morille, Jerome Bejaud, Pierre Legras, Anne Vessieres, Gerard Jaouen, Jean-Pierre Benoit, and Catherine Passirani. 2011. 'Treatment of 9L Gliosarcoma in Rats by Ferrociphenol-Loaded Lipid Nanocapsules Based on a Passive Targeting Strategy via the EPR Effect'. *Pharmaceutical Research* 28 (12): 3189–98. <https://doi.org/10.1007/s11095-011-0501-y>.
- Idlas, Pierre, Abdallah Ladaycia, Fariba Némati, Elise Lepeltier, Pascal Pigeon, Gerard Jaouen, Didier Decaudin, and Catherine Passirani. 2022. 'Ferrocifen Stealth LNCs and Conventional Chemotherapy: A Promising Combination against Multidrug-Resistant Ovarian Adenocarcinoma'. *International Journal of Pharmaceutics* 626 (October): 122164. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122164>.
- Ishida, Tatsuhiro, Masako Ichihara, XinYu Wang, Kenji Yamamoto, Junji Kimura, Eiji Majima, and Hiroshi Kiwada. 2006. 'Injection of PEGylated Liposomes in Rats Elicits PEG-Specific IgM, Which Is Responsible for Rapid Elimination of a Second Dose of PEGylated Liposomes'. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 112 (1): 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.01.005>.
- Ishida, Tatsuhiro, and Hiroshi Kiwada. 2008. 'Accelerated Blood Clearance (ABC) Phenomenon upon Repeated Injection of PEGylated Liposomes'. *International Journal of Pharmaceutics* 354 (1–2): 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.11.005>.
- Jaouen, Gérard, Anne Vessièrès, and Siden Top. 2015. 'Ferrocifen Type Anti Cancer Drugs'. *Chemical Society Reviews* 44 (24): 8802–17. <https://doi.org/10.1039/c5cs00486a>.
- Kaneda, Yoshihisa, Yasuo Tsutsumi, Yasuo Yoshioka, Haruhiko Kamada, Yoko Yamamoto, Hiroshi Kodaira, Shin-ichi Tsunoda, et al. 2004. 'The Use of PVP as a Polymeric Carrier to Improve the Plasma Half-Life of Drugs'. *Biomaterials* 25 (16): 3259–66. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.10.003>.

- Karim, Reatul, Elise Lepeltier, Lucille Esnault, Pascal Pigeon, Laurent Lemaire, Claire Lépinoux-Chambaud, Nicolas Clere, et al. 2018. 'Enhanced and Preferential Internalization of Lipid Nanocapsules into Human Glioblastoma Cells: Effect of a Surface-Functionalizing NFL Peptide'. *Nanoscale* 10 (28): 13485–501. <https://doi.org/10.1039/c8nr02132e>.
- Kleih, Markus, Kathrin Böppe, Meng Dong, Andrea Gaißler, Simon Heine, Monilola A. Olayioye, Walter E. Aulitzky, and Frank Essmann. 2019. 'Direct Impact of Cisplatin on Mitochondria Induces ROS Production That Dictates Cell Fate of Ovarian Cancer Cells'. *Cell Death & Disease* 10 (11): 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2081-4>.
- Kuehn, Bridget M. 2021. 'Rare PEG Allergy Triggered Postvaccination Anaphylaxis'. *JAMA* 325 (19): 1931. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.7215>.
- Lainé, Anne-Laure, Eric Adriaenssens, Anne Vessières, Gérard Jaouen, Cyril Corbet, Emilie Desruelles, Pascal Pigeon, Robert-Alain Toillon, and Catherine Passirani. 2013. 'The in Vivo Performance of Ferrocenyl Tamoxifen Lipid Nanocapsules in Xenografted Triple Negative Breast Cancer'. *Biomaterials* 34 (28): 6949–56. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.05.065>.
- Lambert, Jeremy M. R., Petr Gorzov, Dimitry B. Veprintsev, Maja Söderqvist, Dan Segerbäck, Jan Bergman, Alan R. Fersht, Pierre Hainaut, Klas G. Wiman, and Vladimir J. N. Bykov. 2009. 'PRIMA-1 Reactivates Mutant P53 by Covalent Binding to the Core Domain'. *Cancer Cell* 15 (5): 376–88. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.03.003>.
- Lisio, Michael-Antony, Lili Fu, Alicia Goyeneche, Zu-hua Gao, and Carlos Telleria. 2019. 'High-Grade Serous Ovarian Cancer: Basic Sciences, Clinical and Therapeutic Standpoints'. *International Journal of Molecular Sciences* 20 (4): 952. <https://doi.org/10.3390/ijms20040952>.
- Ma, Chuying, Guangfu Yin, Danhong Yan, Xueling He, Li Zhang, Yan Wei, and Zhongbing Huang. 2013. 'A Novel Peptide Specifically Targeting Ovarian Cancer Identified by in Vivo Phage Display'. *Journal of Peptide Science: An Official Publication of the European Peptide Society* 19 (12): 730–36. <https://doi.org/10.1002/psc.2555>.
- Ma, Chuying, Guangfu Yin, Fei You, Yan Wei, Zhongbing Huang, Xianchun Chen, and Danhong Yan. 2013. 'A Specific Cell-Penetrating Peptide Induces Apoptosis in SKOV3 Cells by down-Regulation of Bcl-2'. *Biotechnology Letters* 35 (11): 1791–97. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1263-x>.
- Matulonis, Ursula A., Anil K. Sood, Lesley Fallowfield, Brooke E. Howitt, Jalid Sehoul, and Beth Y. Karlan. 2016. 'Ovarian Cancer'. *Nature Reviews Disease Primers* 2 (1): 1–22. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.61>.
- Mohell, N., J. Alfredsson, Å Fransson, M. Uustalu, S. Byström, J. Gullbo, A. Hallberg, V. J. N. Bykov, U. Björklund, and K. G. Wiman. 2015. 'APR-246 Overcomes Resistance to Cisplatin and Doxorubicin in Ovarian Cancer Cells'. *Cell Death & Disease* 6 (6): e1794–e1794. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.143>.
- Najlaoui, Feten, Pascal Pigeon, Sonia Aroui, Mylène Pezet, Lucie Sancey, Naziha Marrakchi, Ali Rhouma, et al. 2018. 'Anticancer Properties of Lipid and Poly(ϵ -Caprolactone) Nanocapsules Loaded with Ferrocenyl-Tamoxifen Derivatives'. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 70 (11): 1474–84. <https://doi.org/10.1111/jphp.12998>.
- Nogueira, Sara S., Anne Schlegel, Konrad Maxeiner, Benjamin Weber, Matthias Barz, Martin A. Schroer, Clement E. Blanchet, et al. 2020. 'Polysarcosine-Functionalized Lipid Nanoparticles for

- Therapeutic mRNA Delivery'. *ACS Applied Nano Materials* 3 (11): 10634–45.
<https://doi.org/10.1021/acsanm.0c01834>.
- Pautu, Vincent, Elise Lepeltier, Adélie Mellinger, Jérémie Riou, Antoine Debuigne, Christine Jérôme, Nicolas Clere, and Catherine Passirani. 2021. 'PH-Responsive Lipid Nanocapsules: A Promising Strategy for Improved Resistant Melanoma Cell Internalization'. *Cancers* 13 (9): 2028.
<https://doi.org/10.3390/cancers13092028>.
- Perrier, Thomas, Patrick Saulnier, Florian Fouchet, Nolwenn Lautram, and Jean-Pierre Benoît. 2010. 'Post-Insertion into Lipid NanoCapsules (LNCs): From Experimental Aspects to Mechanisms'. *International Journal of Pharmaceutics* 396 (1–2): 204–9.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.06.019>.
- Pigeon, Pascal, Yong Wang, Siden Top, Feten Najlaoui, Maria Concepcion Garcia Alvarez, Jérôme Bignon, Michael J. McGlinchey, and Gérard Jaouen. 2017. 'A New Series of Succinimido-Ferrociphenols and Related Heterocyclic Species Induce Strong Antiproliferative Effects, Especially against Ovarian Cancer Cells Resistant to Cisplatin'. *Journal of Medicinal Chemistry* 60 (20): 8358–68. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00743>.
- Pu, Ximing, Chuying Ma, Guangfu Yin, Fei You, and Yan Wei. 2014. 'Cell Adhesion and Invasion Inhibitory Effect of an Ovarian Cancer Targeting Peptide Selected via Phage Display in Vivo'. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 443 (3): 858–63.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.12.058>.
- Saadat, Ebrahim, Mohsen Amini, Rassoul Dinarvand, and Farid A. Dorkoosh. 2014. 'Polymeric Micelles Based on Hyaluronic Acid and Phospholipids: Design, Characterization, and Cytotoxicity'. *Journal of Applied Polymer Science* 131 (20). <https://doi.org/10.1002/app.40944>.
- Scalcon, Valeria, Anna Citta, Alessandra Folda, Alberto Bindoli, Michèle Salmain, Ilaria Ciofini, Sébastien Blanchard, et al. 2016. 'Enzymatic Oxidation of Ansa-Ferrocifen Leads to Strong and Selective Thioredoxin Reductase Inhibition in Vitro'. *Journal of Inorganic Biochemistry* 165: 146–51. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.08.005>.
- Scalcon, Valeria, Michèle Salmain, Alessandra Folda, Siden Top, Pascal Pigeon, Hui Zhi Shirley Lee, Gérard Jaouen, Alberto Bindoli, Anne Vessières, and Maria Pia Rigobello. 2017. 'Tamoxifen-like Metallocaffens Target the Thioredoxin System Determining Mitochondrial Impairment Leading to Apoptosis in Jurkat Cells'. *Metallomics: Integrated Biometal Science* 9 (7): 949–59.
<https://doi.org/10.1039/c7mt00121e>.
- Schoenmaker, Linde, Dominik Witzigmann, Jayesh A. Kulkarni, Rein Verbeke, Gideon Kersten, Wim Jiskoot, and Daan J. A. Crommelin. 2021. 'mRNA-Lipid Nanoparticle COVID-19 Vaccines: Structure and Stability'. *International Journal of Pharmaceutics* 601 (May): 120586.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120586>.
- Shariati, Molood, Giovanna Lollo, Kevin Matha, Benedicte Descamps, Christian Vanhove, Leen Van de Sande, Wouter Willaert, et al. 2020. 'Synergy between Intraperitoneal Aerosolization (PIPAC) and Cancer Nanomedicine: Cisplatin-Loaded Polyarginine-Hyaluronic Acid Nanocarriers Efficiently Eradicate Peritoneal Metastasis of Advanced Human Ovarian Cancer'. *ACS Applied Materials & Interfaces*, June. <https://doi.org/10.1021/acсами.0c05554>.
- Shi, Da, Damian Beasock, Adam Fessler, Janos Szebeni, Julia Y. Ljubimova, Kirill A. Afonin, and Marina A. Dobrovolskaia. 2022. 'To PEGylate or Not to PEGylate: Immunological Properties of

- Nanomedicine's Most Popular Component, Polyethylene Glycol and Its Alternatives'. *Advanced Drug Delivery Reviews* 180 (January): 114079. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.114079>.
- Tehrani, Soudeh F., Jean-Michel Rabanel, Samuel Legeay, Jérôme Cayon, Jérémie Riou, Patrick Saulnier, Sylvie Marleau, V. Gaëlle Roullin, Patrice Hildgen, and Guillaume Bastiat. 2022. 'Tailoring PEGylated Nanoparticle Surface Modulates Inflammatory Response in Vascular Endothelial Cells'. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 174 (May): 155–66. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2022.04.003>.
- Topin-Ruiz, Solène, Adélie Mellinger, Elise Lepeltier, Clara Bourreau, Juliette Fouillet, Jérémie Riou, Gérard Jaouen, Ludovic Martin, Catherine Passirani, and Nicolas Clere. 2021. 'P722 Ferrocifen Loaded Lipid Nanocapsules Improve Survival of Murine Xenografted-Melanoma via a Potentiation of Apoptosis and an Activation of CD8+ T Lymphocytes'. *International Journal of Pharmaceutics* 593 (January): 120111. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.120111>.
- Valsalakumari, Remya, Sunil Kumar Yadava, Marzena Szwed, Abhilash D. Pandya, Gunhild Mari Mælandsmo, Maria Lyngaas Torgersen, Tore-Geir Iversen, Tore Skotland, Kirsten Sandvig, and Jyotsnendu Giri. 2021. 'Mechanism of Cellular Uptake and Cytotoxicity of Paclitaxel Loaded Lipid Nanocapsules in Breast Cancer Cells'. *International Journal of Pharmaceutics* 597 (March): 120217. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120217>.
- Vessières, Anne, Emie Quissac, Nolwenn Lemaire, Agusti Alentorn, Patrycja Domeracka, Pascal Pigeon, Marc Sanson, Ahmed Idbaih, and Maité Verreault. 2021. 'Heterogeneity of Response to Iron-Based Metallodrugs in Glioblastoma Is Associated with Differences in Chemical Structures and Driven by FAS Expression Dynamics and Transcriptomic Subtypes'. *International Journal of Molecular Sciences* 22 (19): 10404. <https://doi.org/10.3390/ijms221910404>.
- Virani, Needa A., Carole Davis, Patrick McKernan, Paul Hauser, Robert E. Hurst, Joel Slaton, Ricardo P. Silvy, Daniel E. Resasco, and Roger G. Harrison. 2018. 'Phosphatidylserine Targeted Single-Walled Carbon Nanotubes for Photothermal Ablation of Bladder Cancer'. *Nanotechnology* 29 (3): 035101. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/aa9c0c>.
- Wang, Liping, and Erxia Jia. 2016. 'Ovarian Cancer Targeted Hyaluronic Acid-Based Nanoparticle System for Paclitaxel Delivery to Overcome Drug Resistance'. *Drug Delivery* 23 (5): 1810–17. <https://doi.org/10.3109/10717544.2015.1101792>.
- Wang, Yong, Pascal Pigeon, Siden Top, Juan Sanz García, Claire Troufflard, Ilaria Ciofini, Michael J. McGlinchey, and Gérard Jaouen. 2019. 'Atypical Lone Pair- π Interaction with Quinone Methides in a Series of Imido-Ferrociphenol Anticancer Drug Candidates'. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 58 (25): 8421–25. <https://doi.org/10.1002/anie.201902456>.
- Weber, Benjamin, Alexander Birke, Karl Fischer, Manfred Schmidt, and Matthias Barz. 2018. 'Solution Properties of Polysarcosine: From Absolute and Relative Molar Mass Determinations to Complement Activation'. *Macromolecules* 51 (7): 2653–61. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.8b00258>.
- Weber, Benjamin, Christine Seidl, David Schwiertz, Martin Scherer, Stefan Bleher, Regine Süss, and Matthias Barz. 2016. 'Polysarcosine-Based Lipids: From Lipopolypeptoid Micelles to Stealth-Like Lipids in Langmuir Blodgett Monolayers'. *Polymers* 8 (12): 427. <https://doi.org/10.3390/polym8120427>.
- Yang, Juan-Cheng, Mei-Chin Lu, Chia-Lin Lee, Guan-Yu Chen, Yan-Yu Lin, Fang-Rong Chang, and Yang-Chang Wu. 2011. 'Selective Targeting of Breast Cancer Cells through ROS-Mediated Mechanisms

Potentiates the Lethality of Paclitaxel by a Novel Diterpene, Gelomulide K'. *Free Radical Biology and Medicine* 51 (3): 641–57. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.012>.

Yin, Jie, Dajing Yao, Guangfu Yin, Zhongbing Huang, and Ximing Pu. 2019. 'Peptide-Decorated Ultrasmall Superparamagnetic Nanoparticles as Active Targeting MRI Contrast Agents for Ovarian Tumors'. *ACS Applied Materials & Interfaces* 11 (44): 41038–50. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b14394>.

Zavala-Lagunes, Edgar, Juan-Carlos Ruiz, Gustavo H. C. Varca, and Emilio Bucio. 2016. 'Synthesis and Characterization of Stimuli-Responsive Polypropylene Containing N-Vinylcaprolactam and N-Vinylimidazole Obtained by Ionizing Radiation'. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications* 67 (October): 353–61. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.05.044>.

Zhang, Qiang, Vladimir J. N. Bykov, Klas G. Wiman, and Joanna Zawacka-Pankau. 2018. 'APR-246 Reactivates Mutant P53 by Targeting Cysteines 124 and 277'. *Cell Death & Disease* 9 (5): 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0463-7>.

Conclusion Générale

Conclusion Générale

Le cancer épithélial de l'ovaire séreux de haut grade est le cancer gynécologique le plus mortel. Les traitements actuels consistent en une chirurgie cytoréductrice suivie de cycles de chimiothérapie au carboplatine et paclitaxel. Cependant, ce cancer étant détecté très souvent à un stade avancé déjà métastasé, les rechutes des patientes sont très fréquentes. Ainsi, lorsqu'une femme est atteinte de ce cancer, son pronostic vital à court terme est très sévèrement engagé.

Ce projet de thèse, financé par l'ANR, projet PRCE nommé « NaTeMOC », avait pour acteurs un consortium de trois entités ; le laboratoire MINT, la start-up Feroscan et l'Institut Curie. Le but de ce projet était de proposer une alternative thérapeutique en formulant des nanocapsules lipidiques chargées en succinimide-ferrocifènes et fonctionnalisées en surface par un peptide pénétrant dans le but de les évaluer, seules ou en combinaison avec le carboplatine et le paclitaxel, sur des modèles PDX murins de cancers de l'ovaire séreux de haut grade. Les résultats obtenus au cours de cette thèse peuvent être divisés en trois parties : études physico-chimiques des ferrocifènes-LNCs ; efficacité *in vivo* des formulations **P722**-LNCs sur les modèles PDX murins ; fonctionnalisation de la surface des LNCs par greffage covalent d'un peptide pénétrant.

Dans le premier chapitre, les résultats ont permis de montrer pour la première fois une relation entre la structure du ferrocifène étudié et la forme galénique finale obtenue à partir des LNCs. En effet, six succinimide-ferrocifènes ont été étudiés : le bi-phénol **P722**, les deux isomères mono-phénol (**E**)-**P849** et (**Z**)-**P849**, le bi-acétyle **P769** et les deux isomères mono-acétyle (**E**)-**P998** et (**Z**)-**P998**. De manière surprenante, une différence d'efficacité d'encapsulation dans les LNCs a été observée entre les isomères du **P849** et les isomères du **P998**. En effet, l'un des isomères s'encapsulait mieux que l'autre pour ces ferrocifènes. Le résultat le plus intéressant a été l'obtention d'un gel composé de LNCs avec le **P769** et le (**E**)-**P998**, ce qui n'avait jamais été obtenu précédemment. Afin de comprendre ce phénomène, les expériences ont mis en évidence une position différente des ferrocifènes dans la LNC (cœur ou membrane) : le **P769** et le (**E**)-**P998** se trouvent au niveau de la membrane des LNCs, alors que les autres ferrocifènes se trouvent au cœur de la nanoparticule. De plus, l'importance d'avoir la fonction succinimide du ferrocifène en position *cis* d'une fonction acétyle pour obtenir le gel a été démontré.

Dans le deuxième chapitre, l'évaluation thérapeutique des formulations **P53**-LNCs, conventionnelles ou furtives, et **P722**-LNCs furtives, seules ou en combinaison avec le carboplatine et le paclitaxel, sur les modèles PDX murins développés par l'Institut Curie a été réalisée. Les résultats obtenus ont été très prometteurs, notamment avec les formulations **P722**-LNCs furtives. En effet, même si les traitements **P53**-LNCs furtives et **P722**-LNCs furtives, seuls, n'ont pas montré d'amélioration comparée à la chimiothérapie seule, la combinaison de traitements a, quant à elle, amélioré significativement le taux de réponse globale des souris aux traitements. Ces résultats sont d'autant plus intéressants avec les **P722**-LNCs furtives qu'ils ont été obtenus avec une concentration en **P722** huit fois plus faible qu'en **P53** : une souris présentait même une rémission complète et une autre un volume tumoral très faible pendant

70 jours sur le modèle Low OXPHOS OV21. Ces résultats ont confirmé le fait que le **P722** pouvait être considéré comme le ferrocifène « lead » de cette famille de molécules organométalliques. Enfin, le dernier chapitre de ce travail de thèse présentait la fonctionnalisation de surface des **P722-LNCs** via un greffage covalent du peptide CTLS. L'idée était de mettre en place une stratégie de ciblage actif des cellules cancéreuses ovariennes. Après synthèse du peptide CTLS sur support solide selon la stratégie Fmoc, le peptide CTLS pur a été greffé coalement à la surface des **P722-LNCs**, à deux concentrations : 1 mM et 3 mM. La liaison covalente a été rendue possible par la post-insertion du DSPE-PEG₂₀₀₀-Maleimide dans la membrane des **P722-LNCs**. La réaction entre le soufre provenant de la cystéine du peptide CTLS et la double liaison du maléimide a été démontrée par RMN ¹H et RMN 2D. Ensuite, il a été observé que la formulation **P722-LNCs-CTLS-3mM** n'activait pas les protéines du complément, tout comme la formulation **P722-LNCs** furtives. Cela laisse entrevoir un éventuel comportement similaire de la formulation **P722-LNCs-CTLS-3mM** lors de l'administration par voie intraveineuse, quant à la furtivité vis-à-vis des protéines du complément. Néanmoins, la cinétique d'internalisation réalisée sur les cellules SKOV3 et U87MG n'a pas permis de démontrer la capacité de ciblage actif des formulations **P722-LNCs** modifiées par le peptide CTLS. Cependant, il est possible qu'à une concentration de 3 mM en peptide, CTLS favorise l'échappement à l'endosome des formulations **P722-LNCs**, ce qui est un très bon point pour obtenir une efficacité thérapeutique. La formulation **P722-LNCs-CTLS-3mM** sera évaluée *in vivo* par l'Institut Curie sur les modèles PDX murins Low OXPHOS OV21 et OV54.

Les perspectives de ce projet de thèse sont nombreuses et variées, allant de travaux sur les formulations, en passant par des études mécanistiques *in vitro* sur le **P722** et à l'étude *in vivo* de nouvelles combinaisons de traitement. Par exemple, il serait intéressant de modifier les formulations **P722-LNCs** en utilisant des polymères répondant à un *stimulus* endogène comme une variation de pH et apportant la propriété de furtivité. Au niveau du mécanisme d'action du **P722**, il serait important de vérifier si le **P722** pourrait, tout comme la molécule APR-246, réactiver le gène TP53, celui-ci étant muté à plus de 95 % dans les cancers épithéliaux de l'ovaire et ayant une importance dans l'intégrité du génome. Enfin, il serait possible d'imaginer l'étude de l'efficacité thérapeutique du gel de **P769-LNCs** pour traiter des cellules cancéreuses résiduelles sur des cancers de l'ovaire séreux de haut grade ou sur des glioblastomes, des pistes thérapeutiques qui permettraient de redonner espoir aux patientes.

Titre : Nanocapsules lipidiques chargées en ferrocifènes : évaluations physico-chimiques et biologiques pour application dans le traitement du cancer de l’ovaire

Mots clés : Nanocapsules lipidiques (LNCs), ferrocifènes, gel, cancers multi-résistants, xénogreffes dérivées de tumeur de l’ovaire de la patiente

Résumé : Le cancer épithélial de l’ovaire séreux de haut grade peut être caractérisé selon le métabolisme mitochondrial. Deux sous-types sont à distinguer : les tumeurs «High OXPPOS» qui sont chimiosensibles et les tumeurs «Low OXPPOS» moins sensibles au carboplatine et paclitaxel. Le but de cette thèse était d’étudier de nouvelles alternatives thérapeutiques pour traiter ces sous-types. Tout d’abord, 6 ferrocifènes ont été encapsulés dans des nanocapsules lipidiques (LNCs). Selon le ferrocifène, des différences d’efficacité d’encapsulation ont été observées et une nouvelle forme galénique a été obtenue : un gel. Ensuite, des formulations ferrocifènes-LNCs furtives ont été préparées et caractérisées. Ces formulations ont été testées sur des modèles murins de tumeurs épithéliales de l’ovaire dérivées de patientes.

Les résultats obtenus ont montré un net ralentissement de la progression tumorale sur les modèles Low OXPPOS après traitement avec une des formulations ferrocifènes-LNCs et le traitement de référence (carboplatine et paclitaxel), laissant entrevoir une bonne perspective quant à l’utilisation de cette combinaison de traitement. Enfin, dans le but d’une stratégie de ciblage actif des cellules du cancer de l’ovaire, un peptide pénétrant, C-TLS, a été synthétisé et greffé covalamment à la surface des ferrocifène-LNCs. La cinétique d’internalisation de ces nanomédicaments, étudiée *in vitro* sur la lignée cellulaire SKOV3 de cancer de l’ovaire, n’a pas permis de mettre en évidence une amélioration de l’internalisation cellulaire. Néanmoins, l’étude devra être reproduite *in vivo*, le peptide étant connu également pour son effet cytotoxique sur les cellules de cancer ovarien

Title : Ferrocifen loaded lipid nanocapsules: Physico-chemical characterization and biological evaluations on ovarian cancer

Keywords : Lipid nanocapsules (LNCs), ferrocifen, gel, multi-drug resistant cancer
Ovarian Patient-Derived Xenograft model

Abstract : High grade serous epithelial ovarian cancer can be characterized according to mitochondrial metabolism. Two sub-types can be distinguished: the High OXPPOS tumour which is chemosensitive and the Low OXPPOS tumour, less sensible to carboplatin and paclitaxel. The purpose of this PhD project was to study alternatives to improve treatments for these sub-types. Firstly, six ferrocifens from the succinimide family were encapsulated in LNCs. Results obtained showed differences in terms of encapsulation efficiency, depending on ferrocifen structure. Moreover, interestingly, two of the six ferrocifens led to the formation of a gel. Secondly, ferrocifen stealth LNCs were formulated and characterized. *In vivo* efficacy of these formulations was tested on High and Low OXPPOS ovarian Patient-derived Xenograft models, alone or in combination to standard

chemotherapy (carboplatin and paclitaxel). Results obtained showed a significant improvement of the overall response rate on Low OXPPOS model treated with one of the ferrocifen-LNCs in association with paclitaxel and carboplatin, compared to chemotherapy alone. It highlighted a promising approach to treat chemotherapy resistant ovarian cancer.

To finish, a strategy to specifically target ovarian cancer was thought. A cell penetrating peptide, C-TLS, was synthesized and covalently grafted at the surface of ferrocifen-LNCs. However, internalization kinetic, followed by flow cytometry, did not show any improvement by the decoration. Nevertheless, the study will be reproduced *in vivo*, CTLS peptide being known for its cytotoxicity on ovarian cancer.