



HAL
open science

Nanoparticules à base de dérivés du poly(acide malique) : évaluation de la captation et de la toxicité sur des cellules d'hépatome HepaRG et les macrophages humains

Saad Saba

► To cite this version:

Saad Saba. Nanoparticules à base de dérivés du poly(acide malique) : évaluation de la captation et de la toxicité sur des cellules d'hépatome HepaRG et les macrophages humains. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Rennes, 2020. Français. NNT : 2020REN1B014 . tel-04190124

HAL Id: tel-04190124

<https://theses.hal.science/tel-04190124>

Submitted on 29 Aug 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 DE RENNES 1

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : Biologie Moléculaire et Structurale, Biochimie

Par

Saad SABA

« Nanoparticules à base de dérivés du poly(acide malique) : Evaluation de la captation et de la toxicité sur des cellules d'hépatome HepaRG et les macrophages humains »

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 15/07/2020

Unité de recherche : UMR 1241 NUMECAN

Composition du Jury :

Rapporteurs avant soutenance :

Yann Pellequer	Maitre de Conférences, Université de Franche-Comté
Gilles Ponchel	Professeur, Université Paris-Saclay

Sophie Tomasi	Professeur, Université de Rennes 1
Présidente	
Yann Pellequer	Maitre de Conférence, Université de Franche-Comté
Gilles Ponchel	Professeur, Université Paris-Saclay
Jean-Lux Six	Professeur, Université de Lorraine
Directeur de thèse Pascal Loyer	Chargé de Recherche Inserm, Université de Rennes 1
Co-directeur de thèse Sandrine Cammas-Marion	Chargée de Recherche CNRS ENSCR

A ma mère Nouha et à mon père Georges

“It always seems impossible until it's done”

Nelson Mandela

Remerciement

Je remercie chaleureusement le Dr. Pascal Loyer mon directeur de thèse. Un grand merci pour son accueil dans l'équipe « TGTC », son enthousiasme, sa rigueur et son encadrement ainsi que pour les discussions scientifiques tout au long de ce travail de thèse. Je tiens également à exprimer ma profonde reconnaissance au Dr. Sandrine Cammas-Marion pour son enthousiasme, son accueil exceptionnel, son soutien, son encadrement et sa patience pendant ces années de thèse. Merci à tous les deux, pour leur grande disponibilité et leurs compétences scientifiques et managériales.

Je remercie vivement l'ensemble de l'équipe TGTC ainsi que l'ensemble des personnels du laboratoire de l'Institut NuMeCan pour leur accueil chaleureux et leur consolidation permanente.

Une pensée particulière à Perla Metlej et Elise Vène avec qui j'ai partagé mon bureau, je les remercie pour leur patience et leurs Esprits amusantes.

Je tiens également à remercier le Professeur Gilles PONCHEL et le Docteur Yann PELLEQUER pour m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de ce travail, ainsi que le Professeur Sophie TOMASI et le Professeur Jean-Luc SIX pour avoir accepté d'examiner ce travail

Je remercie vivement Manuel Vlach et Elise Vène qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

Je remercie sincèrement Hanine Ali et Jihad Karam, les deux personnes exceptionnelles qui m'ont donné un support moral infini et des aides techniques copieuses tout au long de ces trois ans de thèse. Je tiens à remercier chaleureusement Nermine Ali et Paola Fakhoury pour leur soutien adorable. Merci pour m'avoir offert votre amitié et votre soutien qui m'ont permis d'affronter les difficultés de la vie.

A Rennes, j'ai eu l'occasion de connaître un groupe d'amis adorables, je les remercie un par un : Ahmad Mortada, Ali Al-Massri, Ali Khalil, Aline Taoum, Bachar Jebbawi, Bassil Dekky, Bernard Helo, Fida Azar, Hadi Hachem, Hassan Al-Sabeh, Elias Ghanem, Mahmoud Bayyari, Katia Al-Sayyed, Katy Yaakoub, Luis Cano, Mira Merdas, Nadia Ibrahim, Narges Babchia, Nour Hoblous, Raghed Bajjani, Rakan Akashe, Rima Souki, Tatiana Victoni, Taycir Zatymani, Tony Rizkallah et Youssra Ghosein. Merci à tous ces moments passés ensemble !!

Gardons le meilleur pour la fin, je souhaiterais remercier ma famille, en particulier mes parents et mes frères Saliba et Walid, mes cousins Jad Eid, Pascale Saba et Ibrahim Barhoun. Merci beaucoup !!! C'est grâce à vous que je suis où je suis aujourd'hui.

Liste d'abréviations

ADN: Acide Désoxyribonucléique

AFP: Alpha-fœtoprotéine

AON: Oligonucléotides Antisens

ARN: Acide Ribonucléique

AIM2: Interferon-Inducible Protein/Absent In Melanoma 2

aROP: anionic Ring Opening Polymerization

ATF4-CHOP/GADD34: Activating Transcription Factor 4-C Homologous Protein/Growth Arrest and DNA Damage Inducible Protein 34

BDM: Body Distribution Modulator

BCLC: Barcelona Clinic Liver Cancer Group

BSB: Binding Site Barrier

BMV: Brome Mosaic Virus

CAPIR: Circulation, Accumulation, Penetration, Internalization and Release

CA125: Cancer Antigen 125

CCMV: Cowpea Chlorotic Mottle Virus

CDK1: Cycline D Kinase 1

CEA: Antigène du Carcinome Embryogénique

CHC: Carcinome Hépatocellulaire

CHO: Fonction Aldéhyde

CNA35: Collagen-Binding Adhesion Protein 35

COOH: Acide Carboxylique

CRP: Protéine C Réactive

CYP: Cytochrome P450

DLS: Diffusion Dynamique de la Lumière

DMA: Anhydride 2,3-Diméthylmaléique

DTX: Docetaxel

EASL: Association Européenne de l'Etude du Foie

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor

EPR: Enhanced Permeability and Retention Effect

ER: Réticulum Endoplasmique

FDA: Food and Drug Administration:

g: Gramme

Gd: Gadolinium

HCRSV: Hibiscus Chlorotic Ringspot Virus

HEMA: 2-hydroxyléthyle méthacrylate

HER-2: Human Epidermal Growth Factor Receptor-2

HIF: Hypoxia Inducible Factor (PAF)

HPMA: N-(2-hydroxypropyl) métacrylamide

HUVEC: Cellules Endothéliales de la Veine Ombilicale Humaine

IL: Interleukine

IPAF: ICE (Interleukin 1- β -Converting Enzyme) Protease Activating Factor

INF: Interferon

IRM: Imagerie par Résonance Magnétique

m: Mètre

MDR: Multi-Drug Resistance

MEC: Matrice Extracellulaire

MLABe: Malolactonate de Benzyle

MPS: Mononuclear Phagocytosing System

NF- κ B: Nuclear Factor-Kappa B

NH₂: Fonction amine

NLC: Nanostructured Lipid Carrier

NMs: Nanomatériaux

NPs: Nanoparticules

nm: Nanomètre

PAGA: Poly[acide-(4-aminobutyl)-L-glycolique

PAMP: Pathogen-Associated Molecular Patterns

PBCA: Poly(n-butyl cyanoacrylate)

PDT: Photodynamic Therapy

PEG: Poly(éthylène glycol)

PEG-*b*-PMLABe: Poly(éthylène glycol)-*bloc*-Poly(malate de benzyle)

PC: Phosphatidylcholine

PCL: Poly(ϵ -caprolactone)

PEI: Poly(éthylène-imine),

pH: Potentiel Hydrogène

PHA: Poly(hydroxyalcanoates)

PHB: Poly(β -hydroxybutyrate)

PLA: Poly(acide D,L-lactique)

PLGA: Poly(acide D,L-lactique-*co*-acide glycolique)

PLI: Pression du Liquide Interstitiel

PLNs: Nanoparticules Hybrides Lipides-Polymères

PMLA: Poly(acide β -malique)

PMLABe: Poly(malate de benzyle)

PMV: Pression Micro-Vasculaire des Vaisseaux Sanguins Tumoraux

PTMC: Poly(triméthylène carbonate)

PVA: Poly(alcool vinylique)

PVP: Poly(vinyl pyrrolidone)

PVX: Potato Virus X

QDs: Quantum dots

RCNMV: Red Clover Necrotic Mottle Virus

RES: Système Réticulo-Endothélial

ROS: Reactive Oxygen Species

RT: Tartrate de Rivastigmine

SDS-PAGE: Sodium Dodecylsulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis

SMC: Cellules des Muscles Lisses

H₂SO₃: Acide Sulfonique

SPDP: Succinimidyl 3-(2-Pyridyldithiopropionate)

SP: Silica Nanoparticles

SPIONS: Super-Paramagnetic Iron Oxyde Nanoparticles

UV: Ultraviolet

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

VHB: Virus de l'Hépatite B

VHC: Virus de l'Hépatite C

VNPs: NPs virales

TEFR: Transfert d'Energie de Fluorescence par Résonance

TEM: Microscopie Electronique en Transmission

TEMP: Tomographie par Emission MonoPhotonique

TEP: Tomographie par Emission de Positons

TGF β : Transforming Growth Factor Beta

TLR: Toll-Like Receptor

TMZH: Témazolomide Hydrazide

TMV: Tobacco Mosaic Virus

μ : Micron

Table des matières

1	Introduction générale	1
1.1	Avant-propos	1
1.2	Nanomatériaux : définition	3
1.3	Nanomédecine et applications	6
1.3.1	Définition et notions générales	6
1.3.2	Types de nanoparticules utilisées	7
1.3.3	Applications de la nanomédecine	16
1.4	Nanomédecine thérapeutique et cancer	24
1.4.1	Notions générales sur le cancer	24
1.4.2	Traitements des cancers par la nanomédecine	27
1.4.3	Stratégies du ciblage thérapeutique anticancéreux	30
1.4.4	Challenges en nanomédecine	39
1.4.5	Cahier de charges	51
1.5	Le poly(acide malique), PMLA, et ses dérivés	55
1.6	Objectifs des travaux de thèse	78
2	Matériels et méthodes	81
2.1	Modèles cellulaires	81
2.1.1	HepaRG	81
2.1.2	Macrophages humains	82
2.2	Préparation des nanoparticules à base de poly(malate de benzyle), PMLABe pour l'étude réalisée dans le chapitre 1	83
2.2.1	Synthèse de MLABe racémique et optiquement actif	83
2.2.2	Polymérisation chimique des RS et R-MLABe	84
2.2.3	Polymérisation enzymatique des RS, R et S-MLABe	84
2.2.4	Préparation des NPs à base de PMLABe	86
2.3	Préparation des nanoparticules à base de poly(malate de benzyle), PMLABe pour l'étude réalisée dans le chapitre 2	87

2.3.1	Préparation molécule de fluorescence	87
2.3.2	Préparation des NPs PMLABe ₇₃ [DiD Oil]	87
2.3.3	Préparation des NPs PEG ₄₂ - <i>b</i> -PMLABe ₆₆ [DiD Oil].....	87
2.3.4	Préparation des NPs 50wt% PEG ₄₂ - <i>b</i> -PMLABe ₆₆ [DiD Oil] + 50wt% PMLABe ₇₃ [DiD Oil].....	87
2.3.5	Préparation des NPs 25wt% PEG ₄₂ - <i>b</i> -PMLABe ₆₆ [DiD Oil] + 75wt% PMLABe ₇₃ [DiD Oil].....	88
2.4	Préparation des NPs à base de dérivés du poly(acide diméthyle malique), PdiMeMLA pour l'étude réalisée dans le chapitre 3	88
2.4.1	Synthèse des monomères	88
2.4.2	Synthèse du PdiMeMLABe ₃₀	89
2.4.3	Synthèse du PdiMeMLAHe ₃₀	89
2.4.4	Synthèse des copolymères à blocs amphiphiles	89
2.4.5	Préparation de NPs vides à base d'homopolymères hydrophobes.....	90
2.4.6	Préparation de NPs vides à base de copolymères à blocs amphiphiles.....	90
2.4.7	Préparation de NPs chargées de DiR à base d'homopolymères hydrophobes.....	90
2.4.8	Préparation des NPs chargées en DiR à base de copolymères à blocs amphiphiles	91
2.5	Evaluation de la toxicité des NPs	91
2.5.1	Test de Viabilité cellulaire “MTT”	91
2.5.2	Test de viabilité cellulaire “ATP”	92
2.6	Evaluation de la captation des NPs par cytométrie en flux	92
2.7	Evaluation de l'internalisation des NPs par microscopie confocale.....	93
3	Résultats et discussion	95
3.1	Chapitre 1. Etude de l'influence de la méthode de synthèse du PMLABe sur la biocompatibilité et la captation cellulaire des NPs correspondantes	95
3.1.1	Contexte générale de l'étude	95

3.1.2	Cell uptake and biocompatibility of nanoparticles prepared from poly(benzyl malate) (co)polymers obtained through Chemical and enzymatic polymerization in human HepaRG cells and primary macrophages.....	97
3.1.3	Discussion	99
3.2	Chapitre 2. NPs à base de dérivés du PMLABe : Effet de la présence de poly(éthylène glycol) et de protéines sériques sur leur captation par des cellules d'hépatome et des macrophages humains.....	107
3.2.1	Contexte générale de l'étude	107
3.2.2	Evolution du profil de captation en fonction du temps dans des cinétiques de captation des NPs à base de dérivés du PMLABe par des macrophages humains et des cellules d'hépatome suite à un traitement par une dose unique de NPs	108
3.2.3	Effet du pourcentage de PEG et du sérum de veau foetal sur la captation des NPs par des cellules d'hépatomes et des macrophages humains.....	111
3.2.4	Evolution du profil de captation en fonction du temps dans des cinétiques de captation des NPs à base de dérivés du PMLABe par des macrophages humains et des cellules d'hépatome suite à des traitement réitérés avec les NPs PMLABe.....	114
3.2.5	Identification du mécanisme de captation des NPs à base de dérivés du PMLABe mis en jeux dans les cellules d'hépatome et les macrophages humains.	121
3.2.6	Discussion	127
3.3	Chapitre 3. Evaluation <i>in vitro</i> d'une nouvelle famille de NPs biodégradables à base de dérivés du poly(acide diméthylmalique).....	131
3.3.1	Contexte générale de l'étude	131
3.3.2	Synthesis of poly(dimethylmalic acid) homo- and copolymers to produce biodegradable nanoparticles for drug delivery: Cell uptake and biocompatibility evaluation in human HepaRG hepatoma cells.....	133
3.3.3	Discussion	135
4	Discussion générale et perspectives	139
5	Références bibliographiques	145

1 Introduction générale

1.1 Avant-propos

La relation de l'être vivant avec son environnement naturel est cruciale. Ce qui est toujours le cas pour l'Homme qui a profité largement des ressources naturelles pour répondre à ses besoins croissants depuis son apparition sur la Terre. Dans les domaines médicaux et pharmacologiques, l'Homme a toujours cherché des substances d'origine naturelle pour se soigner. A titre d'exemple, le peuple de l'Egypte antique utilisait des minéraux comme le sel de nord (natron), les parcelles de cuivre, et les ocres jaunes pour guérir les brûlures ¹. Cette stratégie humaine primitive a évolué avec le temps, notamment grâce au développement de la chimie de synthèse pour l'avancement de la médecine.

Aujourd'hui, le cancer reste une cause de mortalité majeure dans le monde malgré d'indéniables progrès dans le développement de traitements efficaces. Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est considéré comme un des cancers les plus répandus (5^{ème} rang mondial en terme d'incidence) et est la troisième cause de mortalité liée au cancer dans le monde ². La chirurgie, l'ablation par radio fréquence et les chimiothérapies sont les traitements les plus utilisés ³. A un stade précoce, ces traitements, qui peuvent être suivis parfois d'une transplantation hépatique, sont souvent efficaces. Pour les stades intermédiaires et avancés de la maladie, d'autres traitements seront utilisés comme la radiothérapie métabolique, la chimio-embolisation trans-artérielle, ainsi qu'une chimiothérapie utilisant un inhibiteur de la tyrosine kinase, le Sorafenib (Nexavar®) ⁴.

Cependant, les chimiothérapies administrées classiquement ne s'accumulent pas spécifiquement au niveau du site d'intérêt mais se distribuent d'une manière plus ou moins aléatoire dans le corps. Cette distribution non-spécifique conduit à des effets secondaires toxiques non souhaités dans les organes/tissus/cellules sains, à une élimination rapide par le foie et les reins et donc à une biodisponibilité réduite ⁵.

En 1900, le médecin allemand Paul Ehrlich a élaboré le concept de « Magic Bullet », qui vise à utiliser un composé à action spécifique pour cibler un pathogène ou une cellule maligne sans affecter les autres cellules saines de l'organisme hôte ⁶. En se basant sur ce concept, et dans le but d'augmenter la spécificité des traitements et d'améliorer leur biodistribution tout en diminuant leurs effets secondaires toxiques, des nanomatériaux (NMs) ont été développés. En effet, leur taille est idéale pour améliorer

le ciblage de la tumeur ⁷. Ces nano-objets ont tendance à s'accumuler spécifiquement dans la tumeur en raison de l'effet dit « EPR » (Enhanced Permeability and Retention Effect) résultant d'une vascularisation tumorale anormale (cet effet sera détaillé ultérieurement dans la partie 1.4.3 du manuscrit, p. 32) ⁶.

Parmi les NMs utilisés dans le domaine médical, nous distinguons les liposomes, les conjugués de médicaments, les nanoparticules (NPs) virales, les NPs inorganiques, et les NPs polymères ⁸. Pour les NPs validées pour des applications médicales, l'administration se fait majoritairement par voie intraveineuse ⁹. Dans le sang, diverses protéines sanguines viennent adhérer à la surface de ces NPs, facilitant ainsi leur reconnaissance et leur élimination par phagocytose via les cellules du système réticuloendothélial (RES). Ce phénomène reste toujours une des barrières au succès clinique de la nanomédecine ^{10, 11, 12}. Dans ce contexte et dans le but de permettre aux NPs d'échapper à la reconnaissance par le système immunitaire et d'augmenter leur temps de circulation dans le sang, un polymère hydrophile et très flexible, le poly(éthylène glycol) (PEG), a été combiné à des lipides et des homopolymères pour produire des molécules amphiphiles permettant de formuler des nano-objets présentant à leur surface des molécules de PEG. Ce dernier est capable de perturber les interactions qui se produisent entre les NPs et les protéines sanguines, diminuant ainsi la fixation de ces protéines et la probabilité de l'élimination prématurée des NPs ¹³. Cependant, ce « camouflage » ne suffit pas à rendre la vectorisation de principes actifs totalement efficaces et de nombreux challenges restent encore à relever pour une large utilisation de la nanomédecine en clinique humaine.

Après avoir donné quelques définitions concernant les nanomatériaux, j'exposerai les notions générales et les applications de la nanomédecine. Je présenterai ensuite le lien entre la « nanomédecine thérapeutique » et le cancer : après avoir donné les notions générales sur le cancer, j'exposerai la place de la nanomédecine dans les traitements du cancer, les stratégies du ciblage thérapeutique pour les principes actifs anti-cancéreux, les challenges de la nanomédecine et je terminerai par le cahier des charges à respecter pour produire des objets potentiellement utilisables en nanomédecine. Dans une cinquième partie, des généralités ainsi que les propriétés et applications du poly(acide malique) et de ses dérivés seront décrites. L'introduction se terminera par la présentation des objectifs de cette thèse.

1.2 Nanomatériaux : définition

Le mot “nano” est dérivé du mot Grec “nanos” qui signifie nain. Ce mot est utilisé pour indiquer le nombre 10^{-9} qui est le milliardième de n’importe qu’elle unité utilisée¹⁴ (Fig. 1). Aujourd’hui, les nanomatériaux (NMs) représentent un domaine de recherche actif et un secteur techno-économique avec de nombreuses applications dans des domaines multiples. L’organisme Britannique de Normalisation National qui représente les intérêts économiques et sociaux du Royaume-Uni dans l’ensemble des organismes de normalisation européens et internationaux a défini les NMs comme étant des matériaux ayant une ou plusieurs structure(s) intérieure(s) ou extérieure(s) à l’échelle nanométrique. Les NMs ont gagné une grande importance dans le progrès technologique grâce à leur caractéristique de taille et leurs propriétés physicochimiques remarquables comme leurs points de fusion, leurs mouillabilités, leurs activités catalytiques, leurs absorbances et leurs conductivités thermiques¹⁵.

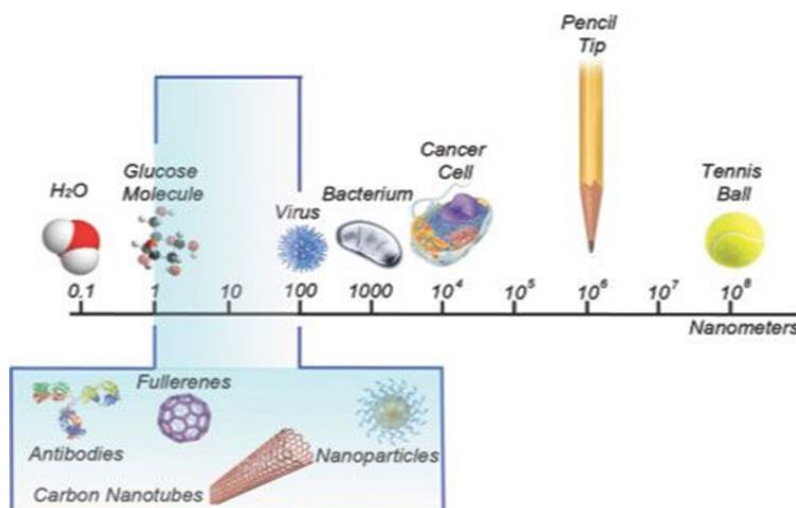


Figure 1 : Différence entre taille nanométrique et taille micrométrique¹⁶.

Etonnamment, les NMs existaient dans l’histoire ancienne de l’être humain. En effet, depuis près de 4 500 ans, les humains ont renforcé des matrices en céramiques en y intégrant des nanofibres d’amiante¹⁷. Pareillement, et depuis près de 4 000 ans, les égyptiens du monde antique utilisaient des NMs issus d’un processus de synthèse chimique pour préparer des NPs de sulfure de plomb (PbS) de 5 nm de diamètre servant à colorer les cheveux¹⁸. Egalement, le bleu égyptien (Egyptian blue) était le premier pigment synthétique préparé et utilisé par les égyptiens. Il s’agissait d’un mélange en poudre de $\text{CaCuSi}_4\text{O}_{10}$ et SiO_2 (verre et quartz) utilisé dans plusieurs régions de l’empire romain à des fins de décoration¹⁹.

En principe, les NMs sont définis en tant que matériaux présentant une taille qui varie entre 1 et 1 000 nm dans une des dimensions de l'objet. Aujourd'hui, il y a plusieurs législations dans l'Union Européenne et aux États-Unis instaurant des références aux NMs. Toutefois, une définition internationale unique des NMs n'existe pas²⁰. Selon l'organisation internationale de standardisation (ISO), les termes nanofibres, nanoplaques, quantum dots, ainsi qu'autres termes sont aussi attribués aux NMs²¹. Egalement, et selon la commission européenne, le terme NMs est donné aux matériaux naturels ou de synthèse possédant des particules non liées, agrégées ou agglomérées dont la dimension reste comprise entre 1 et 1 000 nm²².

La majorité des NMs peut être classifiée en quatre types en fonction de la matière qui les compose. Nous distinguons les NMs à base de carbone, les NMs inorganiques, les NMs organiques et les NMs composites.

- Les NMs à base de carbone sont trouvés dans des structures comme des tubes creux, des ellipsoïdes ou des sphères²³.
- Les NMs inorganiques incluent les NMs à base de métaux et d'oxydes de métaux. Ces NMs peuvent être préparées à partir de métaux comme l'or (Au), l'argent (Ag) et des oxydes de métaux comme l'oxyde de titane (TiO₂) et l'oxyde de zinc (ZnO)¹⁵.
- Les NMs organiques, à l'exception des NMs à base de carbone, sont produites par l'auto-assemblage de molécules par des liaisons non covalentes faibles, ce qui facilite la transformation des NMs organiques en structures désirées comme les dendromètres, les micelles, les liposomes et les NPs polymères¹⁵.
- La dernière catégorie des NMs est représentée par les NMs composites. Ce sont des NMs multi-phases, dont une des phases est à l'échelle nanométrique, pouvant combiner plusieurs types de NPs ou des NPs avec des matériaux totalement différents chimiquement comme les nano-fibres ou des structures complexes comme les cadres organométalliques. Ce type de NMs peut combiner des NPs à base de carbone, organiques et métalliques¹⁵.

D'autres systèmes de classification rassemblent, quant à eux, les NPs comportant des métaux et des oxydes de métaux avec les NPs à base de carbone dans le groupe des NMs inorganiques.

Les NMs peuvent être également catégorisés selon leurs dimensions. Par conséquent, il peut être distingué les NMs zéro dimensionnel (0d), monodimensionnel (1d), bidimensionnel (2d) et tridimensionnel (3d). Les NMs zéro-dimensionnel sont ceux ayant les trois dimensions à l'échelle nanométrique (< 100 nm). Généralement, les NMs 0d sont les NPs. Pour les NMs unidimensionnel (1d), une des trois dimensions est en dehors de l'échelle nanométrique. Cette classe inclut les nanotubes, les nanotiges et les nanofils. Les NMs bidimensionnel (2d) possèdent deux dimensions à l'extérieur de l'échelle nanométrique, comme les nanofilms de graphène, les nanocouches et les nanorevêtements. Enfin, les NMs tridimensionnel (3d) sont ceux n'ayant aucune dimension à l'échelle nanométrique. Les différentes morphologies des NPs sont représentées dans la figure 2 ¹⁴.

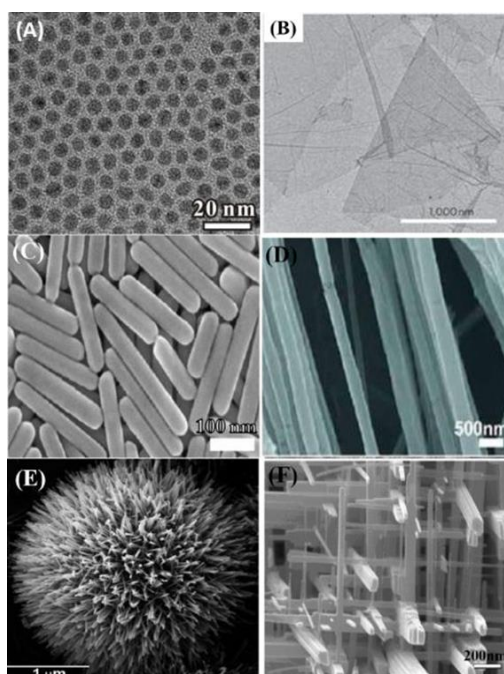


Figure 2 : Nanomatériaux avec différentes morphologies : (A) NPs nanoporeuses à base de Pd (0d) ^{24,25}, copyright Zhang et al. ; license Springer, 2012, (B) Nanofeuilles à base de graphène (2d) ²⁶, copyright 2012, Springer Nature, (C), Nanotiges à base d'Ag (1d) ²⁷, copyright 2011, American Chemical Society, (D) Nanofibres de Poly(oxyde d'éthylène) assemblées par « jet spinning », reproduit d'après Nanoletters 2010 (E) Nanotiges oursins à base de ZnO, reproduites à partir de Gokarna et al. 2014 ²⁸, (F) Réseau de nanofils à base de WO₃ (3d) ²⁹, copyright 2005 Wiley-VCH.

Pareillement, l'organisme de normalisation britannique a défini les NPs en tant que nano-objets ayant les trois dimensions à l'échelle nanométrique (<100 nm) ¹⁵.

La nanotechnologie est un secteur de recherche actif depuis le siècle dernier. Depuis 1959, où la nanotechnologie a été présentée pour la première fois par le lauréat du prix

Nobel Richard P. Feynman durant sa conférence intitulée « *There's Plenty of Room at the Bottom* », il y a eu différents développements « révolutionnaires » dans ce domaine³⁰.

En raison de leurs caractéristiques exceptionnelles, ces matériaux ont acquis des intérêts multiples dans de nombreux domaines multidisciplinaires. Les NMs sont notamment employés en médecine dans le domaine de la thérapie ciblée, en détection biologique chimique et gazeuse, en écologie pour la captation du CO₂ ainsi que dans d'autres applications^{31,32,33,34}. Un exemple d'application des NMs dans le domaine des énergies vertes est représenté. Le dihydrogène (H₂) est un candidat propre, compétent et propice aux énergies renouvelables qui constituent une solution prometteuse aux problèmes de pollution de l'air et de réchauffement climatique lié aux émissions de gaz à effets de serre. Face à la demande croissante d'énergie à base d'hydrogène, des problèmes de sécurité liés à la production, au transport et au stockage de l'hydrogène gazeux impliquent le besoin d'une détection très efficace, rapide et précise du gaz H₂, soit lors de fuites ou infiltré dans des matériaux. Mansha *et al.*, ont développé des détecteurs d'H₂ à base d'hétérostructures composées de feuilles de graphène décorées par des cristaux d'oxyde d'indium (III), In₂O₃. La décoration de la surface du graphène par des nanocristaux d'In₂O₃ est efficacement réalisée pour construire une hétérostructure In₂O₃/Graphène par une synthèse des nanocristaux d'In₂O₃ en solution aqueuse. Les propriétés de détection du nouveau détecteur développé ont montré une sensibilité améliorée et un comportement de détection réversible. Il a été établi que la présence de graphène dans les hétérostructures d'oxyde métallique aide le transfert d'électrons et augmente la conductivité électrique, ce qui améliore donc la sensibilité du capteur d'hydrogène gazeux construit³³.

1.3 Nanomédecine et applications

1.3.1 Définition et notions générales

L'application de la nanotechnologie pour des buts médicaux est nommée nanomédecine. Cette application est définie par l'usage des NMs pour le diagnostic, la surveillance, le contrôle, la prévention et les traitements de pathologies³⁵.

La nanomédecine est un domaine interdisciplinaire, où la nanoscience, le nanogénie et la nanotechnologie interagissent avec les sciences de la vie. La nanomédecine pourrait

conduire à l'amélioration d'appareillages médicaux et de médicaments ainsi qu'au développement d'applications pour les diagnostics précoces ou traitements d'une large gamme de pathologies avec une grande spécificité, efficacité et une personnalisation dans l'objectif d'améliorer la prise en charge du patient ³⁶.

Le terme nanoparticules (NPs) est souvent attribué à la majorité des NMs utilisés en nanomédecine ³⁶. Les NPs possèdent des propriétés physicochimiques spécifiques comme la charge de surface et la taille qui permettent d'offrir un ensemble d'avantages et d'opportunités dans le développement des produits pharmaceutiques. Cependant, des questionnements ont émergé quant à la toxicité potentielle des NPs. L'apparition d'une toxicité non souhaitée pourrait être un frein à l'application des NPs chez l'Homme aussi bien que dans l'environnement. Par ailleurs, les caractéristiques physico-chimiques des NPs peuvent moduler leurs propriétés pharmacocinétiques telles que leur absorption, leur biodistribution, leur élimination, leur métabolisme, leur potentiel à traverser facilement les barrières biologiques mais aussi leur persistance dans le corps humain et dans l'environnement. Par conséquent, il est primordial de bien caractériser les NPs ainsi que leur impact sur les systèmes biologiques et l'environnement ^{35, 37, 38, 39, 40}.

Conventionnellement, la microscopie est utilisée pour caractériser les NPs. Cependant, cette technique semble être insuffisante parce qu'elle est limitée à un nombre réduit de NPs qui peut être non représentatif de la totalité de l'échantillon préparé. Récemment, la diffusion dynamique de la lumière (DLS), la microscopie électronique à transmission (TEM), l'électrophorèse sur gel et l'analyse du potentiel- ζ sont des techniques utilisées pour caractériser les NPs ⁴¹. Dans la partie suivante, je présente les différents types de NPs utilisées en nanomédecine ainsi que les caractéristiques physicochimiques de chaque type.

1.3.2 Types de nanoparticules utilisées

Une large gamme de NPs à base de matériaux inorganiques ou organiques (lipidiques, protéiques, glucidiques ou polymères de synthèse) est utilisée en nanomédecine (Fig. 3) ⁸.

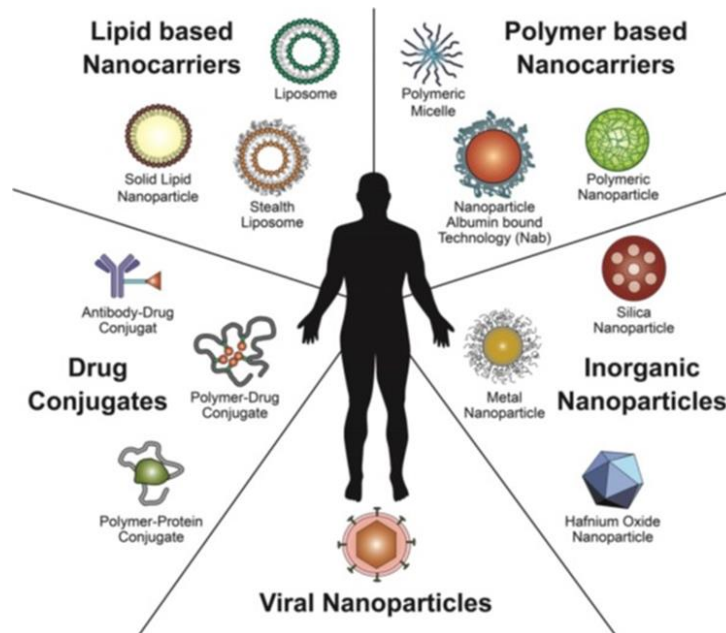


Figure 3 : Représentation schématique des différents types de NPs utilisées en médecine ⁸.

1.3.2.1 NPs inorganiques

Les NPs inorganiques sont faiblement toxiques, hydrophiles, biocompatibles et très stables par rapport aux matériaux organiques ⁴². Parmi les NPs inorganiques les plus connues, nous pouvons citer les NPs à base de métaux comme les NPs d'or et d'argent, les nanotubes à base de carbone et les NPs à base de matériaux semi-conducteurs comme les Quantum dots (Fig. 4) ⁴³.

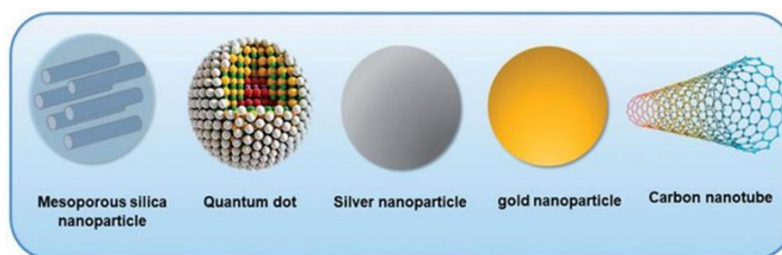


Figure 4 : Illustration schématique des NPs inorganiques les plus utilisées ⁴³.

Les NPs d'or (Au-NPs), également connues sous le nom d'or colloïdal, sont présentes souvent sous la forme d'une suspension de particules d'or de diamètre compris entre 3 et 200 nm dispersées dans un fluide. Ces NPs ont connu un intérêt croissant en nanomédecine grâce à leurs caractéristiques spécifiques comme leurs stabilités élevées, leurs morphologies contrôlables, leurs compatibilités biologiques et la facilité de fonctionnaliser leurs surfaces ⁴⁴.

D'autres NPs inorganiques, tels que les Quantum dots (QDs), ont connu un grand succès en nanomédecine. Les QDs sont obtenus à partir des éléments des groupes III-V et II-VI comme le ZnS, le ZnSe, le CdS, le CdSe, le CdTe et l'InP⁴⁵. Ces NPs sont caractérisées par une haute résistance à la dégradation chimique ainsi qu'une grande photostabilité. Bien que leur taille soit plus grande que celle des colorants organiques et des protéines fluorescentes, leurs propriétés optiques présentent une grande utilité dans diverses applications médicales, notamment en imagerie (détaillées en pages 19 à 22)⁴⁶.

Les NPs inorganiques sont utilisées pour une variété d'applications en médecine comme l'imagerie tumorale, le renforcement de la radiothérapie et le ciblage thérapeutique⁴⁷. L'application par des NPs inorganiques dans le domaine de l'imagerie sera détaillée dans la partie 1.3.3.1 du manuscrit.

1.3.2.2 NPs organiques

a- Les conjugués de médicaments

Les conjugués de médicaments sont considérés parmi les formulations nanomédicales les plus couronnées de succès dans le domaine de la thérapie du cancer. Leur taille dans le domaine de quelques nanomètres leur permet d'être classés parmi les NPs. La structure de ces formulations consiste en une molécule thérapeutique liée de façon covalente à une molécule de ciblage telle qu'un peptide, un anticorps ou un polymère (Fig. 5)⁴⁸.

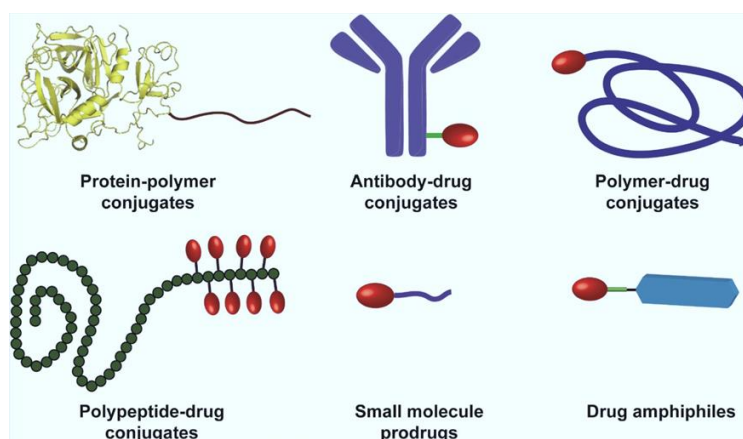


Figure 5 : Illustration schématique des six différents types de conjugués vecteurs-médicaments⁴⁹.

Le conjugué, le plus souvent sous forme de monomère ou d'oligomère, vise à améliorer le ciblage thérapeutique du médicament sans affecter sa solubilité, sa stabilité ou sa biodégradabilité ⁸.

Par exemple, le Vedotin (ou auristatin E monométhylé) est un composé cytostatique ayant une toxicité considérable empêchant son utilisation chez les patients sous sa forme non-conjuguée. Toutefois lorsque cette molécule est conjuguée à l'anticorps anti-CD30 (Brentuximab= Adcetris[®]), le conjugué résultant est dirigé plus sélectivement vers les cellules cancéreuses sur-exprimant les récepteurs du CD30, la toxicité systémique du Vedotin est donc fortement réduite et son efficacité est avérée chez les patients souffrants d'un lymphome Hodgkinien (Fig. 6) ^{50, 51}.

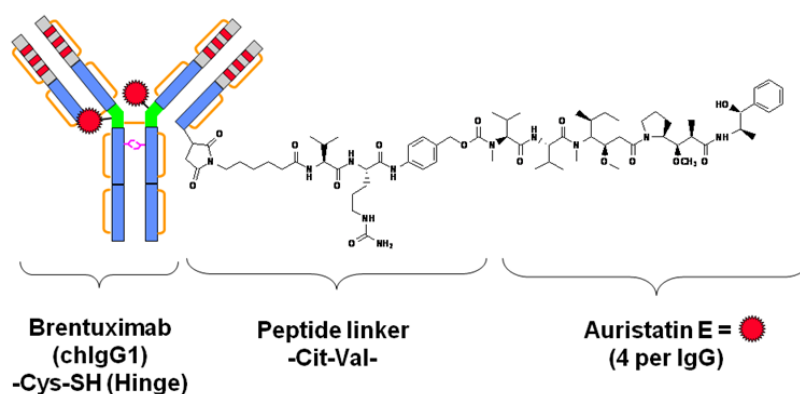


Figure 6 : Représentation schématique du brentuximab. Cit-val : liaison Citrulline-valine ; chlgc1-Cys-Sh : Igg1 ⁵².

b- Les NPs lipidiques

Les NPs lipidiques colloïdales sont composées de lipides naturels ou de synthèse mais présentant une formule très proche de celles de composés naturels, notamment des phospholipides, leur conférant ainsi un caractère biocompatible, non-toxique et biodégradable. Les lipides et les phospholipides possèdent un avantage unique dû à leur grande similitude structurale avec une multitude de composés naturels ⁵³. Les NPs lipidiques peuvent être sous forme de : vésicules, particules et d'émulsion (Fig. 7) ⁵⁴.

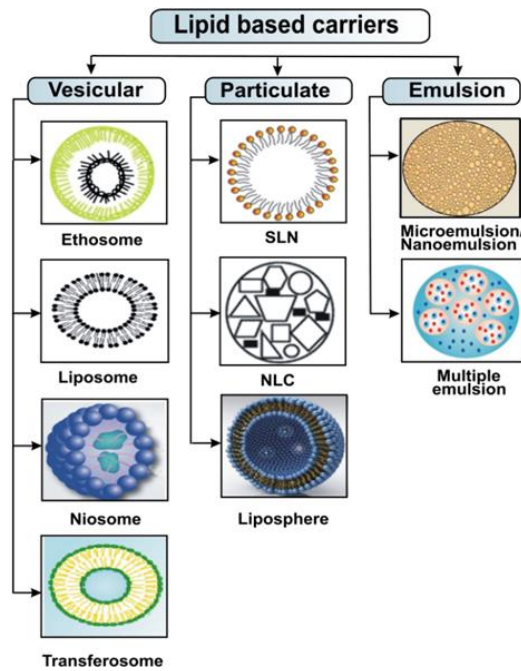


Figure 7 : Différentes NPs lipidiques utilisées en médecine. Les NPs lipidiques solides sont abrégées “SLN” pour Solid Lipid NPs ; les vecteurs lipidiques nanostructurés sont abrégés “NLC” pour nanostructured lipid carrier ⁵⁴.

Ce type de NPs offre plusieurs avantages notamment au niveau de la libération contrôlée de principes actifs, de la stabilité, de la furtivité, de l’efficacité d’encapsulation du principe actif et de la biodégradabilité ⁵⁴.

Parmi ces NPs lipidiques, les liposomes représentent la forme la plus exploitée (Fig. 8) ⁸. Les liposomes sont des structures vésiculaires formées d’une bicouche lipidique encapsulant un volume aqueux ⁵⁴.

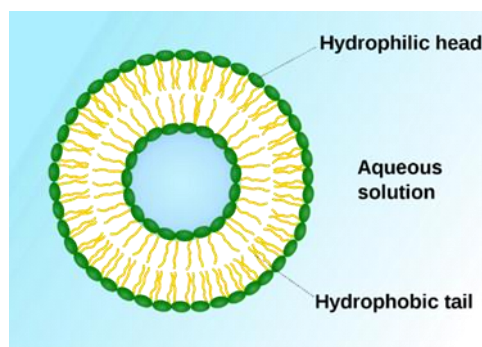


Figure 8 : Illustration schématique de la structure d’un liposome ⁵⁵.

Ils sont compatibles avec l’encapsulation de molécules hydrophiles (dans le volume aqueux présent à l’intérieur du liposome) et lipophiles (dans la bicouche lipidique) grâce à la nature amphiphile des lipides les composant. Cette caractéristique

remarquable permet la vectorisation de produits de différentes solubilités pour des applications diverses ⁵⁴. Par exemple, les liposomes sont largement utilisés comme nanovecteurs pour le transport de nombreuses molécules dans les industries cosmétiques et pharmaceutiques. De plus, les industries alimentaires et agricoles ont étudié de manière approfondie l'utilisation de l'encapsulation dans des liposomes pour développer des systèmes de transfert de composés instables comme les antibiotiques et les antioxydants ⁵⁶.

Toutefois, plusieurs facteurs limitent l'emploi répandu de cette catégorie de NPs. Parmi ces facteurs, je cite leur faible stabilité, l'absence d'une méthode de stérilisation optimale, le taux d'encapsulation faible de certaines molécules hydrophobes ⁵⁷ et la manque d'une libération contrôlée proprement dite du principe actif (due à la diffusion de Fick qui est le mécanisme majoritaire qui dirige la libération des principes actifs à partir des liposomes, ce qui la rend souvent incomplète et lente, entravant ainsi l'efficacité thérapeutique demandée) ^{58, 59, 60}.

c- Les NPs polymères

Le terme ‘‘NPs polymères’’ est un terme générique attribué à tout type de NPs à base de polymères de synthèse ou naturels ^{8, 59}. Ce type de NPs est surtout utilisé dans la vectorisation de molécules bioactives comme des molécules thérapeutiques, des acides nucléiques, des fluorochromes, etc. ⁶¹.

Les NPs polymères peuvent être, principalement, sous trois formes : auto-assemblée, particulaire et de capsule, formes que nous allons détailler succinctement (Fig. 9) ⁵⁴.

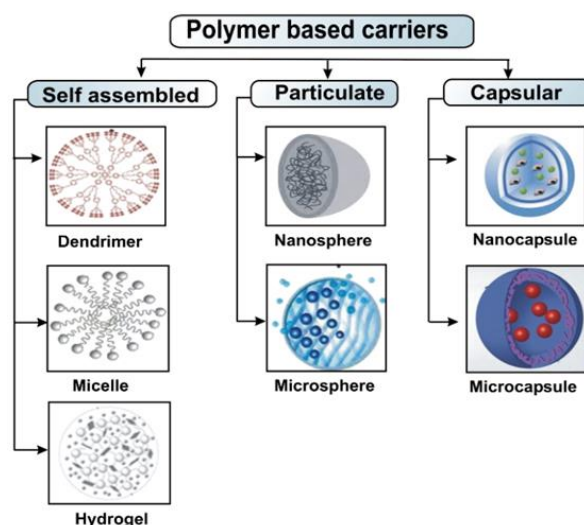


Figure 9 : Différentes formes de NPs polymères utilisées en médecine ⁵⁴.

Les NPs auto-assemblées sont des assemblages supramoléculaires via des interactions non-covalentes entre les unités moléculaires ⁵⁴.

Pour ce sous-type de NPs, les molécules amphiphiles s'auto-assemblent dans des solvants polaires et/ou aqueux de façon à garder leurs parties hydrophobes protégées du contact avec les solvants polaires tandis que les parties hydrophiles restent en contact avec ce solvant.

Parmi les NPs auto-assemblées, nous distinguons les micelles, les dendrimères et les hydrogels. Les micelles sont des NPs ayant un cœur hydrophobe et une couronne hydrophile. Généralement, ces nanoobjets ont une taille comprise entre 5 et 100 nm et sont utilisées pour la vectorisation des molécules hydrophobes (Fig. 10) ⁵⁴. En parallèle, les dendrimères sont des macromolécules mono-dispersées et hautement branchées. Ces molécules possèdent un grand nombre de groupements de surface qui sont tous liés à une seule unité centrale. Le cœur des dendrimères fournit un compartiment pour la vectorisation des molécules thérapeutiques et leur taille nanométrique facilite leur internalisation par endocytose ⁶².

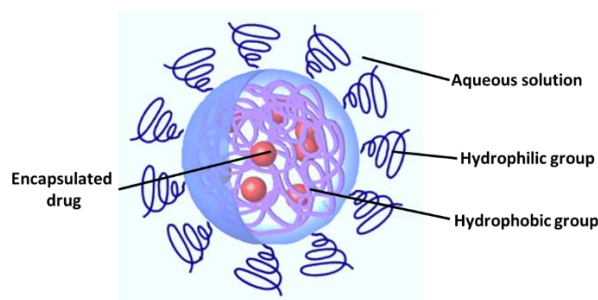


Figure 10 : Structure des micelles polymères représentatives du groupe de NPs auto-assemblées ⁶³.

Les hydrogels font aussi partie des NPs auto-assemblées et sont des réseaux de polymères hydrophobes pouvant absorber une large quantité d'eau, tout en restant insolubles dans les solutions aqueuses due aux phénomènes de réticulation entre les chaînes individuelles de polymères ⁶⁴.

Par ailleurs, les NPs particulières, telles que les nanosphères (10-100 nm) et les microsphères (1-1 000 μm) sont des matrices polymères dans lesquelles les molécules bioactives sont soit dispersées soit dissoutes (Fig. 11). La libération contrôlée des molécules encapsulées se fait par diffusion, gonflement et/ou par érosion ⁵⁴.

Enfin, les NPs capsules, telles que les nanocapsules et les microcapsules, sont des structures de type cœur-couronne dans lesquelles la molécule bioactive est confinée

dans une cavité limitée par une membrane polymère. Cette molécule bioactive peut être présente à l'état solide ou liquide dans cette cavité (Fig. 11) ⁶⁵.

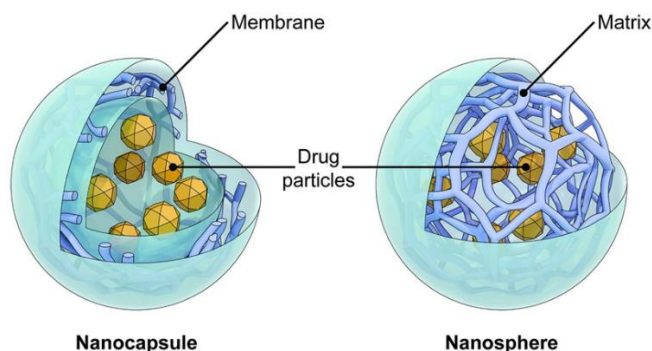


Figure 11 : Structures des NPs polymères. A : nanosphères polymères ; B : nanocapsules polymères ⁶⁶.

Une multitude de polymères est utilisée dans la préparation des NPs polymères dont certains sont naturels et d'autres sont de synthèse. Les polymères naturels typiquement utilisés dans la préparation des NPs polymères incluent l'amidon, les polypeptides, l'albumine, l'alginate, la chitine, la gélatine, la cellulose et les poly(hydroxyalcanoates) [PHA]. En contrepartie, le poly(éthylène glycol) [PEG], l'acide poly(acide D,L-lactique) [PLA], le poly(acide D,L-lactique-co-acide glycolique) [PLGA], la poly(ϵ -caprolactone) [PCL], le poly(alcool vinylique) [PVA], la poly(vinyl pyrrolidone) [PVP], les poly(anhydrides), les poly(orthoesters) et le poly(malate de benzyle) [PMLABe] sont les polymères de synthèse communément utilisés pour la préparation de NPs polymères ^{61, 67}.

1.3.2.3 NPs virales

Les NPs virales (VNPs) sont particulièrement attractives en raison de leur origine naturelle ⁶⁸.

Les VNPs sont des NPs basées sur des virus qui peuvent être utilisées comme des matériaux de base pour une nanomédecine aux propriétés multiples. Les VNPs peuvent être des bactériophages et des virus d'animaux ou de plantes et peuvent être infectieux ou non. Les particules ressemblant au virus ou "Virus like particles" sont un sous-groupe de VNPs obtenus par expression hétérologue sans l'acide nucléique génomique (ADN), ce qui les rend non répliquatives. Les VNPs sont des entités dynamiques, et représentent des systèmes d'auto-assemblage qui forment des structures polyvalentes, monodispersées et parfaitement symétriques. Elles sont exceptionnellement robustes et

peuvent être produites en grande quantité en très peu de temps. Les VNPs offrent des avantages par rapport au NPs de synthèse grâce à leurs propriétés de biodégradabilité et de biocompatibilité. Parmi tous les VNPs, les virus des plantes et les bactériophages sont les plus intéressants, car ils sont souvent peu pathogènes pour l'être humain (Fig. 12) ⁶⁸.

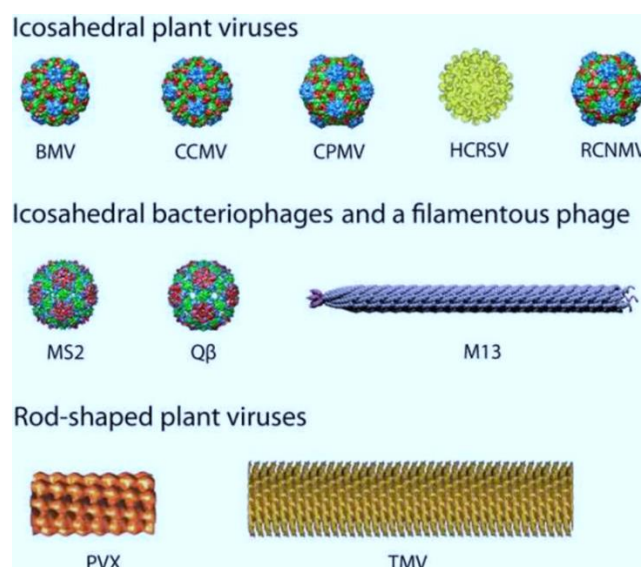


Figure 12 : Représentation schématique de la variété de VNPs utilisées actuellement en nanomédecine ⁶⁸. Nous citons : les virus icosahédriques des plantes comme le virus de la mosaïque de brome (Brome mosaic virus) [BMV], le “virus de la mosaïque de niébé (Cowpea chlorotic mottle virus) [CCMV]”, le “Cowpea mosaic virus (CPMV)”, le “Hibiscus chlorotic ringspot virus (HCRSV), le “ Red clover necrotic mottle virus (RCNMV). Nous citons aussi les bactériophages icosahédriques : le MS2 et le Q β et le phage M13. Les virus des plantes en bâtonnet : le “Potato virus X (PVX)” et le “Tobacco mosaic virus (TMV)” ⁶⁸.

Par ailleurs, il existe plusieurs types de VNPs appliquées dans une multitude de domaines en nanomédecine ⁶⁸. Les VNPs sont utilisés en imagerie biomédicale comme l'imagerie vasculaire. Elles peuvent être modifiées avec des fluorochromes organiques pour l'imagerie optique, des complexes de gadolinium (Gd) pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM), et des QD ou des NPs métalliques pour la détection en utilisant diverses méthodes spectroscopiques. Les VNPs ont été conçues également pour le ciblage thérapeutique de médicaments et pour la thérapie photodynamique ciblée (PDT), dans laquelle un photosensibilisateur est excité par des longueurs d'onde spécifiques de la lumière pour générer des espèces réactives de l'oxygène (reactive oxygen species) [ROS], tuant les cellules cibles ⁶⁸.

1.3.3 Applications de la nanomédecine

Les applications de la nanotechnologie en médecine sont nombreuses mais peuvent être résumées dans trois domaines principaux interconnectés (Fig. 13) :

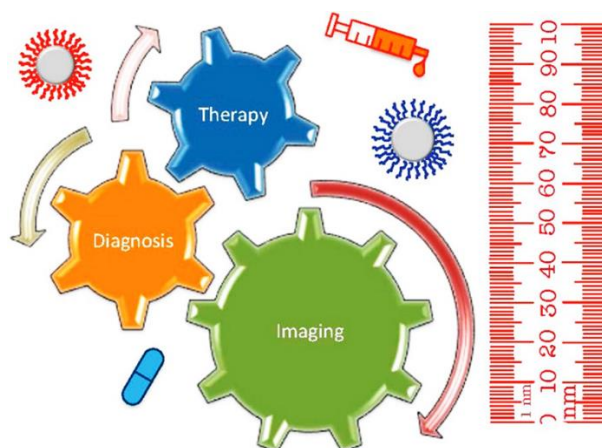


Figure 13 : Les trois domaines principaux des applications de la nanomédecine ³⁶.

1.3.3.1 Nanomédecine pour l'imagerie et le diagnostic

Un objectif clé en nanomédecine implique l'usage des NPs en tant qu'agents pour des imageries anatomiques et fonctionnelles. L'utilisation des NPs permet la visualisation des structures à l'intérieur du corps humain ³⁶. Dans ce contexte et en accord avec la définition de la nanomédecine fournie par l'ESF (European Science Foundation), les nanodiagnosics sont très utiles pour visualiser et mieux comprendre plusieurs principes physiologiques et physiopathologiques pour certaines maladies et certains traitements de maladies ⁶⁹.

Les NPs peuvent être conçues avec différentes propriétés de contraste pour différentes techniques d'imagerie médicale. Les modalités les plus fréquentes sont : la tomodensitométrie (TDM) [CT-Scan], l'imagerie par résonance magnétique (IRM), l'imagerie de la radioactivité comme la tomographie par émission de positons (TEP) et la tomographie par émission monophotonique (TEMP), l'imagerie par fluorescence et l'imagerie photoacoustique ³⁶.

Les nanodiagnosics sont utilisés dans une variété de secteurs en médecine. Cependant cette application concerne majoritairement le cancer où ils sont employés pour la visualisation des lésions cancéreuses primaires ou métastatiques et pour surveiller les

vaisseaux sanguins tumoraux ^{70, 71}. Dans le secteur des maladies cardiovasculaires, les nanodiagnostic sont utilisés pour visualiser les artères et les veines du système cardiovasculaire ⁷². En ce qui concerne la thérapie cellulaire par greffe de cellules souches, les NPs sont maintenant utilisées pour traquer les cellules greffées *in vivo* ⁷³. Dans une étude publiée en 2018 s'inscrivant dans le cadre du développement d'outils d'imagerie par rayons-X, des NPs d'or (Au-NPs) fonctionnalisées par une protéine d'adhésion se liant au collagène (collagen-binding adhesion protein 35, CNA35) ont été développées. Cette étude montre que l'or est un excellent agent de contraste et d'imagerie ciblant la cicatrice myocardique chez les patients ayant eu un infarctus de myocarde (Fig. 14). Ces NPs, appelées GNPs-CNA35, se lient spécifiquement sur la cicatrice myocardique. L'utilisation de ces NPs a permis une augmentation prolongée du ratio signal/bruit de fond du sang (*blood pool enhancement*) pour une imagerie par tomographie de l'artère coronaire et un ciblage spécifique du collagène dans la cicatrice myocardique ⁷⁴.

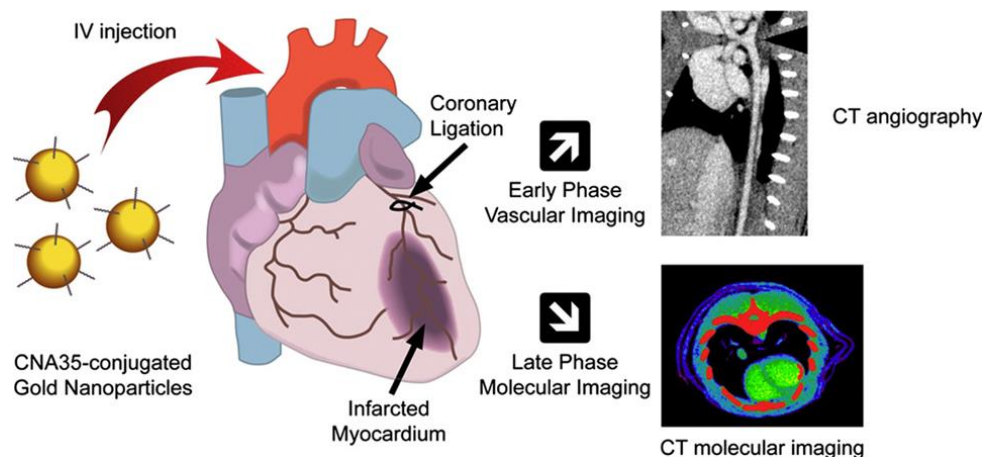


Figure 14 : Illustration schématique des GNPs-CNA35 et leurs applications dans l'imagerie du myocarde et de ses vaisseaux sanguins ⁷⁴.

Par ailleurs, les NPs peuvent être aussi utilisées pour la détection de molécules, cellules et tissus *ex vivo*. Dans cette application dite de diagnostic, les NPs, généralement associées à un ligand tel que des anticorps, sont utilisées pour détecter une ou plusieurs molécules biologiques uniques présentes dans des liquides biologiques prélevés du corps comme le sang et l'urine. Ces molécules sont généralement appelées biomarqueurs de pathologies ³⁶.

Parmi les biomarqueurs de pathologies nous pouvons citer les molécules suivantes :

- l'alpha-fœtoprotéine (AFP) est une protéine plasmatique produite par le foie du fœtus qui n'est plus exprimée chez l'adulte mais qui réapparaît dans certains carcinomes hépatocellulaires. Elle représente le biomarqueur le plus utilisé pour le pronostic des patients souffrant d'un CHC en post-traitement.

- l'antigène du cancer 125 (CA 125) est une glycoprotéine surexprimée chez les patientes ayant un cancer ovarien ; cet antigène est utilisé en tant qu'outil de pronostic des stades terminaux de ce type de cancer ⁷⁵.

- Un autre biomarqueur du cancer est représenté par l'antigène 15.3 (CA 15.3) dans de nombreux cancers, dérivé de la mucine ; cet antigène est utilisé pour détecter la récurrence tumorale chez les patientes ayant un cancer de sein ⁷⁶.

Dans ce contexte, Ge *et al.* ont développé un dispositif de biosenseur sur support papier pour détecter l'AFP, le CA 12.5, le CA 15.3 et l'antigène du carcinome embryogénique (CEA) de façon simple, rapide et utilisable même dans des pays manquant d'infrastructures hospitalières⁷⁷. Pour ce faire, ces auteurs ont utilisé un papier de chromatographie Whatman recouvert d'une couche de poly(éthylène téréphtalate) en tant que substrat pour fixer des anticorps reconnaissant les antigènes déjà sélectionnés (AFP, CA 12.5). De la cire est ensuite ajoutée pour rendre le papier hydrophobe et construire les zones de fixation des anticorps au nombre de 40 avec un diamètre de 5 nm réparties en quatre rangées et 10 colonnes ⁷⁷. Les anticorps des antigènes AFP, CA 12.5, CA 15.3 et CEA sont immobilisés dans les zones fonctionnelles du biosenseur via des liaisons covalentes : chaque colonne peut être utilisée pour la détection simultanée de quatre marqueurs tumoraux dans un seul échantillon. En parallèle des NPs à base d'oxydes de cuivre CuO ont été préparées. Ces NPs sont couplées aux fragments d'anticorps Ab₂. Les fragments d'anticorps Ab₂ sont généralement générés par digestion enzymatique (notamment par la pepsine) de l'immunoglobuline G pour se débarrasser de la majorité de la partie Fc de l'anticorps. Le fragment Ab₂ possède deux régions de liaison à l'antigène (Fab) liées par des liaisons disulfures les rendant ainsi divalentes.

Chaque zone fonctionnelle du biosenseur est ensuite incubée avec les solutions minant des fluides biologiques de patients contenant les antigènes cités précédemment, lavée et à nouveau incubée avec des NPs à base d'oxyde de cuivre et fonctionnalisées par les fragments Ab₂.

Cette incubation conduit à un phénomène de sandwich de l'anticorps (anticorps-antigène-CuO NPs-Ab₂). Enfin, chaque zone est incubée avec des QDs à base de tellure de cadmium (CdTe) quenchées par la dithizone (système de transfert d'énergie de fluorescence par résonance, TEFR). L'ajout d'acide chlorhydrique permet de libérer le Cu²⁺ et de mesurer la fluorescence des CdTe QDs-DZ (Fig. 15). Les auteurs concluent que l'intensité de fluorescence est proportionnelle à la quantité d'analytes, c'est-à-dire d'antigènes, permettant un diagnostic rapide.

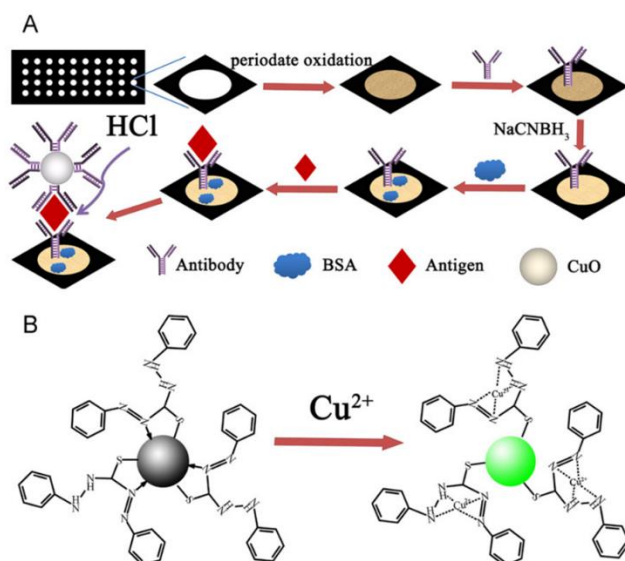


Figure 15 : A : Représentation schématique de la préparation du biosenseur. B : Illustration schématique de la récupération de la fluorescence des QDs ⁷⁷.

Selon Me *et al.*, ce nouveau test pourrait être utile dans de nombreux domaines incluant des tests cliniques dans des régions pauvres en ressources et étendu à d'autres types de biomarqueurs ⁷⁷.

Enfin, la nanotechnologie présente une opportunité pour améliorer le diagnostic global en réduisant la limite de détection avec un débit élevé et une détection multiplexée de plusieurs cibles biologiques avec une grande sensibilité ³⁶.

1.3.3.2 Nanomédecine pour la thérapie

Dans la majorité des cas, l'application de la nanomédecine pour traiter des pathologies se fait grâce au ciblage thérapeutique qui consiste à vectoriser le principe actif à l'aide de nano-objets, nommés dans ce cas nanovecteurs, dans le but de cibler un site spécifique ou à défaut de concentrer les principes actifs vers une cible tissulaire ⁷⁸.

a- Transfert de gènes

La thérapie par transfert de gènes a attiré beaucoup d'attention dans les domaines de la médecine, de la pharmacologie et de la biotechnologie ⁷⁹. Cette approche biotechnologique est une stratégie prometteuse pour un traitement spécifique de nombreuses pathologies monogéniques liées à un dysfonctionnement génétique. Cette thérapie vise donc à corriger une expression génétique altérée dans les cellules pathologiques. La réussite de la thérapie génique dépend largement de l'efficacité des systèmes de transfert de gènes. Cependant, les molécules d'acide nucléique ou ribonucléique (ARN) seules ne sont pas suffisamment efficaces car : *i*). elles sont dégradées dans le sang par des nucléases sériques, *ii*). elles sont rapidement éliminées de l'organisme en raison d'une clairance rénale rapide, *iii*). elles sont facilement phagocytées, *iv*). elles sont faiblement captées par les cellules ciblées, *v*). et elles peuvent activer le système immunitaire induisant alors des effets toxiques. Toutes ces raisons limitent fortement leur application en clinique ⁸⁰.

Par conséquent, plusieurs études ont été menées pour améliorer les thérapies géniques et les NPs ont montré des propriétés intéressantes en tant que nanovecteurs pour le transfert de gènes dans les systèmes biologiques (Fig. 16) ⁸⁰.

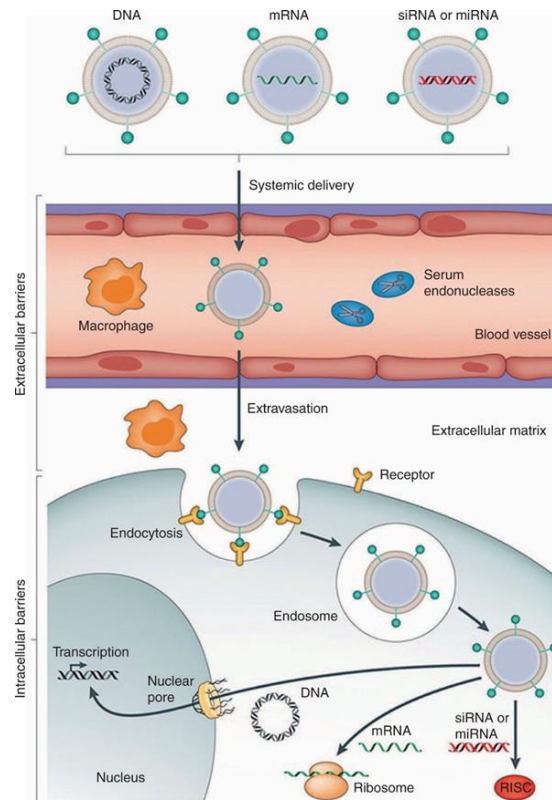


Figure 16 : Schéma représentant le processus de transfert de gènes via des NPs ⁸⁰.

Les nanovecteurs destinés au transfert de gènes sont conçus pour protéger l'ADN ou l'ARN d'une dégradation prématurée dans le sang et pour la transférer d'une façon efficace dans les cellules cibles ⁸¹. La petite taille des NPs, allant de 10 à 200 nm, leur permet de pénétrer profondément dans les tissus comme les tumeurs solides avec un haut niveau de spécificité ⁸². Cette petite taille leur permet également d'interagir avec les biomolécules de la membrane cellulaire ou dans les cellules, et de transporter l'ADN, l'ARN ou des ARN interférents (siRNA) aux tissus cibles ^{83,84}.

Plusieurs types de NPs ont été évalués pour le transfert des gènes. Toutefois, la stratégie principale pour réaliser cette application consiste à utiliser les NPs virales. Les liposomes sont également largement exploités pour ce genre d'application ⁸⁵. Les NPs polymère et les NPs inorganiques sont aussi employées pour le même but ⁸⁰. Nous allons illustrer les applications des NPs en tant que vecteurs pour la thérapie génique par les quelques exemples donnés ci-dessous.

La première application du transfert de gènes est la simple transfection de cellules en culture, par des nanovecteurs polycationiques, utilisée par une majorité de laboratoire de recherche dans le but de réaliser des transfections transitoires, principalement pour du gain ou de la perte de fonction de gènes afin d'en étudier l'impact sur le fonctionnement cellulaire ⁷⁹. Il s'agit donc d'une technique de « routine » en laboratoire de recherche, en parallèle d'autres techniques comme l'électroporation ou l'utilisation de virus recombinants ⁷⁹.

Le second versant du transfert de gènes concerne les protocoles de thérapie génique. Il existe de multiples essais précliniques et cliniques du transfert de gènes. Récemment, il a été proposé que ces approches puissent être utilisées dans la lutte contre le diabète. Le diabète de type 1 est une maladie auto-immune où les cellules- β des îlots de Langerhans sont détruites par les lymphocytes T qui réagissent spécifiquement avec une ou plusieurs protéines exprimées par ces cellules. Il y a de plus en plus de preuves que le diabète de type 1 est une maladie liée à une réponse immunitaire Th1 médiée par des lymphocytes T CD4+ et CD8+ sécrétant de l'interféron gamma (IFN- γ), favorisant l'immunité cellulaire. Les cellules Th2 sécrétant de l'interleukine-4 et l'interleukine-10 (IL-4 et IL-10) répriment l'activité Th1 ^{86, 87, 88}.

Dans ce contexte, Ko *et al.* ont utilisé un polymère cationique biodégradable nommé le poly[acide-(4-aminobutyl)-L-glycolique] (PAGA) pour transférer des plasmides

codants pour les interleukines IL-4 et IL-10 dans le but d'effectuer un transfert de gènes à des souris diabétiques non obèses (non-obese diabetic [NOD] mice). Dans le foie des souris NOD, Ko *et al.* ont détecté l'ARN messager (ARNm) codant pour l'IL-4 et l'IL-10 de la souris cinq jours après l'injection par les plasmides Il4 et Il10 couplés au PAGA (PAGA- Il4 et PAGA- Il10). Six semaines après l'injection, 75% des ilots observés sont intacts par rapport à 3% pour le groupe contrôle. Par ailleurs, 5% des souris traitées ont présenté des ilots sévèrement infiltrés par des lymphocytes par rapport à 30% pour le groupe contrôle. Finalement, le niveau de glucose a été mesuré hebdomadairement pendant 32 semaines. Ces mesures ont montré que la co-injection des plasmides Il4 et Il10 couplés au PAGA empêche le développement du diabète chez 75% des animaux traités. En conclusion, cette étude montre que l'administration combinée des plasmides Il4 et Il10 couplés au PAGA chez des souris NOD empêche le développement de diabète auto-immune (type 1) ⁸⁹.

b- Transfert de médicaments

La vectorisation de principes actifs par des nanovecteurs possède plusieurs avantages sur la thérapie classique. Tout d'abord, elle permet de présenter une solution d'administration à des médicaments hydrophobes sous une nouvelle forme galénique. Ceci est très significatif car plus de 40% des principes actifs identifiés par chimie combinatoire montrent une faible solubilité dans l'eau et par conséquent ne peuvent être facilement ou efficacement administrés sous une forme « libre » ⁹⁰. De plus, les nanovecteurs ont le potentiel d'augmenter la stabilité des principes actifs *in vivo*. Ils permettent de réduire l'excrétion rénale et/ou la dégradation hépatique conduisant ainsi à une augmentation de leur temps de circulation dans le sang. Ils réduisent le volume de distribution conduisant à une diminution de la dispersion des molécules vectorisées dans les tissus, cellules et/ou organes non-ciblés. Ils améliorent aussi la capacité des principes actifs à s'accumuler dans les sites ciblés, augmentant par conséquent leur index thérapeutique. Finalement, les nanomédecines encapsulant des agents thérapeutiques de faibles masses molaires peuvent aider à surmonter plusieurs barrières biologiques comme la membrane hémato-encéphalique afin d'adresser le principe actif à l'endroit désiré (Fig. 17) ^{71, 78, 91, 92}.

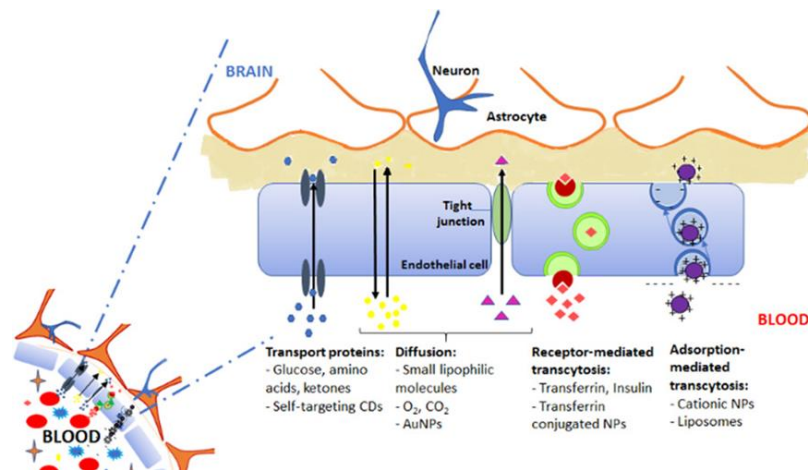


Figure 17 : Illustration schématique de la capacité des NPs à traverser la barrière hémato-encéphalique ⁹³.

Ces nano-objets utilisés en tant qu'outils thérapeutiques sont conçus spécifiquement pour s'accumuler préférentiellement dans des sites du corps où ils sont nécessaires pour améliorer le résultat pharmaco-thérapeutique ⁹⁴. L'objectif principal de cette application est donc d'augmenter la biodisponibilité, l'efficacité thérapeutique tout en diminuant les doses administrées et la toxicité non souhaitée associée aux principes actifs aboutissant ainsi à une meilleure prise en charge des patients ⁹⁴. Nous allons donner un exemple de thérapie utilisant les NPs.

La maladie d'Alzheimer est la maladie neurodégénérative la plus commune à l'âge adulte. Elle a récemment reçu beaucoup d'attention, en particulier dans les domaines liés aux nouveaux traitements. Il s'agit d'un trouble évolutif et mortel caractérisé par une détérioration neuronale qui entraîne une perte des fonctions cognitives, telles que la mémoire, les capacités de communication, les jugements et le raisonnement ⁹⁵. La caractéristique clinique commune de la maladie d'Alzheimer est le dépôt extracellulaire de peptide amyloïde bêta (A β) avec la protéine tau phosphorylée, ce qui entraîne une perte neuronale irréversible et donc une perte de mémoire et de pouvoir de décision ⁹⁶.

Le tartrate de rivastigmine (RT) a été approuvé par la "Food and Drug Administration" aux États-Unis pour le traitement de la maladie d'Alzheimer. Cependant, son application actuelle présente de nombreux inconvénients qui incluent une entrée restreinte dans le cerveau en raison du caractère hydrophile du RT, nécessitant donc une administration fréquente et des effets secondaires ciblant le système cholinergique. Dans ce contexte, Joshi *et al.* ont préparé des NPs à base de PLGA et de poly(n-butyl cyanoacrylate) [PBCA] dans le but d'encapsuler le RT. L'administration de formulations de RT chez des animaux traités par une solution saline (NaCl) n'a pas

entraîné d'amélioration notable des capacités d'apprentissage et de mémoire, tandis que l'administration de différentes NPs chargées en RT chez des souris traitées à la scopolamine contrarie l'amnésie induite par la scopolamine comme le montre la diminution importante de la latence d'échappement. Ces résultats indiquent que les NPs PLGA et PBCA chargées en RT ont permis une récupération plus rapide de la mémoire par rapport à la solution de RT seule chez les souris ayant une amnésie induite par la scopolamine. Ces résultats préliminaires indiquent que les NPs PLGA et PBCA chargées en RT pourraient être efficace pour cibler le cerveau et maintenir la libération de RT pendant une longue période de temps et pourraient ainsi conduire à une amélioration significative du traitement de la maladie d'Alzheimer⁹⁷.

Grace à ces avantages multiples, la nanomédecine offre une solution pour le traitement d'une variété de pathologies comme les maladies infectieuses, les désordres endocrine/exocrine, la régénération de la peau, les maladies cardio-vasculaires, les maladies neurodégénératives, etc.⁹⁸. Cependant, le centre d'intérêt des applications en nanomédecine est la thérapie des cancers³⁶ développée dans la partie suivante "1.4 Nanomédecine thérapeutique et cancer".

1.4 Nanomédecine thérapeutique et cancer

1.4.1 Notions générales sur le cancer

Le cancer est un groupe de plus de 100 maladies qui se développent généralement sur une longue échelle de temps et qui impliquent la perte de mécanismes moléculaires de régulation du cycle cellulaire de certaines cellules du corps. Théoriquement, cette pathologie peut se développer dans n'importe quel tissu de l'organisme sachant que chaque type possède ses caractéristiques spécifiques. Cependant, le processus à la base de la genèse du cancer reste le même pour toutes les formes de la maladie. Dans la très grande majorité des cas, et bien qu'il y ait des gènes de prédisposition aux cancers, le processus d'oncogenèse commence à l'échelle d'une ou plusieurs cellules, par la transformation de cellules normales en cellules cancéreuses découlant d'altérations génétiques ayant pour conséquence la perte du contrôle des mécanismes régulateurs antiprolifératifs de la cellule normale et l'évolution vers une prolifération anarchique⁹⁹.

La transformation cellulaire débute lorsque la cellule subit une mutation génétique activatrice de la prolifération cellulaire (Fig. 18A). La cellule atteinte et ses descendants se multiplient plus fréquemment, une condition appelée hyperplasie. Puis, une de ces cellules subit une seconde mutation génétique d'autant plus fréquente que le rythme de prolifération de la cellule hyperplasique est élevé, qui augmente à nouveau son potentiel prolifératif (Fig. 18B). Les descendants de la cellule portant les deux mutations se divisant excessivement créent à leur tour une évolution vers le stade appelé dysplasie. Au fil de temps, ces cellules à haut potentiel de prolifération vont accumuler les mutations et produire une sélection plus ou moins clonale de cellules perdant les points de contrôles du cycle cellulaire pour acquérir un génotype cancéreux en constante évolution vers un profil de plus en plus prolifératif et résistant aux chimiothérapies par sélection des cellules s'adaptant à la pression thérapeutique au sein de tumeurs génétiquement souvent très hétérogènes (Fig. 18C). Ces cellules présentent un phénotype très altéré en comparaison à celui des cellules normales du même tissu aussi bien au niveau de leur croissance que de leur différenciation. Si la tumeur solide qui s'est formée à partir de ces cellules est toujours contenue dans son tissu d'origine, elle sera nommée cancer *in situ*. Les cellules au sein de la tumeur *in situ* poursuivent leur évolution (Fig. 18D) incluant d'autres mutations qui permettent à la tumeur d'envahir les tissus voisins et à quelques cellules de migrer vers des vaisseaux sanguins et d'atteindre la circulation sanguine ou lymphatique, la tumeur est dite métastatique. Les cellules qui se sont échappées de la tumeur peuvent établir de nouvelles niches tumorales (métastases) dans d'autres organes (Fig. 18E) ⁹⁹.

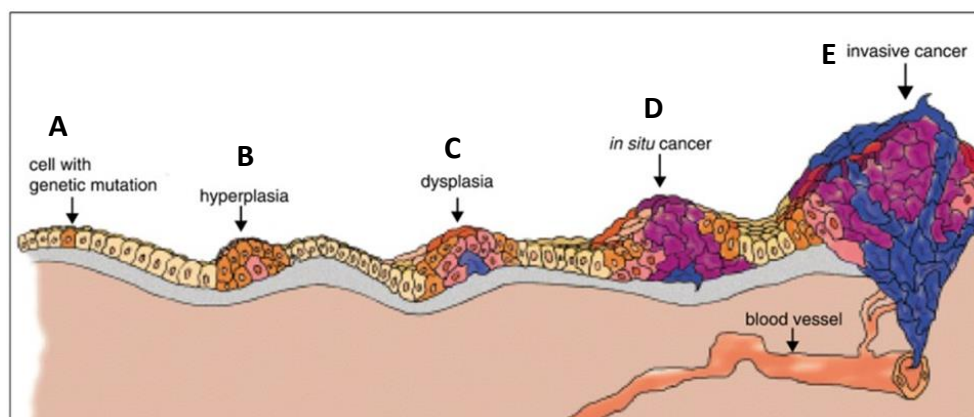


Figure 18 : Les différentes étapes de développement de la tumeur ⁹⁹.

Parmi toutes les types de cancers et selon les normes de l'association européenne pour l'étude du foie (EASL), le cancer de foie est la sixième forme de maladies malignes la plus répandue et constitue 7% de la totalité des types de cancers connus ¹⁰⁰.

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est la forme la plus répandue des cancers hépatiques et est la deuxième cause de mortalité liées au cancer dans le monde ^{101, 102}. En France, cette pathologie est responsable de 8 000 décès annuellement, avec un pronostic considéré comme un des plus sombres comparé avec d'autres types de cancers et une médiane de survie globale équivalente à 9,4 mois ¹⁰³. L'incidence de cette maladie atteint le maximum à l'âge de 70 ans. Egalement, le CHC est plus fréquent chez les hommes que chez les femmes ¹⁰⁰.

Cette pathologie est généralement causée par l'infection chronique par le virus d'hépatite B (VHB) ou d'hépatite C (VHC), la consommation excessive d'alcool, l'exposition à des mycotoxines comme l'aflatoxine B1, ainsi que certaines maladies métaboliques liées au diabète et à l'obésité ¹⁰⁴. Ces étiologies présentent des fréquences très variables en fonction des régions géographiques du monde.

Dans les pays développés, les programmes de surveillance assurent des diagnostics précoces de la maladie chez 40 à 50% des patients à un stade relativement précoce permettant des traitements potentiellement curatifs ^{104, 105, 106}. Par contre, les patients ayant un CHC à un stade intermédiaire sont souvent traités par des thérapies locorégionales, alors que ceux ayant des stades avancés de la maladie ne peuvent profiter que de traitements systémiques palliatifs (Fig. 19) ¹⁰⁴.

La classification de "Barcelona Clinic Liver Cancer" (BCLC) consiste en cinq stades permettant de proposer aux patients des traitements les mieux adaptés ^{104, 107}. Les patients possédant une tumeur asymptomatique (Stade 0-A) sont des candidats pour une thérapie curative par élimination de la tumeur (ablation, résection chirurgicale, transplantation). Les patients asymptomatiques ayant un carcinome hépatocellulaire multi-nodulaire (CHC ; stade B) peuvent subir une chimioembolisation transartérielle par cathéter, tandis que les patients ayant des tumeurs symptomatiques avancées ou invasives (stade C) reçoivent des traitements par une chimiothérapie comme l'inhibiteur multi-kinase Sorafenib. Le stade terminal de la maladie inclut des patients dont le diagnostic est très sombre et qui doivent être traités avec les meilleurs soins palliatifs possibles ^{104, 107}.

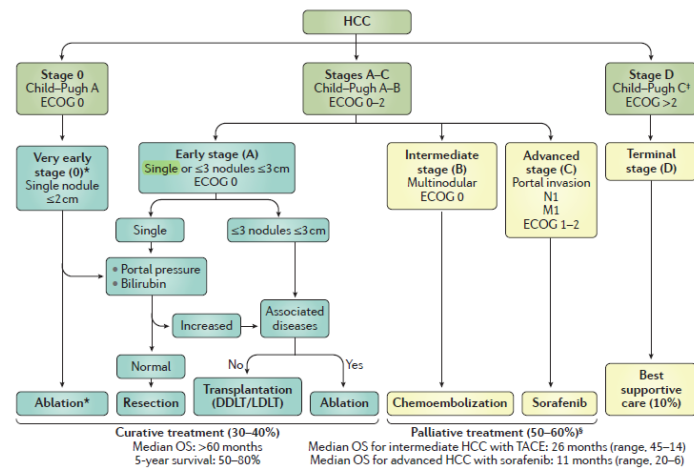


Figure 19 : Le système BCLC de détermination du stade de la maladie et de la stratégie thérapeutique. * Les patients à un stade très précoce (stade 0) sont considérés les premiers candidats pour une ablation s'il n'y a pas de contre-indications pour une transplantation de foie. DDLT, deceased donor liver transplantation (Transplantation de foie de donneur décédé); ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group (Groupe d'oncologie coopérative de l'Est) ; LDLT, living donor liver transplantation (Transplantation de foie de donneur vivant) ; M1, M1 metastasis (métastases M1); N1, N1 lymph node (ganglion lymphatique); OS, overall survival (survie globale). ‡ Les patients classés Child-Pugh (class A) doivent être les premiers candidats pour une transplantation de foie. § Migration au stade du traitement (considère le prochain traitement efficace dans l'algorithme quand les thérapie précédentes échouent) ^{104, 107}.

Globalement, un nombre supérieur à 50% de patients reçoivent une thérapie systémique à un moment donné durant la progression de la maladie ^{104, 105, 106}. Dans une étude intéressante réalisée par Llovet *et al.* (2008), l'inhibiteur de tyrosine kinase multi-cibles Sorafenib possédant des propriétés anti-angiogéniques et antiprolifératives, a permis d'augmenter la médiane de survie globale de 8 à 11 mois tout en montrant un profil de toxicité tolérable chez les patients atteints de CHC à des stades avancés. Cependant, l'utilisation généralisée de ce traitement en première intention a montré ces limites avec un gain faible sur la survie et des effets secondaires difficiles à supporter pour les patients ¹⁰⁸.

1.4.2 Traitements des cancers par la nanomédecine

Une des principales raisons expliquant le taux de mortalité élevé lié aux cancers est l'absence de traitements anticancéreux sélectifs ⁸. La chimiothérapie conventionnelle est basée sur des molécules thérapeutiques de faible masse molaire (généralement <1 000 g/mol). En raison de leur petite taille, les molécules de chimiothérapie, comme la doxorubicine, le cisplatine ou la gemcitabine, possèdent des pharmacocinétiques défavorables et une biodistribution sous-optimale. Ceci est illustré par une demi-vie très courte dans le sang et une accumulation importante dans plusieurs

organes/cellules/tissus sains (Fig. 20A). Ces facteurs combinés au mécanisme d'action non spécifique des agents de chimiothérapie et leur grand volume de distribution engendrent des effets secondaires comme la myélosuppression, la mucite, la neurotoxicité, la nausée et l'alopecie ¹⁰⁹. En augmentant la taille des agents de chimiothérapie administrés par voie systémique d'au moins 5 à 10 nm en diamètre, l'excrétion par les reins pourrait être réduite, la demi-vie pourrait être prolongée et l'accumulation dans le site cible pourrait être réduite (Fig. 20B). A titre d'exemple, l'encapsulation de la doxorubicine dans des liposomes (Caelyx® / Doxil®) entraîne une augmentation de la demi-vie plasmatique qui passe de 5 à 10 minutes pour la forme non encapsulée du médicament, à 2 à 3 jours pour le médicament encapsulé dans des liposomes ¹¹⁰.

Les médicaments de chimiothérapie conventionnelle montrent un niveau important d'accumulation dans les tissus sains durant leur phase de distribution et d'élimination et un niveau faible d'accumulation intra-tumorale. Par contre, les nano-médicaments limitent l'accumulation du principe actif dans les tissus sains et favorisent son accumulation dans les sites pathologiques (Fig. 20A). Les profils pharmacocinétiques typiques des nanoparticules (NPs) illustrent la capacité de ces dernières à s'accumuler préférentiellement dans la tumeur par rapport aux médicaments de faible masse molaire (Fig. 20B) résultant des propriétés intrinsèques de circulation des NPs ¹⁰⁹.

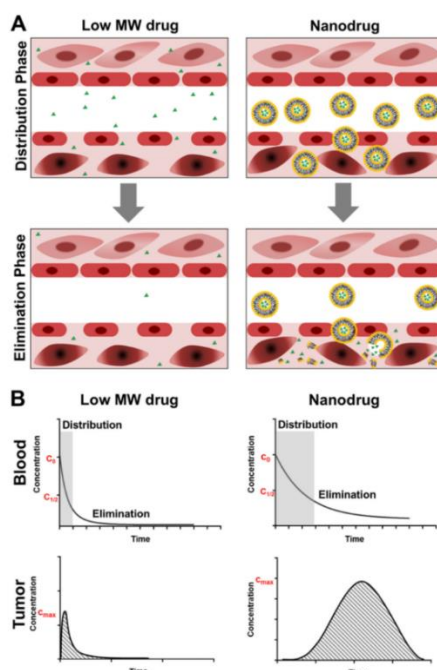


Figure 20 : Agents de chimio thérapie conventionnels de faible masse molaire vs nanomédecine basée sur l'effet EPR ¹⁰⁹.

En effet, une forte exposition systémique aux agents anticancéreux engendre souvent une toxicité limitant ainsi la dose de traitement pouvant être administrée. Par conséquent, le ciblage thérapeutique du cancer est d'une importance cruciale quant à la résolution de problèmes de toxicité concernant les thérapies anticancéreuses actuelles⁸.

La littérature est riche en données *in vivo* obtenues à partir de modèles animaux avec des formulations nanomédicales qui ont déjà été validées par des agences régulatrices et quelques-unes de ces formulations sont déjà utilisées en clinique où elles ont montré une réduction significative des effets secondaires par rapport aux traitements standards¹¹¹.

Parmi les formulations nanomédicales qui ont réussi à atteindre le marché, nous citons le Myocet® et le Caelyx®. Le Myocet® est une formulation de doxorubicine encapsulée dans des liposomes non PEGylés. Cette formulation, mise en marché depuis l'année 2000, est utilisée dans le traitement du cancer de sein métastatique¹¹². Le Doxil® (ou Caelyx® en Europe) correspondant au nom commercial de la doxorubicine encapsulée dans un liposome dont la surface a été modifiée par le greffage du polymère hydrophile, poly(éthylène glycol) (PEG) [liposomes "PEGylés"]¹¹³. Cette formulation, mise en marché depuis 1996, est également utilisée dans le traitement du cancer de sein métastatique, le myélome multiple et le sarcome de Kaposi^{114,115,116}. En 1996, une autre formulation nanomédicale à base de liposome a été mise en marché, elle porte le nom de DaunoXome®. Le DaunoXome® est constituée d'un liposome encapsulant la daunorubicine et est utilisée pour le traitement du sarcome de Kaposi¹¹⁷. La cytarabine liposomale, portant le nom commercial de Depocyte®, a atteint le marché en 2001 et est indiquée pour le traitement intrathécal de la méningite lymphomateuse¹¹⁸.

Une autre génération de NPs a été lancée dans le marché : il s'agit de NPs nab (nanoparticle albumin bound) formées par l'agrégation d'albumine humaine. Ces NPs appartiennent à la famille des NPs polymères. L'exemple de cette génération est l'Abraxane® ou nabTM-Paclitaxel. Ce médicament, mis sur le marché en 2007, est utilisé dans le traitement du cancer de sein, du cancer bronchique non à petites cellules et pour l'adénocarcinome pancréatique^{119, 120, 121}. En outre, le BIND-014 constitué de NPs PEGylées à base de poly(acide lactique) encapsulant du docétaxel est actuellement en

phase 2 des essais cliniques. Ces NPs portent l'antigène "Prostate Specific Membrane Antigen", PSMA, en surface comme agent de ciblage, sachant que le PSMA est une protéine de surface exprimée par les cellules cancéreuses de la prostate et par la plupart des cellules des néo-vaisseaux des tumeurs solides ¹²². Parmi les conjugués de médicament, le Trastuzumab emtansine ou Kadcyla[®] consiste en un anticorps dirigé contre le récepteur de facteur de croissance épidermique humain 2 (human epithelial growth factor receptor 2, HER2) couplé à un dérivé de la maytansine [DM1] (poison du fuseau) appelée l'Emtansine. Utilisé en pratique clinique depuis 2014, ce médicament est indiqué pour le traitement du cancer métastatique du sein HER2-positif métastatique ou localement avancé ¹²³. Cependant, l'augmentation de l'efficacité thérapeutique de ces formulations reste limitée et l'existence d'effets secondaires non souhaités ^{113, 124} justifie les efforts en cours dédiés à les optimiser ¹²⁵.

1.4.3 Stratégies du ciblage thérapeutique anticancéreux

1.4.3.1 Ciblage passif

Les vaisseaux anormaux formés par les tumeurs solides montrent une caractéristique spécifique nommée "perméabilité accrue et effet de rétention" (Enhanced Permeability and Retention Effect, EPR effect). L'effet EPR a été reporté pour la première fois en 1986 par Maturuma et Maeda : ce concept a permis d'expliquer le taux élevé d'accumulation des macromolécules au niveau des tumeurs ¹²⁶.

L'effet EPR est un phénomène qui concerne uniquement les tumeurs solides où l'angiogenèse déséquilibrée aboutit à la formation d'une vascularisation anatomiquement et physiologiquement différente de celle des tissus normaux (Fig. 21) ¹²⁷.

Un des critères cruciaux des tumeurs est représenté par leur croissance anarchique et rapide. Cette croissance excessive conduit à un stress important induit par la prolifération d'un nombre important de cellules dans un volume restreint. Pour maintenir la croissance tumorale, il est indispensable pour les tumeurs de taille supérieure à 1~2 mm en diamètre d'établir leur propre approvisionnement par le sang. Par conséquent, de nouveaux vaisseaux sanguins se forment dans la tumeur ¹²⁸. Toutefois, certains néo-vaisseaux sont comprimés dû à la grande pression intra-tumorale. Cette compression couplée à un taux élevé de croissance cellulaire et de métabolisme intra-tumoral conduit à une condition d'hypoxie dans la tumeur qui résulte

à son tour d'une production du facteur pro-angiogénique "le facteur de croissance vasculaire endothélial" (Vascular endothelial growth factor, VEGF). Le VEGF stimule la croissance des cellules endothéliales ainsi que la poussée des vaisseaux sanguins et leur donne un caractère poreux. De plus, dans les zones hypoxiques, des phénomènes de nécrose surviennent conduisant à des lacunes intratumorales dans lesquelles peuvent s'accumuler du sang et des macromolécules ¹²⁹.

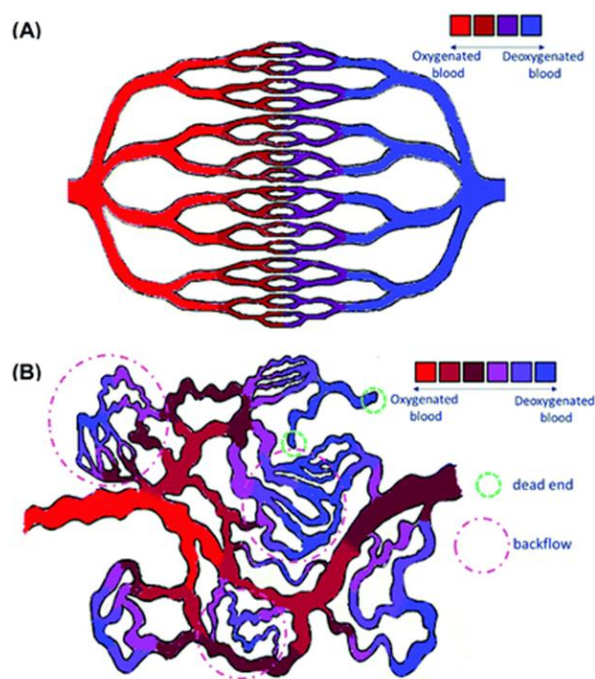


Figure 21 : Vascularisation normale vs vascularisation tumorale. A : représentation schématique d'une vascularisation normale qui a lieu systématiquement sans refoulement de sang. **B :** représentation schématique d'une vascularisation anormale montrant des signes d'impasses et de refoulement de sang. Le changement de couleur représente le degré d'oxygénation du sang à l'intérieur des vaisseaux sanguins. Ce changement montre une diminution graduelle du niveau d'oxygène. Toutefois, des changements erratiques dans le degré d'oxygénation du sang sont souvent observés dans les vaisseaux sanguins anormaux. Dans ces vaisseaux plusieurs régions montrent une augmentation et une diminution graduelle du niveau d'oxygène indiquant des refoulements possibles et une insuffisance de transport d'oxygène au tissu tumoral ¹²⁷.

Tout ceci aboutit à une très haute densité de vascularisation dans les tumeurs solides. Les vaisseaux sanguins formés manquent généralement de couche de muscle lisse et de péricytes, et présentent une lumière plus large que la normale ainsi que des pores allant jusqu'à 4.7 μm de diamètre. Toutefois la majorité des pores formés ont une taille située entre 1 et 100 nm de diamètre ^{130, 131}.

Dans les tissus sains, les molécules thérapeutiques de faible masse molaire migrent facilement des vaisseaux sanguins vers les tissus alimentés par ces vaisseaux, tandis

que les molécules thérapeutiques encapsulées dans des nanovecteurs ne peuvent pas réaliser facilement cette extravasation due à leur grande taille. En parallèle, les caractéristiques des vaisseaux tumoraux facilitent l'infiltration des nanovecteurs de plusieurs centaines de nm alors que l'absence de drainage lymphatique favorisent leur accumulation dans les tumeurs (Fig. 22) ^{132, 133}.

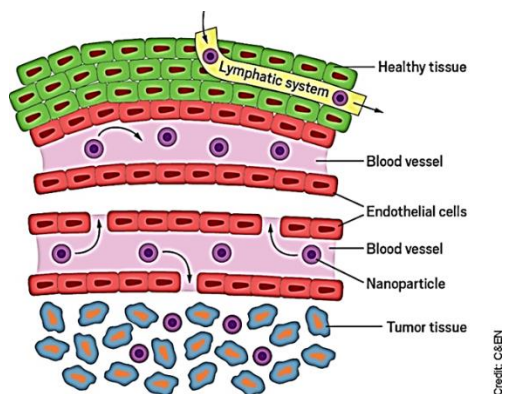


Figure 22 : Démonstration schématique de l'effet EPR ¹³⁴.

La majorité des nano-médicaments anticancéreux cliniquement disponibles sont basés sur le ciblage thérapeutique passif. La première génération de nanomédecine est basée sur le contrôle de la pharmacocinétique et la biodistribution du composé ⁸.

Parmi les traitements de première génération de médicaments anticancéreux basée sur le ciblage passif qui ont atteints le marché, et qui ont été décrits dans le paragraphe 1.4.2, nous pouvons citer le Doxil® et l'Abraxane® (Fig. 23).

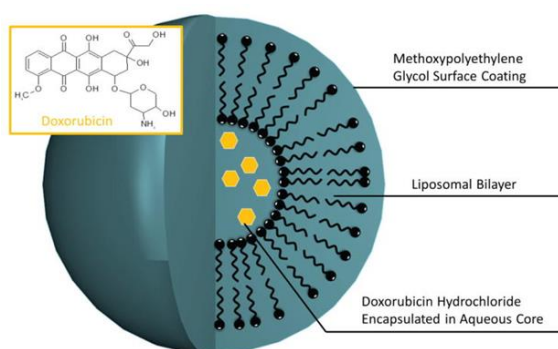


Figure 23 : Représentation schématique de la structure du liposome PEGylé encapsulant la doxorubicine (Doxil®). Les pentagones jaunes représentent les molécules de doxorubicine encapsulées dans le cœur hydrophile du liposome protégé par le methoxy-poly(éthylène glycol). ¹³⁵.

1.4.3.2 Ciblage actif

Le ciblage actif vise à améliorer, d'une part, la biodistribution des NPs portant des molécules de ciblage en surface en les détournant des cellules et/ou tissus sains n'exprimant peu ou pas les récepteurs de ces molécules de ciblage, et d'autre part d'augmenter leur captation par les cellules ciblées¹³⁶. Dans le cas du ciblage actif, un ligand de haute affinité est attaché à la surface du nanovecteur. Le ligand se lie sélectivement à un récepteur sur-exprimé sur la membrane cellulaire de la cellule ciblée. Le ciblage actif est assuré par la grande spécificité du ligand à son récepteur correspondant⁸.

Dans le cas du cancer, les récepteurs (sur)exprimés par les cellules du tissu tumoral sont généralement différents de ceux exprimés par les cellules des tissus sains. Ces récepteurs sont soit uniquement exprimés ou surexprimés par les cellules cancéreuses (Fig. 24)^{105, 106}.

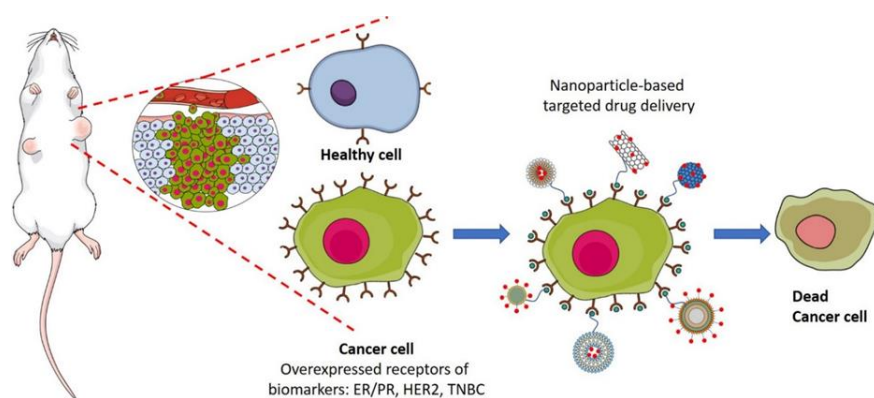


Figure 24 : Concept du ciblage thérapeutique actif représenté par Liyanage . et al. (2019)⁸².

Une large gamme de ligands est utilisée dans le contexte du ciblage actif. Ces ligands peuvent être soit de petites molécules comme l'acide folique et certains glucides, soit des macromolécules comme des peptides, des protéines, des anticorps, des aptamères et des oligonucléotides⁸.

Les interactions spécifiques qui ont lieu entre les ligands présents à la surface du nanovecteur et les récepteurs surexprimés présents à la surface de la cellule ciblée facilitent l'internalisation du complexe ligand-récepteur via un mécanisme d'endocytose médiée par un récepteur et un transport vésiculaire par des endosomes (Fig. 25)¹³⁹.

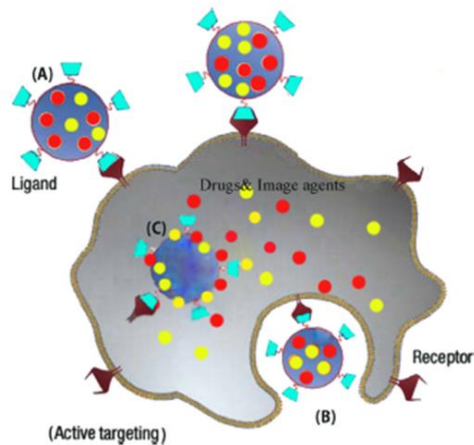


Figure 25 : Illustration schématique du mécanisme d’internalisation de NPs dans le cas du ciblage thérapeutique actif. (A) ligands sur les nanoparticules ; (B) début de l’internalisation du complexe NPs-récepteur par le mécanisme d’endocytose médiée par un récepteur et le transport vésiculaire par des endosomes. (C) Nanoparticule internalisée dans la cellule et commençant à libérer sa charge dans la cellule ciblée ¹³⁹.

Dans le cas des NPs conjuguées à des anticorps monoclonaux, ces derniers sont capables de se lier sur un antigène préférentiellement présent à la surface des cellules cancéreuses ¹⁴⁰. L’anticorps du récepteur de facteur de croissance épidermique (epidermal growth factor receptor, EGFR), l’anti-EGFR, et celui du récepteur du facteur de croissance vasculaire endothélial VEGFR, l’anti-VEGFR, sont les plus utilisés dans les systèmes de vectorisations conçus pour le ciblage thérapeutique actif ¹⁴¹.

Le Docetaxel (DTX) est une molécule de chimiothérapie de deuxième ligne prescrite dans le cas du cancer du sein métastatique ¹⁴². En 2019, une étude menée par Dziawer *et al.* avait pour but d’améliorer l’efficacité thérapeutique du DTX en ciblant les cellules cancéreuses de sein surexprimant le récepteur HER2 par un anticorps appelé le Trastuzumab (Tmab) lié à la surface de NPs. Dziawer *et al.* ont utilisé un système de NPs hybrides lipides-polymères (PLNs) pour encapsuler le DTX. Leur système de vectorisation est constitué : *i*). d’une partie lipidique à base de phosphatidylcholine issue d’œufs (egg-PC) permettant d’augmenter la biocompatibilité de ces NPs hybrides, *ii*). d’une partie polymère à base de poly(acide lactique-co-acide glycolique), PLGA, formant les NPs et permettant l’encapsulation du DTX, et *iii*). d’une autre partie polymère constituée de poly(éthylène-imine), PEI, chargée positivement et localisée en surface des NPs permettant ainsi l’adsorption de l’anticorps Tmab par interactions électrostatiques (Fig. 26) ¹²³.

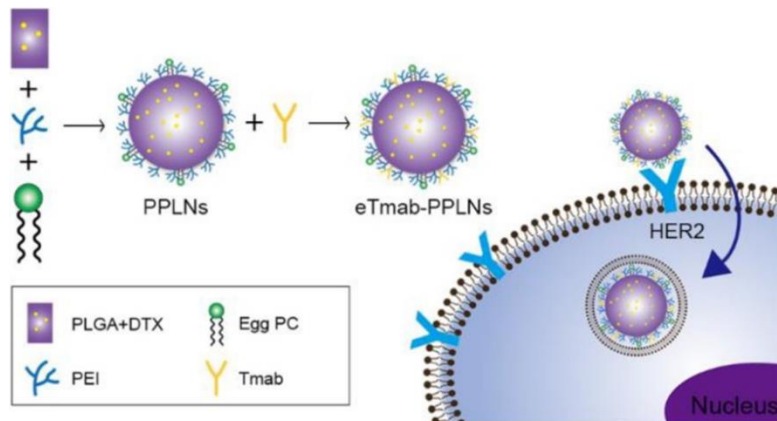


Figure 26 : Illustration schématique des eTmab-PPLNs et leur captation cellulaire. “eTmab-PPLNs” indiquent les NPs (PPLNs) [PLGA/PEI/lipid nanoparticles] conjuguées électrostatiquement au Trastuzumab. PLGA : Poly(D,L-acide lactique-co-acide glycolique). DTX (Docetaxel). PEI: poly(éthylène-imine). Tmab :Trastuzumab. Egg-PC: phosphatidylcholine issue des œufs de poulet ¹²³.

Les résultats obtenus dans cette étude à partir d’expériences menées *in vitro* ont montré que les eTmab-PPLNs préparées sont efficaces dans le transport du DTX au niveau des cellules cancéreuses du sein BT474 sur-exprimant le HER2, efficacité se traduisant par l’inhibition de la prolifération de ces cellules tumorales ¹²³.

1.4.3.3 Ciblage via un stimulus externe

Les systèmes de nanovectorisation sensibles à un stimulus sont des systèmes qui agissent en réponse à des stimulations physiques, chimiques ou biologiques qui déclenchent la libération du principe actif encapsulé dans le nanovecteur en intervenant sur la phase, la structure ou la conformation du nanovecteur. L’avantage de tels systèmes consiste en la libération contrôlée du principe actif dans la zone tumorale, ce qui minimise l’exposition systémique au médicament (Fig. 27) ⁸. Les stimuli peuvent être divisés en deux catégories : des stimuli internes (les conditions patho-chimiques ou patho-physiologiques) et des stimuli externes (stimuli physiques comme la température, la lumière, les ultrasons, et le champ électrique). Les stimuli internes regroupent le changement de pH, du statut redox, de la présence de protéases, de la force de cisaillement, et de la force ionique dans les tissus ciblés ^{143, 144}.

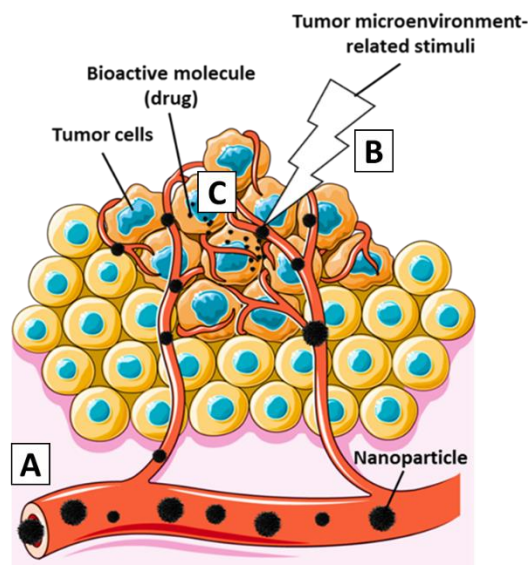


Figure 27 : Ciblage thérapeutique de la tumeur par des systèmes de vectorisation sensibles aux stimuli. A : circulation des nanovecteurs dans le sang. B : en arrivant à la tumeur les nanovecteurs subissent l'effet d'un stimulus lié souvent au microenvironnement tumoral (Hypoxie, acidose, hyperthermie...). C : le stimulus entraîne la dégradation du nanovecteur et donc la libération du médicament encapsulé.

Dans les tumeurs solides, des conditions d'hypoxie sont observées en raison d'une balance perturbée entre la fourniture et la consommation d'O₂ en partie résultant de la croissance tumorale et de l'anomalie de la vascularisation tumorale. L'hypoxie mène à une sur-activation du facteur d'hypoxie 1 (Hypoxia-inducible-factor 1, HIF-1) qui joue un rôle essentiel dans la réponse adaptative à l'hypoxie en modulant plusieurs fonctions cellulaires comme la prolifération, l'apoptose, l'angiogenèse, l'équilibre du pH et la glycolyse anaérobie, activant ainsi la transcription de plusieurs gènes comme le VEGF (vascular endothelial growth factor) et plusieurs autres gènes codants pour des transporteurs de glucose. HIF-1 favorise le changement d'un métabolisme aérobie à un métabolisme anaérobie pour conserver de l'énergie, en activant des transporteurs de glucose et des enzymes glycolytiques, menant à une augmentation de la concentration du taux de l'acide lactique et de l'acidose par la suite (pH extracellulaire, pHe < 6.9). De plus, l'hypoxie et la croissance rapide des cellules cancéreuses produisent un taux élevé d'espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species, ROS) comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Généralement dans les stades primaires de la maladie, l'environnement tumoral est caractérisé par un potentiel de réduction élevé alors que dans les stades terminaux, la tumeur se caractérise par un potentiel de réduction faible et donc un potentiel oxydatif élevé due à la production croissante de ROS¹⁴⁵. Ensemble, l'hypoxie, l'acidose et les ROS favorisent la mutagenèse, les métastases des cellules

cancéreuses, l'angiogenèse et la résistance aux thérapies contribuant à l'échec du traitement (Fig. 28) ¹⁴⁶ .

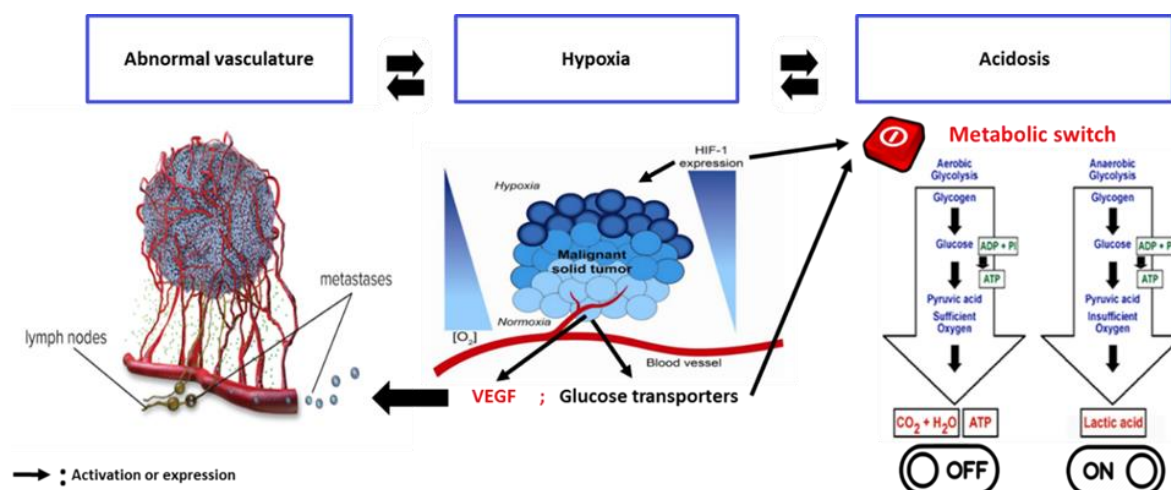


Figure 28 : Caractéristiques du microenvironnement tumoral ¹⁴⁶ ,¹⁴⁷ .

En s'appuyant sur ces caractéristiques, une variété de NPs sensibles au microenvironnement tumoral visant à réduire l'exposition systémique de l'organisme aux médicaments a été élaborée ¹⁴⁸. Hyewon *et al.* (2016) ont réalisé une étude sur des NPs polymères préparées à partir d'un dérivé amphiphile du PEI, dont une fraction est en même temps pH-sensible et charge-convertible, et d'un agent de réticulation sensible à la réduction. Le PEI ramifié constitue le squelette hydrophile du copolymère à bloc amphiphile. Les fonctions amines primaires latérales du PEI sont ensuite utilisées pour greffer : i). l'acide lithocholique (LCA) formant une partie hydrophobe sur le PEI, ii). le succinimidyl 3-(2-pyridyldithiopropionate) (SPDP) servant à réticuler le cœur des NPs via une liaison sensible (ponts disulfures) aux changements des conditions redox, et iii). l'anhydride 2,3-diméthylmaléique (DMA), l'acide carboxylique terminal étant responsable de la conversion de charge des NPs. Les auteurs ont donc synthétisé un copolymère noté *bPEI-LCA-SPDP-DMA* (Fig. 29).

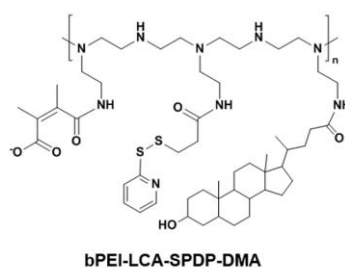


Figure 29 : Illustration de la structure du polymère utilisé pour préparer les CC-NPs

Quand les NPs formées à partir de ce copolymère atteignent la tumeur après administration systémique, leur charge de surface est convertie de négative à positive sous l'effet du pH acide de la matrice extracellulaire tumorale facilitant ainsi leur internalisation par les cellules cancéreuses via des interactions électrostatiques. Après la captation cellulaire, les NPs peuvent libérer sélectivement le principe actif encapsulé dans le cœur réticulé via des ponts disulfures clivables dans le milieu intracellulaire réducteur (Fig. 30) ¹⁴⁹. Ces NPs spécifiques au microenvironnement tumoral pourraient avoir le potentiel de surmonter la résistance aux médicaments ou l'hétérogénéité des tumeurs et peuvent être efficacement internalisées par les cellules cancéreuses dans la matrice extracellulaire tumorale légèrement acide.

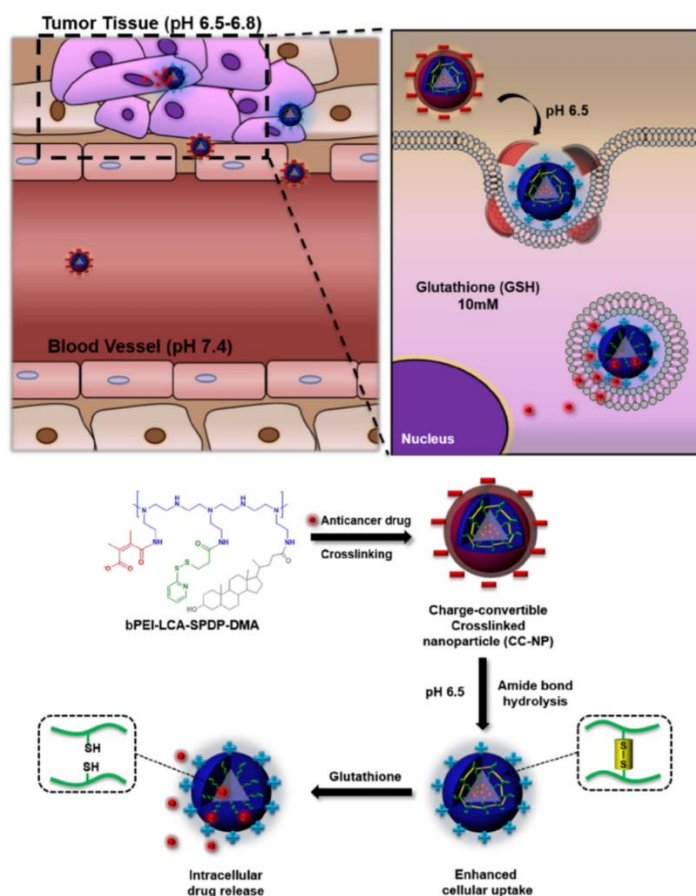


Figure 30 : Illustration schématique de la performance des NPs réticulées et charge-convertibles (CC-NPs) dans la circulation sanguine systémique ¹⁴⁹.

1.4.4 Challenges en nanomédecine

1.4.4.1 Système immunitaire

Injectées par voie intraveineuse, les NPs circulant dans le sang adsorbent une variété de protéines sanguines¹⁰. Ces protéines, également nommées opsonines, forment une couronne protéique adsorbée à leur surface. Ce processus, qui concerne tous les corps étrangers entrant dans la circulation sanguine, est nommé opsonisation. Cette dernière facilite la reconnaissance des NPs par les macrophages du système réticulo-endothélial (reticuloendothelial system, RES). Suite à cette reconnaissance, les macrophages phagocytent et éliminent les NPs (Fig. 31)¹².

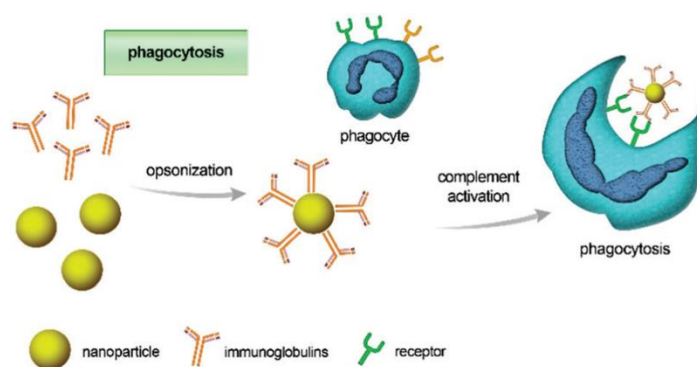


Figure 31 : Illustration schématique de l'opsonisation et de la phagocytose des NPs¹⁵⁰.

Le système RES est formé d'un réseau de cellules immunitaires phagocytaires comme les monocytes, les macrophages, les cellules endothéliales et les cellules dendritiques. La majorité de ces cellules sont résidentes dans des organes lymphoïdes comme la rate, le foie et les ganglions lymphatiques¹⁵¹.

La composition de la couronne protéique change considérablement en quantité et en hétérogénéité, en fonction du temps, des propriétés physicochimiques des NPs et du statut pathologique traité¹⁰. Parmi les protéines sanguines généralement rencontrées dans les couronnes protéiques entourant les NPs, nous avons l'albumine, les apolipoprotéines, les protéines du système complément (C3, C4 et C5) et les immunoglobulines¹⁵². D'autres protéines sériques peuvent aussi être présentes dans la couronne comme la laminine, la fibronectine, la protéine réactive C (C-reactive protein, CRP), le collagène de type 1 et beaucoup d'autres dans des formes plus minoritaires¹⁵³. Par exemple, Vene *et al.* (2016) ont préparé deux lots de NPs à partir de deux copolymères à bloc amphiphiles, les poly(acide β -malique)-*b*-poly(β -hydroxybutyrate), (PMLA-*b*-PHB), et poly(acide β -malique)-*b*-poly(triméthylène carbonate) (PMLA-*b*-

PTMC). Après incubation des NPs présentant à leur surface le même bloc hydrophile, *i.e.* le PMLA, avec du sérum humain pour des durées allant de 5 min à 16 h à 37° C, les protéines des couronnes protéiques formées ont été extraites et évaluées par électrophorèse sur gel suivie d'un immunoblot. Leurs résultats montrent que la taille de la couronne protéique formée augmente en fonction du temps d'incubation des NPs avec le sérum humain. Les protéines identifiées dans cette étude sont les suivantes : l'albumine, la transferrine, le fibrinogène, la protéine C3 du système complément ainsi qu'une variété d'immunoglobulines ¹⁵⁴.

Après la formation de la couronne protéique, les cellules phagocytaires initient le processus de phagocytose en reconnaissant les opsonines de la couronne protéique. Cependant, plusieurs possibilités de phagocytose existent ¹⁵³ :

- Une première possibilité d'attachement a lieu lorsque les opsonines subissent des changements de conformation et passent de protéines inactives présentes dans le sang à des protéines activées dans la couronne pouvant être reconnues par des récepteurs spécifiques présents sur les cellules phagocytaires. En effet, les récepteurs membranaires présents à la surface de ces cellules interagissent avec les opsonines modifiées et ainsi alertent les phagocytes de la présence d'un corps étranger dans le sang. ¹⁵³
- Une deuxième possibilité est une adhérence non-spécifique des phagocytes aux opsonines de la couronne protéique aboutissant ainsi à leur activation et donc une phagocytose des NPs ¹⁵³.
- Enfin, une troisième possibilité est représentée par l'activation du système du complément. Cette activation pourrait avoir lieu via la voie soit classique, alternative ou de la lectine ^{153, 155}. Toutefois quelle que soit la voie concernée, l'activation du système du complément conduit finalement à la phagocytose par les cellules mononuclées du système RES ¹⁵⁶.

Dans le cas des NPs polymères qui ne sont pas détruites par les cellules phagocytaires, une séquestration dans les organes du système RES aura lieu. Si ces NPs ne sont pas biodégradables, elles s'accumulent dans ces organes, notamment dans le foie et la rate, conduisant à une toxicité et à des effets secondaires ^{157, 158}. Les mécanismes de cette toxicité sont détaillés ci-dessous.

1.4.4.2 Nano-toxicité

La toxicité liée aux NPs peut s'exercer au niveau moléculaire, cellulaire ou tissulaire (Fig. 32). En effet, lorsque les NPs se déplacent à travers le corps, elles peuvent être exposées à différents microenvironnements biologiques comme le sang, les matrices extracellulaires, le cytoplasme et les organites cellulaires. Par conséquent, les interactions qui auront lieu à l'interface NPs-bio (NPs-matière biologique) pourraient impacter la fonction des biomolécules, des composants cellulaires et des structures tissulaires ¹⁵⁹. Dans ce qui suit, nous résumons les différents mécanismes de toxicité liés à la présence de certaines NPs.

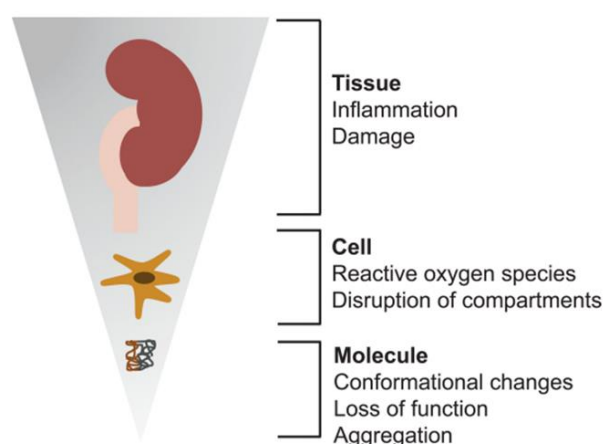


Figure 32 : Illustration schématique des effets toxiques majeurs qui peuvent être induits par un sous-ensemble de NPs. Ces effets peuvent être représentés au niveau moléculaire, cellulaire ou tissulaire ¹⁵⁹.

a- Toxicité au niveau moléculaire

Une fois les NPs entrées dans un fluide biologique, les biomolécules présentes s'adhèrent aux NPs et forment une couronne à leur surface. Ce phénomène déjà décrit dans la littérature a lieu grâce à la grande réactivité des espèces chimiques de surface des NPs ¹⁶⁰.

Ces biomolécules entrées en contact avec les NPs peuvent subir des altérations structurales et fonctionnelles. Il a été démontré que certaines NPs induisent des altérations structurales dans des protéines endogènes comme l'albumine, le cytochrome C, la ribonucléase A et la transferrine ^{161, 162, 163, 164}. Mahmoudi *et al.* ont mené une étude en 2011 sur l'effet de NPs super-paramagnétiques à base d'oxyde de fer (Super-paramagnetic iron oxide nanoparticles, SPIONs) sur la transferrine humaine saturée en fer. La transferrine sérique humaine est composée de deux lobes globulaires similaires

mais non identiques. Chaque lobe (qui abrite un site de liaison du fer III) est divisé en deux domaines consistant en des feuilletts β recouverts d'hélices α . En libérant le fer de la structure de la transferrine (apotransferrine), la conformation compacte est relâchée, plus précisément les deux domaines de chaque lobe vont atteindre une conformation de mâchoire ouverte (open jaw). Dans cette étude, les auteurs ont préparé et caractérisé deux populations de NPs : une population de NPs nues et une autre conjuguée au poly(alcool vinylique), PVA. Ces deux populations possèdent deux tailles différentes. Les NPs ont été ensuite incubées avec de la transferrine humaine saturée en fer. Après incubation, le mélange a été passé sur une colonne de séparation composée d'une matrice sphérique en acier (MACS® columns). Cette colonne a été placée sous un champ magnétique fort, suivi d'un lavage par une solution de chlorure de potassium (KCl) dans le but d'éluer les protéines. La solution de protéines récupérée ayant interagi avec les NPs a été analysée par fluorescence, spectroscopie ultraviolet (UV), électrophorèse sur gel (sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) et par dichroïsme circulaire.

Leurs résultats ont montré que la conformation de la transferrine saturée en fer passe d'une structure compacte et à une conformation plus étalée suite à son interaction avec les SPIONs en raison d'un transfert du fer intégré dans la protéine vers les NPs. Après avoir retiré les SPIONs du mélange transferrine-NPs, la conformation originale des protéines n'est pas rétablie, montrant les changements irréversibles de la conformation de la transferrine après interaction avec les SPIONs. En conclusion, la conformation de la transferrine humaine évolue d'une structure compacte à une structure plus étalée due à la perte de fer qui a lieu après l'interaction avec les NPs ¹⁶⁴.

Un autre aspect important de la toxicité moléculaire des NPs est représenté par l'activation de l'inflammasome. Les inflammasomes comprennent un groupe de complexes multi-protéiques intracellulaires qui peuvent répondre à des stimuli exogènes. Les inflammasomes sont principalement exprimés dans les cellules immunitaires, notamment les cellules dendritiques, les macrophages, les mastocytes et d'autres, mais peuvent être également exprimés dans des cellules non immunitaires comme les fibroblastes et les neurones. Il existe principalement quatre types d'inflammasomes qui incluent les nucleotide-binding oligomerization domaine-leucine rich repeats containing pyrin domain 1, -2 (NLRP1, NLRP3), IPAF et AIM2 (Fig. 33).

Pourtant la recherche sur la nanotoxicité induite par les NPs concerne surtout l'inflammasome NLRP3 ¹⁶⁵.

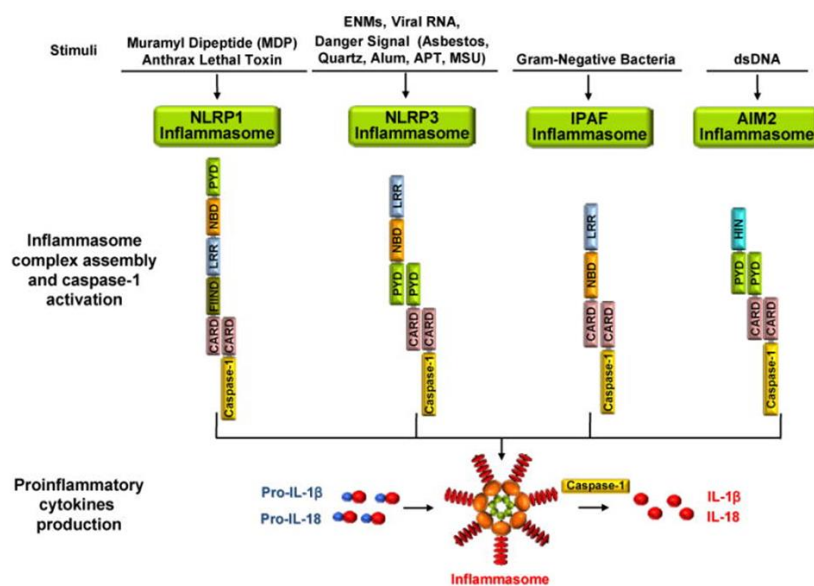


Figure 33 : Le processus d'activation de l'inflammasome ¹⁶⁵.

Les données *in vitro* sur ce sujet montrent que deux signaux sont généralement nécessaires pour activer l'inflammasome NLRP3 ¹⁶⁶. Pour le signal 1, les modèles moléculaires associés aux agents pathogènes (pathogen-associated molecular patterns) [PAMP], tels que les lipopolysaccharides bactériens (LPS) sont reconnus par le récepteur « Toll-like receptor 4 » (TLR4) exprimé sur la membrane cellulaire, ce qui conduit à l'activation du « nuclear factor-kappa B » (NF-κB) via la protéine adaptatrice MyD88, et augmente la production de protéines pro-IL-1β et NLRP3 ¹⁶⁷. Pour le signal 2, lors de l'activation et l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 par divers stimuli, y compris les particules, les fibres et les NPs, le pro-IL-1β est ensuite modifié pour donner IL-1β mature. Cependant pour l'activation de l'inflammasome *in vivo*, il n'est pas clairement établi que le signal 1 soit nécessaire ¹⁶⁸. Après l'activation de l'inflammasome NLRP3, l'IL-1β et l'IL-18 sont sécrétées, ce qui conduit au recrutement d'autres cellules immunitaires dans les tissus affectés et à l'induction de la clairance des NPs. Si la clairance n'est pas réussie, une activation prolongée de l'inflammasome NLRP3 peut entraîner une inflammation et lésions tissulaires subséquentes. Les mécanismes d'activation de l'inflammasome induits par les NPs ne sont pas entièrement compris, cependant d'autres études suggèrent que les propriétés physicochimiques des NPs, y compris la taille et la fonctionnalisation de surface

pourraient jouer un rôle majeur dans l'activation de l'inflammasome NLRP3^{169, 170, 171, 172}.

Dans ce contexte, Morishige *et al.* ont étudié la relation entre la taille des NPs à base de silice (silica NPs) [SPs] ainsi que la fonctionnalisation de leur surface et la production de l'IL1- β conduisant à l'activation de l'inflammasome. Pour ce faire, ces auteurs ont préparé des SPs non modifiées de cinq diamètres différents compris entre 30 et 1 000 nm (nSP 30, nSP 50, nSP 70, nSP300 et mSP1000). Ils ont utilisé une lignée cellulaire monocyttaire humaine appelée THP-1. Les cellules utilisées ont été incubées avec les SPs pendant 24h. Suite à cette incubation, une analyse du taux d'IL1- β dans le surnageant des cellules en culture a été réalisée. Les mSP1000 non modifiées ont induit une production d'IL1- β significativement plus élevée que le témoin PBS, tandis que les SPs de plus petites tailles n'ont induit aucune production d'IL1- β . Ensuite, pour évaluer la corrélation entre la modification de surface et l'effet inflammatoire des SP, ils ont utilisé des mSP1000 modifiées avec divers groupes en surface (non modifiées ou avec ajout de -COOH, -NH₂, -SO₃H ou -CHO). Les temps d'incubations des NPs avec les cellules THP-1 étaient 6 et 24h. Les niveaux de production d'IL1- β ont été examinés. Les mSP1000 non modifiées ont induit une production d'IL1- β beaucoup plus importante que le contrôle à la fois à 6 et 24 h, tandis que les mSP1000 modifiées ont induit des faibles niveaux de production d'IL1- β . *In vivo*, l'injection par voie intrapéritonéale chez des souris C57CL de mSP1000 non modifiées a induit une migration et une infiltration locale par diverses cellules inflammatoires par rapport au contrôle PBS. Les mSP1000 modifiées par les divers groupes mentionnés ci-dessus n'ont pas induit une accumulation plus importante que le contrôle PBS. Ces résultats indiquent qu'une modification de surface appropriée supprime l'effet inflammatoire du mSP1000 non modifiées¹⁶⁹.

b- Toxicité au niveau cellulaire

Un aspect majeur de nano-toxicité est représenté par les lésions des membranes lipidiques des compartiments cellulaires induites directement par les NPs. La perte de l'intégrité de ces membranes pourrait perturber l'homéostasie voire l'intégrité de la cellule¹⁵⁹.

La production de ROS semble être un autre aspect de toxicité induite par les NPs. Ces radicaux libres sont soit formés directement par les NPs en catalysant des réactions

d'oxydation de radicaux libres, soit indirectement en interférant dans les mécanismes de maintien de l'homéostasie cellulaire, en particulier les régulateurs du statut redox ¹⁷³. Les ROS ont la capacité d'endommager l'acide désoxyribonucléique (ADN), les protéines et les lipides cellulaires, endommageant par conséquent des organites cellulaires comme le noyau, les lysosomes et le réticulum endoplasmique ^{159, 174}. Les lésions cellulaires résultantes pourraient conduire à différentes formes de mortalités cellulaires programmées comme l'apoptose, la nécrose ou l'autophagie ¹⁷⁵.

Chen *et al.* (2014) ont étudié la toxicité de NPs à base d'oxyde de zinc (ZnO) sur les cellules endothéliales de la veine de cordon ombilical (HUVEC). Cette étude a conclu que le zinc solubilisé à partir de la surface des NPs exerce une toxicité sur les cellules HUVECs. Ces NPs induisent un stress important au niveau du réticulum endoplasmique. La production de ROS provoquée par les ions Zn^{2+} est responsable de ce genre de stress. Des analyses d'expression de gènes en PCR quantitative ont été menées pour détailler la voie de signalisation activée qui conduit à ce stress. Les résultats obtenus montrent une activation totale de la voie PERK-eIF2R-ATF4-CHOP/GADD34 dans les cellules HUVECs suite aux traitements avec les NPs ZnO. Quand la cellule échoue à neutraliser les effets néfastes de ce stress, elle meurt par apoptose (Fig. 34) ¹⁷⁴.

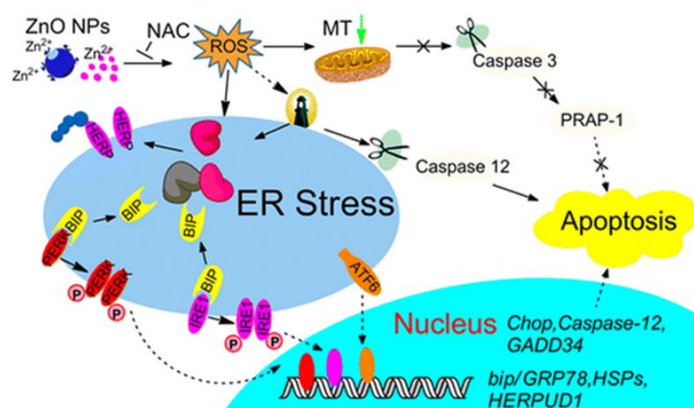


Figure 34 : Représentation schématique de l'influence des NPs ZnO sur l'homéostasie cellulaire et leur activation de la voie de signalisation de stress au niveau du réticulum endoplasmique (endoplasmic reticulum) [ER] ¹⁷⁴.

c- Toxicité au niveau des organes

En général, les organes les plus affectés par les NPs sont ceux qui ont la quantité la plus élevée de NPs accumulées, comme les poumons suite à une administration intratrachéale et dans le foie suite à une injection intraveineuse ¹⁵⁹.

En outre, et suite à une administration intraveineuse, les NPs sont éliminées par les cellules du système de phagocytes hépatobiliaires, rénaux et mononucléaires. Les NPs circulent dans le sang pour atteindre les tissus cibles. Si les NPs ont une taille inférieure à 6 nm, elles peuvent être éliminées via les reins par une clairance rénale quelques heures à quelques jours après l'administration (Fig. 35) ¹⁷⁶.

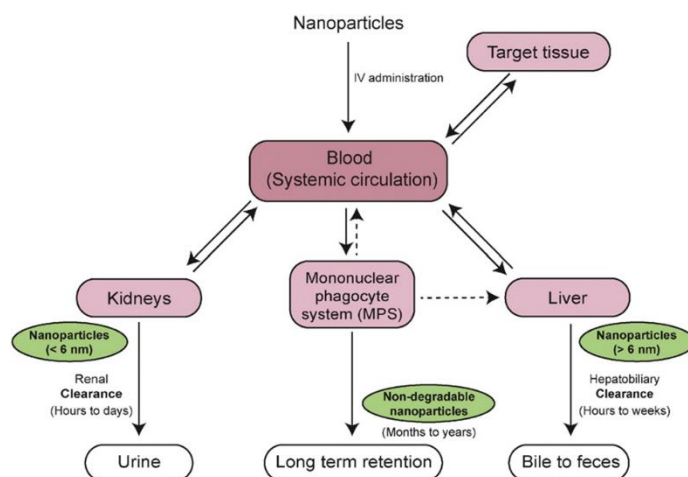


Figure 35 : Schéma des voies de clairance des NPs. Les flèches pleines indiquent les interactions les plus probables, les flèches en pointillés indiquent une interaction possible ¹⁷⁶.

Suite à la phagocytose par les cellules du système RES, il y a deux scénarios possibles, un pour les NPs biodégradables et un autre pour les NPs non biodégradables, par les processus intracellulaires des cellules phagocytaires. Dans le cas des NPs biodégradables, les NPs subissent une dégradation intracellulaire à l'intérieur des cellules MPS après phagocytose, tandis que leurs substituants ayant échappé à ce processus retournent à la circulation sanguine pour une clairance hépatobiliaire ou rénale éventuelle ¹⁷⁶.

En général, la plupart des NPs organiques telles que les liposomes et les NPs à base de polymères biodégradables sont facilement biodégradées par le système RES. Les liposomes peuvent être dégradés par les protéines sériques pendant la circulation sanguine ou par les lipases lorsqu'ils sont endocytés par d'autres cellules ¹⁷⁷.

Par contre, les NPs non biodégradables de grande taille sont plus susceptibles d'être retenues et séquestrées par les cellules du système RES. Quand la cellule phagocytaire saturée en NPs meurt, les NPs sont probablement reprises par d'autres cellules phagocytaires du même organe, résultant en une quantité totale similaire de NPs accumulées dans des clusters au sein d'une population plus petite de cellules dans le

foie, telles que les cellules de Küpffer par exemple ¹⁷⁸. Il a été démontré que cette bioaccumulation de NPs pourrait entraîner des changements importants d'expressions génétiques dans le foie même deux mois après l'administration initiale de NPs ¹⁷⁹. Ces données ont suscité des inquiétudes concernant la toxicité chronique des NPs non (bio)dégradables.

Dans ce contexte, Sureh *et al.* ont étudié la biodistribution et la toxicité des NPs à base d'or (Au-NPs) dans 25 organes après un jour, une semaine, un mois et deux mois d'une seule injection intraveineuse (i.v.) de NPs chez le rat à une dose égale à celle de l'exposition environnementale normale. L'excrétion dans les excréments et l'urine a été également examinée. Cette étude montre que les Au-NPs s'accumulent dans le foie et la rate d'une façon persistante tout au long de la période de deux mois. En parallèle, une accumulation progressive d'Au-NPs dans les reins, les testicules et le sang a eu lieu, avec une réduction de la quantité des Au-NPs dans l'urine, les excréments et les poumons après un mois et deux mois de l'injection. Ceci indique que les Au-NPs étaient inefficacement éliminées du corps par l'urine et les matières fécales et que les Au-NPs pourraient subir une redistribution dans le corps après un mois. Contrairement à l'exposition par inhalation, l'injection i.v a entraîné une accumulation substantielle dans le foie. Ensuite, l'expression d'un ensemble de gènes hépatiques a été évaluée. La plus forte augmentation d'expression a été observée avec le sous-groupe "A" de la famille 1 du cytochrome P450 (CYP450), notamment le polypeptide 1 (CYP1A1). En outre, plusieurs autres membres de la famille des CYP450, y compris les membres CYP4A et CYP3, étaient significativement surexprimés, tandis que l'expression d'un seul membre de cette famille a été sous-exprimée après l'injection d'Au-NPs. Ceci suggère que des gènes/voies métaboliques de détoxification sont induits lorsque les rats sont exposés à des faibles niveaux d'Au-NPs. D'autres gènes hépatiques liés au métabolisme lipidique ont été également altérés par l'exposition aux Au-NPs. Parmi les gènes sous-exprimés dans le foie, il y a ceux impliqués dans les processus du cycle cellulaire comme le complexe Cyclin B1 – Cdk1. Donc, il a été conclu qu'il existe une inhibition des processus du cycle cellulaire et une altération importante de la fonction métabolique du foie après le traitement avec les Au-NPs ¹⁷⁹.

Autrement, d'autres NPs métalliques ont montré une hépatotoxicité importante. Dans ce contexte, des études *in vivo* ont montré que différents types de NPs métalliques ont tendance à s'accumuler dans le foie induisant des effets toxiques considérables ¹⁸⁰.

1.4.4.3 Microenvironnement tumoral

a- L'hétérogénéité tumorale et le "Binding site barrier"

En 1992, Weinstein a défini le concept du 'Binding Site Barrier (BSB)' grâce auquel il a expliqué la distribution non uniforme des anticorps monoclonaux au sein des nodules tumoraux. Il a proposé que la population cellulaire localisée à côté des vaisseaux sanguins et caractérisée par une forte densité d'antigène et une forte affinité de liaison contribue le plus au BSB (Fig. 36) ^{181 182}.

Après administration intraveineuse, l'anticorps (ou le fragment d'anticorps) injecté entre dans la circulation sanguine (Fig. 36A) et circule à travers le corps. Les propriétés de taille et d'adhésion des molécules injectées influencent le ciblage de la tumeur de plusieurs façons (Fig. 36 B). Il est nécessaire que les anticorps extravasent dans la niche tumorale. Généralement, l'effet EPR favorise l'accumulation des molécules relativement larges dans la tumeur. Dans l'interstitium tumoral, les molécules circulent à travers la matrice extracellulaire tumorale pour atteindre les cellules cancéreuses (Fig. 36C). Les molécules de petites tailles diffusent plus rapidement dans la matrice extracellulaire dense. Pour être retenus dans la tumeur, les anticorps doivent avoir une grande affinité pour leurs antigènes cibles exprimés à la surface des cellules cancéreuses (Fig. 36D). Le "Binding Site Barrier" est défini par le fait que des molécules de hautes affinités possèdent un accès limité à la masse tumorale (Fig. 36D).

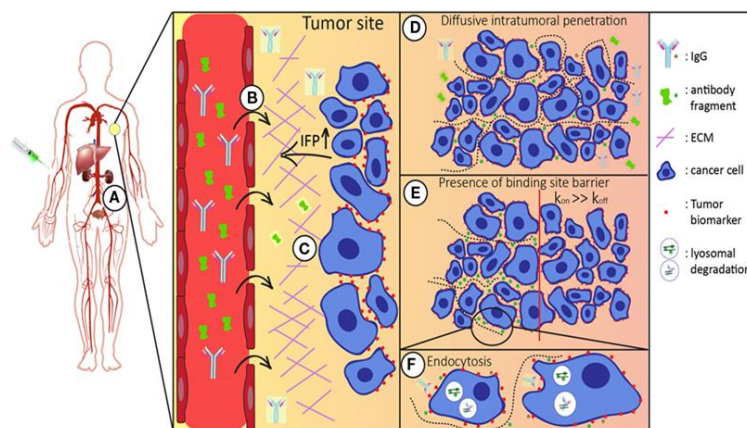


Figure 36 : Représentation schématique du trajet de l'anticorps ou du fragment de l'anticorps après administration ¹⁸³.

Après adhésion aux antigènes cibles, les anticorps sont internalisés par endocytose et dégradés dans les lysosomes. Le catabolisme cellulaire réduit la concentration locale d'anticorps, ce qui constitue la force motrice du transport par diffusion. Le dégagement

systémique des anticorps par le foie et/ou les reins réduit la concentration globale de la molécule administrée dans le corps, affectant ainsi la distribution intra-tumorale (Fig. 36E) ¹⁸³.

Ce même concept peut être appliqué à la distribution intra tumoral des NPs ¹²⁵, dont la captation indésirable par des cellules à proximité des vaisseaux sanguins peut réduire significativement le nombre de NPs disponibles pour l'entrée dans la matrice tumorale ¹⁸⁴. D'une part, des barrières mécaniques comme les jonctions serrées, la matrice extracellulaire (MEC) ou la pression du fluide interstitiel peuvent piéger les NPs non-ciblées du stroma non cellulaire ¹⁸¹. La captation par les composants cellulaires du stroma tumoral en réduit également le nombre ¹⁸⁵. De plus, les vaisseaux sanguins présents dans la tumeur ne permettent pas une bonne extravasation des NPs dans la niche tumorale due à leur dysfonction (Fig. 37) ¹⁸⁶.

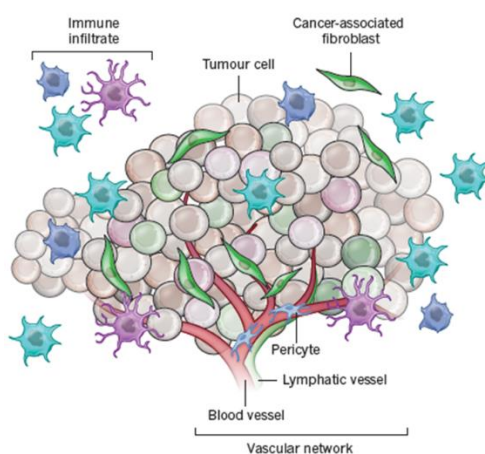


Figure 37 : Représentation schématique de la tumeur et du microenvironnement tumoral ¹⁸⁷.

Par conséquent, la densité des composants de la matrice extracellulaire tumorale, comme le collagène et l'acide hyaluronique, influence l'accumulation des NPs. Ces différents composants forment une barrière empêchant la pénétration des NPs provenant des vaisseaux sanguins dans l'interstitium de la niche tumorale, contribuant ainsi à une distribution inhomogène des médicaments et des nano-vecteurs ¹⁸⁸.

Dans ce contexte, le collagène et sa distribution jouent un rôle crucial dans l'effet BSB. Il a été confirmé que l'accumulation des NPs est limitée dans les tumeurs riches en collagène ¹⁸⁹.

Miao *et al.* ont étudié l'effet des fibroblastes associés à la tumeur sur l'induction de l'effet BSB. Ils ont utilisé des NPs inorganiques à base de phosphate de calcium,

enveloppées par une couche lipidique et des chaînes de PEG, pour étudier leur répartition dans plusieurs modèles tumoraux *in vitro* et *in vivo*. Leur étude a montré que ces NPs sont de préférence captées par les fibroblastes localisés à proximité des vaisseaux sanguins au sein de la tumeur indépendamment de leur taille et de la présence de ligands de ciblage à leur surface, ce qui résulte d'une déplétion des NPs disponibles pour les cellules tumorales ¹⁸⁵.

Dans cette même étude, une seconde caractéristique de l'effet BSB a été mise en évidence. Cette caractéristique est représentée par le nombre de récepteurs présents à la surface des fibroblastes associés au cancer [Cancer associated fibroblasts ou CAF] ¹⁸⁵. Un de ces récepteurs surexprimés dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses est le Sigma R. L'activité métabolique importante des CAFs par rapport aux fibroblastes quiescents entrainerait la surexpression des récepteurs Sigma R à leur surface^{190 191}. Cette surexpression serait due à l'activation des fibroblastes par la cytokine « Transforming Growth Factor Beta » (TGFβ) ¹⁸⁵. D'autres récepteurs, dont l'expression est en corrélation avec l'activité métabolique, existent aussi à la surface des cellules tumorales et sont à l'origine d'une captation non-spécifique des NPs ^{125, 192}.

b- Pression du liquide interstitiel tumoral (PLI)

La circulation du liquide à travers les vaisseaux tumoraux et l'interstitium tumoral ainsi que le drainage du liquide en excès par le réseau de vaisseaux lymphatiques (drainage lymphatique) sont les facteurs qui influencent la pression du liquide interstitiel (PLI) de la tumeur. Les vaisseaux tumoraux poreux permettent l'extravasation d'une quantité excessive de liquide et de molécules plasmatiques dans la niche tumorale. Normalement, ce liquide en excès est drainé par les vaisseaux lymphatiques permettant la maintenance d'un équilibre de la pression interstitiel tissulaire. Pourtant, les tumeurs solides manquent d'un système de drainage lymphatique proprement fonctionnel, ils tendent alors à développer une PLI élevée ¹⁹³.

La PLI élevée ainsi que la pression micro-vasculaire des vaisseaux sanguins tumoraux (PMV) réduite diminuent la pénétration des NPs à l'intérieur de la niche tumorale et notamment leur accumulation dans le centre de la tumeur par les mécanismes décrits ci-après ¹⁹⁴. Tout d'abord, la PLI élevée et la PMV réduite contribuent à la compression des vaisseaux sanguins et lymphatiques, induisant leur effondrement et diminuant donc le transport vasculaires des NPs ¹⁹⁵. De plus, le liquide interstitiel tumoral peut

s'échapper de la périphérie tumorale vers les tissus normaux voisins, transportant, avec les NPs, des facteurs de croissance et/ou des cellules tumorales. Ce phénomène conduit à une réduction du transport trans-vasculaire des NPs^{193, 196}. Au final, la PLI peut forcer les NPs à extravaser par diffusion passive au lieu du transport par convection ce qui minimise surtout le transport interstitiel des grandes NPs¹⁹⁷.

En conclusion, plusieurs facteurs liés au microenvironnement tumoral sont considérés comme barrières contre le transport des NPs dans le cas des tumeurs solides (Fig. 38).

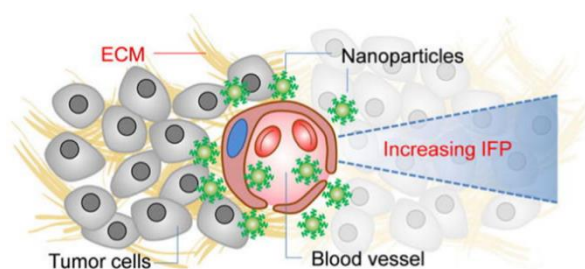


Figure 38 : Illustration schématique représentant l'ensemble des facteurs liés au microenvironnement tumoral qui forme des barrières contre l'entrée des NPs. ECM : Extracellular Matrix. IFP : Interstitial fluid pressure¹⁹⁸.

1.4.5 Cahier de charges

Le processus de vectorisation de principe(s) actif(s) au niveau de tumeurs solides est composé de cinq étapes essentielles, appelées cascade CAPIR : circulation dans le sang, accumulation et pénétration dans la tumeur, internalisation cellulaire et libération intracellulaire du principe actif encapsulé dans le nanovecteur. Par conséquent l'efficacité thérapeutique globale de la nanomédecine administrée est définie par le bon fonctionnement du nanovecteur dans chaque compartiment et à chaque franchissement d'étape (Fig. 39)¹⁹⁹. Pour qu'une nanomédecine soit efficace, elle doit avoir un indice thérapeutique élevé en accomplissant parfaitement les cinq étapes de la cascade CAPIR¹⁹⁹.

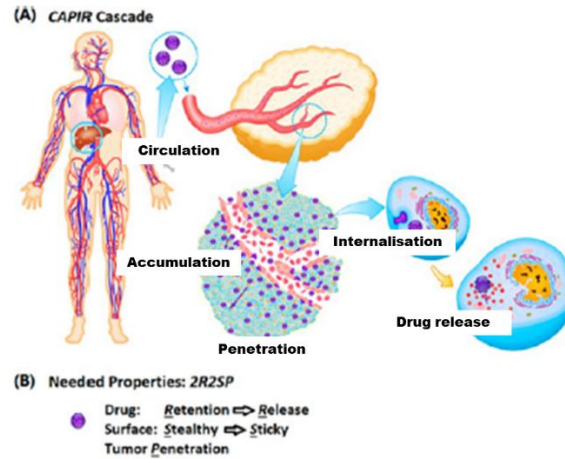


Figure 39 : (A) Les cinq étapes du CAPIR dans la libération ciblée de principe(s) actif(s). (B) Les propriétés requises pour qu'une nanomédecine soit capable d'accomplir les cinq étapes de la cascades CAPIR ¹⁹⁹.

Parallèlement, le nanovecteur doit avoir des propriétés "2R2SP", une abréviation signifiant la libération du principe actif vs sa rétention (2R), la furtivité de la surface vs son adhérence (2S) et la pénétration tumorale (P) ²⁰⁰. L'abréviation "2R" indique les propriétés que doit posséder le nanovecteur en termes d'efficacité d'encapsulation du principe actif. Les NPs doivent retenir la molécule thérapeutique sans libération incontrôlée durant le temps de résidence dans la circulation sanguine, mais avec une libération efficace au niveau de la cible intracellulaire visée pour que le principe actif ainsi libéré puisse effectuer l'action pharmaceutique souhaitée. De même, l'abréviation "2S" reflète les caractéristiques en relation avec la surface des NPs. Ces dernières doivent être furtives dans la circulation sanguine afin de permettre une accumulation passive dans le tissu tumoral, mais adhérentes à proximité des cellules cancéreuses dans le but d'interagir avec elles et être internalisées de façon efficace ²⁰⁰. A côté des propriétés 2R2S, le nanovecteur doit être capable de pénétrer dans le tissu tumoral à travers les vaisseaux sanguins et d'atteindre les cellules tumorales isolées. Par conséquent, seuls les nanovecteurs possédant des propriétés 2R2SP sont capables d'accomplir la cascade CAPIR avec succès et de délivrer le principe actif encapsulé au bon moment et dans le bon endroit pour fournir une efficacité thérapeutique élevée et un pronostic favorable ^{199, 200}.

Par ailleurs et pour accomplir la cascade décrite précédemment, les NPs doivent répondre également à un ensemble de critères d'innocuité. Les NPs devraient être biocompatibles (non toxiques et non-immunogènes, non mutagènes, et non thrombogènes) et/ou biodégradables, bio-fonctionnelles (possèdent des propriétés

mécaniques, physiques, chimiques, thermiques et biologiques adéquates), faciles à utiliser et être préparées sous une forme « stérile » et stockables. Elles doivent aussi être capables d'encapsuler une quantité importante de principes actifs, et permettre une libération prolongée et ciblée des principes actifs, cette libération pouvant être contrôlée par différents stimuli (stimuli internes tels que le pH, les conditions Red/Ox et/ou la température ; stimuli externes tels que les ultrasons et le champ magnétique). Finalement, il est important que ces NPs aient des surfaces furtives dans le but d'échapper au système RES mais aussi d'être capables de traverser les barrières biologiques (Fig. 40) ²⁰¹.

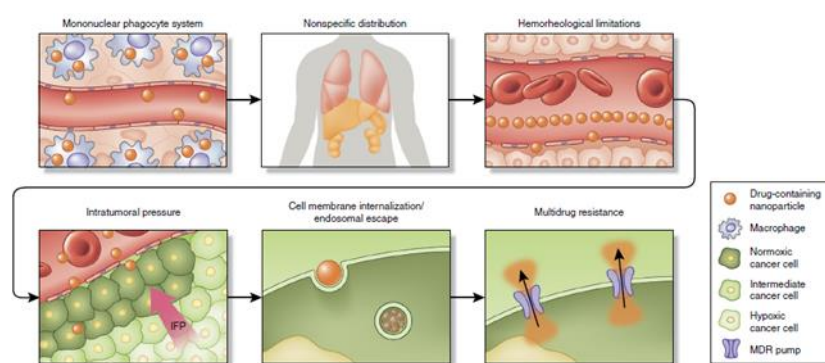


Figure 40 : Ensemble de barrières biologiques limitant le ciblage thérapeutique par les NPs. MDR : Multi-drug resistance ⁵.

Par conséquent, l'élaboration de nanovecteurs efficaces implique la maîtrise des caractéristiques physicochimiques des NPs, comme la taille, les propriétés de surface, la stabilité et beaucoup d'autres. Les NPs doivent avoir des diamètres hydrodynamiques inférieurs à 100 nm leur permettant ainsi d'éviter la clairance rénale garantissant ainsi un temps de circulation important dans le sang. La charge de surface doit être neutre ou légèrement positive pour garantir une bonne internalisation des NPs par la cellule ciblée ¹²⁷. Dans le milieu aqueux, les NPs ayant une surface hydrophobe sont éliminées plus rapidement que celles ayant une surface hydrophile de la circulation sanguine grâce à la plus grande stabilité des NPs hydrophiles dans le sang. La décoration de la surface des NPs par le polymère hydrophile poly(éthylène glycol), PEG, constitue une approche prédominante utilisée pour augmenter le temps de circulation dans le sang et conférer aux NPs, dites PEGylées, des propriétés de furtivité et réduire la toxicité des NPs ²⁰². En effet, le PEG diminue, voire empêche, l'opsonisation des NPs PEGylées en réduisant les liaisons hydrophobes qui peuvent avoir lieu entre les NPs et les protéines sanguines (Fig. 41).

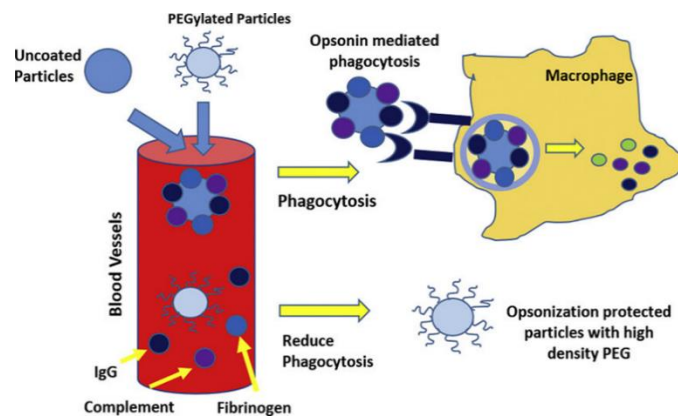


Figure 41 : Illustration schématique de l'effet de l'opsonisation et de son inhibition par le PEG in vivo ²⁰³.

Dans ce contexte, les NPs polymères à base de polymères naturels et/ou de synthèse ont reçu une attention importante de la part des chercheurs en raison de leur stabilité et de la facilité de modification de leurs surfaces et semblent répondre, en partie, aux critères de la cascade CAPIR ^{204, 205}. Toutefois, le concept de NPs idéales pour toutes les applications et les types de pathologies semble être utopique. Tout d'abord, la conception de NPs doit répondre au type de l'application envisagée. Par exemple, les propriétés de fluorescence et de radioactivité de certains métaux offrent un avantage aux NPs métalliques dans le domaine de l'imagerie. Dans le cas de la nanomédecine thérapeutique, les NPs doivent être conçues d'une manière spécifique à chaque type de pathologie traitée. Le critère commun requis pour l'ensemble des applications en thérapie est la biocompatibilité des NPs. Cependant, d'autres critères comme la capacité à traverser les membranes biologiques changent en fonction de la maladie et par suite en fonction du type de barrières biologiques concernées. A titre d'exemple, un critère primordial dans le traitement des maladies neurodégénératives du cerveau est la faculté des NPs à traverser la membrane hémato-encéphalique, par contre les NPs destinées au traitement anticancéreux devraient être capables de s'infiltrer à travers la matrice extracellulaire tumorale pour atteindre les cellules cancéreuses. La captation cellulaire est l'objectif de toute conception de NPs, c'est pour cela les NPs doivent être efficacement internalisées par le type de cellules ciblées dans la pathologie concernée. La conception implique le choix du type des NPs (polymère, lipidiques, métalliques...) mais aussi le choix de leurs caractéristiques physicochimiques (taille, forme, hydrophobicité, fonctionnalisation de surface, etc.). Par exemple, le choix du ligand pour fonctionnaliser la surface des NPs et augmenter leur captation change entre les deux pathologies citées ci-dessus, mais aussi entre les différents types de cancers traités.

Pour toutes ces raisons, de nombreuses équipes interdisciplinaires poursuivent la recherche de nouvelles méthodes de synthèse de matière de base (polymères, lipides, etc.) et de préparation de NPs afin d'accroître la diversité des nanovecteurs et élargir leurs champs d'applications.

1.5 Le poly(acide malique), PMLA, et ses dérivés

La chimiothérapie conventionnelle des cancers, en particulier des tumeurs solides, repose sur l'utilisation d'agents cytotoxiques ciblant les cellules tumorales à fort potentiel prolifératif. Cependant, ces traitements bien qu'efficaces contre les cellules tumorales entraînent des toxicités contre des tissus sains. Depuis de nombreuses années, les chercheurs tentent de développer des traitements de plus en plus spécifiques, dans le but d'améliorer l'effet thérapeutique des médicaments tout en diminuant les doses administrées et les effets secondaires ainsi que de simplifier les protocoles d'administration. Cette quête est basée sur le concept du « Magic Bullet » de Paul Ehrlich²⁰⁶ qui a inspiré une génération de scientifiques dans la conception de thérapies anti-cancéreuses plus spécifiques de la tumeur. Depuis la fin du XXe siècle, des progrès importants ont été réalisés dans la conception de tels traitements sur deux grands axes de recherche : *i*). la conception de thérapies ciblées basées sur l'identification de nouveaux médicaments ciblant une altération moléculaire spécifique de la tumeur, et *ii*). la préparation de nanovecteurs capables de véhiculer des médicaments vers le site tumoral dont certains ont déjà reçu l'approbation de la « Food and Drug Administration » (FDA) ou qui sont en phase préclinique ou clinique^{207, 208, 209, 210, 211, 212}.

Dans ce contexte, la combinaison des nanotechnologies et de la science des polymères devrait conduire à l'obtention de nanoplateformes présentant les propriétés requises pour une vectorisation ciblée efficace de ces nanomédicaments. Cependant, un élément primordial dans la conception des nanovecteurs consiste à définir un cahier des charges très strict auquel les nanoplateformes développées, quelle que soit leur forme, doivent répondre, notamment lorsqu'elles sont conçues pour des usages thérapeutiques. Les nanoplateformes doivent : *i*). être biocompatibles (c.-à-d. non toxiques, non immunogènes, non mutagènes et non thrombogènes) et/ou (bio)dégradables; *ii*). être bio-fonctionnelles (c.-à-d. posséder des propriétés mécaniques, physiques, chimiques, thermiques et biologiques adéquates), être facilement utilisables, être stérilisables,

pouvant être stockées et obtenir l'approbation des administrations régissant la mise sur le marché des médicaments; *iii*). permettre l'encapsulation et/ou le greffage de grandes quantités de principes actifs, *iv*). conduire à une libération durable des principes actifs pouvant être contrôlée par des stimuli internes (variations du pH, du taux de glutathion qui est un réducteur de ponts disulfures, la présence d'hydrolases responsables du clivage de sites spécifiques, etc.) ou en réponse à des stimuli externes (ultrasons, champ magnétique, température, etc.), *v*). avoir une surface contrôlée (furtive) afin de diminuer, voire éviter, la reconnaissance par le système réticulo-endothélial (système phagocytaire mononucléaire), avoir la capacité de franchir les barrières biologiques et de délivrer aux tissus, cellules ou organes sélectionnés les principes actifs grâce à la présence d'une molécule de ciblage (anticorps, peptide, vitamine, etc.)^{201, 213, 214}.

Une nanoplateforme peut être définie comme un support à base de nanomatériaux pour administrer de petites molécules, des gènes et des peptides *in vivo*²¹⁵. Les nanoplateformes ont une gamme de tailles allant de 10 à 200 nm et peuvent être sous forme de polymères, de liposomes et de micelles. Pour préparer de telles nanoplateformes sous forme de nanoconjugués ou de micelles, plusieurs polymères stables ou (bio)dégradables ont été développés avec des structures de plus en plus complexes grâce aux progrès de la science des polymères et de la médecine^{201, 213, 216, 217}. Alors que les progrès de la science des polymères permettent la synthèse de matériaux macromoléculaires complexes dont la structure et les propriétés sont adaptées aux applications sélectionnées, la meilleure connaissance des cancers a permis : *i*). l'identification de récepteurs spécifiques pour lesquels des molécules de ciblage peuvent être greffées sur les polymères pour conférer des propriétés de ciblage aux nanoplateformes, et *ii*). une meilleure compréhension de leurs mécanismes de développement permettant la sélection des nanoplateformes les mieux adaptées.

Suite aux premiers travaux réalisés par Ringsdorf, Duncan et Kopecek, qui ont conçu les premiers nanoconjugués préparés à partir de conjugué N-(2-hydroxypropyl)métacrylamide (HPMA)-doxorubicine, entrés en phase I/II en 1994^{218, 219, 220} et par Kataoka *et al.*^{219, 221, 222, 223, 224, 225} et Kabanov *et al.*^{219, 226, 227, 228, 229}, qui ont conçu les premières micelles à base de copolymères à blocs amphiphiles entrées en phase I/II d'essais cliniques dans les années 1990²¹⁹, de nombreuses nanoplateformes ont été et continuent d'être développées dans le même but de trouver un nanovecteur idéal qui puisse conduire à la meilleure réponse thérapeutique à une maladie donnée^{212, 215, 219, 111}.

Dans ce contexte, plusieurs matériaux macromoléculaires biostables ou biodégradables ont été et continuent d'être développés afin d'obtenir des (co)polymères portant diverses fonctionnalités, tels que des principes actifs ou des groupes fonctionnels permettant le greffage de principes actifs, des molécules de ciblage ou encore des groupes sensibles aux stimuli qui peuvent être transférés aux nanoplateformes ^{212, 219, 111}.

Le poly (acide β -malique), PMLA, (Fig. 42) trouve une place de choix parmi les (co)polymères développés dans le sens où ce polyester est dégradé par hydrolyse ou par voie enzymatique (estérases) en acide malique, une molécule de faible masse molaire non toxique faisant partie des cycles métaboliques naturels (Cycle de Krebs).

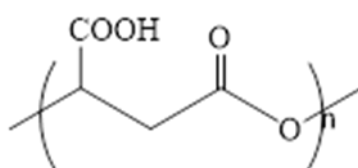


Figure 42 : Structure du PMLA.

La dégradabilité du PMLA résulte de la présence de liaisons esters clivables dans le squelette macromoléculaire de ce polymère, alors que le PMLA est facilement modifiable grâce à la présence de fonctions acides carboxyliques latérales ²³⁰. Grâce à la maîtrise de la synthèse des monomères (Fig. 43) et de leur homopolymérisation et copolymérisation, une grande famille de dérivés du PMLA peut être obtenue, chacun des dérivés ayant des propriétés physico-chimiques et biologiques pouvant être ajustées par la nature des unités de répétitions formant les (co)polymères résultants et de l'amorceur ^{231, 232, 233, 67}.

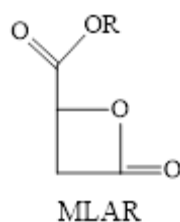


Figure 43 : Structure des alkylmalolactonate

En plus des dérivés du PMLA préparés par synthèse chimique, un PMLA naturel est obtenu à partir du surnageant des cultures de *Physarum polycephalum* ²³⁴. Il a été démontré que la structure de ce PMLA naturel était identique à celle du PMLA synthétisé par polymérisation anionique par ouverture de cycle (aROP) du malolactonate de benzyle (MLABe) et montrée par la figure 42 ^{67, 234, 235}. Tout comme

pour le PMLA de synthèse, les propriétés physico-chimiques et biologiques du PMLA naturel sont ajustables par des modifications chimiques des fonctions acides carboxyliques latérales^{67, 236, 237, 238}.

Le PMLA est comparable de façon avantageuse aux autres nanoplateformes en raison de la présence de nombreuses fonctions acides carboxyliques latérales, de la forte homogénéité chimique et optique du PMLA naturel et du potentiel élevé de sa synthèse chimique. Enfin, grâce à la présence de multiples groupes fonctionnels, les nanoplateformes à base de PMLA offrent une diversité structurelle et fonctionnelle soit sous la forme de conjugués macromoléculaires linéaires ou ramifiés, soit sous forme de nanoparticules encapsulant des principes actifs.

- PMLA et dérivés en tant que « prodrogue » macromoléculaire

En 1975, Ringsdorf a défini, pour la première fois, un modèle type d'une « prodrogue » macromoléculaire constituée par un (co)polymère, biostable ou biodégradable et soluble dans les milieux aqueux, sur lequel plusieurs groupes fonctionnels peuvent être introduits (Fig. 44).

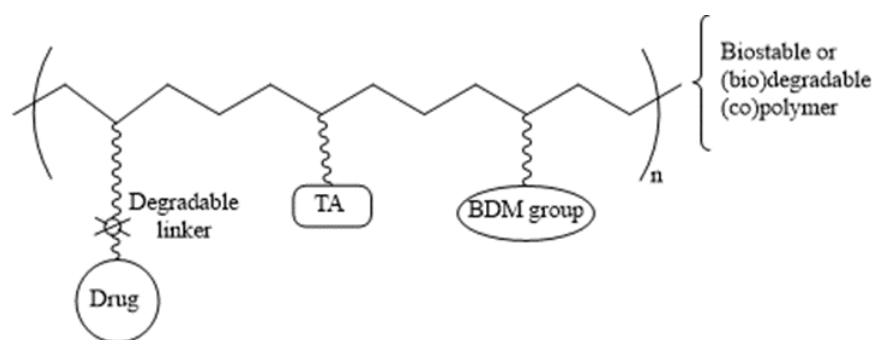


Figure 44: Structure du modèle de « prodrogue » macromoléculaire de Ringsdorf²¹⁹.

Ces groupes sont des molécules biologiquement actives (principes actifs) liées au squelette via une liaison biodégradable, un agent de ciblage (targeting agent, TA) et un modulateur de distribution (body distribution modulator, BDM)²¹⁹.

Le (co)polymère constituant le squelette doit être soluble dans les milieux aqueux, non immunogène et excrétable ou biodégradable après avoir libéré le principe actif au site d'action. La liaison entre le principe actif et le squelette du (co)polymère doit être stable dans la circulation mais dégradabile de façon contrôlée au niveau de la cible. La formulation entière doit être stable pour pouvoir être développée commercialement²¹⁹,

239

Dans ce contexte, les nanoconjugués polymère-principes actifs à base de PMLA pourraient offrir une solution élégante pour répondre aux critères donnés ci-dessus. En effet, ce polymère est connu pour être dégradé en acide malique non toxique avec une vitesse de dégradation qui peut être modulée par le degré de substitution chimique au niveau des groupes acides carboxyliques latéraux. De plus, ces fonctions acides carboxyliques latérales peuvent être modifiées chimiquement de façon relativement simple permettant ainsi l'introduction d'un large éventail de groupes biologiquement actifs (principes actifs, agent de ciblage, etc.).

Dans ce contexte, les nanoconjugués nommés Polycefin™ sont préparés par des modifications chimiques du PMLA naturel extrait de *Physarum polycephalum* : après purifications, le PMLA extrait et fractionné en taille a une masse molaire comprise entre 50 000 et 100 000 g/mol avec une dispersité de 1,3^{67, 236, 238, 240}. Grâce à la présence des fonctions acides carboxyliques latérales, Ljubimova *et al.* ont développé des méthodes pour contrôler finement le couplage chimique de diverses molécules d'intérêt sur le squelette du PMLA: principes actifs anticancéreux (doxorubicine, témozolomide hydrazide (TMZH), oligonucléotides antisens (AON)), le PEG (furtivité), des agents de liaison clivables et sensibles à un stimulus pour la libération des principes actifs, des molécules hydrophobes pour assurer le passage des nanoplateformes des endosomes dans le cytoplasme, des agents de ciblage (anticorps monoclonaux), et, éventuellement, des sondes de fluorescence (Alexa Fluor 680). La structure générale de Polycefin™ est illustrée par la figure 45^{67, 236, 237, 238}.

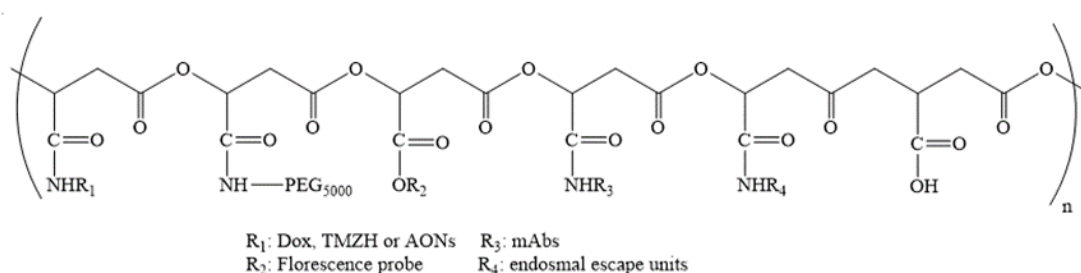


Figure 45: Structure des Polycefin™.

Les résultats concernant l'utilisation des Polycefin™ pour traiter les cancers du cerveau et du sein sont très prometteurs. Parmi ces nanoplateformes, des variantes pour la détection et le traitement par IRM des glioblastomes multiformes et des cancers du sein humains HER2 positifs et triples négatifs et leurs métastases dans le cerveau ont été également préparés^{240, 241}. En effet, il a été montré que ces nanoplateformes

n'induisaient pas de réponses toxiques et immunogènes détectables *in vivo* et qu'elles permettaient une inhibition significative de la croissance tumorale (cerveau et sein) *in vivo*^{67, 236, 237, 238}. De telles nanoplateformes sont actuellement incluses dans des essais cliniques. En raison du potentiel de ces Polycefin™, une société, Arrogene Inc. détient une licence exclusive. En effet, les chercheurs de cette société proposent qu'une telle nanoplateforme peut être considérée comme un excellent moyen d'administration et de ciblage de principes actifs pour les thérapies et les diagnostics de cancers sur la base des résultats des études précliniques menées au centre médical du Cedars-Sinai. Après avoir greffé plusieurs anticorps de ciblage par chaîne polymère, il a été démontré, par fluorescence et microscopie confocale, que les oligonucléotides antisens de type morpholino pouvaient être vectorisés au niveau des sites visés après avoir traversé avec succès plusieurs barrières telles que la barrière hémato-encéphalique et la membrane des cellules tumorales. De plus, les Polycefin™ ont la capacité de vectoriser simultanément différents principes actifs conduisant ainsi à une nanoplateforme spécifique d'une tumeur particulière et, potentiellement, adaptée à un patient en particulier (nanomédecine personnalisée). De plus, comme les résultats obtenus à partir de tests *in vivo* ont montré l'efficacité des Polycefin™ contre plus d'un type de cancer (sein et cerveau), ces nanoplateformes peuvent avoir une application contre plusieurs types de cancer à des fins thérapeutiques et diagnostiques.

Outre l'utilisation de PMLA naturel comme matériau de base pour la construction de nanoplateformes multifonctionnelles, des dérivés de synthèse du PMLA ont été également élaborés pour répondre au cahier des charges des nanoplateformes à visée thérapeutique.

Dans ce contexte, Chan-Park *et al.* ont synthétisé et caractérisé un méthacrylate de 2-hydroxyléthyle (HEMA) greffé sur du poly(ϵ -caprolactone-*co*-RS-acide β -malique) dans le but de préparer un polyester biodégradable fonctionnalisé et photo-modelable pour des applications en tant que micro-supports d'ingénierie tissulaire²⁴². Ces auteurs ont conclu que leur copolymère liquide possédait les propriétés requises pour le micro-marquage UV, une technique de micro-modelage liquide²⁴². Cependant, à ce jour, aucun essai *in vitro* ou *in vivo* n'a été reporté. Ces mêmes chercheurs ont également préparé et caractérisé un hydrogel biodégradable à base de dérivés de PMLA pour l'administration de principes actifs²⁴³. Un copolymère à bloc PMLA-*b*-PEG-*b*-PMLA a été obtenu après hydrogénéolyse catalytique du copolymère PMLA-*b*-PEG-*b*-

PMLABe, lui-même synthétisé par polymérisation du MLABe en présence de PEG. Le PMLA-*b*-PEG-*b*-PMLA a ensuite été modifié par addition de groupes méthacrylate aux deux extrémités de chaîne (PEGMLAAc). Ces auteurs ont mélangé de l'O-carboxychitosane méthacrylé (OCMCS), du PEGMLAAc et du PEG diacrylate (PEGDAc) dans diverses proportions dans l'eau. Ces solutions ont formé des hydrogels après photopolymérisation de groupements acrylates ²⁴³. Le peptide Arg-Gly-Asp (RGD) a été greffé sur les fonctions acides carboxyliques latérales des blocs PMLA. Ces hydrogels ont été utilisés comme matrice de culture pour les cellules des muscles lisses (SMC) qui ont grandi au fil du temps sans toxicité apparente. Ces hydrogels sont dégradables avec une libération modérée d'acide malique à pH physiologique. Par conséquent, ces hydrogels à base de PMLA pourraient être considérés comme un support prometteur pour la culture et la prolifération cellulaire à long terme ²⁴³.

Dans la conception de matériaux biodégradables pour l'ingénierie tissulaire, des copolymères poly(acide lactide-*co*-acide malique) ont été synthétisés par polymérisation anionique par ouverture de cycle du lactide (énantiomère L ou DL) et du RS-MLABe ^{244 245, 246, 247, 248, 249, 250}. Les auteurs ont étudié les propriétés de ces copolymères biodégradables en termes de taux de dégradation, de propriétés thermiques et de morphologie des copolymères à blocs. Tous ces paramètres variaient selon la composition du copolymère et la température de synthèse ^{244 245}. Les différents copolymères synthétisés ont ensuite été évalués pour la colonisation et la biocompatibilité des cellules ainsi que pour l'ingénierie tissulaire ^{246, 247, 248, 249, 250}. He *et al.* ont testé l'adhésion cellulaire sur des films préparés à partir de poly(acide L-lactide-*co*-acide malique) en utilisant des fibroblastes de souris 3T3. Leur étude a démontré que ces fibroblastes se développaient correctement à la fois à la surface et à l'intérieur des supports macromoléculaires ²⁴⁸. Dans le but de concevoir des matrices biocompatibles pour la culture cellulaire, des chercheurs ont également évalué le potentiel du poly(acide L-lactide-*co*-acide malique) amorphe, greffé ou non avec du peptide RGD, pour la culture de cellules musculaires lisses primaires d'artère ombilicale ²⁴⁷. La viabilité cellulaire a été améliorée et leur prolifération et migration se sont révélées meilleures sur les films de poly(acide L-lactide-*co*-acide malique), avec ou sans peptide RGD, que sur les films préparés à partir de PLA ²⁴⁷. Les poly(acide L-lactide-*co*-acide malique) permettent également la culture de ces cellules musculaires, ce qui conduit les auteurs à conclure que leurs copolymères fonctionnalisés pourraient être intéressants pour l'ingénierie des tissus vasculaires ²⁴⁸.

Quelques années plus tard, une autre équipe de recherche a évalué l'utilisation de films à base de poly(acide L-lactide-co-acide malique) sur lesquels ont été greffés soit des bras hydroxyle ou carboxyle longs ²⁵⁰ ou le peptide Gly-Arg-Gly-Asp-Ser (GRGDS) ²⁴⁹ pour l'ingénierie des tissus vasculaires. À la recherche d'un matériau biocompatible idéal pour l'ingénierie des vaisseaux, Wang *et al.* ont synthétisé un copolymère à base de PMLA avec des bras carboxyles étendus pour améliorer l'adhésion des cellules endothéliales et l'hémocompatibilité ²⁵⁰. Ils ont comparé les propriétés de ce nouveau copolymère aux copolymères à base de PMLA avec des bras hydroxyles et du PLA en termes de taux de dégradation, d'absorption d'eau, de morphologies de surface, d'adhésion plaquettaire, d'hémocompatibilités et d'attachement et de prolifération des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVEC) ²⁵⁰. Les résultats de leurs études ont montré que les taux de dégradation du poly(acide lactide-co-acide malique) avec des bras hydroxyles latéraux (PMLA-HE) et du poly(acide lactide-co-acide malique) avec des bras carboxyles étendus (PMLA-ECA) étaient similaires avec des taux de dégradation lents au cours du premier mois, s'accéléralent ensuite. Les temps de coagulation intrinsèque et extrinsèque représentant l'hémocompatibilité n'ont pas été influencés par la présence des deux copolymères. Le PMLA-ECA a cependant réduit de manière significative l'adhésion des plaquettes sanguines sans les activer tout en permettant la meilleure fixation et prolifération des HUVEC ²⁵⁰.

Enfin, Wang *et al.* ont évalué la compatibilité sanguine du poly(acide L-lactide-co-acide malique) sur lequel le peptide GRGDS a été greffé ²⁴⁹. Ces auteurs ont montré que ce copolymère, contenant 9% d'unités d'acide malique et 2,9% en moles de peptide GRGDS greffés sur les fonctions acides carboxyliques latérales du PMLA, : *i*). possède une hydrophilie assez élevée; *ii*). n'active pas les voies de coagulation intrinsèque et extrinsèque; *iii*). diminue de manière significative l'adhésion et l'activation des plaquettes sanguines; *iv*). favorise l'adhésion et la prolifération des HUVEC ²⁴⁹. Des tests de coagulation et d'adhésion plaquettaire ont également été étudiés sur les HUVEC placés sur les copolymères démontrant qu'aucune différence n'était observée avant et après ensemencement cellulaire. Les auteurs ont conclu que les cellules cultivées sur leurs films présentaient une bonne anti-thrombogénicité et que ces films biodégradables pouvaient être intéressants pour l'ingénierie des tissus vasculaires ²⁴⁹.

Enfin, la copolymérisation par ouverture anionique de cycle de trois β -lactones β substituées différentes, spécifiquement sélectionnées, a conduit à la synthèse d'un ter-polymère qui pourrait favoriser la cicatrisation des plaies (Fig. 46) ^{251, 28, 232, 49, 253}.

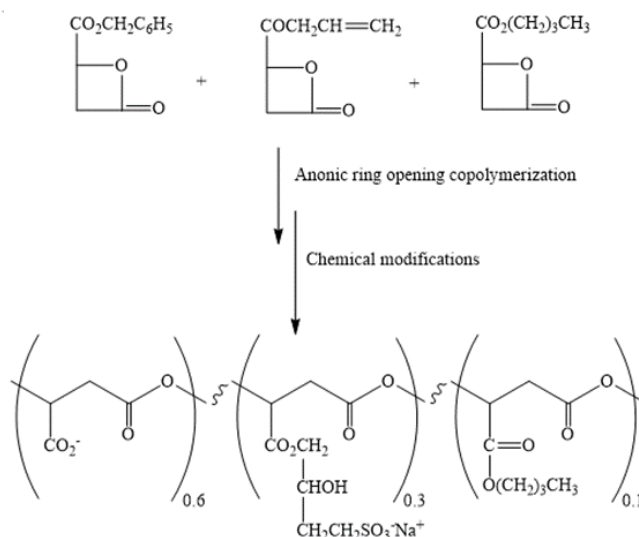


Figure 46 : Structure de la nanoplateforme de synthèse ayant des propriétés facteurs de croissance des fibroblastes ^{231, 232, 253}.

Grâce à la polyvalence et au contrôle de la synthèse à la fois des monomères et des polymères, un ter-polymère bien défini a été obtenu. Ce dernier a été synthétisé pour mimer l'héparane-sulfate et se lier et stabiliser le facteur de croissance des fibroblastes. Des essais *in vitro* ont démontré que cette nanoplateforme stabilisait et protégeait effectivement le facteur de croissance des fibroblastes, et des expériences *in vivo* ont indiqué une amélioration de la régénération musculaire ^{231, 232, 253}.

Plus récemment, les fonctions acides carboxyliques latérales d'un PMLA de synthèse ont été modifiées et ont servi pour greffer, avec succès, un PEG, de la doxorubicine (Dox) et de la galactosamine en tant qu'agent de ciblage des cellules d'hépatome ²⁵². Les premiers résultats des essais *in vitro* sur les lignées cellulaires d'hépatome HepaRG ont mis en évidence que ce nanoconjugué permettait de réduire significativement la viabilité des cellules HepaRG ²⁵².

Ces données intéressantes mettent en évidence le potentiel des dérivés naturels et de synthèse du PMLA en tant que nanoplateformes pour des applications dans le domaine biomédical. La polyvalence structurelle et biologique, le contrôle des réactions de synthèse des monomères, des polymères et des conditions de modifications, la multifonctionnalité, la biodégradabilité, la non-toxicité et la non-immunogénicité

mettent en avant le fort potentiel thérapeutique de ces nanoconjugués à base de PMLA naturel et de synthèse.

- PMLA et dérivés sous la forme de nanoparticules

Une autre stratégie pour vectoriser des principes actifs au niveau de leur site d'action consiste en leur encapsulation dans des nanovecteurs polymères (micelles et nanoparticules). Les micelles (assemblage de type cœur/couronne) sont généralement formées par l'autoassemblage de copolymères amphiphiles alors que les nanoparticules sont préparées par la dispersion forcée de polymères hydrophobes dans des milieux aqueux. L'organisation spontanée de ces matériaux macromoléculaires implique des interactions non covalentes^{254, 255}. Par ailleurs et comme le montre la figure 47, des principes actifs hydrophobes peuvent être encapsulés dans le cœur des NPs et des micelles soit par des interactions hydrophobes (encapsulation physique), soit par des liaisons covalentes entre les principes actifs et le polymère (encapsulation chimique). L'encapsulation offre une protection efficace contre la dégradation et la libération prématurée du principe actif dans la circulation sanguine et une augmentation de la biodisponibilité du médicament au niveau du site tumoral (Fig. 47)²⁵⁶.

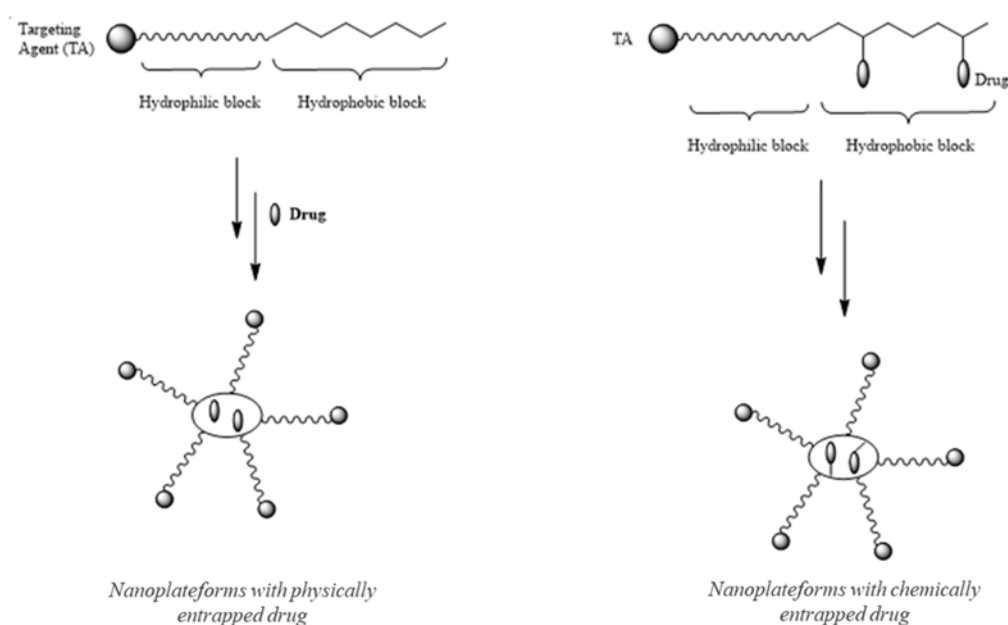


Figure 47 : Structure cœur/couronne des nanoplateformes.

Dans le domaine de l'administration de principes actifs encapsulés dans des micelles macromoléculaires, deux groupes de chercheurs ont été les pionniers dans le développement de tels systèmes de vectorisation : *i*). Kataoka *et al.* ont développé des NPs de type cœur/couronne à base de copolymères di-blocs amphiphiles formés d'un

bloc hydrophile de PEG et d'un bloc hydrophobe constitué poly(acides aminés) sur lesquels un principe actif hydrophobe a été greffé, comme par exemple la doxorubicine ^{221, 222, 223, 224, 225, 257}, et *ii*). Kabanov *et al.* ont élaboré des nanovecteurs à base de copolymères à blocs poly(oxyde d'éthylène)-*b*-poly(oxyde de propylène), plus connus sous le nom de Pluronic® ^{226, 227, 228, 229}.

La mise au point de méthodes de synthèse chimiques de polyhydroxyalcanoates ou PHAs, polymères biodégradables pouvant être également synthétisés par des microorganismes placés en conditions de stress, a marqué le début d'une nouvelle classe de nanovecteurs très prometteurs pour la vectorisation ciblée et la libération contrôlée de principes actifs. L'un de ces PHAs, le poly(acide lactique-*co*-acide glycolique), PLGA (Fig. 48), est un polymère (bio)dégradable largement utilisé pour des applications dans le domaine biomédical.

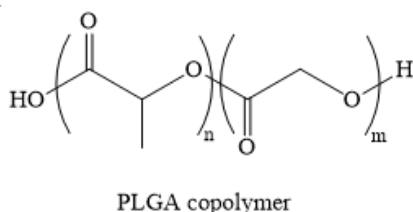


Figure 48 : Structure of PLGA.

Ce copolymère, dégradé en acides lactique et glycolique, est approuvé à la fois par la FDA et l'Agence Européenne du Médicament (EMA) pour des applications chez l'Homme ²¹⁵. Par conséquent, les copolymères PLGA ont été utilisés par les chercheurs pour la formulation de nanovecteurs capables d'encapsuler divers principes actifs de faibles masses molaires, de préférence hydrophobes, comme le Paclitaxel ²¹⁵. Malgré des résultats encourageants obtenus pour le traitement du cancer dans des essais précliniques, il a été démontré que de tels nanovecteurs à base de PLGA étaient rapidement reconnus par le système réticuloendothélial et ainsi éliminés de l'organisme en raison de leurs surfaces hydrophobes ²¹⁵. Une solution a été trouvée en greffant des chaînes PEG hydrophiles à la surface des nanoparticules PLGA ou en utilisant des copolymères à blocs amphiphiles. Par ailleurs, les copolymères PLGA manquent de groupes chimiquement fonctionnalisables le long de la chaîne polymère ne permettant pas le greffage de molécules biologiquement actives. Par conséquent, le choix de la famille du PMLA a offert une solution aux inconvénients mentionnés ci-dessus grâce à la présence des fonctions acides carboxyliques latérales.

Dans ce contexte, des dérivés hydrophobes du PMLA naturel ont permis de formuler des NPs similaires à celles préparées à partir du PLA et/ou du PGLA⁶⁷. Pour ce faire, le PMLA naturel a été chimiquement modifié avec différents alcools ou avec des acides aminés ayant des chaînes latérales hydrophobes donnant ainsi accès à des copolymères permettant la formulation de NPs capables de vectoriser et libérer un principe actif encapsulé dans leur cœur hydrophobe. Cependant, les résultats ont montré que les NPs à base de PMLA dont les fonctions acides carboxyliques latérales avaient été méthylées induisaient des effets toxiques en raison de la libération de méthanol lors de la dégradation du polymère²⁵⁸. Par conséquent, d'autres groupes hydrophobes ayant une toxicité négligeable dans la plage de concentration utilisée pour un traitement *in vivo*, tels que les esters d'acides aminés hydrophobes ou des peptides, ont été utilisés. La toxicité de ces NPs a été efficacement diminuée et les principes actifs anticancéreux comme le doxorubicine (DOX) et le témozolomide (TMZH) ont été encapsulés avec succès²⁵⁹.

Toutefois, la modification chimique du PMLA naturel ne permet pas une préparation simple de copolymères à blocs amphiphiles nécessaires à la préparation de micelles macromoléculaires.

Par conséquent, la synthèse de dérivés du PMLA par (co)polymérisation anionique par ouverture de cycle de β -lactones β -substituées fonctionnelles à l'aide d'amorceurs eux aussi fonctionnalisés offre un moyen de préparer soit des homopolymères hydrophobes, soit des copolymères à bloc amphiphiles permettant la formulation de NPs et de micelles fonctionnelles, respectivement.

Dans ce domaine, Stolnik *et al.* ont publié les premiers résultats sur la préparation et la caractérisation de particules colloïdales biodégradables préparées à partir de dérivés amphiphiles de PMLA^{58, 59, 262}. Différents poly(acide malique-co- malate de benzyle) ont été synthétisés par ROP anionique de MLABe suivi d'une hydrogénéolyse catalytique partielle. Ces auteurs n'ont effectué qu'une caractérisation physico-chimique des systèmes particuliers correspondants et ont montré que leur taille, leur charge et chimie de surface variaient considérablement selon la composition du copolymère : la présence d'unités acide malique entraînait la formation de NPs plus grosses avec une diminution significative du potentiel zêta.^{58, 59} Les vitesses de dégradation de ces nanosphères étaient lentes et variaient selon la composition du copolymère : la présence

de fonctions esters benzyliques réduisait le taux d'hydrolyse des liaisons esters dans les chaînes principales du polymère ²⁶². Même si de tels systèmes semblaient présenter un intérêt en tant que systèmes d'administration de médicaments, aucun essai *in vitro* et *in vivo* n'a encore été publié.

Il y a plus d'une décennie, Osanai *et al.* ont étudié les effets de la complexation entre liposomes et PMLA sur le comportement d'agrégation et d'encapsulation dans le but de préparer des liposomes sensibles au pH ²⁶³. Ces auteurs ont préparé un poly(malate de sodium-*co*-malate d'octyle) par copolymérisation du MLABe et de malolactonate d'octyle suivie d'une hydrogénéolyse catalytique. Ce copolymère a ensuite été mélangé avec du L, α -dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) de lécithine de soja pour formuler des liposomes possédant une couronne formée par le polymère synthétisé ²⁶³. Il a été montré que les liposomes obtenus avaient une structure sphérique et des diamètres compris entre 30 et 55 nm, les groupes octyle introduits sur le PMLA fonctionnant comme des ancres stabilisant la complexation entre lipide et PMLA ²⁶³. Osanai *et al.* ont étudié l'influence du pH sur l'agrégation et la fusion de ces liposomes ainsi que sur la libération de calcéine encapsulée dans ces liposomes. Ils ont montré que l'agrégation et la fusion étaient faibles à pH neutre et augmentaient dans des conditions de pH acide. Le même comportement a été observé pour la libération de calcéine, faible à pH neutre et plus rapide dans des conditions acides ²⁶³.

Plusieurs études rapportent également l'utilisation de poly(acide lactide-*co*-acide malique) pour la conception de NPs dégradables ^{264, 265, 266}. Wang *et al.* ont synthétisé un copolymère amphiphile di-blocs MeOPEG-*b*-poly(lactide-*co*-acide malique) par hydrogénéolyse catalytique du MeOPEG-*b*-poly(lactide-*co*-malate de benzyle) synthétisé par copolymérisation par ouverture de cycle du DL-lactide et du RS-MLABe en utilisant le MePEG comme amorceur et l'octoate stanneux comme catalyseur ²⁶⁵. Les nanosphères correspondantes ont été préparées par la méthode d'évaporation de solvant. Les images obtenues par microscopie électronique à transmission (TEM) ont montré que ces nanosphères préparées à partir des copolymères à blocs protégés avaient une morphologie sphérique compacte tandis que celles préparées à partir des copolymères à blocs déprotégés avaient une morphologie sphérique non compacte. De plus, les expériences *in vitro* ont démontré que les taux de dégradation augmentaient avec les quantités d'unités d'acide malique hydrophiles ²⁶⁵. Récemment, Nottelet *et al.* ont préparé et caractérisé des micelles à base des copolymères séquencés entièrement

dégradables, le PMLA-*b*-poly(dihexyllactide), le PMLA-*b*-poly(monohexyllactide) et le PMLA-*b*-PLA. La première étape a consisté en la polymérisation par ouverture du cycle du MLABe générant le bloc PMLABe qui a été utilisé, dans une 2ème étape, pour la polymérisation par ouverture du cycle du dihexyllactide (DiHeLA), du monohexyllactide (MoHeLA) ou du LA. La dernière étape, l'hydrogénolyse catalytique des blocs PMLABe, a conduit aux copolymères blocs amphiphiles attendus ²⁶⁴. Les micelles correspondantes ont été préparées en ajoutant une solution d'acétone de ces copolymères dans de l'eau ou du PBS à pH physiologique sous sonication. Les micelles résultantes ont des diamètres allant de 21 à 60 nm et des concentrations micellaires critiques (cmc) comprises entre 7 et 100 mg/L ²⁶⁵. L'étude de la stabilité et du taux d'encapsulation de ces micelles, évalués avec la sonde de fluorescence NilRed, a démontré que ces dernières présentaient : *i*). une stabilité acceptable à température ambiante, *ii*). une stabilité raisonnable pendant les deux premières semaines à pH 7,4 et 37° C suivie d'une dégradation assez rapide, et *iii*). une dégradation plus rapide à pH 5 et 37° C. Les auteurs ont conclu que les propriétés des micelles polymères PMLA-*b*-PDiHeLA pourraient être intéressantes pour une libération contrôlée du médicament *in vivo* ²⁶⁵.

Dans le but d'administrer des siARN spécifiques capables de cibler le récepteur alpha des œstrogènes (ER α) sans affecter le récepteur ER β , Bouclier *et al.* ont étudié les possibilités d'encapsulation des siARN dans des NPs constituées de copolymères à blocs PEG-*b*-poly(ϵ -caprolactone-co-malate de dodécyle) ²⁶⁷. Les auteurs ont donc décrit la synthèse et la caractérisation physico-chimique des NPs chargées en siRNA ainsi que les résultats de plusieurs tests *in vitro* et *in vivo*. Les NPs à base de PEG-*b*-poly (ϵ -caprolactone-co-malate de dodécyle), préparées par double émulsion en présence ou en l'absence de siRNA, ont un diamètre de 105 à 118 nm, avec un potentiel zêta légèrement négatif et un taux d'encapsulation de siRNA de 72% ²⁶⁷. Les NPs à base de PEG-*b*-poly(ϵ -caprolactone-co-malate de dodécyle) n'ont pas montré de toxicité significative vis-à-vis des cellules MCF7 *in vitro*. Les auteurs ont ensuite étudié le profil de libération de siRNA et ont montré que la présence de protéines augmentait le taux de libération de siRNA et qu'un effet « burst » était observé suivi d'une période de libération plus lente, phénomène expliqué par la morphologie des NPs ²⁶⁷. Avant de passer à des essais *in vivo*, les auteurs ont montré que les siRNA encapsulés dans les NPs de PEG-*b*-poly(ϵ -caprolactone-co-malate de dodécyle) diminuaient

significativement l'expression des $E\alpha$ dans les cellules MCF7 *in vitro*, prouvant ainsi une internalisation efficace de siRNA dans les cellules ²⁶⁷. Enfin, des NPs de PEG-*b*-poly(ϵ -caprolactone-co-malate de dodécyle) chargées en siRNA ont été injectées par voie intraveineuse à des souris immuno-incompétentes (nude) portant des xénogreffes de cellules cancéreuses cérébrales œstrogéno-dépendantes. Dans les conditions expérimentales, les auteurs ont observé une diminution significative de l'expression des $E\alpha$ dans les tumeurs et une légère diminution de la croissance tumorale ²⁶⁷. Les auteurs ont conclu que les formulations doivent être optimisées pour conduire à des effets plus significatifs sur la régression tumorale mais que ces NPs présentaient cependant un réel potentiel en tant vecteur d'acides nucléiques et de principes actifs.

Avec l'objectif de préparer des micelles macromoléculaires possédant des capacités de ciblage, Yang *et al.* ont utilisé des copolymères à blocs PEG-*b*-poly(ϵ -caprolactone-co-acide malique), sur lesquels ils ont greffé de l'acide folique (FA), comme agent de ciblage, à l'extrémité de la chaîne libre du bloc PEG et de la DOX sur les fonctions acides carboxyliques latérales du bloc PMLA via une liaison hydrazone sensible au pH ²⁶⁸. Les micelles obtenues ont un diamètre d'environ 25 nm et 14% de DOX greffée. À pH 7,4, presque aucune quantité de DOX n'a été libérée, tandis que la libération de la DOX a été augmentée à des valeurs de pH inférieures. Les micelles présentant des molécules de fluorescéine amine (FA) en surface se sont avérées être efficacement captées par les cellules 4T1 *in vitro*, induisant une cytotoxicité grâce à la libération de la DOX ²⁶⁸.

Yin *et al.* ont, quant à eux, greffé sur du chitosane, de l'acide linoléique hydrophobe et du poly(acide malique) hydrophile ayant à une extrémité de chaîne de l'acide lactique, ce dernier polymère étant obtenu par polymérisation par ouverture de cycle du MLABe en présence d'acide lactique ^{269, 270}. Dans une première étude, Yin *et al.* ont préparé des NPs par sonication à partir du dérivé de chitosane ainsi synthétisé. Les NPs obtenues ont des diamètres dans la gamme de 190 à 330 nm avec un potentiel zêta négatif (environ -10 mV), tandis que la concentration d'agrégation critique (CAC) dépendait de la balance hydrophile/hydrophobe contrôlée par le nombre de molécules d'acide linoléique et de PMLA greffées sur le chitosane ²⁶⁹. Le paclitaxel (PTX) a été encapsulé dans des NPs au cours de l'étape de préparation par sonication avec une efficacité d'encapsulation d'environ 70% en poids. Le profil de libération *in vitro* du PTX (PBS pH 7,4 contenant 0,1% de tween 80) a montré une libération de PTX très rapide dans

la première heure (effet « burst ») suivie d'une libération de PTX légèrement plus lente. Près de 80% du PTX encapsulé ont été libérés après 12 heures d'incubation. Les effets hémolytiques *in vitro* des NPs, représentatifs de la compatibilité sanguine *in vivo*, étaient assez faibles, indiquant que les formulations préparées pouvaient convenir aux injections intraveineuses et aux applications hématologiques ²⁶⁹. Une légère toxicité aiguë a été observée pour l'une des formulations. En effet, lorsque cette formulation a été injectée par voie intraveineuse à des souris à une dose de 625 mg/kg, aucun signe de toxicité et de mortalité n'a été observé. De plus, une dose plus élevée (1250 mg/kg) n'a induit que des signes de toxicité modérés et transitoires, qui ont disparu après 24 heures ²⁶⁹. Huit jours après l'injection intraveineuse de cette formulation chargée de PTX, le volume et le poids de la tumeur ont été considérablement réduits, ce qui signifie que le PTX encapsulé dans les formulations à base de chitosane était plus efficace que le PTX seul ²⁶⁹.

De même, Yin *et al.* ont également préparé et caractérisé des formulations à base de chitosane ayant une charge de surface positive permettant la complexation d'ADN, dans le but de développer des systèmes de vectorisation dégradables de gènes thérapeutiques. Comme décrit ci-dessus, ils ont, dans un premier temps, synthétisé un dérivé amphiphile du chitosane par greffage sur ce polymère de l'acide linoléique et du PMLA avec un degré de substitution inférieur à ceux de l'étude précédente ²⁶⁹. La sonication d'une solution tamponnée à pH 5,5 contenant ce dérivé amphiphile du chitosane leur a permis d'obtenir des NPs de diamètre variant de 170 à 260 nm et ayant un potentiel zêta entre +30 et +50 mV ²⁷⁰. Ils ont ensuite préparé des nanocomplexes en mélangeant ces NPs avec le plasmide pEGFP codant la protéine fluorescente verte (GFP). Des nanocomplexes NPs/pEGFP stables et uniformes ont été obtenus à pH 5,5 avec un diamètre inférieur à 300 nm. Ils ont démontré que le greffage de l'acide linoléique hydrophobe et du PMLA hydrophile permettait la suppression de l'adsorption non spécifique, la réduction des interactions au sein des nanocomplexes NPs/pEGFP et une libération accrue d'ADN. D'autre part, Yin *et al.* ont démontré que l'adsorption et la captation cellulaires des nanocomplexes étaient favorisées par une teneur plus élevée en acide linoléique et un plus faible degré de substitution du PMLA ²⁷⁰. Des tests de transfection *in vitro* sur des cellules HEK 293 ont démontré que les nanocomplexes ayant un rapport pondéral de 12 avaient un niveau d'expression génique élevé avec 34% de cellules HEK positives à la GFP. Ce nanocomplexe a été sélectionné pour le test de transfection intramusculaire. Il a montré une capacité de transfection *in vivo* supérieure

à celle observée pour les nanocomplexes chitosane/pEGFP et poly(éthylénimine)/pEGFP indiquant que le chitosane substitué par le PMLA pourrait être intéressant dans le domaine de la vectorisation de médicaments et de gènes ²⁷⁰.

Dans une autre étude, Dove *et al.* ont préparé des NPs par stéréocomplexation entre le PEG-*b*-P(L)MLABe et le PEG-*b*-P(D)MLABe. Ces deux copolymères ont été préalablement synthétisés par polymérisation par ouverture de cycle du R-MLABe ou du S-MLABe à l'aide de PEG comme macro-amorceur et de 4-méthoxypyridine comme catalyseur ²⁷¹. Ces auteurs n'ont réalisé que des caractérisations physico-chimiques partielles de leurs micelles montrant que ces dernières, formées par la stéréocomplexation des deux copolyesters à blocs, étaient plus stables que celles préparées à partir de PEG-*b*-P(L)MLABe ou de PEG-*b*-P(D)MLABe. Finalement, ces auteurs ont conclu qu'elles pouvaient trouver des applications dans le domaine de la vectorisation de principes actifs ²⁷¹.

Parallèlement à ces travaux, Cammas-Marion *et al.* ont également synthétisé des dérivés amphiphiles et hydrophobes du PMLA dans le but d'élaborer des micelles et des NPs fonctionnelles pour la vectorisation ciblée et la libération contrôlée de principes actifs. Les premiers systèmes nanoparticulaires développés par cette équipe étaient basés sur les dérivés hydrophobes du PMLA : le PMLABe, le poly(malate d'isopropyle) ou PMLAiPr, le poly(malate de néohexyle) noté PMLAnHe, le poly(malate d'hexyle) ou PMLAHe et le poly(acide malique-*co*-malate d'hexyle) noté P(MLA-*co*-MLAHe) (Fig. 49) ^{231, 272}.

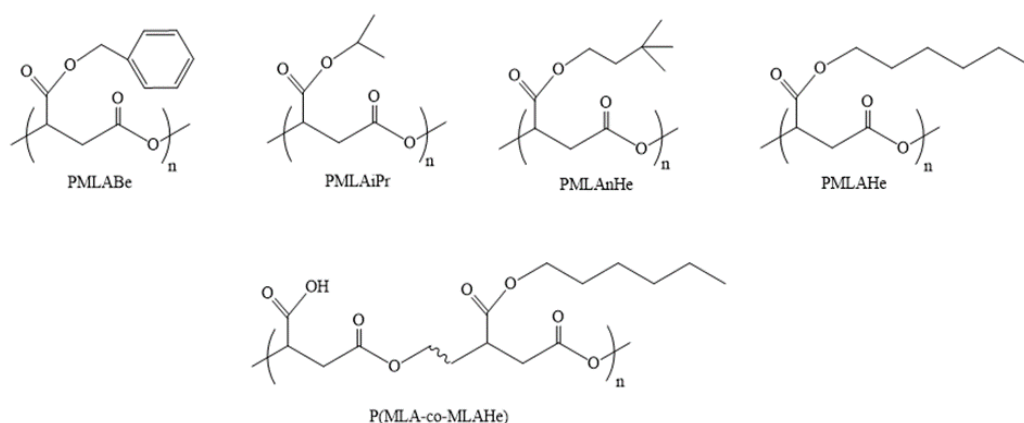


Figure 49 : Structure des PMLABe, PMLAiPr, PMLAnHe, PMLAHe et P(MLA-*co*-MLAHe).

Les NPs correspondantes, préparées par nanoprecipitation, ont été analysées (diffusion dynamique de la lumière, DLS) et évaluées dans divers tests *in vitro*. Il a été montré que les diamètres des NPs obtenues dépendaient de la nature des unités répétitives et variaient de 85 à 160 nm. Il convient de noter que les potentiels zêta se sont avérés être d'environ -30 mV quel que soit le polymère utilisé pour préparer les NPs, mettant probablement en évidence que les fonctions acides carboxyliques terminales étaient situées à la surface des NPs^{231, 272}. La dégradation des NPs a été évaluée dans divers milieux à 37 ° C par chromatographie d'exclusion stérique (évolution des masses molaires des polymères), RMN ¹H (structure des produits de dégradation) et DLS (stabilité des NPs). Les résultats ont logiquement montré que la vitesse de dégradation des NPs constituées par des dérivés hydrophobes du PMLA était plus lente que celle des NPs à base des dérivés plus hydrophiles du PMLA. De plus, le processus de dégradation semblait être un phénomène se produisant de façon aléatoire dans la chaîne principale du polymère^{231, 272}. Par ailleurs, la cytotoxicité de ces NPs sur les macrophages murins J774 A1 était faible et dépendait, d'une part, du taux de dégradation des polymères formant les NPs et, d'autre part, de la formation de produits de dégradation²⁷². Enfin, l'halofantrine, principe actif peu soluble dans l'eau utilisé dans le traitement du paludisme, a été encapsulé dans les NPs à base de PMLAiPr et de PMLAnHe à hauteur de 5% en poids. Les diamètres des NPs chargées étaient corrélés à la quantité d'halofantrine ajoutée au milieu de nanoprecipitation et une inversion des potentiels zêta avec une augmentation de la quantité initiale d'halofantrine a été observée laissant penser qu'une partie de ce principe actif était adsorbée à la surface des NPs. Comme prévu, la libération d'halofantrine a été plus rapide dans le milieu intestinal que dans le PBS et un effet « burst » a été observé avec 50% d'halofantrine libérée après 30 min d'incubation²³¹.

Afin d'améliorer ces systèmes nanoparticulaires et proposer une plus large gamme de nanovecteurs avec des propriétés physico-chimiques variées et adaptées à l'application envisagée, Cammas-Marion *et al.* ont travaillé à la conception de micelles macromoléculaires entièrement dégradables^{231, 273}. Pour atteindre cet objectif, trois copolymères à bloc amphiphiles, le PMLA₄₃-*b*-poly(malate de butyle)₇, le PMLA₄₃-*b*-poly(malate de butyle)₁₀ et le PMLA₈₃-*b*-poly(malate de butyle)₁₄ ont été synthétisés par polymérisation anionique par ouverture de cycle séquentielle du MLABe suivie du malolactonate de butyle, et caractérisés (Fig. 50)²⁷³.

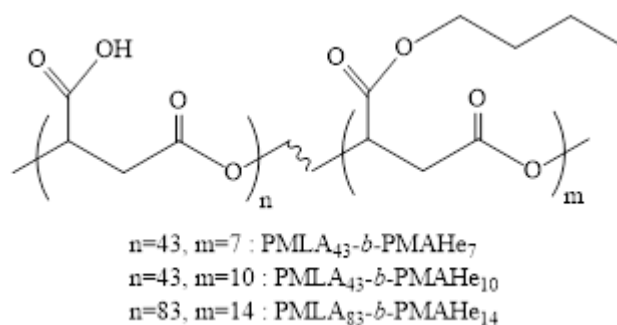


Figure 50 : Structure des copolymères à bloc amphiphiles : PMLA₄₃-*b*-poly(malate de butyle)₇, PMLA₄₃-*b*-poly(malate de butyle)₁₀ et PMLA₈₃-*b*-poly(malate de butyle)₁₄.

En raison de la présence de fonctions acides carboxyliques latérales sur le bloc PMLA hydrophile, un protocole a été établi afin d'obtenir des micelles stables dans des conditions (pH, salinité, etc.) compatibles avec les applications *in vivo*. Des micelles macromoléculaires stables ont été obtenues par dissolution directe des copolymères à blocs amphiphiles dans une solution tampon phosphate (PBS) à 10 mM et pH7,4 contenant 0,15 M de NaCl. Les micelles avaient des propriétés dépendant de la nature et de la longueur de chacun des blocs des copolymères amphiphiles : les micelles les plus stables, d'un diamètre de 35 nm et ayant une concentration micellaire critique (cmc) de 8 mg/L, ont été obtenues avec le copolymère à bloc ayant *i*). des blocs hydrophiles et hydrophobes les plus longs, *ii*). un bloc hydrophobe avec le degré d'hydrophobie le plus élevé, et *iii*). une balance hydrophile/hydrophobe la plus élevée ²⁷³. De plus, il a été montré que les micelles dégradables obtenues présentaient des propriétés dépendantes du pH de la solution. Par conséquent, ces micelles macromoléculaires entièrement dégradables pourraient être intéressantes en tant que vecteurs de principes actifs répondant à une variation de pH du milieu environnant.

Dans le but de concevoir des systèmes nanoparticulaires plus efficaces pour la vectorisation ciblée de principes actifs, des NPs possédant des agents de ciblage en surface et/ou furtives ont été élaborées à partir de dérivés amphiphiles du PMLA constitués par : *i*). un bloc hydrophile PEG formant la couronne des NPs et leur conférant stabilité et furtivité, et *ii*). un bloc hydrophobe PMLA_{Be} formant le cœur hydrophobe des NPs dans lequel des principes actifs hydrophobes peuvent être encapsulés ^{274, 275}. Ces nanovecteurs ont été élaborés dans le but de disposer de nanovecteurs efficaces pour la thérapie et/ou le diagnostic du carcinome hépatocellulaire (CHC) ²⁷⁶. Par conséquent, trois dérivés du PMLA ont été synthétisés par polymérisation anionique par ouverture de cycle du MLABe en présence soit

benzoate de tétraéthylammonium comme amorceur conduisant au PMLABe₆₈ hydrophobe, d'α-méthoxy,ω-carboxylate-PEG₄₂ de tétraéthylammonium comme amorceur conduisant au copolymère à bloc amphiphile PEG₄₂-b-PMLABe₆₈ ou d'α-biotine,ω-carboxylate-PEG₆₂ de tétraéthylammonium comme amorceur conduisant au copolymère à bloc amphiphile ciblant Biot-PEG₆₂-b-PMLABe₇₅ (Fig. 51) ^{274, 275}.

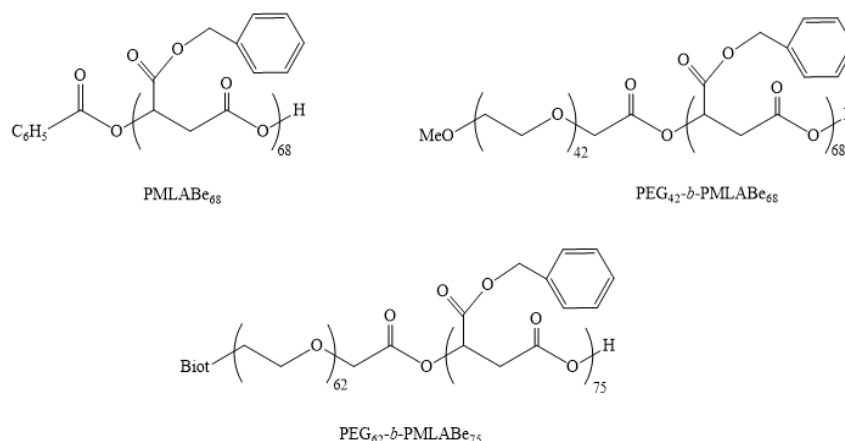


Figure 51 : Structure des PMLABe₆₈, PEG₄₂-b-PMLABe₆₈ et Biot-PEG₆₂-b-PMLABe₇₅.

La biotine a été sélectionnée pour deux raisons principales : *i*). elle est connue pour être un agent de ciblage de certaines cellules cancéreuses ^{277, 278, 279}.et, *ii*). elle est capable d'interagir fortement avec la streptavidine ²⁸⁰, propriété utilisée pour greffer toute une série de peptides sur l'enveloppe externe des NPs afin de cribler rapidement leur spécificité vis-à-vis des hépatocytes *in vitro* avec l'objectif final de sélectionner les peptides les plus hépatotropes pour un greffage covalent en fin de chaîne libre du bloc PEG ²⁷⁵. Des dérivés fluorescents des dérivés du PMLA ont également été synthétisés en greffant une molécule de fluorescéine amine sur l'extrémité libre du bloc PMLABe afin de visualiser les NPs correspondantes dans les cellules par microscopie de fluorescence. Partant soit des dérivés non fluorescents du PMLA, soit d'un mélange de copolymères à bloc non fluorescents et fluorescents (50/50% en poids), des NPs vides, chargées en principe actif (DOX) ou en sondes de fluorescences (DiDoil ou DiR) ont été préparées par nanoprécipitation conduisant à l'obtention de nano-objets bien définis d'une manière reproductible ^{274, 275}. La cytotoxicité *in vitro* des NPs à base de PMLABe₆₈, PEG₄₂-b-PMLABe₆₈ et Biot-PEG₆₂-b-PMLABe₇₅ vides a été évaluée sur plusieurs lignées de cellules cancéreuses (PC3, NCI, Caco, HCT116, MDA, HuH7 et mmt 060562) et saines (fibroblastes humains). Ces tests ont montré que ces NPs étaient non toxiques *in vitro* pour toutes les lignées cellulaires testées, avec seulement une

légère diminution de la viabilité cellulaire uniquement pour des concentrations élevées supérieures à 10 μM ²⁷⁴. La cinétique de libération de la DOX encapsulée dans les NPs à base de PEG₄₂-*b*-PMLABe₆₈ et Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₅ a été suivie dans l'eau et dans un milieu de culture cellulaire à 37°C. Comme attendu, un effet « burst » a été observé dans les premières heures d'incubation avec environ 40% à 50% de DOX libérée après 10 heures d'incubation, suivi d'une libération lente sur la période testée (70 heures d'incubation) ²⁷⁵. Le traitement des cellules HuH7 *in vitro* avec de la DOX encapsulée dans les NPs à base de PMLABe₆₈, PEG₄₂-*b*-PMLABe₆₈ et Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₅ a induit, comme pour la DOX libre, une cytotoxicité dose-dépendante avec des concentrations inhibitrices (IC₅₀) similaires à celle de la DOX libre. Ces résultats étaient encourageants dans le sens où l'efficacité de DOX n'était pas affectée par le processus d'encapsulation

Pour étudier l'effet de la biotine sur la captation *in vitro* par les cellules mmt 060562 connues pour surexprimer le récepteur de la biotine, des nanoparticules à base de PEG₄₂-*b*-PMLABe₆₈ et Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₅ encapsulant la sonde de fluorescence DiDoil ont été préparées : la fluorescence rouge n'a été observée que dans les cellules ayant été incubées avec les NPs Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₅ chargées en DiDoil ²⁷⁴. Ces résultats ont démontré que le ciblage des cellules tumorales avec la biotine semblait être efficace et met en évidence l'intérêt des dérivés du PMLA pour l'élaboration de nanovecteurs potentiellement intéressants pour la vectorisation ciblée et la libération contrôlée de principes actifs hydrophobes.

Comme mentionné plus haut, outre l'utilisation de la biotine comme agent de ciblage, cette molécule a été utilisée pour développer une procédure polyvalente de criblage d'agents de ciblage spécifiques des cellules cancéreuses du foie (Fig. 52), l'objectif final étant de sélectionner les peptides présentant un tropisme très élevé pour les cellules d'hépatome puis de les greffer en bout de chaîne libre du bloc PEG.

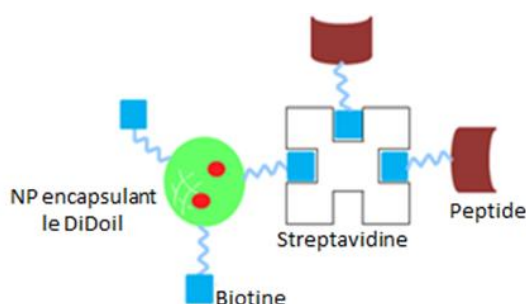


Figure 52 : Structure de l'assemblage Peptide-Biot-Strep-Biot-NPs.

Pour cette étude, des NPs fluorescentes constituées d'un mélange de PEG₄₂-*b*-PMLABe₆₈ et PEG₄₂-*b*-PMLABe₆₈-FA (50% en poids) ou Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₅ et Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₅-FA (50% en poids) ont été préparées. Le peptide cyclique c-RGD biotinylé a d'abord été associé à la streptavidine suivi par l'ajout de ce complexe à des NPs fluorescentes biotinylées dans des conditions bien définies (4 μ M de copolymères à blocs, 4 μ M de streptavidine et 8 μ M du peptide c-RGD biotinylé)²⁷⁵. Une augmentation modérée du diamètre et de l'indice de dispersité de ces NPs a été observée après l'ajout du complexe Biot-cRGD/streptavidine dans du PBS et dans du milieu de culture²⁷⁵. Plusieurs tests *in vitro* ont été réalisés avec les NPs modifiées par le c-RGD afin d'évaluer leur potentiel pour des applications *in vivo*²⁷⁵. La captation cellulaire *in vitro* par la lignée cellulaire d'hépatome humain HepaRG des NPs fluorescentes mentionnées ci-dessus a été suivie en cytométrie en flux et par microscopie à fluorescence. Les données obtenues ont démontré que l'ajout du peptide c-RGD en surface des NPs fluorescentes biotinylées a conduit à une amélioration considérable de leur captation cellulaire⁶⁷. La spécificité de la captation par les cellules HepaRG des NPs fluorescentes modifiées par le c-RGD a été évaluée en présence ou en absence d'un excès de c-RGD libre : les résultats ont démontré que la présence du peptide c-RGD à la surface des NPs était effectivement responsable de l'augmentation de la captation de ces NPs par les cellules HepaRG. La captation des NPs fluorescentes biotinylées et des NPs fluorescentes modifiées par le c-RGD par trois lignées cellulaires différentes (cellules cancéreuses HepaRG, HT29 et HeLa) a ensuite été étudiée par cytométrie de flux. Les trois lignées cellulaires ont montré de faibles niveaux de fluorescence lorsqu'elles ont été incubées avec les NPs fluorescentes biotinylées. Pour les cellules HT29, le nombre de cellules positives et le taux de captation étaient très faibles. Au contraire, le nombre de cellules HeLa positives était légèrement supérieur à celui des cellules HepaRG. Cependant, le degré de captation par les cellules HeLa était beaucoup plus faible celui observé avec les cellules HepaRG. Ces résultats mettent en évidence que le peptide c-RGD avait un véritable tropisme pour les cellules hépatiques. Par ailleurs, ces études ont mis en évidence que l'échafaudage moléculaire Pept-Biot-Streptavidine-Biot-NPs pourrait être utilisé pour cribler d'autres peptides courts ciblant les cellules cancéreuses du foie. Des peptides courts (<20 acides aminés) ont été sélectionnés et greffés en surface des NPs biotinylées via la streptavidine, comme décrit plus haut avec le c-RGD biotinylé. Des études de captation cellulaire avec ces NPs fluorescentes ont été réalisées par cytométrie de flux sur plusieurs lignées cellulaires

hépatiques (cancéreuses et saines) et sur d'autres lignées cellulaires cancéreuses non hépatiques. Les résultats obtenus ont permis de dégager deux peptides, le GBVA10-9 et le CPB, montrant un fort tropisme pour les lignées de cellules cancéreuses du foie (Vène et collaborateurs, manuscrit en rédaction). Des études sont actuellement en cours afin de greffer directement ces peptides en fin de chaîne du PMLABe et du PEG-*b*-PMLABe afin de s'affranchir de l'utilisation de la streptavidine pour de futurs essais *in vivo* de biodistribution.

Parallèlement, une étude préliminaire de biodistribution *in vivo* chez des souris BALB/c « nude » après injection intraveineuse de NPs à base de Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₅ modifiées ou non avec du peptide c-RGD encapsulant du DiR a été menée. Les résultats préliminaires ont indiqué que ces NPs étaient bien tolérées sans aucun signe de toxicité. De plus, il a été possible de détecter de la fluorescence chez l'animal vivant démontrant ainsi que les conditions expérimentales utilisées étaient compatibles avec ce type d'étude. De plus, les premières analyses semblaient mettre en évidence une accumulation abdominale plus importante des NPs modifiées par le c-RGD chargées en DiR par rapport aux NPs biotinylées encapsulant le DiR ⁶⁷.

Tous ces résultats mettent en évidence la polyvalence des dérivés de synthèse du PMLA dans l'élaboration de NPs capables d'encapsuler des principes actifs hydrophobes et ayant des propriétés (vitesse de dégradation et de libération des principes actifs, biocompatibilité, etc.) adaptées à l'application ciblée. De plus, à travers cet aperçu rapide des travaux réalisés avec des dérivés du PMLA, il apparaît qu'une telle famille de polymères dégradables et biocompatibles puisse être intéressante pour la conception de nanovecteurs permettant la vectorisation ciblée et la libération contrôlée de principes actifs.

1.6 Objectifs des travaux de thèse

Mon travail de thèse s'inscrit dans un des thèmes du laboratoire dédié au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques du carcinome hépatocellulaire. Ce thème de recherche comporte à la fois un volet clinique et une recherche préclinique.

Au niveau clinique, les Prs J. Edeline et E. Garin, respectivement oncologue et médecin nucléaire, utilisent et optimisent des radiothérapies vectorisées (microsphères, lipiodol) pour l'embolisation de tumeurs hépatiques. Ces approches sont utilisées dans un nombre encore restreint de patients mais constituent une voie prometteuse de thérapie des tumeurs primitives du foie avec des optimisations originales liées à une dosimétrie personnalisée à chaque patient.

Au niveau préclinique, notre projet vise à développer de nouveaux copolymères à base de polyesters biocompatibles et biodégradables dérivés du poly(malate de benzyle) (PMLABe) pour formuler des nanoparticules (NPs) innovantes décorées ou non de peptides de liaison aux cellules hépatomes qui pourront être évaluées en tant que systèmes d'administration de médicaments pour cibler le CHC.

Mon travail de thèse s'inscrivait dans ce second axe préclinique et a consisté à étudier de nouveaux nanovecteurs et de caractériser leur toxicité et leur captation par des cellules en culture.

Les polyesters aliphatiques, comme le poly(acide malique) (PMLA) et ses dérivés, sont des polymères aux propriétés de biocompatibilité et de biodégradabilité remarquables, qui en font des candidats de choix pour l'élaboration de systèmes de vectorisation de principes actifs ²¹⁴. La synthèse de ce type de polyesters peut être réalisée soit par polycondensation, soit par polymérisation par ouverture de cycle (ROP) d'esters cycliques correspondants (les β -lactones). La première méthode conduit à des polymères de structure non contrôlée et de masse molaire faible. Par contre, la deuxième méthode permet de préparer des polymères de structures bien définies et de masses molaires bien contrôlées ^{281, 282}. Cependant, les réactions de polymérisation par ouverture de cycle impliquent l'usage d'amorceurs cationiques ou anioniques, en présence le plus souvent de catalyseurs organométalliques dont la présence même à l'état de traces peut induire une toxicité remarquable *in vivo* ^{283, 284}.

Une alternative intéressante à l'emploi d'amorceurs toxiques est l'utilisation d'enzymes, et plus spécifiquement des lipases en tant qu'amorceurs « écologiques ». Les lipases sont des enzymes appartenant à la famille des hydrolases, ce qui est équivalent à la classe 3 selon la nomenclature fournie par la commission des enzymes (Enzyme commission numbers) [EC]. Plus spécifiquement se sont des hydrolases de sérines qui ont la particularité d'être activées en présence d'une interface phase aqueuse (eau ou tampon)/phase organique (substrat hydrophobe ou solvant organiques). Ces enzymes présentes chez les plantes, les insectes, les animaux et les microorganismes jouent un rôle essentiel dans la synthèse et la dégradation des lipides. Physiologiquement, les lipases catalysent des réactions d'hydrolyses de mono- di- et triglycérides. Pourtant elles sont aussi capables de catalyser des réactions d'estérification et de transestérification quand l'activité de l'eau est faible ²⁸⁵. Ces enzymes ont été déjà étudiés dans la catalyse de réactions de polymérisation par ouverture de cycle de lactone non substitués comme l' ϵ -caprolactone ²⁸⁶.

En s'inspirant de ce concept, nous avons poursuivi notre travail de recherche en collaboration avec l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes (ENSCR) et plus spécifiquement avec Hubert Casajus pour effectuer des synthèses de polymères à base de PMLA par voie chimique et par voie enzymatique et les utiliser pour préparer des NPs par la technique de nanopréciipitation ²⁸⁵. Cette étude visait à comparer la toxicité aiguë et chronique de NPs préparées à partir de dérivés du PMLABe synthétisés soit par polymérisation chimique soit par polymérisation enzymatique. Nous avons également étudié leur captation par les cellules HepaRG et des macrophages humains. Dans cet objectif, nous avons synthétisé et caractérisé une série de huit dérivés du PMLABe, formulé les NPs correspondantes et enfin étudié leur toxicité sur les cellules HepaRG progénitrices et différenciées et leur captation par les cellules HepaRG et les macrophages humains. Cette étude visait également à étudier la relation entre le mode de synthèse des NPs d'une part et leur captation et leurs toxicités d'autre part.

Toutefois quel que soit le degré de biocompatibilité des NPs préparées, un nombre important de barrières biologiques reste à franchir pour achever un ciblage thérapeutique anticancéreux efficace. Ces barrières sont soit liées au microenvironnement tumoral, soit liées au système immunitaire. Concernant le microenvironnement tumoral, des barrières moléculaires représentées par les composants de la matrice extracellulaire tumorale et d'autres cellulaires comme les

macrophages associés à la tumeur et les fibroblastes associés à la tumeur limitent la captation des NPs par les cellules tumorales, réduisant ainsi leur efficacité thérapeutique ¹⁸². De plus, l'opsonisation des NPs par les protéines du sang facilitent leur phagocytose par les macrophages du système RES déviant ainsi leur accumulation vers les organes du système réticuloendothélial ¹⁵⁰.

Dans le but d'évaluer l'impact des barrières biologiques sur la captation des NPs à base de PMLABe et de son dérivé le copolymère amphiphile PEG-*b*-PMLABe, nous avons utilisé les mêmes modèles cellulaires que ceux mentionnés ci-dessus. Nous avons évalué l'effet de la présence de la couronne de PEG, et de l'opsonisation de NPs à base de PMLABe₇₃ et de PEG₄₂-*b*-PMLABe₇₃ par les protéines sériques sur leur captation. Nous avons caractérisé le processus d'internalisation des NPs mis en jeu par les cellules (Phagocytose ou Endocytose), ainsi que des cinétiques de captation des NPs. Nous avons également testé l'impact d'expositions répétées des modèles cellulaires utilisés aux NPs afin d'évaluer le devenir de ces cellules.

Une autre alternative à l'usage d'amorceurs toxiques dans les réactions de polymérisation réside dans l'utilisation d'amorceurs organiques comme l'acide pyrène acétique activé par une base phosphazène (P₄-*t*-Bu). Les amorceurs organiques apportent une variété de procédures synthétiques de polymérisation de lactones et surtout des β -lactones. Parmi les dérivés du PMLA, le poly(acide diméthyle malique) est connu pour sa biocompatibilité et sa biodégradabilité, et peut être obtenu par aROP de β -lactones α , α' , β -substituées en présence du couple acide pyrène acétique/phosphazène ²⁸⁷.

Dans ce contexte et grâce à une collaboration avec Ali Khalil (ENSCR-France) et Olivier Coulembier (Université de MONS - Belgique), nous avons exploité ce système amorceur/base pour synthétiser trois homopolymères hydrophobes (le PdiMeMLABe₂₈, le PdiMeMLAHe₂₉, et le PdiMeMLAPrOBe₂₁) ainsi que deux copolymères à blocs amphiphiles différent entre eux par la longueur respective des deux blocs (le PdiMeMLA₂₇-*b*-PdiMeMLAHe₅₀, et le PdiMeMLA₅₄-*b*-PdiMeMLAHe₂₉). Ensuite les différents polymères synthétisés ont été utilisés pour préparer les NPs correspondantes par la technique de nanopréciptation. Le but de ce travail était de tester la captation de ces NPs ainsi que leur toxicité sur les cellules de la lignée d'hépatome HepaRG.

2 Matériels et méthodes

2.1 Modèles cellulaires

2.1.1 HepaRG

2.1.1.1 Avant-propos

L'activité du laboratoire dans lequel j'ai effectué mon doctorat est centré autour du foie et des maladies associées dont le carcinome hépatocellulaire (CHC). Un des objectifs de recherche du laboratoire est donc la compréhension et l'élaboration de traitements efficaces de ce type de cancer hépatique. Par conséquent, le modèle cellulaire HepaRG qui semble être un des modèles les plus représentatifs de ce type de cancer hépatique a été sélectionné.

La lignée cellulaire HepaRG est dérivée d'un carcinome hépatocellulaire différencié et développé consécutivement à une infection par le virus d'hépatite C (Hepatitis C virus, HCV)²⁸⁸. Ensemencées à une faible densité, ces cellules prolifèrent rapidement jusqu'à confluence où elles commencent à se différencier. Les cellules HepaRG sont des cellules bipotentes, elles se différencient en des colonies de cellules de type hépatocyte entourées par des cellules épithéliales de type biliaire²⁸⁹.

Le statut de différenciation acquis par les cellules HepaRG n'est possible qu'après une quiescence prolongée de ces cellules maintenues en confluence associée à une exposition au diméthyle sulfoxyde (DMSO). Sans le DMSO et en présence d'hydrocortisone, la confluence seule permet de restaurer l'expression de plusieurs fonctions hépatiques. Pourtant, le DMSO est indispensable pour un niveau d'expression élevé de cytochrome P450²⁹⁰.

Il est important de noter que ces cellules différenciées sont capables de se retro-différencier lorsqu'elles sont réensemencées à faibles densités²⁸⁹.

2.1.1.2 Culture des cellules HepaRG

Les cellules HepaRG sont cultivées suivant le protocole adopté par Corlu & Loyer²⁹¹. Nous avons utilisé le milieu de culture William's E (Lonza, Basel, Switzerland) supplémenté avec 2 mM de glutamine (Gibco, ThermoFischer, Waltham, MA, USA), 5 mg/L d'insuline (Sigma, Saint Louis, MO, USA), 10^{-2} mM d'hémisuccinate d'hydrocortisone, 50 unités/mL de pénicilline, 50 µg/mL de streptomycine et 100 mL de sérum de veau fœtal (SVF) FetalClone III® à une température de 37 °C avec 5% de CO₂ humidifié. Après une semaine en culture (Fig. 53), les cellules atteignent la confluence et commencent le phénomène de différenciation donnant

naissance à des cellules HepaRG hépatocytaires (phénotypiquement semblables aux hépatocytes humains) et des cellules biliaires (phénotypiquement semblables aux cholangiocytes) humains.

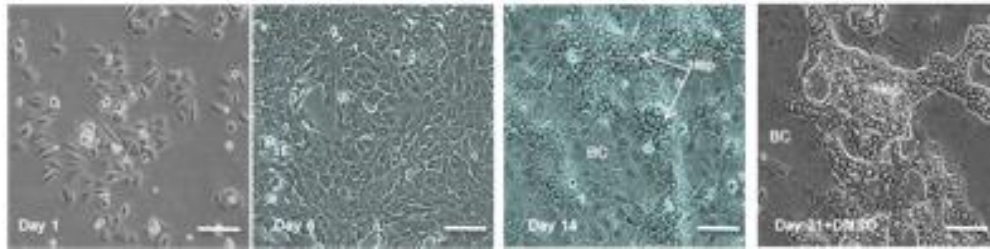


Figure 53 : Cellules HepaRG : des progénitrices bipotentes se différenciant en hépatocytes & cholangiocytes.

2.1.2 Macrophages humains

2.1.2.1 Avant-propos

Les macrophages humains sont l'un des nombreux agents de la réponse immunitaire innée. Ils phagocytent des corps étrangers circulant dans notre sang, ils sont donc en partie responsables de l'élimination des nanoparticules de l'organisme. Ce type cellulaire est également présent dans le foie (cellules de Kupffer). Bien qu'ils ne représentent que 5% de la population cellulaire totale du foie, ils jouent un rôle majeur dans la physiopathologie hépatique ²⁹². C'est pourquoi nous avons intégré les macrophages dans notre étude.

Dans ce but, nous avons trié les monocytes CD14 + à partir de cellules sanguines mononucléaires, qui sont ensuite différenciées en macrophages (Fig. 54).

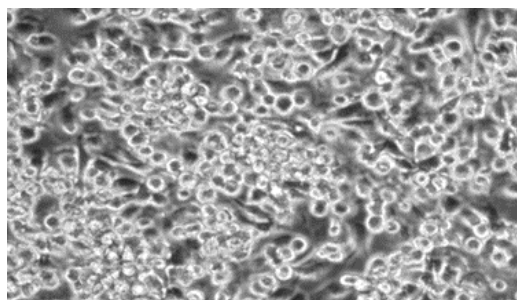


Figure 54 : Macrophages humains différenciés à partir de monocytes CD44+.

2.1.2.2 Tri cellulaire et culture des macrophages

Nous avons obtenu des cellules mononucléaires du sang périphérique à partir de couches leucocytaires (Etablissement Français du Sang, Rennes, France), en appliquant la technique de centrifugation différentielle sur des tubes UNI-SEP maxi U10 (Novamed, Jérusalem).

Les expériences ont été réalisées en respectant la législation française sur le don de sang et l'utilisation et la sécurité des produits sanguins. Nous avons utilisé un kit de séparation CD14 humain pour enrichir le surnageant obtenu en macrophages (Microbeads; Miltenyi Biotec,

Bergisch Gladbach, Allemagne). Les cellules obtenues sont ensuiteensemencées à une densité de $0,5 \times 10^6$ cellules par puits dans des plaques à 24 puits et cultivées à 37 °C avec 5% de CO₂ humidifié et dans du milieu RPMI 1640 complémenté avec 100 UI /mL de pénicilline – 100 mg /mL de streptomycine, 2 mM de L-glutamine et 10% de FCS BioWhittaker®.

Les macrophages ont été obtenus après différenciation des monocytes par incubation avec 50 ng/ml de rhGM-CSF dans du milieu RPMI 1640 pendant 7 jours, comme décrit précédemment par Gicquel et al.²⁹³.

2.2 Préparation des nanoparticules à base de poly(malate de benzyle), PMLABe pour l'étude réalisée dans le chapitre 1

2.2.1 Synthèse de MLABe racémique et optiquement actif

Les RS, R et S-MLABe ont été synthétisés (Fig. 55) comme déjà décrit dans les travaux de Cammas et al.²⁵¹. Brièvement, l'acide DL, L ou D-aspartique (1 eq) a été mis en réaction avec du bromure de sodium (5,5 eq) et du nitrite de sodium (1,2 eq) dans H₂SO₄ 2N, conduisant après recristallisation dans l'acétonitrile, à l'acide RS, S ou R-bromosuccinique pur correspondant. L'acide bromosuccinique racémique ou optiquement actif a été dissous dans du THF anhydre et a réagi avec de l'anhydride trifluoroacétique (1,3 eq), conduisant à l'anhydride bromosuccinique racémique ou optiquement actif correspondant, qui a immédiatement réagi avec de l'alcool benzylique (1 eq) pour obtenir le mélange correspondant de monoesters racémiques ou optiquement actifs. Le pH de ce mélange de monoesters racémiques ou optiquement actifs a été augmenté à 7,2 par addition de NaOH 2N. La solution aqueuse résultante a été mélangée avec du dichlorométhane et le milieu biphasique a été chauffé à 45 °C. Les RS, R et S-MLABe sont récupérés dans la phase dichlorométhane. Ce solvant organique est ensuite éliminé sous vide pour donner les lactones brutes sous forme d'une huile légèrement jaune. Après purification par chromatographie sur colonne et distillation sous vide, les RS, R ou S-MLABe purs ont été obtenus et caractérisés par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR) et par résonance magnétique nucléaire du proton (RMN ¹H).

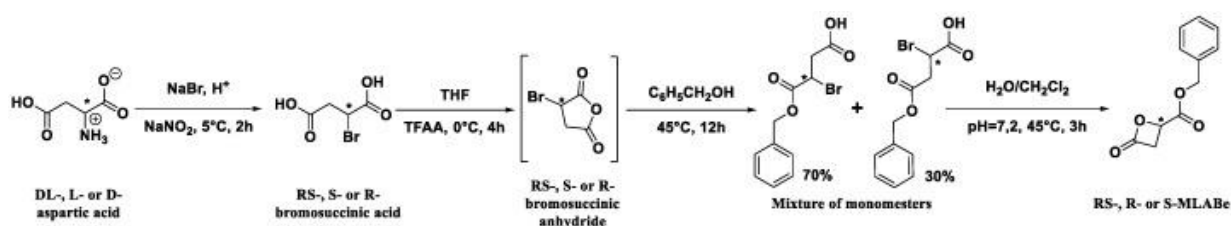


Figure 55 : Synthèse du malate de benzyle.

2.2.2 Polymérisation chimique des RS et R-MLABe

Les RS-PMLABe (P1) et S-PMLABe (P2) ont été synthétisés comme décrit précédemment par Cammas et al.¹⁷⁹ par polymérisation anionique par ouverture de cycle (Anionic ring opening polymerization, aROP) des RS-MLABe et R-MLABe, respectivement, en présence de benzoate de tétraéthylammonium comme amorceur. La masse molaire théorique (30 000 g/mol) a été fixée par le rapport monomère/amorceur. Les deux polymères ont été purifiés par précipitation dans l'éthanol. Après séchage sous vide, le RS-PMLABe et le S-PMLABe ont été analysés par RMN ¹H, chromatographie d'exclusion stérique (SEC) et polarimétrie.

Le PEG₄₅-*b*-PMLABe₇₃ (P3) a été synthétisé comme décrit précédemment par Huang et al. par aROP du RS-MLABe en présence du tétraéthylammonium d' α -méthoxy, ω -carboxylate PEG₄₅ comme amorceur dans du THF anhydre²⁷⁴. Dans ce cas également, la masse molaire du PMLABe a été fixée par le rapport monomère/amorceur sur la valeur de 15 000 g/mol. Le copolymère à bloc résultant a été purifié par précipitation dans l'éthanol. Après séchage sous vide, le copolymère bloc pur a été analysé par RMN ¹H et par SEC.

2.2.3 Polymérisation enzymatique des RS, R et S-MLABe

Le RS-PMLABe P4 a été synthétisé comme décrit précédemment par Casajus et al. par polymérisation par ouverture de cycle du RS-MLABe en présence de lipase pancréatique porcine (PPL)²⁸⁵. Les synthèses ont été réalisées dans une ligne Büchi Syncore de 24 réacteurs multiples (Flawil, Suisse). Dans un tube de 30 mL, la PPL (8,4 mg) a été mélangée avec du RS-MLABe (336 mg) et du tampon Tris-HCl (125 μ L, pH7, 105 mM). Le mélange a été agité à 390 tours/min et la température a été contrôlée à 60 ° C. Après 72 h, la réaction a été arrêtée par l'addition de 3 mL de THF et 3 mL de chloroforme. Le mélange a ensuite été transféré dans une ampoule à décanter. Les séparations ont été réalisées en ajoutant 15 mL d'eau distillée et 15 mL de chloroforme. Les phases organiques ont été séchées sur du sulfate de magnésium (MgSO₄) et filtrées. Enfin, les solvants ont été évaporés sous pression réduite. Le RS-PMLABe P4 a été dissous dans du chloroforme puis précipité dans un large excès d'éther diéthylique froid. Après élimination du surnageant, le polymère a été séché sous vide et analysé par RMN ¹H, SEC et polarimétrie.

Le RS-PMLABe P5, le S-PMLABe P6 et le R-PMLABe P7 ont été obtenus comme décrit précédemment dans les travaux de Casajus et al. par polymérisation par ouverture de cycle des RS-MLABe, R-MLABe et S-MLABe, respectivement, en présence de lipase pancréatique porcine (PPL)²⁸⁵. Les expériences ont été réalisées dans une ligne Büchi Syncore à 24 réacteurs. Dans un tube de 30 mL, la PPL (8,4 mg) a été mélangée avec les RS-MLABe, R-MLABe ou S-

MLABe (338 mg), respectivement, du Tris- HCl (333 μ L, pH = 7, 105 mM) et du toluène (667 μ L). Le volume final était de 1 mL. Les mélanges réactionnels ont été agités à 390 tours/min à 60 °C. Après 72 h, la réaction a été arrêtée par l'addition de 3 mL de THF et 3 mL de chloroforme. Les mélanges ont ensuite été transférés dans une ampoule à décantier. Les séparations ont été réalisées en ajoutant 15 mL d'eau distillée et 15 mL de chloroforme. Les phases organiques ont été séchées sur MgSO₄ et filtrées. Finalement, les solvants ont été évaporés sous pression réduite. Les RS-PMLABe P5, S-PMLABe P6 et R-PMLABe P7 ont été dissous dans du chloroforme, puis précipités dans un large excès d'éther diéthylique froid. Après élimination du surnageant, les polymères ont été séchés sous vide et analysés par RMN ¹H, SEC et polarimétrie.

Le PEG₁₇-*b*-PMLABe₄₇ (P8) a été synthétisé par polymérisation enzymatique à ouverture de cycle (ROP) du RS-MLABe en présence de α -méthoxy- ω -hydroxy-PEG₁₇ et de PPL comme catalyseur. Avant la réaction, la PPL et l' α -méthoxy- ω -hydroxy-PEG₁₇ (M = 736 g/mol) ont été lyophilisés pendant 12 h. Dans un tube de 30 mL, 12,5 mg de PPL ont été mélangés avec 427 mg (2,07 mmol, 1 eq) de RS-MLABe, 77 mg (0,1 mmol, 0,05 eq) d' α -méthoxy- ω -hydroxy-PEG₁₇ et 630 μ l de toluène anhydre. La réaction a été effectuée à 60 ° C, sous une agitation à 390 tours/min pendant 72 h. La réaction a été arrêtée par l'addition de 5 mL de chloroforme. Ensuite, le mélange a été transféré dans des tubes Eppendorf et centrifugé pendant 3 min à 14 000 tours/min. Les surnageants ont été filtrés et le chloroforme a été évaporé sous pression réduite. Le polymère P8 a été dissous dans du chloroforme, puis précipité dans un large excès d'éther diéthylique froid. Après élimination du surnageant, les polymères ont été séchés sous pression réduite à température ambiante. Le PEG₁₇-*b*-PMLABe₄₇ (P8) a été analysé par RMN ¹H et SEC (Fig. 56).

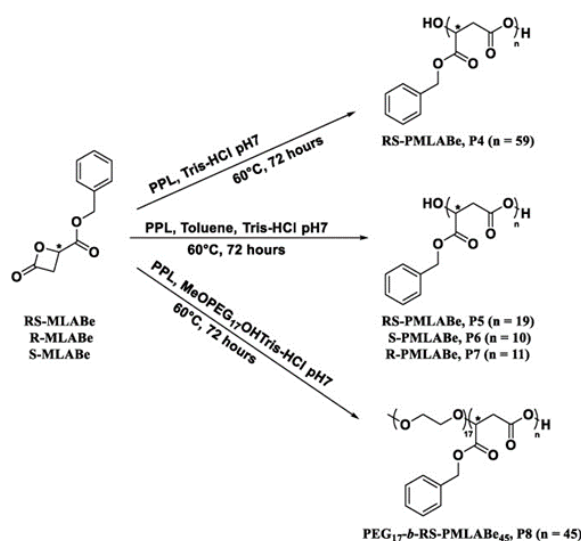


Figure 56 : Synthèse enzymatique du PMLABe P4, P5, P6 et P7 et du PEG₁₇-*b*-PMLABe₄₅ P8.

2.2.4 Préparation des NPs à base de PMLABe

2.2.4.1 Formulation de NPs pour l'évaluation de la captation cellulaire

Les NPs ont été chargées avec du DiR (DiIC18 (7) (iodure de 1,1''-dioctadécyl-3,3,3'', 3''-tétraméthylindotricarbocyanine). Le DiR est une sonde de fluorescence hydrophobe de type carbocyanine émettant dans le proche infrarouge (780 nm). Cinq mg du polymère sélectionné ont été dissous dans 100 µL de DMF, puis 50 µL de DiR (1 mg/ml dans le diméthylformamide (DMF), correspondant à 1% en poids avec le polymère dissous) ont été ajoutés. Cette solution a été rapidement ajoutée dans 1 mL d'eau distillée sous agitation vigoureuse. Les NPs se forment instantanément en raison de la nature hydrophobe ou amphiphile des (co)polymères. La suspension a été laissée sous agitation pendant 1 h. Ensuite, les NPs chargées en DiR ont été purifiées en utilisant des colonnes d'exclusion stérique Sephadex G25 (colonne PD-10) pour éliminer le DiR libre, puis caractérisées par DLS. La concentration de DiR encapsulé a été mesurée par UV à 670 nm dans une solution préparée en mélangeant 80 µL de NPs chargées de DiR avec 320 µL de DMF, et en utilisant une courbe d'étalonnage de la solution de DiR dans un mélange de DMF/H₂O (80/20). L'absorbance des solutions a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à microplaques powerwase XS / XS2 (Biotek, Winooski, VT, USA), équipé d'un logiciel d'analyse de données Gen5 (Biotek, Winooski, VT, USA). Les NPs ont été caractérisées par une diffusion dynamique de la lumière (DLS) dans l'eau à température ambiante avec une concentration en polymère de 2,5 mg/mL.

Pour l'étude réalisée dans le chapitre 2 de la partie 3, les NPs 1 et NPs 3 chargées en perchlorate de 1,1'-dioctadécyl-3,3,3', 3'-tétraméthylindodicarbocyanine (DiDoil) ont été préparées en utilisant la procédure de nanoprécipitation suivantes : 1% (wt/wt) du fluorochrome DiDoil dissous dans de l'acétone (2 mg/mL) ajouté à la solution du copolymère à bloc (5 mg) dissous dans l'acétone jusqu'à un volume final de 1 mL ; évaporation du solvant organique, et élimination du DiDoil non encapsulé par filtration sur une colonne de Sephadex PD 10. Le volume de la solution récupérée a été complété avec de l'eau distillée afin d'obtenir une concentration en NPs équivalente à 2 mg/mL de polymère et les NPs ont été caractérisées par DLS. La concentration de DiDoil encapsulé a été évaluée par UV à 660 nm en utilisant une courbe d'étalonnage d'une solution de DiDoil dans un mélange de DMF/H₂O (80/20, v/v). Un volume de 80 µL de NPs chargées en DiDoil a été mélangé avec 320 µL de DMF et la solution résultante a été analysée par UV pour mesurer l'efficacité d'encapsulation (EE) calculée en utilisant l'équation suivante :

$$EE (\%) = \frac{[DiDoil]_{\text{encapsulée}}}{[DiDoil]_0} \times 100.$$

2.2.4.2 Préparation de NPs vides pour les tests de toxicité

Les NPs ont été préparés par la méthode de nanopréciipitation comme décrit par Thioune et al. et Rivas et al.^{294, 295}. Cinq mg du polymère sélectionné ont été dissous dans 5 mL de 1,4-dioxane. Cette solution a été rapidement ajoutée dans 2 mL d'eau distillée sous agitation vigoureuse. La suspension a été laissée sous agitation pendant 15 min, et le 1,4-dioxane a été évaporé sous pression réduite à 40°C. La concentration finale de polymère était de 2,5 mg/mL. Les NPs ont été caractérisées par DLS dans l'eau à température ambiante.

2.3 Préparation des nanoparticules à base de poly(malate de benzyle), PMLABe pour l'étude réalisée dans le chapitre 2

2.3.1 Préparation molécule de fluorescence

Trois mg de DiD Oil sont solubilisés dans 3 mL de DMF. La concentration de cette solution est donc : [DiD Oil] = 1 mg/mL

2.3.2 Préparation des NPs PMLABe₇₃ [DiD Oil]

Une masse de 5 mg de PMLABe₇₃ (M=15 000 g/mol) est solubilisée dans 100 µL de DMF. 50 µL de la solution DiD Oil à 1 mg/mL (1wt%) sont rajoutés et la solution bleue est additionnée rapidement dans 1 mL d'eau sous forte agitation. Le mélange est agité à température ambiante pendant 1 heure. La solution est déposée sur une colonne Séphadex G25 (PD10). Quand tout l'échantillon a pénétré dans la colonne, 1,5 mL d'eau sont rajoutés. Quand toute l'eau a pénétré dans la colonne, 3,5 mL d'eau sont rajoutés. Les NPs chargées en DiD oil sont récupérées dans un pilulier et caractérisées par DLS.

2.3.3 Préparation des NPs PEG_{42-b}-PMLABe₆₆ [DiD Oil]

Une masse de 5 mg de PEG_{42-b}-PMLABe₆₆ (M=15 620 g/mol) est solubilisée dans 100 µL de DMF. 50 µL de la solution DiD Oil à 1 mg/mL (1wt%) sont rajoutés et la solution bleue est additionnée rapidement dans 1 mL d'eau sous forte agitation. Le mélange est agité à température ambiante pendant 1 heure. La solution est déposée sur une colonne Séphadex G25 (PD10). Quand tout l'échantillon a pénétré dans la colonne, 1,5 mL d'eau sont rajoutés. Quand toute l'eau a pénétré dans la colonne, 3,5 mL d'eau sont rajoutés. Les NPs chargées en DiD oil sont récupérées dans un pilulier et caractérisées par DLS.

2.3.4 Préparation des NPs 50wt% PEG_{42-b}-PMLABe₆₆ [DiD Oil] + 50wt% PMLABe₇₃[DiD Oil]

2,5 mg de PEG_{42-b}-PMLABe₆₆ (M=15 620 g/mol) et 2,5 mg de PMLABe₇₃ (M=15 000 g/mol) sont solubilisés dans 100 µL de DMF. 50 µL de la solution DiD Oil à 1 mg/mL (1wt%) sont

rajoutés et la solution bleue est additionnée rapidement dans 1 mL d'eau sous forte agitation. Le mélange est agité à température ambiante pendant 1 heure. La solution est déposée sur une colonne Séphadex G25 (PD10). Quand tout l'échantillon a pénétré dans la colonne, 1,5 mL d'eau sont rajoutés. Quand toute l'eau a pénétré dans la colonne, 3,5 mL d'eau sont rajoutés. Les NPs chargées en DiD oil sont récupérées dans un pilulier et caractérisées par DLS.

2.3.5 Préparation des NPs 25wt% PEG₄₂-*b*-PMLABe₆₆ [DiD Oil] + 75wt% PMLABe₇₃[DiD Oil]

1,25 mg de PEG₄₂-*b*-PMLABe₆₆ (M=15 620 g/mol) et 3,75 mg de PMLABe₇₃ (M=15 000 g/mol) sont solubilisés dans 100 µL de DMF. 50 µL de la solution DiD Oil à 1 mg/mL (1wt%) sont rajoutés et la solution bleue est additionnée rapidement dans 1 mL d'eau sous forte agitation. Le mélange est agité à température ambiante pendant 1 heure. La solution est déposée sur une colonne Séphadex G25 (PD10). Quand tout l'échantillon a pénétré dans la colonne, 1,5 mL d'eau sont rajoutés. Quand toute l'eau a pénétré dans la colonne, 3,5 mL d'eau sont rajoutés. Les NPs chargées en DiD oil sont récupérées dans un pilulier et caractérisées par DLS.

2.4 Préparation des NPs à base de dérivés du poly(acide diméthyle malique), PdiMeMLA pour l'étude réalisée dans le chapitre 3

2.4.1 Synthèse des monomères

Les lactones sélectionnées, diMeMLAHe et diMeMLABe, ont été synthétisées à partir de propionate de diéthylloxal comme décrit précédemment par Barbaud et al.^{296, 297}. En bref, le tert-butoxyde de potassium dissous dans du toluène sec a été mis en réaction avec du propionate de diéthylloxal, de l'éther couronne 18-6 et de l'iodure de méthyle. Le diéthyl-3,3-diméthyl-2-cétosuccinate **1** obtenu a été purifié par distillation donnant une huile incolore qui a été mise en réaction avec du tétrahydroborate de sodium (NaBH₄) dans de l'éthanol absolu conduisant au diéthyl-3,3-diméthylmalate **2**. Les deux groupes carboxyliques de ce produit ont été déprotégés en utilisant une solution de KOH/éthanol conduisant ainsi à l'acide 3,3-diméthylmalique **3** qui a été mis en réaction avec de l'anhydride trifluoroacétique (TFAA) suivi par l'addition soit de l'alcool benzylique anhydre, conduisant à l'acide 3-benzyloxycarbonyl-2,2-diméthyl-3-hydroxypropanoïque **4**, ou l'alcool hexylique anhydre conduisant à l'acide 3-hexyloxycarbonyl-2,2-diméthyl-3-hydroxypropanoïque **5**. Enfin, ces acides hydroxypropanoïques ont subi une réaction de Mitsunobu en présence de triphénylphosphine (TPP) et de diisopropyl l'azodicarboxylate (DIAD) conduisant aux lactones attendues, diMeMLABe **6** et diMeMLAHe **7**, avec des rendements de l'ordre de 25%, similaires à ceux donnés dans la littérature (Fig. 57)^{296, 297}. Les lactones ont ensuite été caractérisées par FT-IR et RMN ¹H.

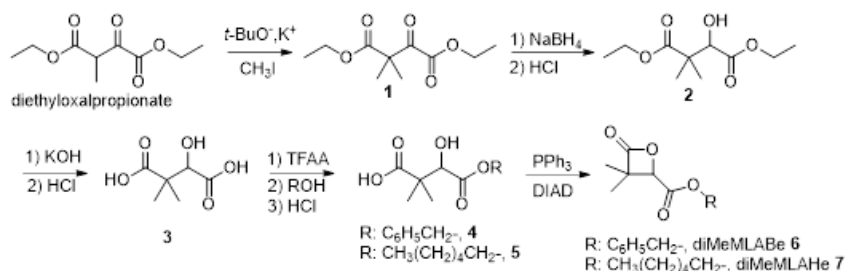


Figure 57 : Synthèse des monomères diMeMLABe et diMeMLAHe.

2.4.2 Synthèse du PdiMeMLABe₃₀

Dans une boîte à gants, l'acide 1-pyrène acétique (2,6 mg, 0,011 mmol, 1 équivalent) et le P_4 -*t*-Bu (2,1 mg, 0,008 mmol, \approx 1 équivalent) ont été introduits dans un flacon et dissous dans du THF (0,5 mL). Dans un autre flacon, 82 mg de diMeMLABe (0,352 mmol, 32 équivalents) ont été dissous dans 1 mL de THF anhydre. Les deux solutions ont été mélangées ($[\text{diMeMLABe}]_0 = 0,16 \text{ M}$) à température ambiante pendant un temps de réaction approprié. Le mélange résultant a été concentré à sec sous vide. L'homopolymère PdiMeMLABe₃₀ a été précipité dans de l'éthanol froid. Les échantillons d'homopolymère ont été caractérisés par RMN ^1H et SEC et ont été conservés sous atmosphère inerte à 4 °C.

2.4.3 Synthèse du PdiMeMLAHe₃₀

Dans la boîte à gants, l'acide 1-pyrène acétique (1,8 mg, 0,0069 mmol, 1 équivalent) et le P_4 -*t*-Bu (2,1 mg, 0,0068 mmol, \approx 1 équivalent) ont été introduits dans un flacon et dissous dans du THF (1 mL). Dans un autre flacon, 52 mg de diMeMLAHe (0,228 mmol, 33 équivalents) ont été dissous dans 2 mL de THF anhydre. Les deux solutions ont été mélangées ($[\text{diMeMLAHe}]_0 = 0,15 \text{ M}$) à température ambiante pendant un temps de réaction approprié. Le mélange résultant a été concentré à sec sous vide. L'homopolymère PdiMeMLAHe₃₀ récupéré a ensuite été précipité dans de l'heptane froid. Les échantillons d'homopolymère ont été caractérisés par RMN ^1H et SEC et ont été conservés sous atmosphère inerte à 4 °C.

2.4.4 Synthèse des copolymères à blocs amphiphiles

Dans la boîte à gants, l'acide 1-pyrène acétique (1,8 mg, 0,0069 mmol, 1 équivalent) et le P_4 -*t*-Bu (4,3 mg, 0,0068 mmol, \approx 1 équivalent) ont été introduits dans un flacon et dissous dans THF (0,5 mL). Dans un autre flacon, 50 mg de diMeMLAHe (0,226 mmol, 32 équiv), pour le copolymère PdiMeMLABe₅₄-*b*-PdiMeMLAHe₂₉, ou 77 mg de diMeMLAHe (0,339 mmol, 49 équiv), pour le copolymère PdiMeMLABe₂₇-*b*-PdiMeMLAHe₅₀ ont été dissous dans 1 mL de THF anhydre. Les deux solutions ont été mélangées ($[\text{diMeMLAHe}]_0 = 0,16 \text{ M}$) à température ambiante pendant un temps de réaction approprié. Après conversion complète du diMeMLAHe

(déterminée par FTIR), une solution de 80 mg de diMeMLABe (0,345 mmol, 49 équiv), pour le copolymère PdiMeMLABe₅₄-*b*-PdiMeMLAHe₂₉, dans 0,8 mL de THF, ou une solution de 39 mg de diMeMLABe (0,166 mmol, 24 équiv), pour le copolymère PdiMeMLABe₂₇-*b*-PdiMeMLAHe₅₀, dans 0,39 mL de THF a été ajoutée au mélange réactionnel ([diMeMLABe] = 0,16 M). Après conversion complète, le mélange résultant a été concentré à sec sous vide. Le copolymère PdiMeMLABe_{*n*}-*b*-PdiMeMLAHe_{*m*} récupéré a été dissous dans une quantité minimale d'acétone puis précipité dans de l'éthanol froid. Les échantillons de copolymère ont été caractérisés par RMN ¹H et SEC et ont été conservés sous atmosphère inerte à 4 °C.

Les deux copolymères hydrophobes ont ensuite été soumis à une hydrogénolyse catalytique permettant la déprotection spécifique des groupes latéraux d'acide carboxylique. Ils ont été dissous dans un mélange THF/éthanol (50/50 v/v%) et 20% en poids de palladium sur charbon actif, Pd/C, (quantité relative par rapport aux groupes benzyle) ont été ajoutés. Les mélanges ont été placés sous pression atmosphérique d'hydrogène (H₂) et laissés sous agitation vigoureuse pendant une nuit. Les suspensions noires ont été filtrées sur célite pour éliminer le Pd/C et les solvants ont été évaporés sous vide conduisant ainsi aux copolymères à blocs amphiphiles attendus caractérisés par RMN ¹H.

2.4.5 Préparation de NPs vides à base d'homopolymères hydrophobes

Dans un Eppendorf, 2,5 mg d'homopolymère ont été dissous dans 150 µL de DMF et ajoutés goutte à goutte à 2 ml d'eau distillée à une vitesse d'agitation de 1 400 tours/min. La solution a été agitée pendant 20 minutes. La solution a ensuite été passée à travers une colonne G25 Sephadex conduisant à des suspensions de NPs de 3,5 mL qui ont été caractérisées par DLS, zétamétrie et microscopie électronique à transmission (TEM).

2.4.6 Préparation de NPs vides à base de copolymères à blocs amphiphiles

Dans un flacon, 10 mg de PdiMeMLA₅₄-*b*-PdiMeMLAHe₂₉ ou 5 mg de PdiMeMLA₂₇-*b*-PdiMeMLAHe₅₀ ont été solubilisés dans 1 mL d'acétone puis ajoutés goutte à goutte à 2 mL de phase aqueuse sous une vitesse d'agitation de 1 400 tours/min. La solution a été agitée pendant 20 minutes et l'acétone a été éliminée sous pression réduite. Les volumes finaux des suspensions de NPs ont été ajustés à 2 mL (si nécessaire) par addition du volume adéquate de phase aqueuse, puis les NPs ont été caractérisées par DLS, zétamétrie et TEM.

2.4.7 Préparation de NPs chargées de DiR à base d'homopolymères hydrophobes

Dans un Eppendorf, 2,5 mg d'homopolymère ont été solubilisés dans 135,5 µL de DMF et 14,5 µL d'une solution de DiR/DMF à une concentration de 1 mg/mL (0,5% en poids de la masse du

polymère) ont été ajoutés. Ce mélange a ensuite été ajouté goutte à goutte à 2 ml d'eau distillée sous une vitesse d'agitation de 1 400 tours/min. La solution a été agitée pendant 20 minutes. La solution a ensuite été passée à travers une colonne de Sephadex G25 conduisant à 3,5 ml de suspensions de NP chargées en DiR. Les NPs résultantes ont été caractérisées par DLS et zétamétrie.

2.4.8 Préparation des NPs chargées en DiR à base de copolymères à blocs amphiphiles

Dans un flacon, 10 mg de PdiMeMLA_{54-b}-PdiMeMLAHe₂₉ ou 5 mg de PdiMeMLA_{27-b}-PdiMeMLAHe₅₀ ont été solubilisés dans un volume total de 1 mL d'acétone : 900 µL d'acétone et 100 µL d'une solution DiR/acétone à 1 mg/mL (1% en poids de la masse du copolymère bloc) pour le copolymère bloc PdiMeMLA_{54-b}-PdiMeMLAHe₂₉ ; 950 µL d'acétone et 50 µL de la solution DiR/acétone à 1 mg/mL (1% en poids de la masse du copolymère bloc) pour le copolymère bloc PdiMeMLA_{27-b}-PdiMeMLAHe₅₀. Ces solutions ont ensuite été ajoutées goutte à goutte à 2 mL de phase aqueuse sous une vitesse d'agitation de 1 400 tours/min. La solution a été agitée pendant 20 minutes et l'acétone a été éliminée sous pression réduite. Les échantillons ont ensuite été passés à travers une colonne G25 Sephadex conduisant à 3,5 mL de suspensions de NPs chargées en DiR qui ont été caractérisées par DLS et zétamétrie.

2.5 Evaluation de la toxicité des NPs

2.5.1 Test de Viabilité cellulaire “MTT”

En ce qui concerne le chapitre 1 de la partie 3 “Résultats et discussion”, la cytotoxicité des NPs a été évaluée à l'aide du test au bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium), MTT. Les cellules HepaRG ont été incubées avec du MTT (0,5 mg/ml) pendant 1 h à 37°C. Les cristaux formés ont été dissous dans du DMSO à température ambiante pendant 10 min, et l'absorbance a été lue à 490 nm avec un lecteur de microplaques. Les valeurs déterminées à l'aide du test au MTT, reflétant le nombre de cellules viables, ont été exprimées en pourcentage par rapport à l'absorbance déterminée dans les cultures témoins. Les cellules ont été exposées aux huit NPs à des concentrations molaires dans des polymères allant de 0,5 µM à 20 µM, correspondant à des concentrations massiques différentes, car les polymères présentent des masses molaires différentes. Les masses de polymère en grammes (g) par litre (L) obtenues sont présentées dans le tableau 5. La même gamme de concentrations molaires dans les polymères a été choisie, car les NPs avaient des diamètres relativement similaires, indiquant que les mêmes quantités de masses de polymères produiraient des nombres presque identiques de NPs.

2.5.2 Test de viabilité cellulaire “ATP”

La toxicité des NPs dans les chapitres 2 et 3 de la partie 3 “Résultats et Discussion” du manuscrit a été évaluée par le test de viabilité cellulaire ATP. Les cellules ont étéensemencées dans des plaques à 96 puits à une densité de 1×10^4 cellules par puits. Après 24h de culture, les cellules ont été traitées avec des milieux contenant des NPs pendant le temps d’incubation correspondant pour chaque expérience. Après le temps d’incubation correspondant, le milieu a été retiré et remplacé par un autre exempt de rouge de phénol. Trente minutes plus tard, un volume de CellTiter-Glo® Reagent (Luciférine coléoptère + tampon de lyse) équivalent au volume de milieu de culture cellulaire présent dans chaque puits (100 μ L) a été ajouté. Les plaques ont été placées sur un agitateur orbital pendant 2 minutes, puis l’intégralité du contenu des plaques a été transférée dans des plaques multi-puits à parois opaques, adéquates pour la culture cellulaire. Les valeurs de luminescence ont été mesurées en utilisant un luminomètre Omega Polarstar (BMG Labtech) (Fig. 58).

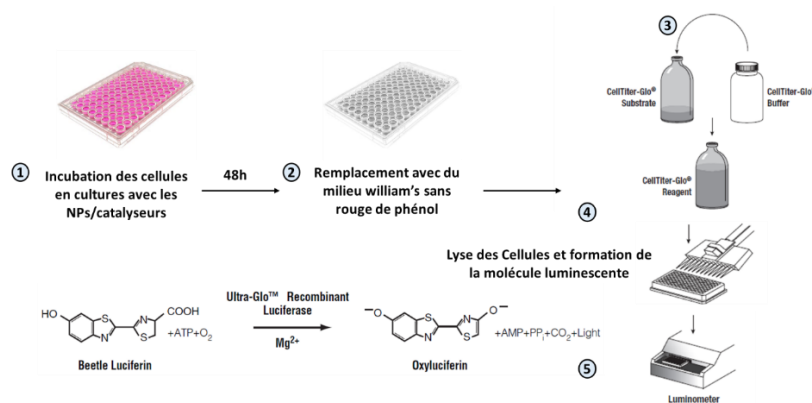


Figure 58: Illustration schématique du test de viabilité cellulaire “ATP”.

Les valeurs de luminescence obtenues sont proportionnelles au contenu cellulaire en ATP, et par suite proportionnelles aux nombres de cellules vivantes, ce qui nous a servi pour évaluer la toxicité de nos NPs.

2.6 Evaluation de la captation des NPs par cytométrie en flux

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 24 puits à une densité de $0,15 \times 10^6$ cellules par puits. Après 24h d’ensemencement, l’ancien milieu a été retiré et remplacé par un nouveau milieu contenant les NPs ($[NPs] = 25 \mu\text{g/mL}$). Après le temps d’incubation correspondant, le milieu a été à nouveau retiré et les cellules ont été lavées par du PBS. Ensuite, les cellules ont été décollées en utilisant de la trypsine (0,05% pour les cellules HepaRG ou 0,25% pour les macrophages). La fluorescence moyenne ainsi que le pourcentage de cellules fluorescentes ont été évalués par cytométrie en flux (Becton Dickinson le LSRFortessa™ X-20, Franklin Lakes,

NJ, USA) à la plateforme Biosit - Biologie, Santé, Innovation technologique - UMS Inserm 18/ CNRS 3480 – Rennes-France. Des tracés de points de la diffusion vers l'avant (Forward scatter) [FSC: axe des x, taille des événements] et de diffusion latérale (side scatter) [SSC: axe des y, structure des événements] ont permis de localiser les cellules viables avant de détecter la fluorescence émise par les NPs en utilisant le canal BV786-1A pour les NPs chargées en DiR et le canal APC-A pour les NPs chargées en DiDoil. Deux paramètres ont été analysés : le pourcentage de cellules positives qui internalisaient les NPs et l'intensité de la fluorescence (moyenne de fluorescence) reflétant l'accumulation de NPs fluorescentes dans les cellules (Fig. 59).

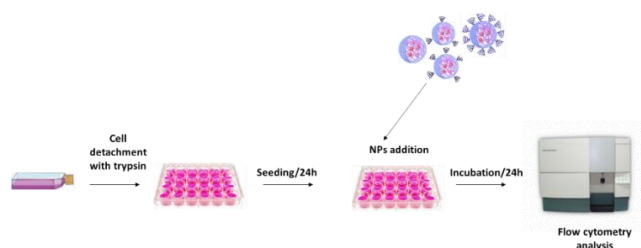


Figure 59: Illustration schématique du protocole expérimental suivi pour évaluer la captation de NPs par cytométrie en flux.

Concernant les macrophages et toutes les cellules utilisées pour la réalisation de cinétique de captation, un protocole de fixation des cellules a été adopté pour protéger le fluorochrome d'une dégradation probable. Suite au temps d'incubation des cellules avec les NPs, les cellules sont décollées par la trypsine puis transférées dans des tubes Eppendorf avant d'être centrifugées à la vitesse de 2 800 tours/min. Après centrifugation, le surnageant a été éliminé et 300 μL de paraformaldéhyde (PFA) 4% ont été transférés dans les tubes qui ont été placés à 4 °C pendant 15 minutes. Ensuite, les tubes sont centrifugés à nouveau à la même vitesse de 2 800 tours/min, le surnageant constitué de PFA en excès a été éliminé et remplacé par 400 μL de PBS. Après fixation, l'ensemble des tubes ont été stockés à 4 °C avant d'être passés en cytométrie.

2.7 Evaluation de l'internalisation des NPs par microscopie confocale

Après avoir traité les cellules par les NPs et évalué la fluorescence cellulaire, il était important de confirmer la localisation des NPs dans les cellules (localisation membranaire, cytoplasmique, nucléaire...). Pour cette raison, nous avons utilisé la microscopie confocale pour déterminer l'endroit des NPs captées. Dans cet objectif, nous avons ensemencé les cellules en question dans des chambres de culture de verre (Chamber slide system, 8puits, NUNC) à une densité de $4,5 \cdot 10^3$ cellules/puits. Vingt-quatre heures plus tard, un volume de 300 μL de NPs [25 $\mu\text{g}/\text{mL}$] a été ajouté à chaque puits. Après le temps d'incubation correspondant, les monocouches cellulaires

ont été lavées deux fois au PBS puis fixées avec 100 μ L de PFA 4% pendant une durée de 15 minutes à 4 °C. Ensuite, les cellules ont été lavées à nouveau par du PBS puis les noyaux des cellules ont été colorés par le Hoechst 3342 (Sigma-Aldrich) : la solution mère de Hoechst (5 mg/mL) a été diluée au 1/5000 dans du PBS et 100 μ L de ce mélange sont transférés dans les puits. Après 10 min d'incubation à température ambiante, deux lavages au PBS sont effectués et les chambres de cultures sont décollées de la lame support. Une goutte du liquide de montage (Ultamount, Dako) est déposée et une lamelle est fixée sur la lame. Les cellules sont observées en microscopie confocale grâce à l'appareil SP8 (SP8, Leica. Plateforme MRic photonics Biosit-BiogenOuest).

3 Résultats et discussion

3.1 Chapitre 1. Etude de l'influence de la méthode de synthèse du PMLA_{Be} sur la biocompatibilité et la captation cellulaire des NPs correspondantes

3.1.1 Contexte générale de l'étude

Dans le cadre du traitement de patients atteints de cancers hépatiques à des stades avancés, l'application de la nanomédecine en thérapie pourrait être une approche prometteuse pour améliorer le résultat thérapeutique de principes actifs. L'encapsulation de ces derniers dans des nanovecteurs pourrait améliorer leur biocompatibilité, leur biodisponibilité, leur biodistribution, leur pharmacocinétique et donc leur efficacité en favorisant leur distribution au niveau des cellules tumorales.

Cependant, les nanovecteurs doivent répondre à un cahier des charges très strict pour être appliqués en médecine. Ils doivent être biocompatibles et (bio)dégradables, facile à produire et capable d'encapsuler des quantités importantes de principes actifs.

Les polyesters aliphatiques, comme le poly(acide malique) (PMLA) et ses dérivés, semblent être des candidats appropriés pour l'élaboration de systèmes de vectorisation de principes actifs²¹⁴. La synthèse de ce type de polyesters est normalement réalisée par polymérisation par ouverture de cycle (ROP) d'esters cycliques correspondants tels que le lactide et la β -propiolactone. Les réactions ROP impliquent l'usage d'amorceurs cationiques ou anioniques en présence, le plus souvent, de catalyseurs organométalliques dont la présence même à l'état de traces peut induire une toxicité importante *in vivo*^{283, 284}.

Dans ce contexte, l'utilisation d'enzymes comme les lipases, en tant que catalyseurs des réactions de ROP, peut être une solution élégante pour le remplacement des amorceurs et catalyseurs chimiques.

Par ailleurs, la forme des NPs semble avoir une influence sur leur toxicité et leur captation par les cellules traitées. Enfin, la morphologie des nanoparticules peut être influencée par la conformation et/ou la chiralité des polymères qui les constituent.

Dans le but d'étudier l'effet du mode de synthèse des polymères (chimique vs enzymatique) et la chiralité des unités monomères constituant ces polymères sur la captation et la toxicité des NPs correspondantes, nous avons lancé un projet de recherche en collaboration avec Hubert Casajus lors de son doctorat réalisé au sein de l'équipe Chimie Organique aux Interfaces (Corint)

de l'Institut des Sciences Chimiques de Rennes (ISCR) située dans les locaux de l'Ecole Nationale de Chimie de Rennes (ENSCR).

Ce travail vise à comparer la toxicité aiguë et chronique de NPs préparées à partir de dérivés du poly(malate de benzyle) (PMLABe) synthétisés soit par polymérisation chimique soit par polymérisation enzymatique à partir de monomères racémiques et optiquement actifs. La captation des NPs par les cellules HepaRG et des macrophages humains été également évaluée. Dans cet objectif, nous avons synthétisé et caractérisé une série de huit dérivés du PMLABe, formulé les NPs correspondantes et, enfin, étudié leur toxicité sur les cellules HepaRG progénitrices et différenciées ainsi que leur captation par les cellules HepaRG et les macrophages humains. Ce travail a fait l'objet d'une publication dans le journal *Polymers* en 2018 pour laquelle je suis co-premier signataire.






3.1.2 Cell uptake and biocompatibility of nanoparticles prepared from poly(benzyl malate) (co)polymers obtained through Chemical and enzymatic polymerization in human HepaRG cells and primary macrophages.

Hubert Casajus^{1,*}, Saad Saba^{2,*}, Manuel Vlach², Elise Vène², Catherine Ribault², Sylvain Tranchimand¹, Caroline Nugier-Chauvin¹, Eric Dubreucq³, Pascal Loyer^{2,§}, Sandrine Cammas-Marion^{1,2,§}, Nicolas Lepareur^{2,4}

Polymers (Basel). 2018 Nov 10;10(11). pii: E1244. doi: 10.3390/polym10111244.

Article

Cell Uptake and Biocompatibility of Nanoparticles Prepared from Poly(benzyl malate) (Co)polymers Obtained through Chemical and Enzymatic Polymerization in Human HepaRG Cells and Primary Macrophages

Hubert Casajus ^{1,†}, Saad Saba ^{2,†}, Manuel Vlach ², Elise Vène ², Catherine Ribault ², Sylvain Tranchimand ¹, Caroline Nugier-Chauvin ¹, Eric Dubreucq ³, Pascal Loyer ^{2,*}, Sandrine Cammas-Marion ^{1,2,*} and Nicolas Lepareur ^{2,4,*}

¹ Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes, Univ Rennes, CNRS, ISCR, UMR 6226, F-35000 Rennes, France; casajus.hubert@gmail.com (H.C.); sylvain.tranchimand@ensc-rennes.fr (S.T.); caroline.nugier@ensc-rennes.fr (C.N.-C.)

² Univ Rennes, INSERM, INRA, Institut NUMECAN (Nutrition Metabolisms and Cancer) UMR_A 1341, UMR_S 1241, F-35000 Rennes, France; saad.saba@etudiant.univ-rennes1.fr (S.S.); manuel.vlach@univ-rennes1.fr (M.V.); elise.vene@univ-rennes1.fr (E.V.); catherine.ribault@univ-rennes1.fr (C.R.)

³ Montpellier SupAgro, INRA, CIRAD, Univ Montpellier, UMR 1208 IATE, F-34060 Montpellier, France; eric.dubreucq@supagro.fr

⁴ Comprehensive Cancer Center Eugène Marquis, F-35000 Rennes, France

* Correspondence: pascal.loyer@univ-rennes1.fr (P.L.); sandrine.marion.1@ensc-rennes.fr (S.C.-M.); n.lepareur@rennes.unicancer.fr (N.L.); Tel.: +33-223-233-873 (P.L.); +33-223-238-109 (S.C.-M.), +33-299-253-144 (N.L.)

† These authors contributed equally to the work.

Received: 16 October 2018; Accepted: 5 November 2018; Published: 10 November 2018



Abstract: The design of drug-loaded nanoparticles (NPs) appears to be a suitable strategy for the prolonged plasma concentration of therapeutic payloads, higher bioavailability, and the reduction of side effects compared with classical chemotherapies. In most cases, NPs are prepared from (co)polymers obtained through chemical polymerization. However, procedures have been developed to synthesize some polymers via enzymatic polymerization in the absence of chemical initiators. The aim of this work was to compare the acute in vitro cytotoxicities and cell uptake of NPs prepared from poly(benzyl malate) (PMLABe) synthesized by chemical and enzymatic polymerization. Herein, we report the synthesis and characterization of eight PMLABe-based polymers. Corresponding NPs were produced, their cytotoxicity was studied in hepatoma HepaRG cells, and their uptake by primary macrophages and HepaRG cells was measured. In vitro cell viability evidenced a mild toxicity of the NPs only at high concentrations/densities of NPs in culture media. These data did not evidence a higher biocompatibility of the NPs prepared from enzymatic polymerization, and further demonstrated that chemical polymerization and the nanoprecipitation procedure led to biocompatible PMLABe-based NPs. In contrast, NPs produced from enzymatically synthesized polymers were more efficiently internalized than NPs produced from chemically synthesized polymers. The efficient uptake, combined with low cytotoxicity, indicate that PMLABe-based NPs are suitable nanovectors for drug delivery, deserving further evaluation in vivo to target either hepatocytes or resident liver macrophages.

Keywords: enzymatic polymerization; chemical polymerization; poly(benzyl malate); biocompatible nanoparticles; cell uptake; cytotoxicity; HepaRG cells; human macrophages

1. Introduction

Biocompatible polymeric nanoparticles combined with the design of more specific therapeutic molecules are developed toward the goal of reducing the drug amounts administrated to patients, simplifying protocols of administration, and overcoming side effects. This research is based on the “Magic Bullet” concept first coined by Paul Ehrlich [1] at the beginning of the 20th century, which was a concept that inspired generations of scientists in the design of more efficient therapeutic molecules and vectorized therapies. Since the end of the 20th century, progress in this area has been significant, and has led to the design of nanovectors approved by the United States (US) Food and Drug Administration (FDA), or in pre-clinical or clinical phases [2–7].

The design of nanovectors for clinical applications implies very strict specifications. They must: (i) be biocompatible and/or (bio)degradable; (ii) be easy to produce in Good Manufacturing Practice (GMP) grade for clinical use; (iii) allow the encapsulation of a significant amount of active molecules such as drugs, genes, or peptides [8]; (iv) lead to the controlled release of active molecules at the targeted sites (cells, tissues, and/or organs) through the presence of targeting agents (antibodies, peptides, vitamins) [9–11]; and (v) have controlled surface characteristics to minimize their recognition by the immune system. These nanovectors can take the form of active molecule–polymers conjugates [12], nanoparticles [13], micelles [14], or polymersomes [15].

Aliphatic polyesters are produced for multiple industrial use such as the plastic bag industry instead of poly(ethylene), which is a non-biodegradable polymer derived directly from petrochemicals [16]. Their remarkable properties of biodegradability and biocompatibility make them also suitable for biomedical and pharmacological applications, including the preparation of nanoparticles (NPs) for drug delivery [11,17].

Such aliphatic polyesters are usually synthesized by the polymerization of the corresponding monomer(s) using chemically-based initiators [18]. On the other hand, some of these polyesters can be extracted from fungi, such as for instance the natural poly(malic acid) extracted from *Physarum polycephalum* [19], or may be prepared by biotechnological means using a large-scale culture of bacteria as for polyhydroxyalkanoates or (PHAs) [20]. The advantage of these biotechnological pathways relies mainly in the use of so-called “green” synthetic processes. However, it is difficult, if not impossible, to control the molar masses of the polymers, and only chiral polymers are obtained when the repeating unit of the block (co)polymers has one or more asymmetric carbon(s). Therefore, the so-called conventional “chemical” methods of synthesis cannot, at present, be totally ruled out. However, authors have pointed out the question of whether the initiators and/or catalysts that are used during these polymerization reactions might induce cytotoxicities when the corresponding polymers are in contact with cells in living organisms, even if initiators and catalysts are present only as traces in the final material [21]. Among the aliphatic polyesters’ family, poly(malic acid) (PMLA) and its derivatives have raised a growing interest in the biomedical field because of their properties of biocompatibility and biodegradability [22,23] and potential applications in drug delivery. In addition to these remarkable properties, a whole family of PMLA derivatives can be obtained by modifying the synthesis of the monomers and the reactions of the homopolymerization and copolymerization of these monomers [24,25]. We and others have recently developed PMLA-based nanovectors, taking advantage of the exceptional properties of such polymers [22,24,26–28]. The first nanovector is a polymer-drug conjugate constituted of a PMLA whose lateral carboxylic acids were modified to graft different molecules of interest: doxorubicin as a drug, poly(ethylene glycol) to improve the hydrophilic properties of the conjugate, and N-acetyl galactosamine as a targeting agent [29]. Furthermore, we also prepared NPs from either hydrophobic poly(benzyl malate) (PMLABe) or amphiphilic poly(ethylene glycol)-*block*-PMLABe (PEG-*b*-PMLABe) having or not having the biotin as a targeting agent at the free end of the PEG block [22,23,30,31].

This family of polyesters is obtained by the anionic ring-opening polymerization (AROP) of alkyl malolactonates (monomers) in the presence of tetraethylammonium carboxylate salts, and more particularly tetraethylammonium benzoate [32]. It is important to note that this last initiator is

a powerful neurotoxin [33]. Therefore, the use of biocatalysts, such as lipases, is an interesting alternative to avoid the presence of traces of toxic chemical initiators in polymeric materials. Lipases are enzymes belonging to the family of hydrolases, which is class 3 in the EC nomenclature (Enzyme Commission numbers). More specifically, they are serine hydrolases that have the particularity of being active in the presence of an interface, called activation, between an aqueous phase (water or buffer) and an organic phase (hydrophobic substrate and/or organic solvent). Present in plants as well as in insects, animals, and microorganisms, lipases play a key role in the degradation and synthesis of lipids [34]. The physiological reaction catalyzed by lipases is the hydrolysis of mono, di, and triglycerides. However, they are also capable of synthesizing esters, either by esterification or transesterification, when the activity of the water is low. This property is one of the main reasons for the use of this class of enzymes, along with their high selectivity during hydrolysis [34]. More than 100 three-dimensional structures are deposited on the Protein Data Bank (PDB), which has made it possible to highlight the highly conserved structural elements specific to lipases [34]. The canonical mechanism of hydrolysis of ester functions involves the three amino acids of the catalytic triad, namely, aspartate, histidine, and serine [35].

These enzymes have been studied as potential catalysts in the ring-opening polymerization of unsubstituted lactones such as ϵ -caprolactones [36]. The mechanism of this enzymatic catalyzed ring opening polymerization of unsubstituted lactones has been extensively studied and described in the literature: it occurs through the canonical mechanism described for the hydrolysis of esters' functions [37–39]. However, despite the interest of such enzymatic polymerization, several technological barriers still need to be overcome to completely replace the chemical initiators/catalysts. Indeed, enzymatic polymerizations are, to date, less controlled than chemical ones [40–42]. Nevertheless, we recently set up conditions to synthesize well-defined poly(benzyl malate) (PMLABe) derivatives of high molar masses through the enzymatic polymerization of benzyl malolactonate (MLABe) in the presence of pancreatic porcine lipase (PPL) [43].

Taking advantage of the availability of (co)polymers synthesized by polymerization in the presence of chemical initiators and enzymatic polymerization, the aim of this work was to compare the acute in vitro cytotoxicity of NPs prepared from PMLABe derivatives synthesized either by chemical (PMLABe chemicals) or enzymatic (PMLABe enzymatic) polymerization and their cell uptake. For that purpose, we have synthesized and characterized a series of eight PMLABe-based polymers, formulated the corresponding NPs, and studied their cytotoxicity in progenitor and differentiated hepatoma HepaRG cells, and measured their uptake by both primary macrophages and HepaRG cells.

2. Materials and Methods

2.1. Materials and Apparatus

All of the chemicals were used as received. α -methoxy, ω -carboxylic acid PEG₄₅ ($\overline{M}w = 2000$ g/mol, $n = 45$) and α -hydroxyl, ω -methoxy-PEG₁₇ ($\overline{M}w = 736$ g/mol, $n = 17$) were purchased from PEG Iris Biotech. Porcine pancreatic lipase (PPL) was purchased from Sigma-Aldrich Co. (Saint Louis, MO, USA).

Nuclear magnetic resonance spectroscopy: The standard temperature was adjusted to 298K. NMR spectra were recorded on a Bruker Avance III 400 spectrometer (Billerica, MA, USA) operating at 400.13 MHz for ^1H , equipped with a BBFO probe with a Z-gradient coil and a GREAT 1/10 gradient unit. The zg30 Bruker pulse program was used for 1D ^1H NMR, with a TD of 64 k, a relaxation delay $d1 = 2$ s, and eight scans. The spectrum width was set to 18 ppm. Fourier transform of the acquired FID was performed without any apodization in most cases.

Infrared spectroscopy: Fourier transform infrared (FT-IR) spectra were recorded on an Avatar 320FT-IR Thermo Nicolet spectrometer (ThermoFischer, Waltham, MA, USA) between $500\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ by direct measurement.

Size exclusion chromatography: Mass average molar mass (\overline{M}_w) and dispersity ($\text{Đ} = \overline{M}_w/\overline{M}_n$) values were measured by size exclusion chromatography (SEC) in THF at 40 °C (flow rate = 1.0 mL/min) on a GPC2502 Viscotek apparatus (Malvern Instruments, Malvern, UK) equipped with a refractive index detector Viscotek VE 3580 RI, a guard column Viscotek TGuard, Org 10 mm \times 4.6 mm, a LT5000L gel column (for samples soluble in organic medium) 300 mm \times 7.8 mm, and a GPC/SEC OmniSEC Software. The polymer samples were dissolved in THF (2 mg/mL). All of the elution curves were calibrated with polystyrene standards.

Polarimetry: Optical rotations were measured using a Perkin-Elmer 341 polarimeter (Waltham, MA, USA) with a sodium lamp (wavelength = 589 nm). Samples were dissolved in chloroform (concentration around 10 mg/mL) and transferred into the polarimeter microcell (length = 1 dm). Measures were performed at room temperature.

Dynamic light scattering: The size and polydispersity index (PDI) of the formulations were measured by dynamic light scattering using a Zetasizer Nano-ZR90 (Malvern Instruments, Malvern, UK) apparatus at 25 °C, an He-Ne laser at 633 nm, and a detection angle of 90°. Data were processed by the Zetasizer Software v7.11 (Malvern Instruments, Malvern, UK).

Flow cytometry: Cell monolayers were detached with trypsin and analyzed by flow cytometry (Becton Dickinson le LSRFortessa™ X-20, Franklin Lakes, NJ, USA), using the cytometry core facility of the Biology and Health Federative research structure Biosit, Rennes, France to quantify the fluorescence emitted by the DiIC18 (7) (1,1"-dioctadecyl-3,3,3",3"-tetramethylindotricarbocyanine iodide) (DiR)-loaded NPs within cells. Cytometry data were analyzed using DIVA software (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

2.2. Synthesis of Monomers and Polymers

Synthesis of racemic and optically active MLABe: RS, R, and S-MLABe were synthesized as previously described [32]. Briefly, DL, L, or D-aspartic acid (1 eq) was reacted with sodium bromide (5.5 eq) and sodium nitrite (1.2 eq) in 2N H₂SO₄ leading, after recrystallization in acetonitrile, to the corresponding pure RS, S, or R-bromosuccinic acid. The racemic or optically active bromosuccinic acid was dissolved in anhydrous THF and reacted with trifluoroacetic anhydride (1.3 eq), leading to the corresponding racemic or optically active bromosuccinic anhydride, which was immediately reacted with benzyl alcohol (1 eq) to obtain the corresponding mixture of racemic or optically active monoesters. The pH of this mixture of racemic or optically active monoesters was increased to 7.2 by addition of 2N NaOH; the resulting aqueous solution was mixed with dichloromethane, and the biphasic medium was heated at 45 °C. After purification (column chromatography and distillation under vacuum), the pure RS, R, or S-MLABe was obtained and characterized by FT-IR and ¹H NMR (Figure SI).

RS-MLABe (Figures SI 1.1 and SI 2.1):

FT-IR (ν , cm^{-1}): 1840 (C=O, lactone) 1750 (C=O, ester)

¹H NMR (400 MHz, Acetone-*d*₆), δ (ppm): 7.47–7.28 (m, 5H), 5.27 (s, 2H), 5.11 (dd, *J* = 6.7, 4.4 Hz, 1H), 4.00–3.60 (dd, *J* = 16.5, 6.7 Hz, 1H), 3.72 (dd, *J* = 16.5, 4.4 Hz, 1H).

S-MLABe (Figures SI 1.2 and 2.2):

FT-IR (ν , cm^{-1}): 1840 (C=O, lactone) 1750 (C=O, ester)

¹H NMR (400 MHz, Acetone-*d*₆), δ (ppm): 7.47–7.28 (m, 5H), 5.27 (s, 2H), 5.11 (dd, *J* = 6.7, 4.4 Hz, 1H), 4.00–3.60 (dd, *J* = 16.5, 6.7 Hz, 1H), 3.72 (dd, *J* = 16.5, 4.4 Hz, 1H).

R-MLABe (Figures SI 1.3 and 2.3):

FT-IR (ν , cm^{-1}): 1840 (C=O, lactone) 1750 (C=O, ester)

¹H NMR (400 MHz, Acetone-*d*₆), δ (ppm): 7.47–7.28 (m, 5H), 5.27 (s, 2H), 5.11 (dd, *J* = 6.7, 4.4 Hz, 1H), 4.00–3.60 (dd, *J* = 16.5, 6.7 Hz, 1H), 3.72 (dd, *J* = 16.5, 4.4 Hz, 1H).

Chemical polymerization of RS and R-MLABe: The RS-PMLABe (P1) and S-PMLABe (P2) were synthesized as previously described [32] by anionic ring-opening polymerization (AROP) of the

RS-MLABe and R-MLABe, respectively, in presence of tetraethylammonium benzoate as initiator. The theoretical molar mass (30,000 g/mol) was fixed by the ratio monomer/initiator. Both polymers were purified by precipitation into ethanol. After drying under vacuum, the RS-PMLABe and S-PMLABe were analyzed by ^1H NMR, SEC, and polarimetry.

RS-PMLABe (P1): ^1H NMR (400 MHz, Acetone- d_6) δ (ppm): 7.40–7.25 (m, 5nH), 5.55 (m, 1nH), 5.16 (m, 2nH), 3.24–2.67 (m, 2nH)—Figure SI 3.1. SEC (THF, 40 °C, polystyrene standards): $\overline{M}_w = 14,850$ g/mol, $\overline{D} = 1.60$. $[\alpha]_D = 0$;

S-PMLABe (P2): ^1H NMR (400 MHz, Acetone- d_6) δ (ppm): 7.40–7.25 (m, 5nH), 5.55 (m, 1nH), 5.16 (m, 2nH), 3.24–2.67 (m, 2nH)—Figure SI 3.2. SEC (THF, 40 °C, polystyrene standards): impossible to measure in THF. $[\alpha]_D = -10.7$.

The PEG₄₅-*b*-PMLABe₇₃ (P3) was synthesized as previously described [23] through the AROP of RS-MLABe in presence of α -methoxy, ω -carboxylate PEG₄₅ tetraethylammonium salt as initiator, in anhydrous THF. In this case also, the PMLABe molar mass was set by the ratio monomer/initiator, and selected to be 15,000 g/mol. The resulting block copolymer was purified by precipitation in ethanol. After drying under vacuum, the pure block copolymer was analyzed by ^1H NMR and SEC.

PEG₄₅-*b*-PMLABe₇₃ (P3): ^1H NMR (400 MHz; Acetone- d_6), δ (ppm): 7.40–7.20(m, 5nH), 5.60–5.49 (m, 1nH), 5.40 (m, 2nH), 3.60 (m, 4mH (m = 45)), 3.10–2.80 (m, 2nH)—Figure SI 3.3. $M_{\text{NMR}} = 15,040$ g/mol for the PMLABe block (n = 73). SEC (THF, 40 °C, polystyrene standards): $\overline{M}_w = 9600$ g/mol, $\overline{D} = 1.30$.

Enzymatic polymerization of RS, R, and S-MLABe: The RS-PMLABe P4 was synthesized as described previously [43] by ring-opening polymerization of the RS-MLABe in the presence of porcine pancreatic lipase (PPL) without toluene. Experiments were realized in a 24-multi reactor Büchi Syncore Line (Flawil, Switzerland). In a 30-mL tube, PPL (8.4 mg) was mixed with pure RS-MLABe (336 mg) and Tris/HCl buffer (125 μL , pH = 7, 105 mM). The mixture was stirred at 390 rpm, and the temperature was controlled at 60 °C. After 72 h, reaction was stopped by the addition of 3 mL of THF and 3 mL of chloroform. The mixture was then transferred into a separatory funnel. Separations were realized by adding 15 mL of distilled water and 15 mL of chloroform. Organic phases were dried over MgSO_4 and filtered. Finally, solvents were evaporated under reduced pressure. The RS-PMLABe P4 was dissolved in chloroform and then precipitated in a large excess of cold diethyl ether. After elimination of the supernatant, the polymer was dried under vacuum and analyzed by ^1H NMR, SEC, and polarimetry.

RS-PMLABe (P4): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.25 (m, 5nH), 5.49 (m, 1nH), 5.08 (m, 2nH), 2.88 (m, 2nH)—Figure SI 3.4. SEC (THF, 40 °C, polystyrene standards): $\overline{M}_w = 12,250$ g/mol, $\overline{D} = 1.4$. $[\alpha]_D = 0$.

The RS-PMLABe P5, the S-PMLABe P6, and the R-PMLABe P7 were obtained as described previously [43] by ring-opening polymerization of the RS-MLABe, R-MLABe, and S-MLABe, respectively, in the presence of porcine pancreatic lipase (PPL) with toluene. Experiments were realized in a 24-multi reactor Büchi Syncore Line. In a 30-mL tube, PPL (8.4 mg) was mixed with RS-MLABe, R-MLABe, or S-MLABe (338 mg), Tris/HCl (333 μL , pH = 7, 105 mM), and toluene (667 μL). The final volume was 1 mL. The reaction mixtures were stirred at 390 rpm, and the temperature was maintained at 60 °C. After 72 h, reaction was stopped by the addition of 3 mL of THF and 3 mL of chloroform. The mixtures were then transferred into a separatory funnel. Separations were realized by adding 15 mL of distilled water and 15 mL of chloroform. Organic phases were dried over MgSO_4 and filtered. Finally, solvents were evaporated under reduced pressure. The RS-PMLABe P5, S-PMLABe P6, and R-PMLABe P7 were dissolved in chloroform, and then precipitated in a large excess of cold diethyl ether. After elimination of the supernatant, polymers were dried under vacuum and analyzed by ^1H NMR, SEC, and polarimetry.

RS-PMLABe (P5): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.25 (m, 5nH), 5.49 (m, 1nH), 5.08 (m, 2nH), 2.88 (m, 2nH)—Figure SI 3.5. SEC (THF, 40 °C, Standards Polystyrene): $\overline{M}_w = 3850$ g/mol, $\overline{D} = 1.5$. $[\alpha]_D = -3$.

S-PMLABe (P6): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.25 (m, 5nH), 5.49 (m, 1nH), 5.08 (m, 2nH), 2.88 (m, 2nH)—Figure SI 3.6. SEC (THF, 40 °C, polystyrene standards): $\bar{M}_w = 2000$ g/mol, $\bar{D} = 1.50$. $[\alpha]_D = -11$.

R-PMLABe (P7): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.25 (m, 5nH), 5.49 (m, 1nH), 5.08 (m, 2nH), 2.88 (m, 2nH)—Figure SI 3.7. SEC (THF, 40 °C, polystyrene standards): $\bar{M}_w = 2300$ g/mol, $\bar{D} = 1.40$. $[\alpha]_D = +18$.

The PEG₁₇-*b*-PMLABe₄₇ (P8) was synthesized by enzymatic ring opening polymerization (ROP) of RS-MLABe in the presence of α -methoxy- ω -hydroxy-PEG₁₇ and PPL as the catalyst. Before the reaction, the PPL and the α -methoxy- ω -hydroxy-PEG₁₇ ($M_w = 736$ g/mol) were lyophilized for 12 h. In a 30-mL tube, PPL (12.5 mg) was mixed with 427 mg (2.07 mmol, 1eq.) of RS-MLABe, 77 mg (0.1 mmol, 0.05 eq) of α -methoxy- ω -hydroxy-PEG₁₇, and anhydrous toluene (630 μL). The reaction was performed at 60 °C at 390 rpm during 72 h. The reaction was stopped by the addition of 5 mL of chloroform. Then, the mixture was transferred in Eppendorf tubes and centrifuged for 3 min at 14,000 rpm. Supernatants were filtered, and the chloroform was evaporated under reduced pressure. Polymer P8 was dissolved in chloroform, and then precipitated in a large excess of cold diethyl ether. After elimination of the supernatant, polymers were dried under reduced pressure at room temperature. The PEG₁₇-*b*-PMLABe₄₇ (P8) was analyzed by ^1H NMR (Figure SI) and SEC.

PEG₁₇-*b*-PMLABe₄₇ (P8): ^1H NMR (400 MHz, Acetone-*d*₆) δ (ppm): 7.57–7.07 (m, 5nH), 5.55 (m, 1nH), 5.16 (m, 2nH), 3.60 (m, 4mH), 3.24–2.67 (m, 2nH).—Figure SI 3.8. SEC (THF, 40 °C, 1 mL/min, polystyrene standards): $\bar{M}_w = 9650$ g/mol $\bar{D} = 1.50$.

2.3. Formulation of PMLABe-Based Nanoparticles

Formulation of NPs for the cell uptake assays: NPs were loaded with DiR (DiIC18 (7) (1,1''-dioctadecyl-3,3,3'',3''-tetramethylindotricarbocyanine iodide)). DiR is a hydrophobic carbocyanine-type probe emitting in the near infrared (780 nm). Five mg of the selected polymer were dissolved in 100 μL of DMF, and then 50 μL of DiR (1 mg/mL in dimethylformamide (DMF), corresponding to 1 wt % with the dissolved polymer) was added. This solution was rapidly added into 1 mL of distilled water under vigorous stirring. The nanoparticles formed instantly because of the hydrophobic or amphiphilic nature of the (co)polymers. The suspension was left under stirring for 1 h. Then, DiR-loaded NPs were purified using Sephadex steric exclusion columns (PD-10 column) to eliminate free DiR. The concentration of loaded DiR was measured by UV at 670 nm in a solution prepared by mixing 80 μL of the DiR-loaded nanoparticles with 320 μL of DMF, and using a calibration curve of DiR solution in a mixture of DMF/H₂O (80/20). The absorbance of the solutions was measured using a Microplate Spectrophotometer powerwase XS/XS2 (Biotek, Winooski, VT, USA), equipped with Gen5 Data Analysis Software (Biotek, Winooski, VT, USA). The NPs were characterized by dynamic light scattering (DLS) in water at room temperature with a concentration in polymer of 2.5 mg/mL.

Formulation of NPs for the acute toxicity: NPs were prepared by the nanoprecipitation method as described described [44,45]. Five mg of the selected polymer were dissolved in five mL of 1,4-dioxane. This solution was rapidly added into two mL of distilled water under vigorous stirring. The suspension was left under stirring during 15 min, and the 1,4-dioxane was evaporated under reduced pressure at 40 °C. The final polymer concentration was 2.5 mg/mL. The NPs were characterized by dynamic light scattering (DLS) in water at room temperature with a concentration in polymer of 2.5 mg/mL.

2.4. In Vitro Assays

HepaRG culture: For all of the studies, proliferating progenitors HepaRG cells were seeded at a density of $3 \cdot 10^4$ cells/cm² and cultured as previously described [46], in William's E medium (Lonza, Basel, Switzerland) supplemented with 2 mM of glutamine (Gibco, ThermoFischer, Waltham, MA, USA), 5 mg/L of insulin (Sigma, Saint Louis, MO, USA), 10^{-2} mM of hydrocortisone hemisuccinate, and 10% of fetal calf serum (FCS) (Lonza, Basel, Switzerland). HepaRG cells were cultured in William's

E medium supplemented with 10% of FCS, 50 units/mL of penicillin, 50 µg/mL of streptomycin, 5 µg/mL of insulin, 2 mM of L-glutamine, and 50 µM of hydrocortisone hemisuccinate.

Primary macrophage culture: Peripheral blood mononuclear cells were purified from human buffy coat (Etablissement Français du Sang, Rennes, France) by differential centrifugation on UNI-SEP maxi U10 (Novamed, Jerusalem, Israel). The experiments were performed in compliance with the French legislation on blood donation and blood products' use and safety. Monocytes from healthy donors were enriched using a human CD14 separation kit (Microbeads; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), plated at a density of 0.5×10^6 cells per well in 24-well plates, and cultured at 37 °C with 5% humidified CO₂ in RPMI 1640 medium supplemented with 100 IU/mL of penicillin, 100 mg/mL of streptomycin, 2 mM of L-glutamine, and 10% FCS BioWhittaker®. Macrophages were obtained after differentiation from monocytes by incubation with 50 ng/mL of rhGM-CSF in RPMI 1640 medium for seven days, as previously described [47].

Cytotoxicity assays: The cytotoxicity was assessed using the human HepaRG hepatoma cell line and the Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) assay. Briefly, cells were incubated with MTT (0.5 mg/mL) for 1 h at 37 °C. The formed crystals were dissolved in DMSO at room temperature for 10 min, and the absorbance was read at 490 nm with a microplate reader. The MTT values reflecting the number of viable cells were expressed in percentage relative to the absorbance determined in control cultures. The cells were exposed to the eight NPs at molar concentrations in polymers ranging from 0.5 µM to 20 µM, corresponding to different mass concentrations, since the polymers exhibit different molar masses. The polymer masses in grams per liter (L) were the following: NPs 1: 15×10^{-3} to 0.6 g/L; NPs 2: 15×10^{-3} to 0.6 g/L; NPs 3: 7.5×10^{-3} to 0.3 g/L; NPs 4: 6.125×10^{-3} to 0.245 g/L; NPs 5: 1.925×10^{-3} to 0.077 g/L; NPs 6: 10^{-3} to 0.04 g/L; NPs 7: 1.15×10^{-3} to 0.046 g/L; NPs 8: 4.8×10^{-3} to 0.193 g/L. The same range of molar concentrations in polymers was chosen, since the NPs had relatively similar diameters, indicating that the same amounts of masses of polymers would produce almost nearly identical numbers of NPs. The 5 mg of polymers that was used to prepare NPs (2 mL suspension of water) produced the following numbers of NPs: NPs 1 = 9.9×10^{11} , NPs 2 = 1.5×10^{12} , NPs 3 = 1.3×10^{13} , NPs 4 = 9.2×10^{11} , NPs 5 = 3.8×10^{12} , NPs 6 = 2.4×10^{12} , NPs 7 = 3.3×10^{12} , and NPs 8 = 1.2×10^{12} .

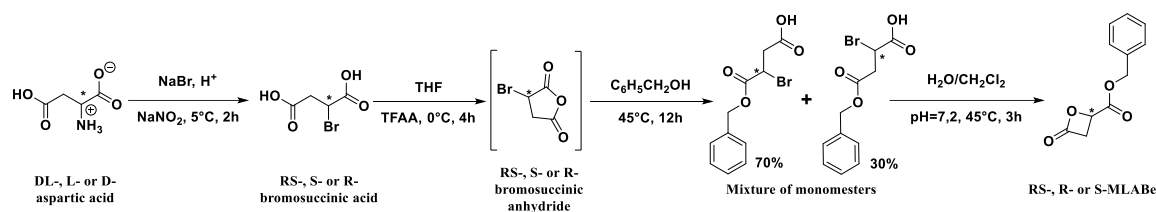
Cell uptake assays: For the cell uptake assay of NPs, human macrophages and HepaRG cells were plated in 24-well plates. The culture medium of macrophages and HepaRG cells was renewed, and PMLABe-based NPs loaded with DiR were added to the wells for 24 h. After incubation, culture media were discarded, and the cell monolayers were washed once with Phosphate Buffer Saline (PBS); then, they were detached with trypsin and analyzed by flow cytometry. Dot plots of forward scatter (FSC: *x* axis, size of events) and side scatter (SSC: *y* axis, structure of events) allowed to gate the viable cells prior to detecting the fluorescence emitted by DiR-loaded NPs using the BV786-1A channel. Two parameters were analyzed: the percentage of positive cells that internalized NPs and the intensity of fluorescence (mean of fluorescence) reflecting the accumulation of fluorescent NPs within the cells.

Statistical analyses: Statistical analyses were performed using a one-way Anova followed by the Kruskal–Wallis post-test or Dunn's multiple comparison tests. Statistically significant variations after treatment were compared with controls using Student's *t*-test with Excel software. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

3. Results and Discussion

3.1. Synthesis and Characterization of the Monomers.

The three β-substituted β-lactones involved in this study were synthesized in four steps starting from DL, L, or D-aspartic acid, as described previously (Scheme 1) [32].

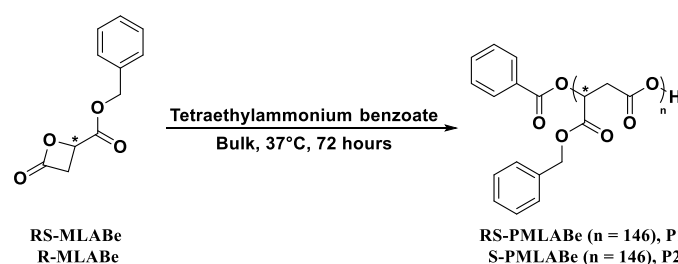


Scheme 1. Synthesis of poly(benzyl malate) (MLABe).

As shown by the results given in the Experimental part and in the Supplementary Information (Figure SI), the characteristics (yields and ^1H NMR and FT-IR spectra) of the synthesized RS, S, and R-MLABe were identical to those given in the literature [32]. The L-aspartic acid leads to the R-MLABe, while the D-aspartic acid leads to the S-MLABe. Indeed, the last step of the MLABe's synthesis occurs through an intramolecular nucleophilic substitution of second-order ($\text{S}_{\text{N}}2$) reaction [10]. We thus obtained pure racemic and optically active benzyl malolactonates, which can be therefore polymerized in the presence of either chemical or enzymatic initiators.

3.2. Synthesis and Characterization of the Polymers

Chemical polymerization: Two lactones, the RS and the R-MLABe, were polymerized by anionic ring-opening polymerization (AROP) in the presence of tetraethylammonium benzoate as the initiator, leading to the expected RS- and S-PMLABe, respectively (Scheme 2) [32].



Scheme 2. Synthesis of the RS-PMLABe (P1) and S-PMLABe (P2).

The ring-opening of the monomer occurs via an O-alkyl bond cleavage, and thus with an inversion of configuration of the asymmetric carbon. Therefore, the R-MLABe leads to the S-PMLABe. Due to a fast initiation step, the molar mass of the resulting polymer is controlled by the monomer versus initiator ratio. Within this study, we chose to synthesize RS and S-PMLABe with a theoretical molar mass of 30,000 g/mol. The polymerization's reaction was followed by FT-IR and stopped when the band characteristic of the lactone ring at 1850 cm^{-1} totally disappeared from the FT-IR spectrum. After reaction, the obtained polymers were purified by precipitation in ethanol and characterized by ^1H NMR (structure—Figures SI 3.1 and 3.2), SEC (molar mass and dispersity) and polarimetry (Table 1). The SEC analysis on the S-PMLABe was not possible as a result of the insolubility of this polymer into THF.

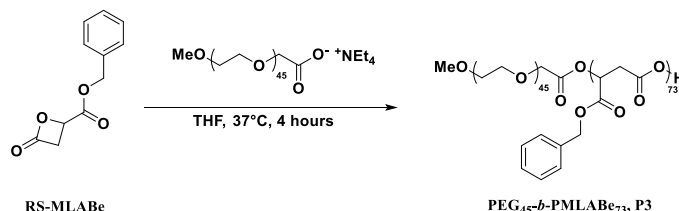
Table 1. Characteristics of the RS-PMLABe (P1) and S-PMLABe (P2).

Polymers	$M_{\text{theoretical}}$ g/mol	\overline{M}_w^a g/mol	\overline{D}^a	$[\alpha]_D^b$
RS-PMLABe, P1	30,000	14,850	1.60	0
S-PMLABe, P2	30,000	n.d.	n.d.	−10.7

^a Measured by SEC in THF, standards polystyrene, 40 °C, 1 mL/min; ^b Measured by polarimetry in chloroform. n.d.: not determined.

The synthesized RS-PMLABe (P1) and S-PMLABe (P2) have the expected characteristics and were further used for preparing the corresponding NPs.

Besides, we synthesized an amphiphilic block copolymer composed by a hydrophilic block of poly(ethylene glycol) (PEG) and a hydrophobic block of PMLABe by the AROP of the RS-MLABe in the presence of α -methoxy, ω -carboxylate-PEG tetraethylammonium salt as initiator (Scheme 3), as described previously [23]. The theoretical molar mass of the PMLABe block was fixed by the ratio monomer to the initiator and selected at 15,000 g/mol.



Scheme 3. Synthesis of the poly(ethylene glycol)-*block*-PMLABe (PEG₄₅-*b*-PMLABe₇₃) (P3).

In this case also, the polymerization's reaction was followed by FT-IR, and stopped when the band characteristic of the lactone ring at 1850 cm⁻¹ totally disappeared from the FT-IR spectrum. After reaction, the obtained polymers were purified by precipitation in ethanol (elimination of unreacted PEG chains) and characterized by ¹H NMR (structure and PMLABe molar mass—Figure SI 3.3) and SEC (molar mass and dispersity). Due to the presence of the PEG block with a known molar mass, it is possible to determine, by ¹H NMR, the molar mass of the PMLABe block [23] (Table 2).

Table 2. Characteristics of the PEG₄₅-*b*-PMLABe₇₃ (P3).

	M_{PEG} ^a g/mol	$M_{\text{PMLABe Theo}}$ g/mol	$M_{\text{PMLABe NMR}}$ g/mol ^b	\overline{M}_w ^c g/mol	\overline{D} ^c
PEG ₄₅ - <i>b</i> -PMLABe ₇₃ , P3	2000	15,000	15,040	9600	1.30

^a Molar mass given by the supplier PEGIris Biotech. ^b Determined by ¹H NMR. ^c Measured by size exclusion chromatography (SEC) in THF, standards polystyrene, 40 °C, 1 mL/min.

As shown by results gathered in Table 2, the expected amphiphilic block copolymer P3 was successfully obtained.

We have included this PEG₄₅-*b*-PMLABe₇₃ amphiphilic block copolymer in the present study because it spontaneously forms stable core-shell NPs that are particularly suitable as a drug delivery system [22,23,30,31].

Enzymatic polymerization: The enzymatic polymerization of unsubstituted lactones (γ -butyrolactone, δ -valerolactone, ϵ -caprolactone, and others) has been widely studied since the 1980s–1990s [48,49]. On the other hand, the enzymatic polymerization of substituted lactones, such as MLABe, is much less described [50]. The first enzymatic polymerization of MLABe was carried out in 1996 by Matsumura et al. [51]. More recently, Panova et al. [52] have also studied the enzymatic polymerization of propyl malolactonate in the presence of *Candida rugosa* lipase. In this context, we have first replicated Matsumura's work, and we have next tried to improve it. Thus, the effect of various parameters (enzyme/MLABe ratio, aqueous phase/organic phase ratio, and stirring rate) was studied. However, given the large number of parameters that can influence the reaction, we have chosen to use a design of experiment approach to find the best conditions leading to well-defined high molar mass enzymatic PMLABe [43]. Using such an approach, we were able to find reaction conditions under which the expected enzymatic PMLABe were reproducibly synthesized [43].

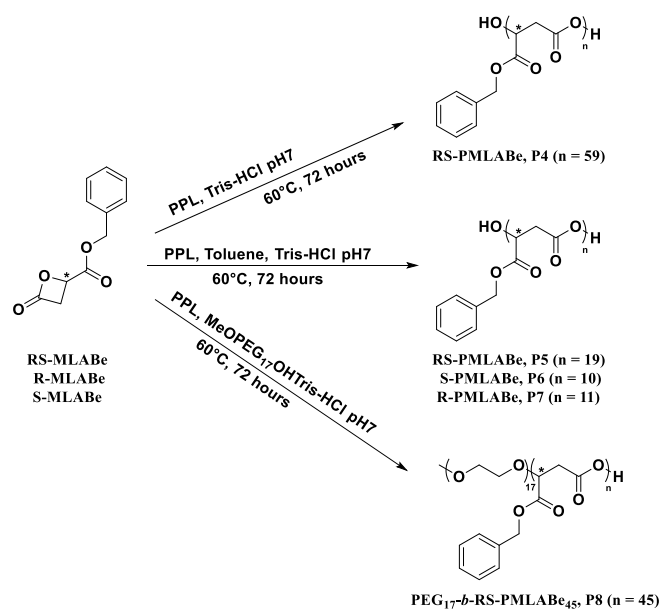
Therefore, we used the conditions that we previously defined to synthesize racemic and optically active PMLABe as well as an amphiphilic PEG-*b*-PMLABe block copolymer by the ring-opening polymerization of racemic or optically active MLABe in the presence of PPL as a catalyst (Table 3, Scheme 4). The enzymatic polymerizations were conducted either in the presence or absence of toluene. After 72 h of reaction, all of the polymers were purified by precipitation in diethyl ether, and analyzed by ¹H NMR (structure, Figures SI 3.4–3.8), SEC (molar mass and dispersity) and polarimetry.

Table 3. Characteristics of RS-PMLABe (P4 and P5), S-PMLABe (P6), R-PMLABe (P7), and PEG₁₇-b-PMLABe₄₅ (P8) obtained by enzymatic polymerization in presence of porcine pancreatic lipase (PPL) as the catalyst.

Polymer	Toluene	\bar{M}_w ^a g/mol	\bar{D} ^a	$[\alpha]_D$ ^c
RS-PMLABe, P4	No	12,250	1.40	0
RS-PMLABe, P5	Yes	3850	1.50	−3
S-PMLABe, P6	Yes	2000	1.50	−11
R-PMLABe, P7	Yes	2300	1.40	+18
PEG ₁₇ -b-PMLABe ₄₅ , P8	Yes	9650	1.50	-

^a Measured by size exclusion chromatography (SEC) in THF, standards polystyrene, 40 °C, 1 mL/min; ^b Determined by ¹H NMR; ^c Measured by polarimetry in chloroform.

Well-defined enzymatic PMLABe derivatives were obtained as highlighted by the relatively low dispersity values of around 1.5 (Table 3). Moreover, the molar masses of the polymers can be modulated by adding toluene or not during the enzymatic polymerization reaction. Indeed, the molar mass of the PMLABe P4 that was obtained by enzymatic polymerization of RS-MLABe in the absence of toluene is higher than the one of RS-PMLABe P5 obtained by the same reaction conducted in the presence of toluene (Table 3). The S-PMLABe P6 was obtained by enzymatic polymerization of the R-MLABe in toluene, while the R-PMLABe P7 was prepared by the ring-opening polymerization of the S-MLABe in toluene in presence of PPL as the catalyst.



Scheme 4. Enzymatic synthesis of PMLABe P4, P5, P6, and P7, and of PEG₁₇-b-PMLABe₄₅ P8.

It is important to note that enzymatic ring-opening polymerization leads to an inversion of configuration of the asymmetric carbon. This is similar to the chemical ring-opening polymerization of the optically active MLABe [53], as demonstrated by the value of the specific rotary power for the enzymatic S-PMLABe P6 polymer, which is itself similar to the one measured by the chemical S-PMLABe P2 compound in both the value and sign. Both polymers P6 and P2 were synthesized by the ring-opening polymerization of the R-MLABe in presence of PPL and tetraethylammonium benzoate, respectively. Such an observation suggested that the MLABe ring-opening in the presence of the PPL occurs through an O-alkyl cleavage without the intervention of the serine from the catalytic triad. This result is quite surprising, especially if compared to what is usually observed for unsubstituted lactones. Indeed, the ring-opening polymerization of unsubstituted lactones in the presence of lipases has been described to occur via the canonical mechanism involving the activated serine of the catalytic

triad, leading to a ring opening through an O-acyl cleavage [37–39]. Our preliminary results rather support the conclusion that the β -substituted β -lactones, as in the case of the AROP reactions, are polymerized by lipases through an O-alkyl cleavage. However, the exact mechanism needs to be further studied, and we undertake several experiments using a serine-knocked-out lipase, which is currently under synthesis, to confirm that the ring-opening polymerization of β -substituted β -lactones by lipases occurs through an O-alkyl cleavage without involvement of the catalytic serine.

Although the mechanism of polymerization is not clearly established, the enzymatic polymers obtained (P4 to P7) were used to prepare the corresponding NPs.

The last enzymatic synthesis of an amphiphilic block copolymer was realized in toluene solution in the presence of PPL as the catalyst and an α -methoxy, ω -hydroxyl PEG₁₇. The obtained polymer PEG₁₇-*b*-PMLABe₄₅ (P8) was characterized by ¹H NMR (structure, Figure SI 3.8) and SEC (molar mass and dispersity). The SEC analysis indicated the formation of a block copolymer as a result of the presence of only one peak with a quite narrow distribution ($\overline{M}_w/\overline{M}_n = 1.50$, Table 3).

3.3. Preparation and Characterization of the Nanoparticles

The methodology that was used to prepare the NPs starting from the eight polymers that were previously produced was based on the nanoprecipitation method as previously described [44,45] (see materials and methods section).

For the NPs loaded with the DiR fluorescent probe, the rate of DiR encapsulation was determined. To measure the amount of DiR encapsulated in the nanoparticles, 80 μ L of the solution of nanoparticles encapsulating the DiR were added to 320 μ L of DMF. The optical density of these solutions was then measured at 670 nm. The amount of encapsulated DiR was determined using a calibration curve of DiR solutions at different concentrations in DMF/water (80/20) (Figure SI 4).

Knowing the initial amount of DiR, we were able to determine the rate of DiR encapsulation that varied between 45–95%, with quantitative encapsulation rates for NPs 2, NPs 3, and NPs 8 (Table 4).

Table 4 also summarizes the hydrodynamic diameters (Dh) and dispersities (PDIs), measured by DLS, of the PMLABe-based NPs. All of the NPs have hydrodynamic diameters between 83–200 nm, which are values expected for NPs based on either hydrophobic or amphiphilic (co)polymers encapsulating a fluorescent probe such as the DiR. The samples are relatively monodisperse, since the PDIs values were all between 0.13–0.26.

Table 4. Characteristics of the prepared NPs loaded with DiR formulated for the cell uptake studies.

Entry	Polymers	Way of Synthesis	Dh nm	PDI	DiR Encapsulation Rate %
NPs 1	RS-PMLABe, P1	Chemical	195	0.19	61
NPs 2	S-PMLABe, P2	Chemical	170	0.26	Quantitative
NPs 3	PEG ₄₅ - <i>b</i> -PMLABe ₇₃ , P3	Chemical	83	0.22	Quantitative
NPs 4	RS-PMLABe, P4	Enzymatic	200	0.13	45
NPs 5	RS-PMLABe, P5	Enzymatic	125	0.19	83
NPs 6	S-PMLABe, P6	Enzymatic	145	0.19	95
NPs 7	R-PMLABe, P7	Enzymatic	130	0.16	94
NPs 8	PEG ₁₇ - <i>b</i> -PMLABe ₄₅ , P8	Enzymatic	185	0.24	Quantitative

Preparation of nanoparticles for the in vitro cytotoxicity assays. PDI: polydispersity index.

In this case, the synthesized PMLABe polymers were dissolved in 1,4-dioxane. This solution was quickly added in distilled water to trigger nanoprecipitation and auto-assembly of the polymers into NPs. The final concentration of polymers was 2.5 mg/mL. Table 5 summarizes the hydrodynamic diameters (Dh) and PDIs of the corresponding NPs used for the cytotoxicity study.

Table 5. Characteristics of the nanoparticles prepared for the in vitro cytotoxicity assays.

Entry	Polymers	Way of Synthesis	Dh nm	PDI
NPs 1	RS-PMLABe, P1	Chemical	72	0.18
NPs 2	S-PMLABe, P2	Chemical	122	0.32
NPs 3	PEG ₄₅ - <i>b</i> -PMLABe ₇₃ , P3	Chemical	51	0.16
NPs 4	RS-PMLABe, P4	Enzymatic	113	0.28
NPs 5	RS-PMLABe, P5	Enzymatic	96	0.17
NPs 6	S-PMLABe, P6	Enzymatic	121	0.19
NPs 7	R-PMLABe, P7	Enzymatic	107	0.18
NPs 8	PEG ₁₇ - <i>b</i> -PMLABe ₄₅ , P8	Enzymatic	83	0.17

The hydrodynamic diameters (Dh) of NPs were found in the range of 50 nm to 120 nm (average diameter of 102 nm \pm 19 nm). The smallest Dh was measured for NPs 3 produced with the amphiphilic block copolymer PEG₄₅-*b*-PMLABe₇₃ P3, harboring the longest PEG chain. Such a result is in good agreement with the already observed characteristics of NPs based on PEGylated amphiphilic block copolymers [23]. All of the PDIs' values are lower than 0.3, indicating a good size distribution with the exception of the NPs 2 formulation, for which the PDI is slightly greater than 0.3. Nevertheless, we considered that all of the prepared formulations meet the conditions for the in vitro cytotoxicity assays.

3.4. In Vitro Assays

3.4.1. In Vitro Cytotoxicity Assays

In order to evaluate the biocompatibility of the PMLABe-based NPs, we incubated human hepatoma HepaRG cells with the 8 NPs in a wide range of concentrations. HepaRG cells are bipotent hepatic progenitors that can be differentiated into hepatocyte-like cells [54] expressing most of the major hepatic detoxifying enzymes [55]. These metabolically competent hepatocyte-like cells are used worldwide as an in vitro model for studying the metabolism [56] and toxicity of xenobiotics [57–59], including exposure to NPs [31,47,60].

Proliferating progenitor and quiescent differentiated HepaRG cells were incubated with NPs for 24 h and 72 h at concentrations ranging from 0.5 μ M to 20 μ M, and the cell viability was assayed using the MTT assay (Figure 1). The exposure of progenitor cells during 24 h triggered a moderate and partially dose-dependent decrease in MTT activity for NPs 1, 2, 3, 4, 7, and 8 compared to that measured in control cultures without nanoparticles (Figure 1A). This effect was less significant at 72 h. For these NPs, the highest concentrations in polymers (10 μ M and 20 μ M) reduced the cell viability by less than 30%, and the half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) was not reached for these amounts of NPs. The exposure of hepatocyte-like HepaRG cells that exhibit a higher ability to metabolize xenobiotics, showed a weaker decrease in MTT activities (Figure 1B).

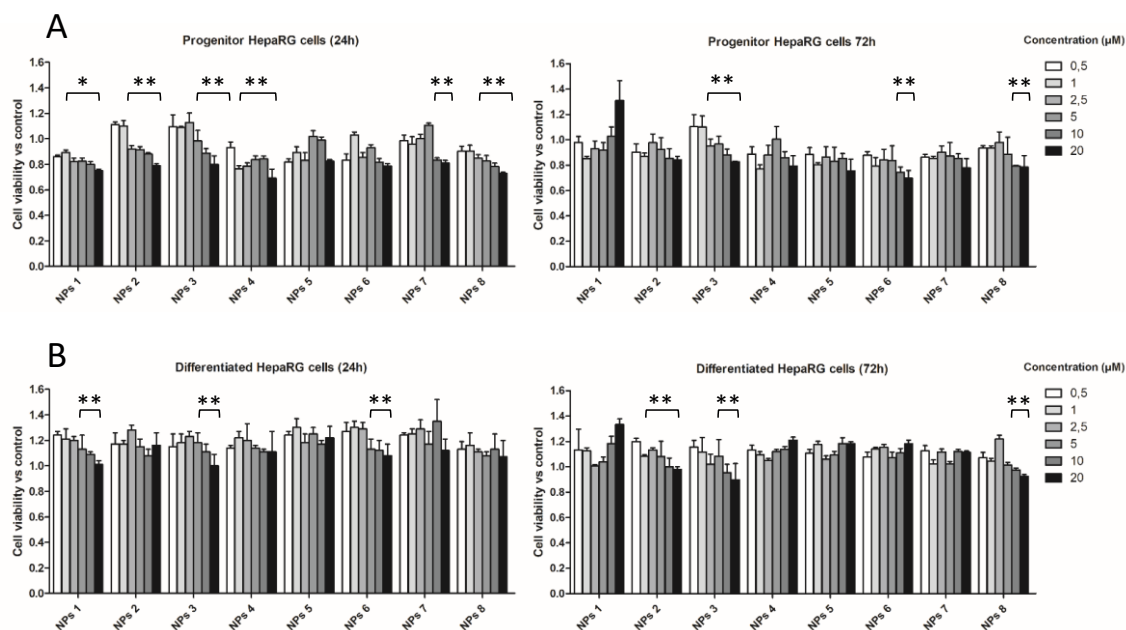


Figure 1. MTT assays (viability assay) in progenitor (A) and hepatocyte-like HepaRG cells (differentiated cells, B) incubated with PMLABe-based nanoparticles at 24 h (24 h) and 72 h (72 h). Statistical analyses: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ versus non treated cells, three independent experiments.

Together, these data demonstrated the mild toxicity of these PMLABe-based NPs following incubation with HepaRG cells, which is in agreement with our previous reports describing the moderate effects on total cell numbers following the exposure of various human cell lines, including the Huh7 hepatoma cell line with NPs 1 and NPs 3 [23]. Interestingly, in this work, we compared the effects of NPs prepared from polymers synthesized by chemical (NPs 1 to 3) and enzymatic (NPs 4 to 8) polymerization. Our data indicate that mild effects on cell viability were observed with both types of NPs based on either enzymatic or chemically synthesized PMLABe. Moreover, the use of NPs constituted by PMLABe derivatives prepared through enzymatic synthesis did not really improve the cell viability in comparison to what is observed with NPs based on chemical PMLABe derivatives.

3.4.2. In Vitro Cells Uptake Assays

The NPs' cell uptake by HepaRG cells (Figure 2) and human macrophages (Figure 3) of PMLABe-based nanoparticles was monitored by the detection of the cells that internalized NPs encapsulating the DiR lipophilic fluorescent dye using flow cytometry.

The flow cytometry analysis (Figures 2 and 3) was performed on single cells gated on dot plots with size of events (x axis, forward scatter, FSC-A) and structure (y axis, side scatter, SSC-A). HepaRG cells and macrophages non-incubated with NPs were used to determine the endogenous cell fluorescence and the M1 gate corresponding to negative cells. The M2 gate defined the positive cell populations that internalized fluorescent NPs.

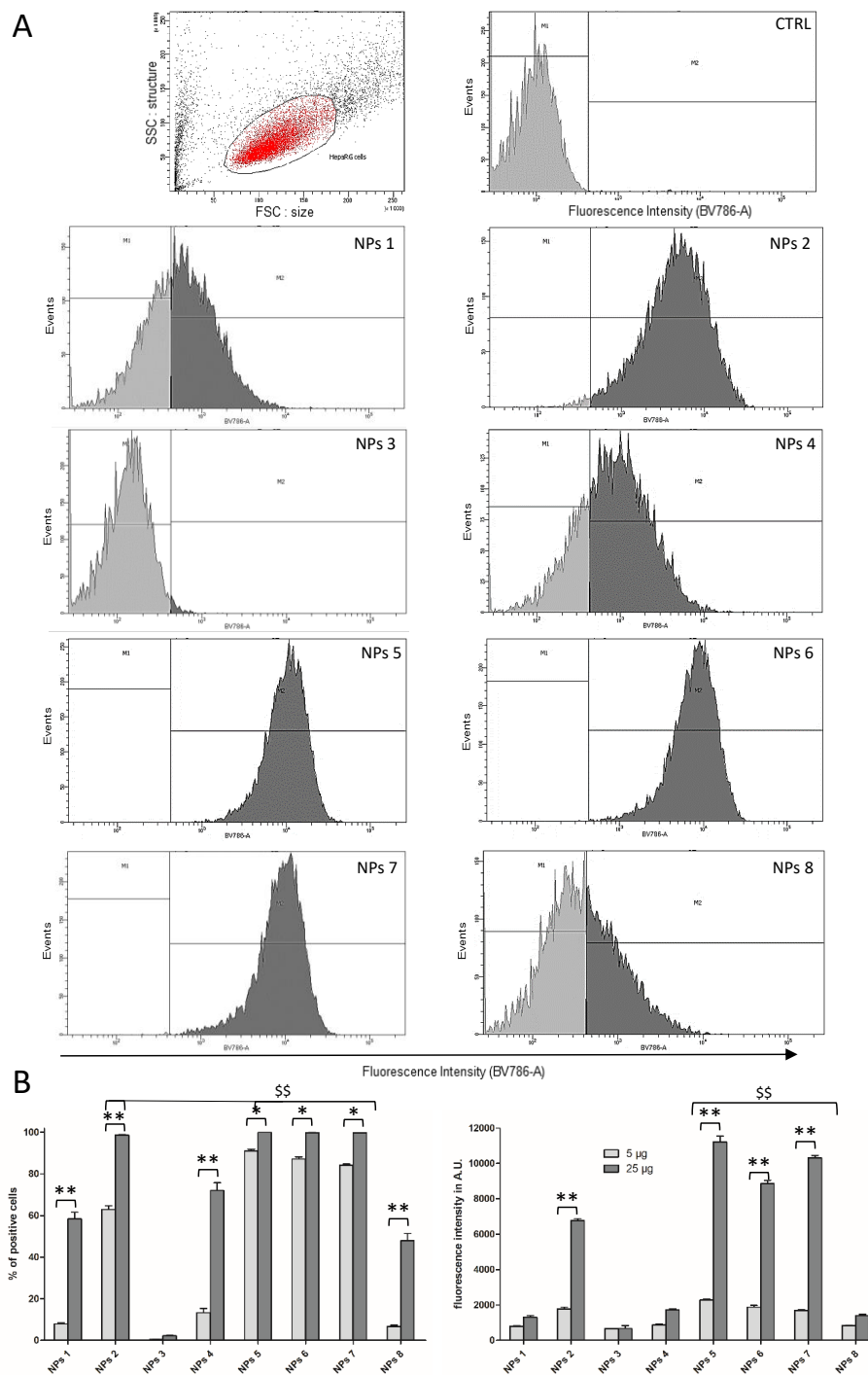


Figure 2. (A) Dot plot (control HepaRG cells) and histograms used to detect negative (M1 gate) and positive (M2 gate) cells and determine the mean of fluorescence in control (CTRL) and cells incubated with nanoparticles (NPs) 1 to 8; (B) Quantification of percentages of positive cells and mean of fluorescence in progenitor HepaRG cells incubated with PMLABe-based nanoparticles for 24 h. Statistical analyses: ** $p < 0.01$: cells incubated with 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of polymers versus cells incubated with 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$; \$\$ < 0.01 : highest percentages of positive cells or mean of fluorescence versus all the other conditions.

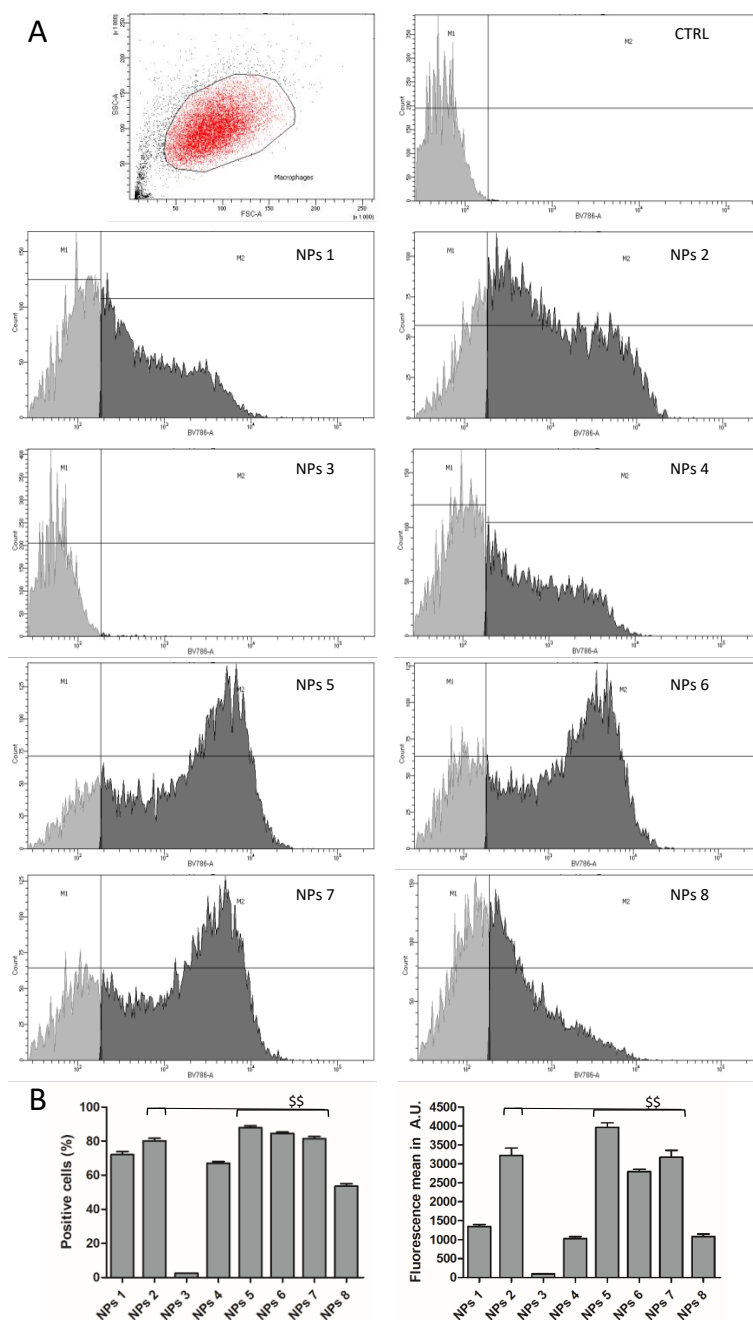


Figure 3. (A) Dot plot (control macrophages) and histograms used to detect negative (M1 gate) and positive (M2 gate) cells and determine the mean of fluorescence in control (CTRL) and cells incubated with NPs 1 to 8; (B) Quantification of percentages of positive cells and mean of fluorescence in macrophages incubated with PMLABe-based nanoparticles for 24 h. Statistical analyses: \$\$ < 0.01: highest percentages of positive cells or mean of fluorescence versus all the other conditions.

We first compared the HepaRG cell uptake of NPs using 5 µg/mL and 25 µg/mL of polymers (Figure 2B). At 5 µg/mL, the cell uptake was very low for NPs 1, 3, 4, and 8, with less than 10% of positive cells, while NPs 2, 5, 6, and 7 were internalized in more than 60% of the HepaRG cells. At 25 µg/mL, the percentages of positive cells and the intensity of fluorescence, reflecting the intracellular accumulation of NPs, were considerably enhanced with high levels of internalization for NPs 1, 2, 4, 5, 6, and 7, indicating that this concentration of polymers and the corresponding amounts of NPs were more appropriate to visualize the cell uptake. At this concentration, in

both cultures of HepaRG cells and macrophages, cellular uptakes of NPs 2, 5, 6, and 7 prepared from PMLABe were very efficient, with at least 80% of positive cells and the highest mean of fluorescence. The efficient internalization of these NPs was not correlated to the molar masses of the corresponding homopolymers, but with small hydrodynamic diameters (Table 4). Interestingly, the cell uptake of NPs 2 was much higher than that of NPs 1, while they exhibit similar molar masses and hydrodynamic diameters. The main difference between these two NPs was that NPs 1 were prepared with RS-PMLABe, while NPs 2 were formulated with S-PMLABe, suggesting that NPs derived from this optically active polymer exhibit a physicochemical feature favoring cell uptake. Furthermore, the highest cell uptake was observed for NPs 5 to 7, which were prepared from homopolymers synthesized by enzymatic polymerization. This data led us to postulate that PMLABe homopolymers obtained by enzymatic polymerization, and with low molar masses (<4000 g/L), formed NPs that are more efficiently internalized than NPs produced from PMLABe polymers synthesized by chemical polymerization.

In contrast, the percentages of positive cells were much lower for PEGylated NPs 8 (PEG_{17-b}-PMLABe₄₅) with 45% to 55% of positive cells and almost abolished for PEGylated NPs 3 (PEG_{45-b}-PMLABe₇₃) with less than 5% of positive cells. These data are in agreement with the well-established role of the neutral PEG moiety that reduces the opsonization of PEGylated NPs by plasma proteins and their cell internalization.

4. Conclusions

In the present work, we have successfully synthesized and characterized a series of eight PMLABe-based polymers through chemical and enzymatic polymerization, formulated the corresponding NPs, studied their cytotoxicity human hepatoma HepaRG cells, and measured their uptake by both primary macrophages and HepaRG cells.

In vitro cell viability assessed by MTT on HepaRG cells evidenced a mild toxicity of the NPs formed from PMLABe polymers at high concentrations/densities of NPs in the culture media of cells. This cytotoxicity is in agreement with our previous reports, and does not evidence a higher biocompatibility of the NPs prepared from polymers synthesized by enzymatic polymerization. These data further demonstrate that the chemical polymerization and the procedure of nanoprecipitation led to the production of biocompatible PMLABe-based NPs. The efficient uptake combined with low cytotoxicity toward HepaRG cells indicates that PMLABe-based NPs are suitable nanovectors for drug delivery that will further be evaluated in vivo to target either hepatocytes or resident liver macrophages.

Supplementary Materials: The supplementary materials are available online at <http://www.mdpi.com/2073-4360/10/11/1244/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, S.T., C.N.C., S.C.M., P.L. and N.L.; methodology, H.C., S.S., M.V. and E.V.; software, H.C., S.S. and M.V.; validation, S.C.M., P.L. and N.L.; formal analysis, S.C.M., P.L. and N.L.; investigation, H.C., S.S., M.V., E.V., E.D. and C.R.; resources, C.R. and E.V.; data curation, H.C., M.V., E.V., S.C.M. and P.L.; writing—original draft preparation, S.C.M., P.L. and N.L.; writing—review and editing, S.C.M., P.L. and N.L.; visualization, S.C.M., P.L. and N.L.; supervision, C.N.C., S.C.M., P.L. and N.L.; project administration, S.C.M., P.L.; funding acquisition, C.N.C., S.C.M., P.L.

Funding: This work was funded by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), l'École Nationale Supérieure de Chimie de Rennes (ENSCR, France), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and les comités départementaux de la Ligue contre le Cancer du Grand Ouest (comités 17 et 35). Hubert Casajus and Saad Saba were recipients of fellowships from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (France) and the Islamic Center Association for Guidance and Higher Education (Lebanon), respectively.

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

References

1. Strebhardt, K.; Ullrich, A. Paul Ehrlich's Magic Bullet Concept: 100 Years of Progress. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 473–480. [CrossRef] [PubMed]

2. Torchilin, V.P. Recent Advances with Liposomes as Pharmaceutical Carriers. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 145–160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Hoffman, A.S. The Origins and Evolution of “Controlled” Drug Delivery Systems. *J. Control. Release* **2008**, *132*, 153–163. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Liu, S.; Maheshwari, R.; Kiick, K.L. Polymer-Based Therapeutics. *Macromolecules* **2009**, *42*, 3–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Malam, Y.; Loizidou, M.; Seifalian, A.M. Liposomes and Nanoparticles: Nanosized Vehicles for Drug Delivery in Cancer. *Trends Pharmacol. Sci.* **2009**, *30*, 592–599. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Misra, R.; Acharya, S.; Sahoo, S.K. Cancer Nanotechnology: Application of Nanotechnology in Cancer Therapy. *Drug Discov. Today* **2010**, *15*, 842–850. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Etheridge, M.L.; Campbell, S.A.; Erdman, A.G.; Haynes, C.L.; Wolf, S.M.; McCullough, J. The Big Picture on Nanomedicine: The State of Investigational and Approved Nanomedicine Products. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2013**, *9*, 1–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Jin, S.E.; Jin, H.E.; Hong, S.S. Targeted Delivery System of Nanobiomaterials in Anticancer Therapy: From Cells to Clinics. *BioMed Res. Int.* **2014**, *2014*, 814208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Park, J.H.; Lee, S.; Kim, J.H.; Park, K.; Kim, K.; Kwon, I.C. Polymeric Nanomedicine for Cancer Therapy. *Prog. Polym. Sci.* **2008**, *33*, 113–137. [[CrossRef](#)]
10. Kumari, A.; Yadav, S.K.; Yadav, S.C. Biodegradable Polymeric Nanoparticles Based Drug Delivery Systems. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2010**, *75*, 1–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Ulery, B.D.; Nair, L.S.; Laurencin, C.T. Biomedical Applications of Biodegradable Polymers. *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* **2011**, *49*, 832–864. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Tucker, B.S.; Sumerlin, B.S. Poly (N-(2-Hydroxypropyl) Methacrylamide)-Based Nanotherapeutics. *Polym. Chem.* **2014**, *5*, 1566–1572. [[CrossRef](#)]
13. El-Say, K.M.; El-Sawy, H.S. Polymeric Nanoparticles: Promising Platform for Drug Delivery. *Int. J. Pharm.* **2017**, *528*, 675–691. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Deshmukh, A.S.; Chauhan, P.N.; Noolvi, M.N.; Chaturvedi, K.; Ganguly, K.; Shukla, S.S.; Nadagouda, M.N.; Aminabhavi, T.M. Polymeric Micelles: Basic Research to Clinical Practice. *Int. J. Pharm.* **2017**, *532*, 249–268. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Marguet, M.; Bonduelle, C.; Lecommandoux, S. Multicompartmentalized Polymeric Systems: Towards Biomimetic Cellular Structure and Function. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *42*, 512–529. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Kale, G.; Kijchavengkul, T.; Auras, R.; Rubino, M.; Selke, S.E.; Singh, S.P. Compostability of Bioplastic Packaging Materials: An Overview. *Macromol. Biosci.* **2007**, *7*, 255–277. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Seyednejad, H.; Ghassemi, A.H.; van Nostrum, C.F.; Vermoden, T.; Hennick, W.E. Functional aliphatic polyesters for biomedical and pharmaceutical applications. *J. Control. Release* **2011**, *152*, 168–176. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Sauer, A.; Kapelski, A.; Fliedel, C.; Dagorne, S.; Kol, M.; Okuda, J. Structurally Well-Defined Group 4 Metal Complexes as Initiators for the Ring-Opening Polymerization of Lactide Monomers. *Dalton Trans.* **2013**, *42*, 9007–9023. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Chaturvedi, D.; Mishra, S.; Tandon, P.; Portilla-Arias, J.A.; Muñoz-Guerra, S. Thermal Degradation and Theoretical Interpretation of Vibrational Spectra of Poly (β ,L-Malic Acid). *Polymer* **2011**, *52*, 3118–3126. [[CrossRef](#)]
20. Philip, S.; Keshavarz, T.; Roy, I. Polyhydroxyalkanoates: Biodegradable Polymers with a Range of Applications. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2007**, *82*, 233–247. [[CrossRef](#)]
21. Tanzi, M.C.; Verderio, P.; Lampugnani, M.G.; Resnati, M.; Dejana, E.; Sturani, E. Cytotoxicity of Some Catalysts Commonly Used in the Synthesis of Copolymers for Biomedical Use. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **1994**, *5*, 393–396. [[CrossRef](#)]
22. Loyer, P.; Cammas-Marion, S. Natural and Synthetic Poly (Malic Acid)-Based Derivates: A Family of Versatile Biopolymers for the Design of Drug Nanocarriers. *J. Drug Target.* **2014**, *22*, 556–575. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Huang, Z.W.; Laurent, V.; Chetouani, G.; Ljubimova, J.Y.; Holler, E.; Benvegna, T.; Loyer, P.; Cammas-Marion, S. New Functional Degradable and Bio-Compatible Nanoparticles Based on Poly (Malic Acid) Derivatives for Site-Specific Anti-Cancer Drug Delivery. *Int. J. Pharm.* **2012**, *423*, 84–92. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

24. Jaffredo, C.G.; Guillaume, S.M. Benzyl β -Malolactonate Polymers: A Long Story with Recent Advances. *Polym. Chem.* **2014**, *5*, 4168–4194. [CrossRef]
25. Coulembier, O.; Degée, P.; Cammas-Marion, S.; Guérin, P.; Dubois, P. New Amphiphilic Poly [(R,S)- β -Malic Acid-b- ϵ -Caprolactone] Diblock Copolymers by Combining Anionic and Coordination-Insertion Ring-Opening Polymerization. *Macromolecules* **2002**, *35*, 9896–9903. [CrossRef]
26. Vert, M.; Lenz, R.W. Preparation and Properties of Poly- β -Malic Acid: A Functional Polyester of Potential Biomedical Importance. *Polym. Prepr.* **1979**, *20*, 608–611.
27. Cammas, S.; Béar, M.M.; Moine, L.; Escalup, R.; Ponchel, G.; Kataoka, K.; Guérin, P. Polymers of Malic Acid and 3-Alkylmalic Acid as Synthetic PHAs in the Design of Biocompatible Hydrolyzable Devices. *Int. J. Biol. Macromol.* **1999**, *25*, 273–282. [CrossRef]
28. Cammas-Marion, S.; Guérin, P. Design of Malolactonic Acid Esters with a Large Spectrum of Specified Pendant Groups in the Engineering of Biofunctional and Hydrolyzable Polyesters. *Macromol. Symp.* **2000**, *153*, 167–186. [CrossRef]
29. Venkatraj, N.; Nanjan, M.J.; Loyer, P.; Chandrasekar, M.J.N.; Cammas-Marion, S. Poly (Malic Acid) Bearing Doxorubicin and N-Acetyl Galactosamine as a Site-Specific Prodrug for Targeting Hepatocellular Carcinoma. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2017**, *28*, 1140–1157. [CrossRef] [PubMed]
30. Loyer, P.; Bedhouche, W.; Huang, Z.W.; Cammas-Marion, S. Degradable and Biocompatible Nanoparticles Decorated with Cyclic RGD Peptide for Efficient Drug Delivery to Hepatoma Cells in Vitro. *Int. J. Pharm.* **2013**, *454*, 727–737. [CrossRef] [PubMed]
31. Vene, E.; Jarnouen, K.; Huang, Z.W.; Bedhouche, W.; Montier, T.; Cammas-Marion, S.; Loyer, P. In Vitro Toxicity Evaluation and in Vivo Biodistribution of Polymeric Micelles Derived from Poly (Ethylene Glycol)-b-Poly(Benzyl Malate) Copolymer. *Pharm. Nanotechnol.* **2016**, *4*, 24–37. [CrossRef]
32. Cammas, S.; Renard, I.; Langlois, V.; Guerin, P. Poly (β -Malic Acid): Obtaining High Molecular Weights by Improvement of the Synthesis Route. *Polymer* **1996**, *37*, 4215–4220. [CrossRef]
33. Tetraethylammonium. Available online: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB08837> (accessed on 2 November 2018).
34. Casas-Godoy, L.; Duquesne, S.; Bordes, F.; Sandoval, G.; Marty, A. Lipases: An Overview. In *Lipases and Phospholipases*; Humana Press: New York, NY, USA, 2012; pp. 3–30.
35. Rauwerdink, A.; Kazlauskas, R.J. How the Same Core Catalytic Machinery Catalyzes 17 Different Reactions: The Serine-Histidine-Aspartate Catalytic Triad of α/β -Hydrolase Fold Enzymes. *ACS Catal.* **2015**, *5*, 6153–6176. [CrossRef] [PubMed]
36. Shoda, S.; Uyama, H.; Kadokawa, J.; Kimura, S.; Kobayashi, S. Enzymes as Green Catalysts for Precision Macromolecular Synthesis. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 2307–2413. [CrossRef] [PubMed]
37. MacDonald, R.T.; Pulapura, S.K.; Svirkin, Y.Y.; Gross, R.A.; Kaplan, D.L.; Akkara, J.; Swift, G.; Wolk, S. Enzyme-Catalyzed Epsilon.-Caprolactone Ring-Opening Polymerization. *Macromolecules* **1995**, *28*, 73–78. [CrossRef]
38. Henderson, L.A.; Svirkin, Y.Y.; Gross, R.A.; Kaplan, D.L.; Swift, G. Enzyme-Catalyzed Polymerizations of ϵ -Caprolactone: Effects of Initiator on Product Structure, Propagation Kinetics, and Mechanism. *Macromolecules* **1996**, *29*, 7759–7766. [CrossRef]
39. Johnson, P.M.; Kundu, S.; Beers, K.L. Modeling Enzymatic Kinetic Pathways for Ring-Opening Lactone Polymerization. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 3337–3343. [CrossRef] [PubMed]
40. Kobayashi, S. Enzymatic Polymerization: A New Method of Polymer Synthesis. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **1999**, *37*, 3041–3056. [CrossRef]
41. Kobayashi, S. Green Polymer Chemistry: New Methods of Polymer Synthesis Using Renewable Starting Materials. *Struct. Chem.* **2016**, *28*, 461–474. [CrossRef]
42. Albertsson, A.C.; Srivastava, R.K. Recent Developments in Enzyme-Catalyzed Ring-Opening Polymerization. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 1077–1093. [CrossRef] [PubMed]
43. Casajus, H.; Tranchimand, S.; Wolbert, D.; Nugier-Chauvin, C.; Cammas-Marion, S. Optimization of Lipase-Catalyzed Polymerization of Benzyl Malolactonate through a Design of Experiment Approach. *J. Appl. Polym. Sci.* **2017**, *134*, 44604. [CrossRef]
44. Thioune, O.; Fessi, H.; Devissaguet, J.P.; Puisieux, F. Preparation of Pseudolatex by Nanoprecipitation: Influence of the Solvent Nature on Intrinsic Viscosity and Interaction Constant. *Int. J. Pharm.* **1997**, *146*, 233–238. [CrossRef]

45. Martínez Rivas, C.J.; Tarhini, M.; Badri, W.; Miladi, K.; Greige-Gerges, H.; Nazari, Q.A.; Galindo Rodríguez, S.A.; Román, R.Á.; Fessi, H.; Elaissari, A. Nanoprecipitation Process: From Encapsulation to Drug Delivery. *Int. J. Pharm.* **2017**, *532*, 66–81. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Laurent, V.; Glaise, D.; Nübel, T.; Gilot, D.; Corlu, A.; Loyer, P. Highly Efficient siRNA and Gene Transfer into Hepatocyte-Like HepaRG Cells and Primary Human Hepatocytes: New Means for Drug Metabolism and Toxicity Studies. In *Cytochrome P450 Protocols*; Phillips, I.R., Shephard, E.A., Ortiz de Montellano, P.R., Eds.; Humana Press: Totowa, NJ, USA, 2013; Volume 987, pp. 295–314.
47. Vène, E.; Barouti, G.; Jarnouen, K.; Gicquel, T.; Rauch, C.; Ribault, C.; Guillaume, S.M.; Cammas-Marion, S.; Loyer, P. Opsonisation of nanoparticles prepared from poly (β -hydroxybutyrate) and poly(trimethylene carbonate)-*b*-poly(malic acid) amphiphilic diblock copolymers: Impact on the in vitro cell uptake by primary human macrophages and HepaRG hepatoma cells. *Int. J. Pharm.* **2016**, *13*, 438–452. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Matsumura, S. Enzymatic Synthesis of Polyesters via Ring-Opening Polymerization. In *Enzyme-Catalyzed Synthesis of Polymers*; Kobayashi, S., Ritter, H., Kaplan, D., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2005; Volume 194, pp. 95–132.
49. Uyama, H.; Takeya, K.; Kobayashi, S. Synthesis of Polyesters by Enzymatic Ring-Opening Copolymerization Using Lipase Catalyst. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* **1993**, *69*, 203–207. [[CrossRef](#)]
50. Kikuchi, H.; Uyama, H.; Kobayashi, S. Lipase-Catalyzed Ring-Opening Polymerization of Substituted Lactones. *Polym. J.* **2002**, *34*, 835–840. [[CrossRef](#)]
51. Matsumura, S.; Beppu, H.; Nakamura, K.; Osanai, S.; Toshima, K. Preparation of Poly (β -Malic Acid) by Enzymatic Ring-Opening Polymerization of Benzyl β -Malolactonate. *Chem. Lett.* **1996**, *25*, 795–796. [[CrossRef](#)]
52. Panova, A.A.; Taktak, S.; Randriamahefa, S.; Cammas-Marion, S.; Guerin, P.; Kaplan, D.L. Polymerization of Propyl Malolactonate in the Presence of *Candida Rugosa* Lipase. *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 19–27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Guerin, P.; Francillette, J.; Braud, C.; Vert, M. Benzyl esters of optically active malic acid stereocopolymers as obtained by ring-opening polymerization of (R)-(+)- and (S)-(-)-benzyl malolactonates. *Macromol. Symp.* **1986**, *6*, 305–314. [[CrossRef](#)]
54. Cerec, V.; Glaise, D.; Garnier, D.; Morosan, S.; Turlin, B.; Drenou, B.; Gripon, P.; Kremsdorf, D.; Guguen-Guillouzo, C.; Corlu, A. Transdifferentiation of hepatocyte-like cells from the human hepatoma HepaRG cell line through bipotent progenitor. *Hepatology* **2007**, *45*, 957–967. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Aninat, C.; Piton, A.; Glaise, D.; Le Charpentier, T.; Langouet, S.; Morel, F.; Guguen-Guillouzo, C.; Guillouzo, A. Expression of cytochrome P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells. *Drug Metab. Dispos.* **2006**, *34*, 75–83. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Quesnot, N.; Bucher, S.; Gade, C.; Vlach, M.; Vène, E.; Valenca, S.; Gicquel, T.; Holst, H.; Robin, M.-A.; Loyer, P. Production of chlorzoxazone glucuronides via cytochrome P4502E1 dependent and independent pathways in human hepatocytes. *Arch. Toxicol.* **2018**, *92*, 3077–3091. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Jossé, R.; Aninat, C.; Glaise, D.; Dumont, J.; Fessard, V.; Morel, F.; Poul, J.M.; Guguen-Guillouzo, C.; Guillouzo, A. Long-term functional stability of HepaRG hepatocytes and use for chronic toxicity and genotoxicity studies. *Drug Metab. Dispos.* **2008**, *36*, 1111–1118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Dumont, J.; Jossé, R.; Lambert, C.; Anthérieu, S.; Laurent, V.; Loyer, P.; Robin, M.-A.; Guillouzo, A. Preferential induction of the AhR gene battery in HepaRG cells after a single or repeated exposure to heterocyclic aromatic amines. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2010**, *249*, 91–100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Quesnot, N.; Rondel, K.; Martinais, S.; Audebert, M.; Glaise, D.; Morel, F.; Loyer, P.; Robin, M.-A. Evaluation of genotoxicity using automated detection of gammaH2AX in metabolically competent HepaRG cells. *Mutagenesis* **2016**, *31*, 43–50. [[PubMed](#)]
60. Barouti, G.; Jarnouen, K.; Cammas-Marion, S.; Loyer, P.; Guillaume, S. Polyhydroxylakanoate-based diblock copolymers: Potential biocompatible nanovectors. *Polym. Chem.* **2015**, *6*, 5414–5429. [[CrossRef](#)]



3.1.3 Discussion

Dans cette étude, nous avons préparé un ensemble de huit lots de NPs à base des polymères PMLABe et PEG-*b*-PMLABe synthétisés par voie chimique ou enzymatique à partir de monomères racémiques ou optiquement actifs. Des cellules HepaRG progénitrices et différenciées ont été incubées avec les différentes NPs à des doses allant de 0,5 μM à 20 μM pendant 24h et 72h.

Les tests de cytotoxicités réalisés après chaque incubation montrent que toutes les NPs possèdent une toxicité très faible et que les NPs 1, 2, 3, 4, 7 et 8 ont une cytotoxicité dose-dépendante à 24h, ce qui est en accord avec les résultats des études précédentes pour lesquelles plusieurs lignées cellulaires ont été incubées avec les NPs 1 et NPs 3²⁷⁴. Dans l'étude réalisée par Huang et al., en 2012, la cytotoxicité *in vitro* des NPs à base de PMLABe₆₈, PEG₄₂-*b*-PMLABe₆₈ et Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₅ a été évaluée sur plusieurs lignées de cellules cancéreuses (PC3, NCI, Caco, HCT116, MDA, HuH7 et mmt 060562) et saines (fibroblastes humains) : les résultats ont mis en évidence que ces trois types de NPs n'avaient qu'une faible toxicité à des doses élevées (> 10 μM) sur l'ensemble des lignées cellulaires utilisées y compris sur la lignée d'hépatome HuH7²⁷⁴. En comparant les deux études, nous pouvons conclure que les NPs 1 et 3 ne sont que très faiblement toxiques sur le grand nombre de lignées cellulaires testé dont les lignées d'hépatomes HuH7 et HepaRG. L'absence de toxicité met en évidence la biocompatibilité *in vitro* de ces deux NPs (1 et 3). D'autre part, la présence de poly(éthylène glycol) [PEG] en surface des NPs n'a pas d'influence sur leur toxicité vis-à-vis des lignées cellulaires considérées dans cette étude.

La viabilité cellulaire pour les différentes lignées est similaire pour les huit lots de NPs à une dose donnée. Il semble donc qu'il n'existe pas de corrélation entre la taille des NPs, allant de 51 nm à 122 nm, et la viabilité cellulaire observée. En outre, la similitude des niveaux de viabilité cellulaire observée entre les NPs préparées à partir de PMLABe synthétisés par voie enzymatique et celles préparées à partir de PMLABe synthétisés par voie chimique semble indiquer une absence de corrélation entre le mode de synthèse des polymères et la toxicité des NPs à base de PMLABe et PEG-*b*-PMLABe.

Par ailleurs, les NPs à base de polymères synthétisés à partir de monomères racémique (RS) ou optiquement actif (R ou S) par voie enzymatique montrent aussi des taux de viabilités cellulaires similaires : la chiralité des unités monomères constituant les polymères ne semble donc pas avoir d'influence sur la toxicité des NPs correspondantes.

La captation des NPs par les cellules HepaRG progénitrices et différenciées ainsi que par des macrophages humains a ensuite été évaluée aux doses de 5 µg/ml et 25 µg/ml.

La captation des NPs réalisée à une concentration de 25 µg/ml par tous les modèles cellulaires étudiés était beaucoup plus importante par rapport à celle réalisée à une concentration de 5 µg/ml. Ces données pourraient refléter une captation dose dépendante des NPs. Cependant, le même profil de captation est conservé pour les deux modèles cellulaires utilisés (macrophages humains et HepaRG) indiquant que les différences du niveau de la captation entre un lot de NPs et un autre sont liées aux caractéristiques physicochimiques des NPs.

Les données obtenues par cytométrie en flux montrent que les NPs 3 et les NPs 8 sont beaucoup moins bien captées que les autres lots de NPs. Les copolymères à blocs amphiphiles constituant ces deux lots de NPs (NPs 3 et NPs 8) sont le PEG₄₅-*b*-PMLABe₇₃ et le PEG₁₁-*b*-PMLABe₄₇, respectivement. Le critère commun entre ces deux copolymères est la présence du PEG, ce qui implique que la présence de PEG réduit significativement la captation des NPs. Ces données sont en accord avec plusieurs études menées sur la captation des NPs polymères *in vitro* ²⁹⁸. Cependant, en comparant l'efficacité de captation des NPs 3 et des NPs 8, la captation des NPs 8 est nettement supérieure à celle des NPs 3. La différence entre ces deux lots de NPs, outre le fait que le copolymère à bloc constituant les NPs 3 est synthétisé par voie chimique alors que celui constituant les NPs 8 est préparé par voie enzymatique, est la masse molaire du bloc PEG qui est de 2 000 g/mol pour le copolymère à bloc constituant les NPs 3 contre 500 g/mol pour celui formant les NPs 8 (45 unités de PEG pour NPs 3 vs 11 unités de PEG pour NPs 8). Ces résultats montrent que plus le bloc PEG a une masse molaire élevée, plus la captation cellulaire est diminuée, en accord avec les résultats de la littérature concernant les études de l'influence de la masse molaire du PEG constituant la couronne hydrophile de NPs sur la diminution de leur reconnaissance par le système immunitaire et donc sur leur captation cellulaire ²⁹⁹.

Le diamètre hydrodynamique des NPs semble, quant à lui, avoir une influence significative sur leur captation par les deux modèles cellulaires : l'internalisation des NPs est plus efficace lorsque leurs diamètres hydrodynamiques sont petits. En effet, les NPs 4 et 5, préparées toutes les deux à partir d'homopolymères synthétisés par voie enzymatique à partir de RS-MLABe ont des diamètres hydrodynamiques de 200 et 125 nm, respectivement. Les NPs 4 ayant un diamètre hydrodynamique plus important (200 nm), sont moins bien captées que les NPs 5, vérifiant que la captation diminue en fonction du diamètre hydrodynamique de la nanoparticule (Fig. 60).

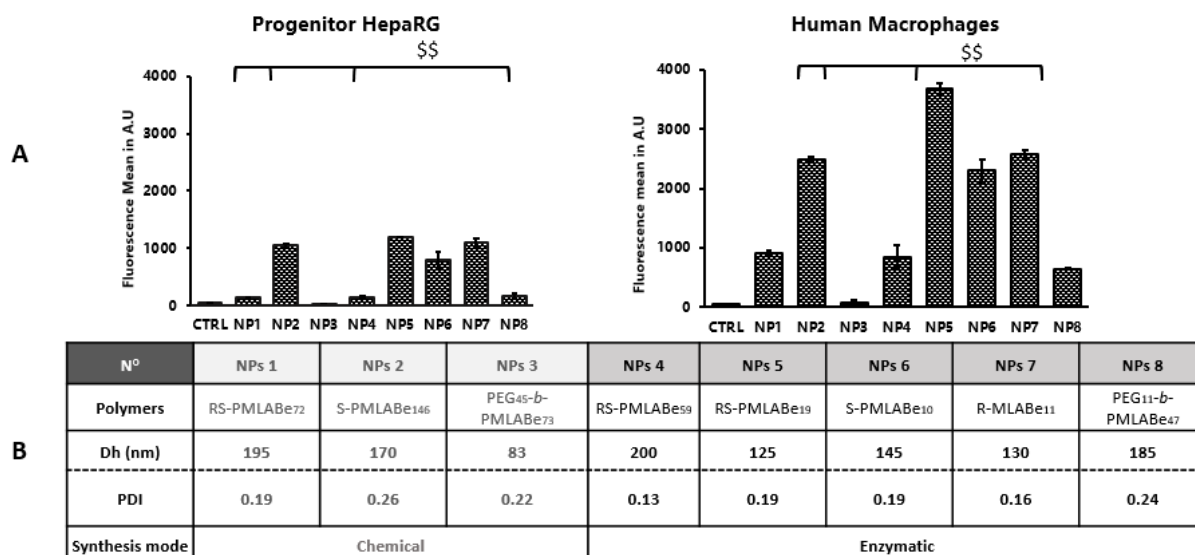


Figure 60 : A : Histogrammes représentant la moyenne de fluorescence pour l'ensemble des cellules (gauche), et le pourcentage des cellules positives (droite) suite à l'incubation des HepaRG progénitrices et des macrophages humains avec les différents types de NPs. B : Tableau représentant les différents types de NPs préparées et leurs caractéristiques physicochimiques (Polymères d'origine, diamètre hydrodynamique, indice de polydispersité, et mode de synthèse).

Par ailleurs, la chiralité des unités monomères constituant les polymères formant les NPs pourrait jouer un rôle dans la captation des NPs correspondantes. En effet, la captation des NPs 2 est beaucoup plus élevée que celle des NPs 1, alors que les polymères les constituant ont des masses molaires et que les NPs ont des diamètres hydrodynamiques similaires. La différence entre ces deux lots de NPs est basée sur le fait que les NPs 1 sont préparées avec l'homopolymère racémique RS-PMLABe, alors que les NPs 2 ont été préparées avec l'homopolymère optiquement actif S-PMLABe, suggérant que les NPs dérivées d'homopolymères optiquement actifs présentent une caractéristique physico-chimique favorisant la captation cellulaire des NPs (Fig. 60A). Des études complémentaires pour caractériser, d'une part, la conformation des chaînes macromoléculaires (Rayons X, par exemple) et, d'autre part, la morphologie des NPs correspondantes (Microscopie électronique à transmission, TEM) sont nécessaires afin de confirmer la relation entre conformation des chaînes macromoléculaires liées à la chiralité des unités monomères, morphologie des NPs et efficacité de captation cellulaire.

Enfin, les NPs préparées à partir d'homopolymères de faibles masses molaires et synthétisés par voie enzymatique (NPs 5, 6 et 7) sont les mieux captées. Cette observation semble indiquer que les homopolymères obtenus par voie enzymatique forment des NPs ayant des caractéristiques physicochimiques favorisant leur captation.

En conclusion, le mode de synthèse des polymères, leur chiralité et leurs masses molaires n'influencent pas la toxicité des NPs correspondantes. Par contre, ces paramètres semblent avoir une forte influence sur les caractéristiques physicochimiques de ces NPs, ces dernières affectant par suite la captation cellulaire des NPs. Comme précisé plus haut, des études complémentaires sont nécessaires afin de déterminer la conformation des PMLABe synthétisés, que ce soit par voie enzymatique ou chimique, et la morphologie des NPs préparées à partir de ces polymères. Lorsque ces caractéristiques seront connues, il sera alors possible d'expliquer de façon précise les différences de captation observées entre les lots de NPs.

Nous avons ensuite évalué les effets de la même série de NPs suite à une exposition chronique des cellules HepaRG. L'objectif est de réaliser une évaluation nanotoxicologique en recherchant, non pas des effets cytotoxiques, mais un impact sur la prolifération ou la différenciation des cellules hépatiques exposées à des doses faibles, mais répétées, de NPs. Ce type d'étude se rapproche de travaux réalisés au laboratoire sur les effets d'exposition chronique des cellules hépatiques à des xénobiotiques tels que des médicaments, des polluants de l'environnement comme les pesticides³⁰⁰.

Les hépatocytes étant à la fois exposés aux xénobiotiques et capables de les métaboliser, ils sont susceptibles de subir la toxicité de composés réactifs. Dans le contexte de l'exposition humaine aux xénobiotiques ou à des NPs, il est important d'évaluer minutieusement leur métabolisme et leur toxicité dans les hépatocytes. Les études toxicologiques s'appuient sur des modèles cellulaires *in vitro* et sur des modèles animaux pour mener des essais précliniques et d'évaluation de la toxicologie des xénobiotiques. Les cultures primaires d'hépatocytes humains constituent un modèle de choix pour mener des études toxicologiques³⁰¹. Cependant, il existe plusieurs limites et contraintes liées à leur utilisation. Leur disponibilité est dépendante des biopsies chirurgicales et le nombre d'hépatocytes est réduit par la qualité du tissu et le volume de parenchyme « sain » récupéré. Enfin, il existe une grande variabilité d'activité métabolique entre chaque expérience due aux altérations fonctionnelles des cellules isolées des biopsies de patients atteints de différentes pathologies ou soumis à des traitements médicamenteux.

La lignée cellulaire HepaRG, établie à partir des cellules isolées d'un carcinome hépatocellulaire humain²⁹⁰, est un des modèles *in vitro* d'étude toxicologique et de métabolisme sur hépatocytes humains car ces cellules possèdent une expression des enzymes hépatiques proche de celles des hépatocytes humains^{289, 302}. Ces cellules sont des cellules progénitrices bipotentes qui ont la capacité de se différencier, lorsqu'elles sont à confluence, en deux populations de cellules distinctes : les cholangiocytes et les hépatocytes. Les cellules sont entretenues selon un protocole

très codifié issu des travaux du laboratoire. La population est amplifiée à partir d'une culture confluente par décollement des cellules 14 jours après ensemencement (Fig. 61A). Les cellules sont ensemencées à faible densité permettant une forte prolifération pendant la première semaine. Lors de la seconde semaine, la prolifération réduit fortement pour atteindre la quiescence lorsque la monocouche est complète, parallèlement à l'engagement de la différenciation dans les lignages hépatocytaire et cholangiocytaire (Fig. 61A). Il est possible d'accentuer la différenciation des cellules en ajoutant 2% de diméthylsulfoxyde (DMSO) au milieu de culture et d'augmenter ainsi l'expression des enzymes hépatiques dans les hépatocytes^{303, 288, 304, 300}.

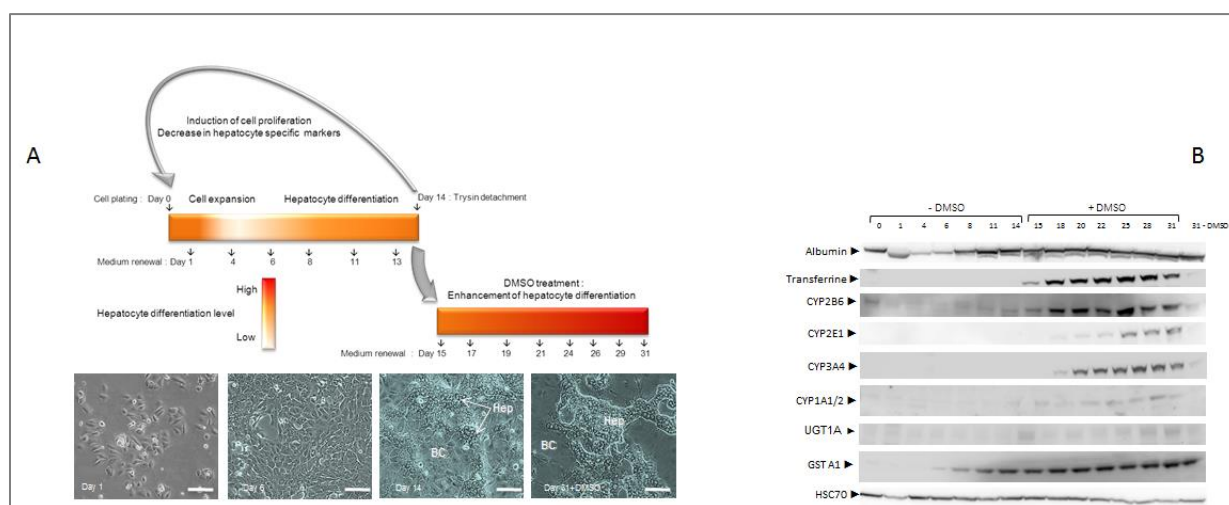


Figure 61 : A. Progression des cellules de la lignée HepaRG à différents stades. Au jour 1, cellules progénitrices proliférantes. Au Jour 6, les cellules atteignent la confluence et arrêtent de proliférer par inhibition de contact. Au Jour 14, les cellules commencent à engager la différenciation. A ce stade, la culture est soit repiquée et ensemencée à faible densité, soit 2% de DMSO sont ajoutés dans le milieu de culture pour potentialiser la différenciation. Au bout de 14 jours de culture supplémentaires, les cellules atteignent leur niveau de différenciation maximal (Jour 31); B. Immunoblot montrant l'évolution de l'expression protéique de fonctions spécifiques de l'hépatocyte entre le jour 1 et le jour 31.

Dans une étude récente publiée en 2019, Vlach et al. montrent, par immunoblot, que l'expression protéique de fonctions spécifiques de l'hépatocyte, dont des enzymes de phase 1 et 2, varie considérablement sur la période de 31 jours de culture avec une dépendance vis-à-vis de la stimulation par le DMSO pour certaines d'entre elles (Fig. 61B). Cette période est représentative de l'expression de l'ensemble des stades de différenciation des cellules HepaRG durant leur culture. Le protocole montre trois stades bien distincts : l'ensemencement où la différenciation est faible, le stade confluent au 14^{ème} jour et enfin le 31^{ème} jour qui survient après la culture en condition de stimulation en DMSO 2%. Ce protocole de culture permet de parvenir à une expression plus forte des enzymes hépatiques et plus proche de celle d'un hépatocyte humain primaire.

Nous avons donc choisi d'utiliser ce modèle pour étudier l'influence de l'exposition chronique de ces cellules HepaRG aux nanoparticules sur l'intégralité de leur cinétique de différenciation pendant 30 jours (Fig. 62). Les cellules ont été traitées 7 fois par des NPs en quantité variable afin d'obtenir des concentrations finales en (co)polymères de 1µM pour les NPs 1 à 7.

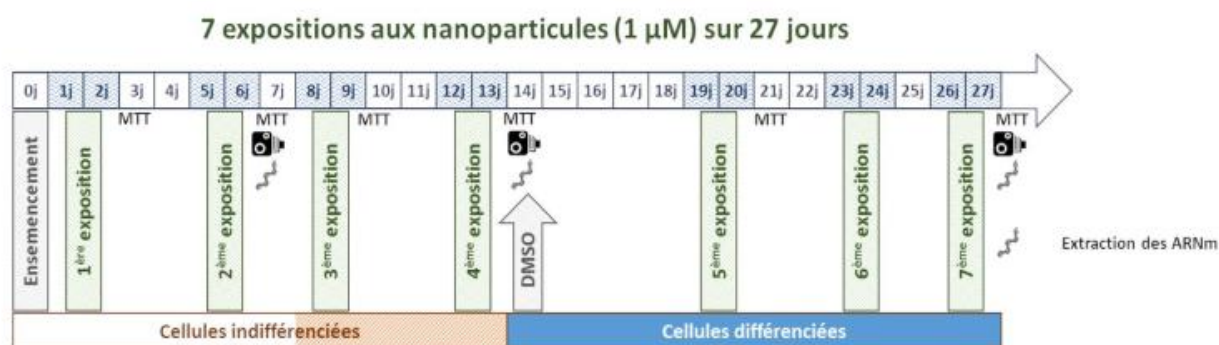


Figure 62 : Schéma expérimental de l'exposition des cellules HepaRG aux NPs pendant les 30 jours de culture. Les cellules ont été exposées à 7 traitements réitérés, 4 pendant les 2 premières semaines et 3 pendant les 2 dernières lors de la potentialisation de leur différenciation par le DMSO à 2%. Les traitements ont été réalisés en ajoutant des NPs en nombre variable pour obtenir une concentration finale en polymère de 1µM. Les analyses ont consisté à réaliser un test de viabilité au MTT à différents temps et à extraire des ARN totaux à 3 temps (jours 7, 14 et 27) afin d'analyser l'impact sur la différenciation par l'étude de marqueurs géniques.

Les analyses de viabilité cellulaire basée sur l'observation morphologique des cellules au microscope à contraste de phase et la mesure de l'activité au MTT (données non montrées) n'ont révélé aucune toxicité de ces traitements chroniques indiquant que ce protocole et l'exposition répétée à 1mM de (co)polymères n'induisaient aucune toxicité cellulaire, à aucun des temps testés.

Nous avons ensuite étudié l'expression de plusieurs gènes au niveau de leur ARNm par RT-qPCR afin de rechercher un éventuel effet d'altération de la prolifération et/ou de la différenciation hépatocytaire lors de la cinétique des 30 jours de culture du protocole utilisé pour les cellules HepaRG. L'expression des marqueurs de prolifération (tels que CDK1 et Ki67) n'a montré aucune différence entre les cellules contrôles et celles exposées aux différentes NPs (données non montrées). Ensuite, une série de marqueurs de différenciation hépatocytaire a été analysée en particulier des enzymes de phase I (CYP450) et II (UGT) mais également des marqueurs d'inflammation (CRP), de stress oxydant (SOD2, GSTA4) et le gène xCT impliqué dans la captation de cystine et la synthèse du glutathion (Fig. 63). Cette vaste étude a démontré que les cellules HepaRG se différenciaient parfaitement dans toutes les conditions de traitement puisque tous les marqueurs de différenciation sont fortement induits dans les cellules confluentes et/ou différenciées au jour 30. Nous n'avons pas non plus observé d'induction de la CRP ni des

gènes de stress oxydant. Un seul marqueur, l'UGT1A1, montre des variations significatives au jour 30 et seulement avec certaines NPs. En effet, les cellules différenciées exposées aux NPs 1, 5, 6 et 7 expriment des niveaux relatifs des ARNm UGT1A1 plus élevés que les cellules contrôles et les cellules exposées aux autres NPs.

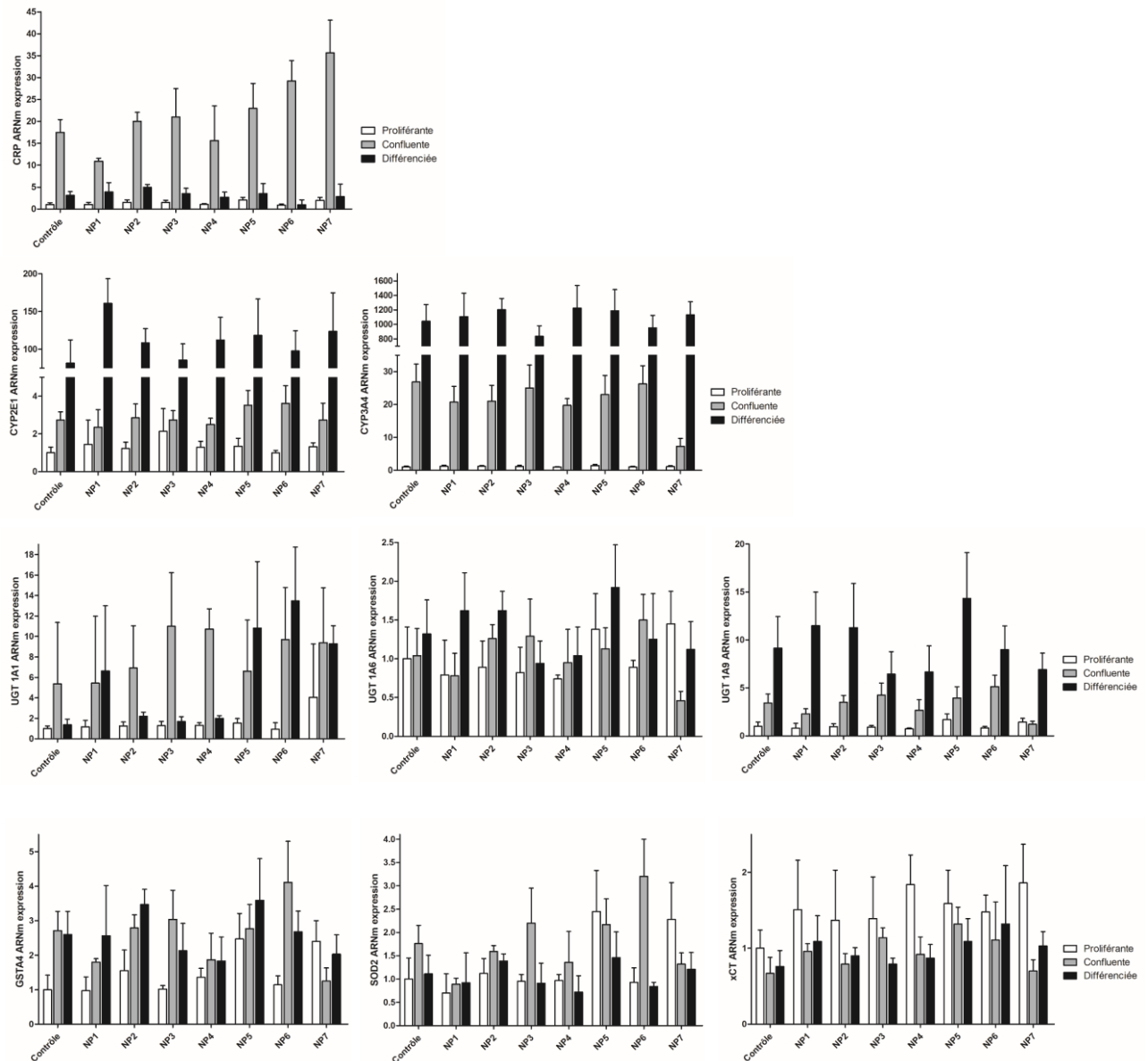


Figure 63 : RT-qPCR évaluant l'impact sur la différenciation des cellules HepaRG par l'étude de marqueurs géniques des fonctions hépatocytaires. Les traitements ont été réalisés en ajoutant des NPs en nombre variable pour obtenir une concentration finale en polymère de 1 μ M. Les analyses ont consisté à déterminer l'expression relative des différents gènes ramenée à la condition contrôle (cellules non exposées aux NPs) au temps jour 7 (cellules proliférantes). L'analyse en qPCR a été réalisée aux temps 7, 14 (cellules confluentes quiescentes) et 30 jours (cellules différenciées).

En conclusion, cette étude a permis d'élaborer huit lots de NPs biodégradables, biocompatibles et bien captées par les cellules HepaRG dont l'effet sur la viabilité des cellules hépatiques lors d'expositions aiguës pendant 48 heures ou chroniques sur une période de 4 semaines, est négligeable.

Cette étude confirme le lien entre l'efficacité de l'internalisation cellulaire et la présence de PEG ou encore le diamètre hydrodynamique des NPs. Par contre, le mode de synthèse ne semble pas affecter ni la viabilité cellulaire ni la captation des NPs. De plus, nos travaux ouvrent la piste d'un effet de la chiralité des unités monomères sur l'organisation tridimensionnelle des NPs et leur internalisation.

Enfin, bien qu'aucune des NPs n'induisent d'altérations de la prolifération et de la différenciation des cellules HepaRG lors d'expositions chroniques, nos résultats préliminaires suggèrent que des NPs préparées à partir de certains des (co)polymères modifieraient le profil d'expression d'enzymes de biotransformation, en particulier l'isoforme UGT1A1. Ces résultats préliminaires seront confirmés par une nouvelle série d'expériences et la vérification de cette induction ciblée de l'UGT1A1 par l'étude de son expression protéique et de son activité enzymatique.

3.2 Chapitre 2. NPs à base de dérivés du PMLABe : Effet de la présence de poly(éthylène glycol) et de protéines sériques sur leur captation par des cellules d'hépatome et des macrophages humains

3.2.1 Contexte générale de l'étude

Le succès de la nanomédecine thérapeutique anticancéreuse dépend largement de sa capacité de franchir les différentes barrières biologiques liées à la tumeur ou au système immunitaire. Le microenvironnement tumoral et la matrice extracellulaire tumorale représentent des barrières moléculaires et cellulaires qui limitent la captation des NPs par les cellules tumorales, réduisant l'efficacité thérapeutique de la nanomédecine administrée ¹⁸². L'administration de la nanomédecine se fait, généralement, par voie intraveineuse (*i.v.*) et les NPs sont, par conséquent, rapidement en contact avec les protéines sériques. Ce contact conduit à l'opsonisation des NPs par les protéines du sang. Ce phénomène facilite la phagocytose des NPs par les macrophages du système RES réduisant ainsi le ciblage d'autres organes y compris vers le compartiment hépatocytaire du foie ¹⁵⁰.

L'évaluation du niveau d'accumulation intracellulaire des NPs *in vitro* par la technique de cytométrie en flux, tout en tenant compte des barrières biologiques possibles, peut guider les chercheurs sur l'efficacité des NPs conçues. Dans cette seconde partie de ma thèse, j'ai souhaité comparer de façon plus approfondie la captation des NPs à base de PMLABe et de son dérivé amphiphile, le PEG-*b*-PMLABe, dans les cellules d'hépatome HepaRG et les macrophages humains en culture primaire en analysant les cinétiques d'internalisation des NPs lors d'une incubation unique ou de plusieurs incubations. De plus, mon travail a consisté à évaluer l'effet de la présence de la couronne de PEG et l'opsonisation par des protéines sériques sur la captation des NPs *in vitro*.

Dans ce but, nous avons préparé et caractérisé des NPs à base des polymères PMLABe₇₃ et de PEG₄₂-*b*-PMLABe₇ encapsulant un fluorochrome nommé DiDoil. Les NPs ont été testées sur le modèle d'hépatome HepaRG ainsi que sur des macrophages humains obtenus par différenciation *in vitro* de monocytes purifiés à partir de « buffy coat » préparés par l'Etablissement Français du Sang de Rennes. Dans un premier temps, j'ai réalisé des cinétiques de captation des NPs par ces deux modèles cellulaires en utilisant la technique de cytométrie en flux. J'ai également testé l'impact d'expositions répétées des modèles cellulaires utilisés aux NPs afin d'examiner les changements possibles sur le niveau d'accumulation intracellulaire de NPs. Enfin, j'ai caractérisé le processus d'internalisation des NPs mis en jeu par les cellules (Phagocytose ou Endocytose) en s'appuyant sur les techniques de cytométrie en flux et de microscopie confocale.

3.2.2 Evolution du profil de captation en fonction du temps dans des cinétiques de captation des NPs à base de dérivés du PMLABe par des macrophages humains et des cellules d'hépatome suite à un traitement par une dose unique de NPs

L'évaluation de la captation des NPs par les cellules traitées a été réalisée par la technique de cytométrie en flux. Pour ce but, j'ai utilisé des NPs chargées en DiDoil (1 mg/mL soit 1 %wt par rapport à la masse de (co)polymère), sachant que le DiDoil est un fluorochrome utilisé pour marquer les NPs dans plusieurs techniques dont la technique de cytométrie en flux. Les NPs ont été ajoutées aux cellules à la concentration de 25 µg/mL.

Pour réaliser ce travail ayant pour but d'étudier l'évolution du profil de captation des NPs en fonction du temps, des cinétiques de captation de NPs PMLABe et PEG-*b*-PMLABe ont été réalisées avec des cellules HepaRG progénitrices et des macrophages humains (Fig. 64).

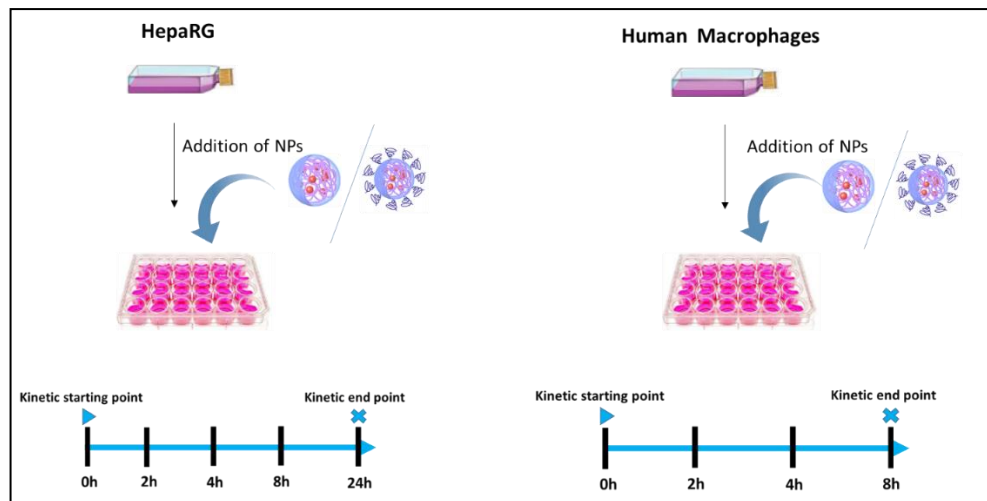


Figure 64 : Protocole suivi pour la réalisation des cinétiques de captation de NPs par les cellules HepaRG progénitrices et les macrophages humains.

Le cytomètre fournit un signal relatif à l'intensité de fluorescence des cellules sous la forme d'un histogramme représentant le nombre de cellules en fonction de leur intensité de fluorescence. Dans le cas des cellules non traitées par les NPs, le signal généré reflète l'auto fluorescence cellulaire, ce signal marque la zone négative M1 (les cellules qui n'ont pas capté les NPs fluorescentes). Le traitement des cellules par les NPs conduit à un déplacement du signal vers la zone positive M2 de l'histogramme obtenu (Fig. 65).

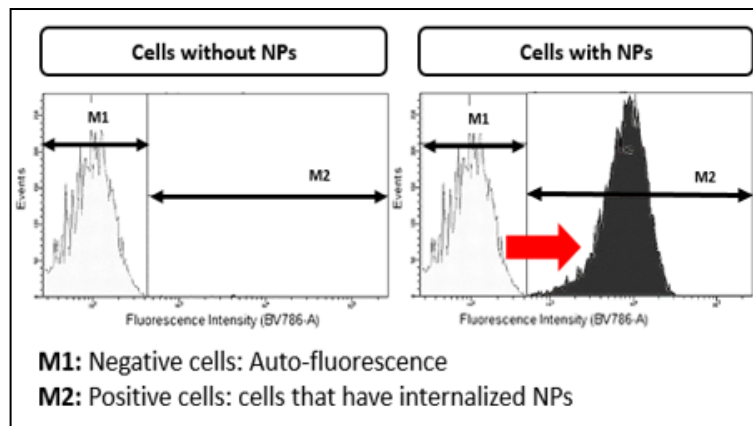


Figure 65 : Illustration schématique expliquant le déplacement du signal fourni par cytométrie en flux de la zone négative M1 à la zone positive M2 suite au traitement par les NPs fluorescentes.

L'analyse des résultats de cytométrie en flux est faite en utilisant le logiciel d'analyse DIVA. Cette analyse permet de déterminer deux paramètres essentiels : la moyenne de fluorescence de l'ensemble des cellules qui est proportionnelle au nombre de NPs captées par cellule, et le pourcentage des cellules positives reflétant le nombre de cellules qui ont captées les NPs par rapport à l'ensemble de cellules traitées.

J'ai calculé le ratio des signaux ou "Fold change" de la moyenne de fluorescence des cellules ($Fluorescence\ Fold\ change = \frac{moyenne\ de\ fluorescence\ à\ un\ temps\ donné}{moyenne\ de\ fluorescence\ au\ temps\ 0}$). Ensuite et en utilisant Microsoft Excel, j'ai élaboré des graphes représentant soit le « Fold change » calculé, soit le pourcentage des cellules positives en fonction du temps. Les barres d'erreurs ainsi sont également déterminées en utilisant Microsoft Excel.

Les graphes concernant les cellules HepaRG représentent une compilation de plusieurs répétitions de l'expérience ($n > 3$). Cependant, il était impossible de combiner les données concernant la moyenne de fluorescence des macrophages obtenues à partir des différentes manipulations réalisées en raison de la grande différence observée entre les donneurs de sang (Fig. 66).

Les données obtenues concernant la moyenne de fluorescence et le pourcentage des cellules positives montrent bien que la captation des NPs par les cellules suite à une seule incubation augmente en fonction du temps. De plus, la captation des NPs à base de PMLABe est beaucoup plus importante que celle des NPs à base de PEG-*b*-PMLABe pour les deux modèles cellulaires utilisés, indiquant que la présence d'une couronne de PEG à la surface des NPs réduit très fortement la captation.

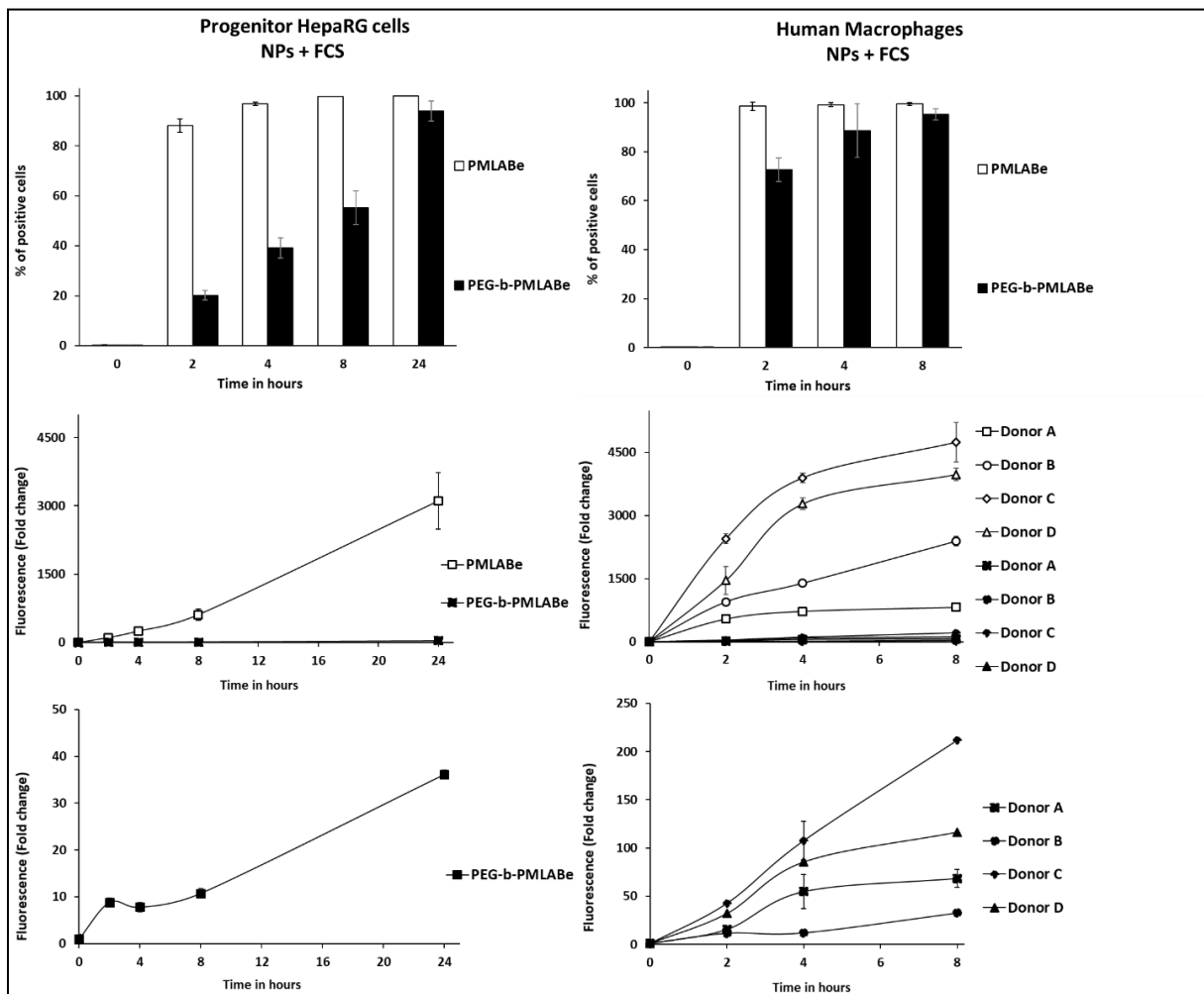


Figure 66 : Captation des NPs PMLABe et des NPs PEG-b-PMLABe par des HepaRG progénitrices (gauche) et des macrophages humains (droite). Les cellules HepaRG ont été incubées avec les NPs pendant 24h, et les macrophages ont été incubés avec les NPs pendant 8h. Les digrammes en battons représentent le % des cellules positives (ayant capté les NPs) tandis que la partie inférieure représente la moyenne de fluorescence reflétant l'accumulation intracellulaire des NPs.

Ces mêmes données indiquent que, pour la majorité des donneurs de monocytes, les macrophages qui en sont issus captent largement plus les deux types de NPs par rapport aux cellules HepaRG avec des cinétiques très différentes qui sont pratiquement linéaires pour les cellules HepaRG et exponentielles pour des NPs à base de PMLABe dans les macrophages.

3.2.3 Effet du pourcentage de PEG et du sérum de veau foetal sur la captation des NPs par des cellules d'hépatomes et des macrophages humains

Le poly(éthylène glycol), PEG, possède des propriétés physicochimiques et biologiques exceptionnelles. Cette macromolécule est soluble dans l'eau et dans certains solvants organiques. Le PEG a été approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) des Etats-Unis pour des applications chez l'Homme. Grâce à ces propriétés, le PEG est généralement utilisé pour fournir une barrière stérique hydratée à la surface des nanoparticules³⁰⁵. Il est largement décrit dans la littérature que le PEG confère aux nano-vecteurs des propriétés de furtivité. Cette couronne de PEG peut réduire l'opsonisation par les protéines sériques et, par conséquent, la phagocytose résultante par les cellules non parenchymateuses du foie, aidant ainsi les nanoparticules à échapper au le système réticuloendothélial après une administration par voie intraveineuse^{306, 307, 308}.

Nous avons donc décidé d'étudier l'influence de la présence d'une couronne de PEG à la surface des NPs à base de PMLABe sur leur captation par des cellules HepaRG progénitrices, ainsi que par des macrophages humains. Pour ce faire, nous avons mélangé des proportions différentes des deux polymères PMLABe et PEG-*b*-PMLABe pour préparer deux lots additionnels de NPs : un lot de NPs préparés à partir d'un mélange de 75 wt% de PMLABe et de 25 wt% de PEG-*b*-PMLABe (NPs 25% PEG) et un autre lot de NPs préparées à partir d'un mélange de 50 wt% de PMLABe et de 50 wt% de PEG-*b*-PMLABe (NPs 50% PEG) (Fig. 67).

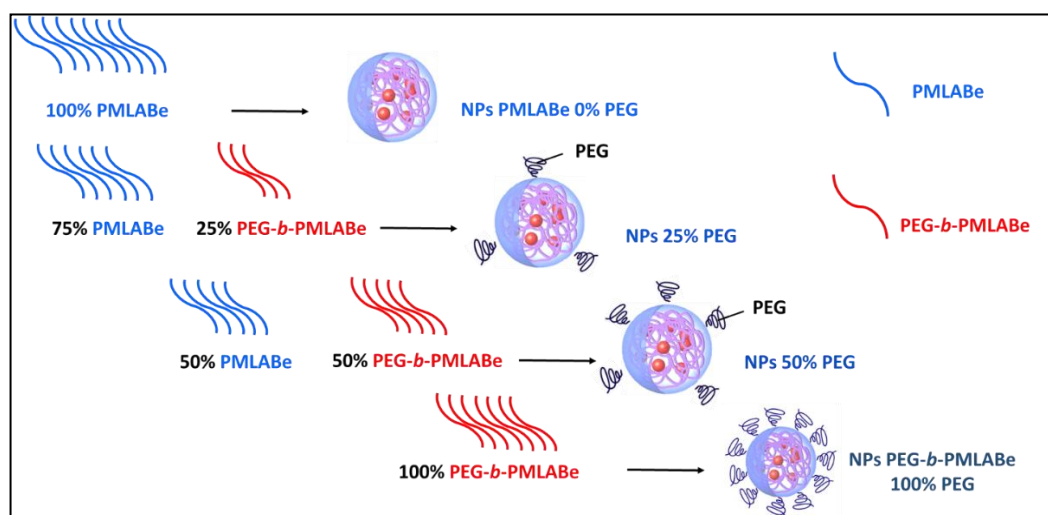


Figure 67 : Illustration schématique de la préparation de NPs à base de PMLABe ayant différents pourcentages de PEG en surface.

En utilisant ces NPs, j'ai réalisé des expériences dans les mêmes conditions cinétiques que celles décrites précédemment. De plus, et dans le but d'évaluer l'effet du sérum de veau foetal sur la

captation des NPs, j'ai réalisé les mêmes cinétiques dans un milieu de culture exempt de SVF. Les résultats concernant les cellules HepaRG progénitrices (n>3) sont présentés dans la figure 68.

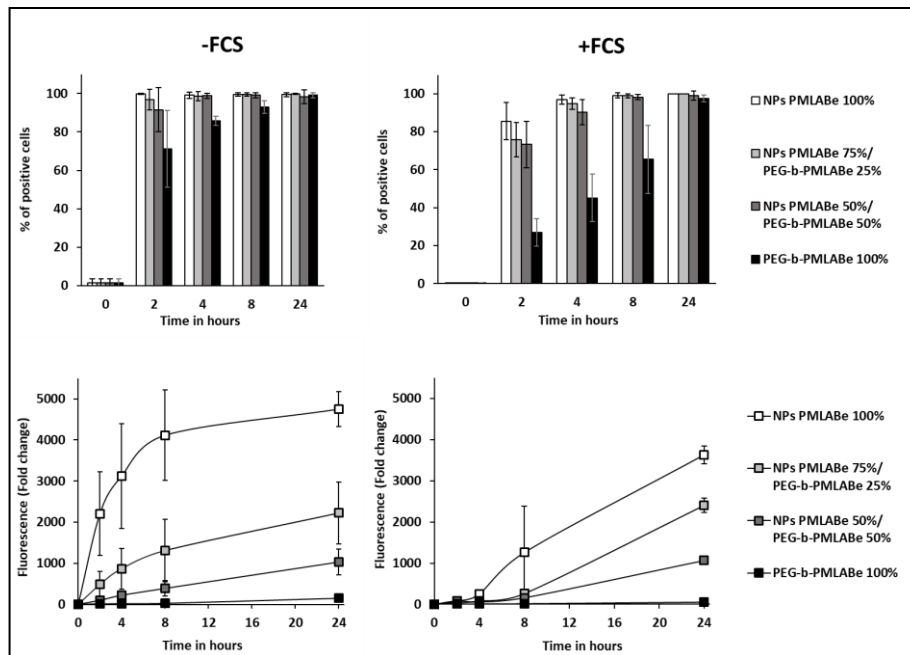


Figure 68 : Effet du % de PEG sur la captation des NPs par des HepaRG progénitrices. Les cellules ont été traitées par des NPs ayant des pourcentages différents de PEG (0%, 25%, 50%, 100%). La partie supérieure de la figure présente les histogrammes représentant le % des cellules positives tandis que la partie inférieure représente la moyenne de fluorescence reflétant l'accumulation intracellulaire des NPs. La partie gauche de la figure représente les expériences réalisées en absence de sérum de veau fœtal (-FCS) dans le milieu de culture des cellules traitées, tandis que la partie droite représente les expériences faites en présence de SVF (+FCS) dans le milieu de culture.

D'une part, les résultats exposés dans la figure 68 mettent en évidence que les NPs non PEGylées sont beaucoup mieux captées que les NPs PEGylées, et que la captation des NPs par les cellules HepaRG diminue proportionnellement en fonction du pourcentage de PEG présent sur la surface des NPs. D'autre part, le taux de fluorescence des cellules incubées avec des NPs en absence de SVF dans le milieu de culture est beaucoup plus important que celui des cellules incubées avec des NPs en présence de SVF, ce qui indique que la présence du SVF limite la captation des NPs par les cellules HepaRG quel que soit le degré de PEGylation des NPs. De plus en absence de sérum la captation survient plus rapidement.

Les résultats des expériences réalisées sur des macrophages humains sont présentés dans la figure 69.

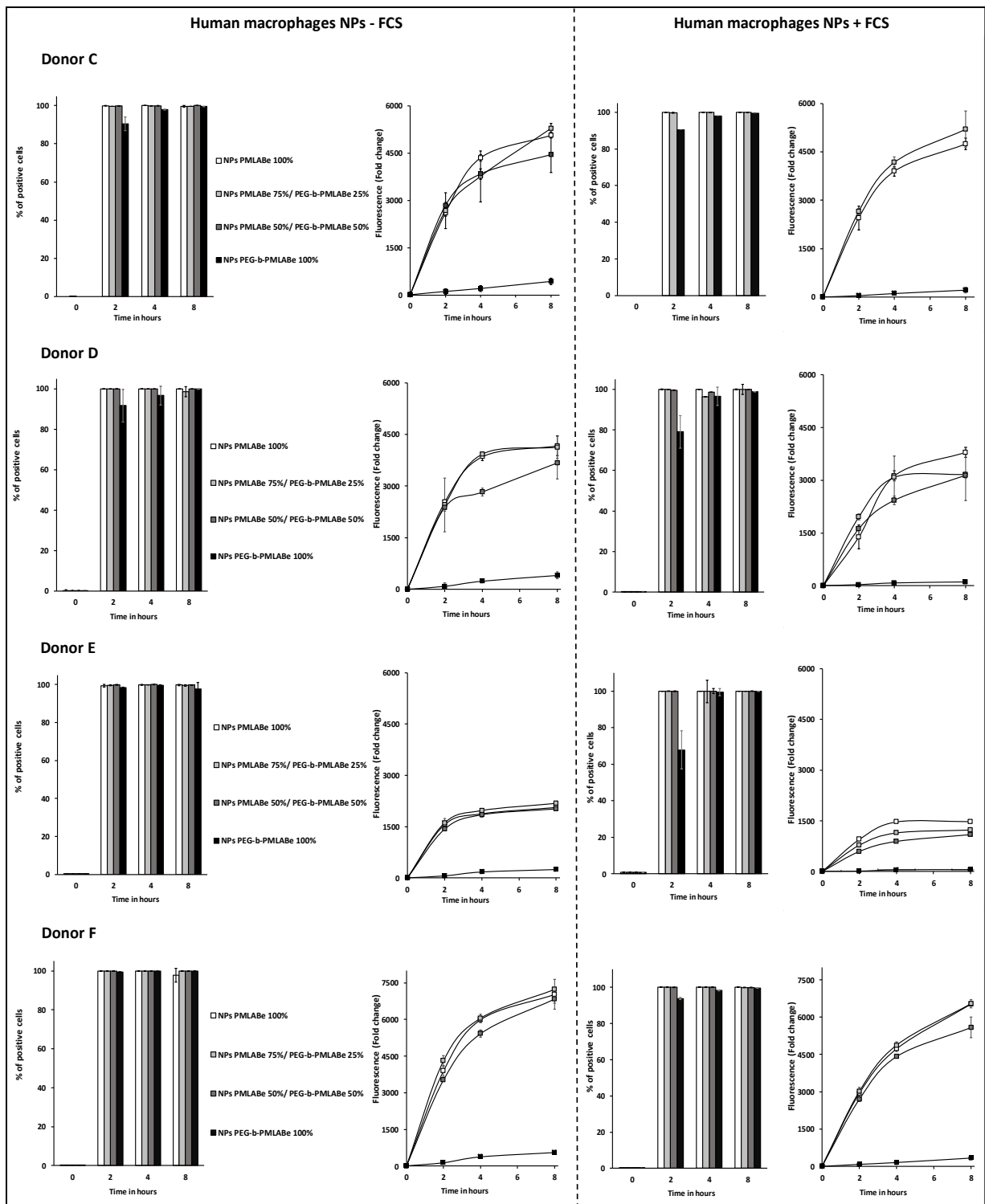


Figure 69 : Effet du % de PEG sur la captation des NPs par des macrophages humains issus de quatre donneurs différents. Les cellules ont été traitées par des NPs ayant des pourcentages différents de PEG (0%, 25%, 50%, 100%). Les colonnes 1 et 3 de la figure contiennent les histogrammes représentant le % des cellules positives tandis que les colonnes 2 et 4 représentent la moyenne de fluorescence (en Fold change) reflétant l'accumulation intracellulaire des NPs. La partie gauche de la figure représente les expériences réalisées en absence de sérum de veau fœtal (SVF) dans le milieu de culture des cellules traitées,

Ces données montrent que les macrophages incubés avec les NPs 0%, 25%, 50% PEG présentent des niveaux de fluorescence très proches (une légère diminution est parfois observée en fonction du % de PEG). Cependant, l'incubation des macrophages avec des NPs 100% PEG résulte en des niveaux de fluorescence significativement inférieurs à ceux observés avec les trois autres types de NPs. Donc, une couronne de PEG dense à la surface des NPs PMLABe est requise pour inhiber fortement leur captation cellulaire par les macrophages humains normaux.

Par ailleurs, la présence du SVF dans le milieu de culture ne fait varier que très faiblement la moyenne de fluorescence des macrophages incubés avec les NPs 0%, 25%, 50% PEG. Toutefois, la présence de SVF dans le milieu de culture conduit à une diminution significative de la moyenne de fluorescence des macrophages incubés avec les NPs 100% PEG suggérant donc que le SVF induit une diminution de la captation uniquement des NPs 100% PEGylées.

3.2.4 Evolution du profil de captation en fonction du temps dans des cinétiques de captation des NPs à base de dérivés du PMLABe par des macrophages humains et des cellules d'hépatome suite à des traitements réitérés avec les NPs PMLABe

Cette partie du projet avait pour objectif d'étudier le devenir des cellules incubées avec les NPs en termes d'accumulation intracellulaire de NPs et de toxicité à moyen terme (plusieurs jours) après l'incubation des cellules soit avec une dose unique, soit lors d'une exposition chronique aux NPs PMLABe sur plusieurs jours.

Pour étudier l'accumulation de NPs fluorescentes dans les cellules, nous avons dû modifier le protocole de préparation des NPs car la fluorescence absolue obtenue pour des cellules ayant capté des NPs PMLABe encapsulant le DiDoil à 1% aboutissait à une saturation des signaux de fluorescence. Le paramètre de sensibilité du cytomètre (Fortessa Becton Dickinson le LSRFortessa™ X-20) initialisé dans l'ensemble de nos expériences jusqu'alors ne permettait de rester dans la gamme dynamique de signaux que pendant 24h pour les cellules HepaRG et 8h pour les macrophages en cinétique de captation avec les NPs PMLABe. Dans la figure 70, je présente l'ensemble des signaux obtenus au début et à la fin des cinétiques et aux temps auxquels nous obtenons la saturation de l'appareil (48h pour les HepaRG et 24h pour les macrophages) qui est visible par des histogrammes accolés à l'axe de droite aux plus grandes valeurs de fluorescence. Les cinétiques ont été réalisées en présence ou en absence du sérum de veau fœtal (SVF) dans le milieu de culture.

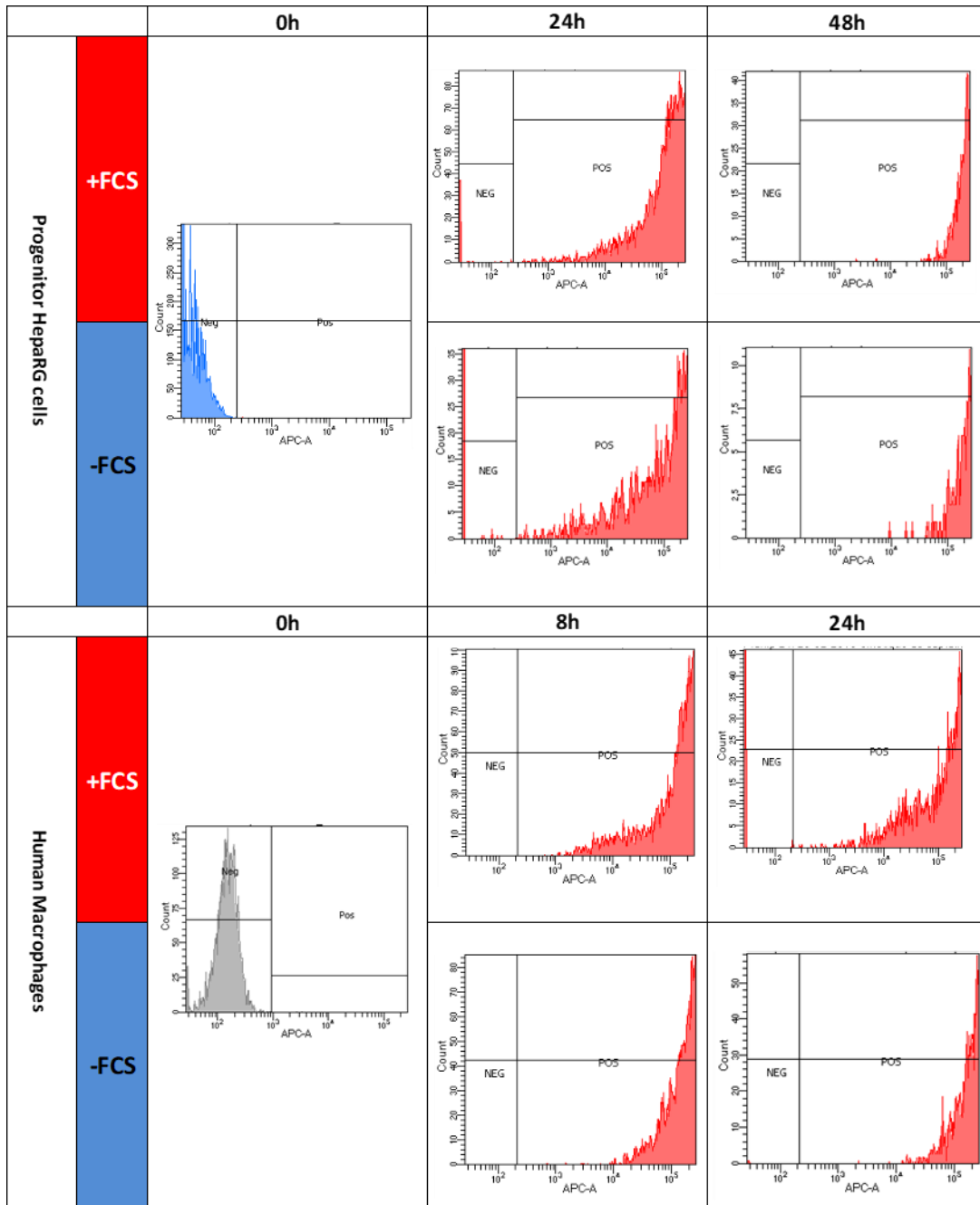


Figure 70 : Graphes représentant le nombre de cellules en fonction de l'intensité de fluorescence suite au traitement par les NPs PMLABe, dans le cas des cellules HepaRG (à 0h, 24h et 48h) et les macrophages humains (à 0h, 8h, 24h) soit en présence soit en absence de sérum de veau fœtal (SVF).

Dans le cas du traitement des cellules par les NPs PEG-*b*-PMLABe, aucune perte de signal n'a été démontrée aux mêmes temps des cinétiques réalisées avec les NPs PMLABe (Fig. 71).

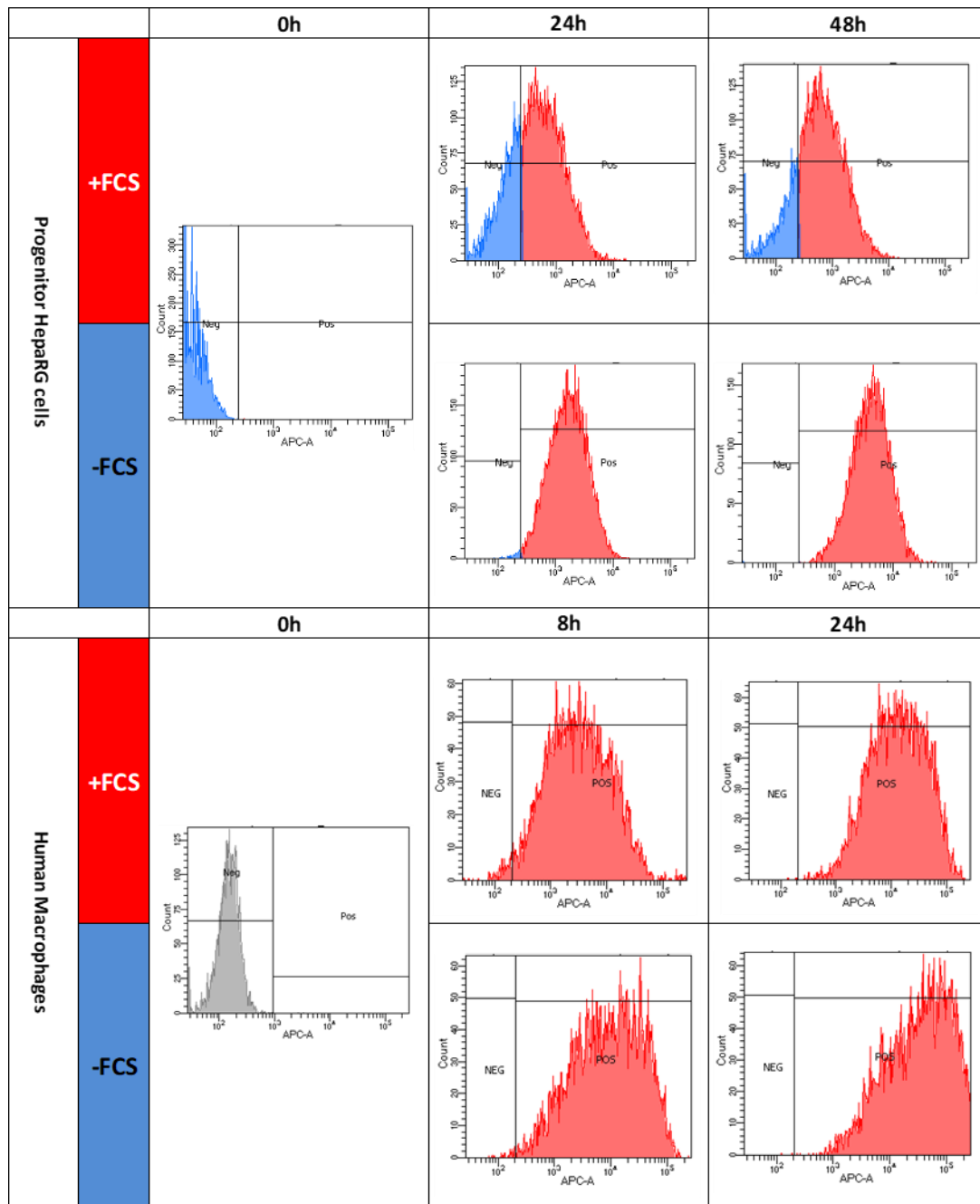


Figure 71 : Graphes représentant le nombre de cellules en fonction de l'intensité de fluorescence suite au traitement par les NPs PEG-b-PMLABe, dans le cas des cellules HepaRG (à 0h, 24h et 48h) et les macrophages humains (à 0h, 8h, 24h) soit en présence soit en absence de sérum de veau fœtal (SVF).

Pour pouvoir prolonger la durée des cinétiques de captation des NPs PMLABe, je devais changer soit le paramètre de sensibilité du cytomètre, soit la quantité ajoutée de DiDoil par nanoparticule. Dans ce contexte, nous avons préparé un lot de NPs à base de PMLABe contenant 0.1 wt% DiDoil et un mélange de NPs PMLABe 1 wt% DiDoil avec des NPs PMLABe vides (1:9). J'ai testé ces deux lots de NPs préparées sur les macrophages humains tout en réduisant le paramètre

de sensibilité de l'appareil utilisé pour pouvoir choisir les conditions les plus adaptées à une cinétique de longue durée (Fig. 72).

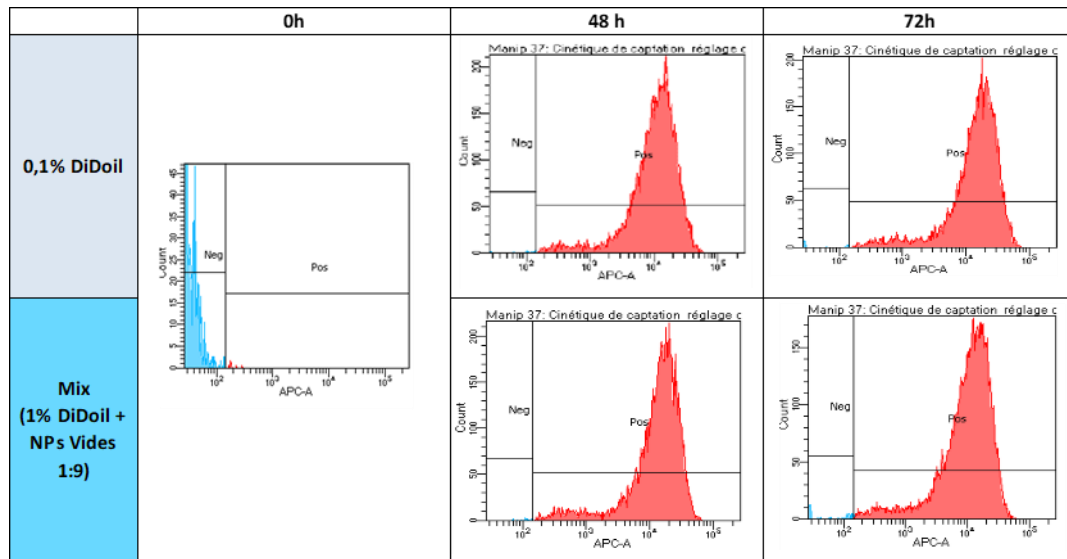


Figure 72 : Histogrammes représentant le nombre de cellules en fonction de l'intensité de fluorescence suite à l'incubation des macrophages humains soit avec des NPs PMLABe 0,1% DiDoil soit avec le mélange NPs 1% DiDoil - NPs vides (1 :9)

En s'appuyant sur ces résultats, nous avons choisi les NPs PMLABe 0,1 wt% DiDoil pour réaliser ce travail. J'ai décidé alors de prolonger la durée des cinétiques de captation jusqu'à 168h. Dans une première condition, 48h après incubation de la première dose de NPs PMLABe, le milieu de culture est éliminé et remplacé par un milieu de culture exempt de NPs, la cinétique a été poussée jusqu'à 168h. Le milieu de culture enlevé a été récupéré et transféré à des cellules non traitées par des NPs, la durée de la cinétique réalisée avec les cellules non traitées est de 48h. Le but de cette condition est de déterminer si le milieu de culture contient toujours à ce stade de la cinétique des NPs aptes à être captées par d'autres cellules « naïves ».

En parallèle, j'ai réalisé une cinétique dans laquelle les cellules ont été traitées plusieurs fois par des NPs PMLABe (0h, 48h, 96h). A ces temps, le milieu de culture est remplacé par un milieu frais contenant la même dose de NPs PMLABe. Le but de ce travail est de déterminer si les cellules atteignent un stade de saturation à partir duquel elles seront incapables de capter plus des NPs c'est-à-dire de déterminer si le processus d'internalisation est saturable et si de très forte accumulation de NPs génèrent une cytotoxicité (Fig. 73).

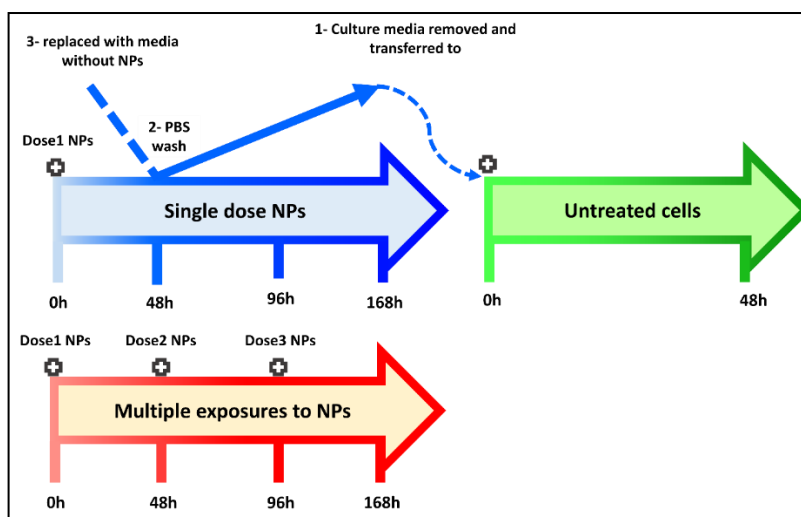


Figure 73 : Schéma représentant le protocole expérimental suivi pour les différentes cinétiques de traitements réitérés.

Avant d'élaborer les résultats concernant la moyenne de fluorescence des macrophages (en Fold change), j'ai vérifié que l'appareil permettait de suivre la fluorescence des cellules pendant 168h et suite à plusieurs incubations avec les NPs PMLABe sans saturation du signal de fluorescence (Fig. 74).

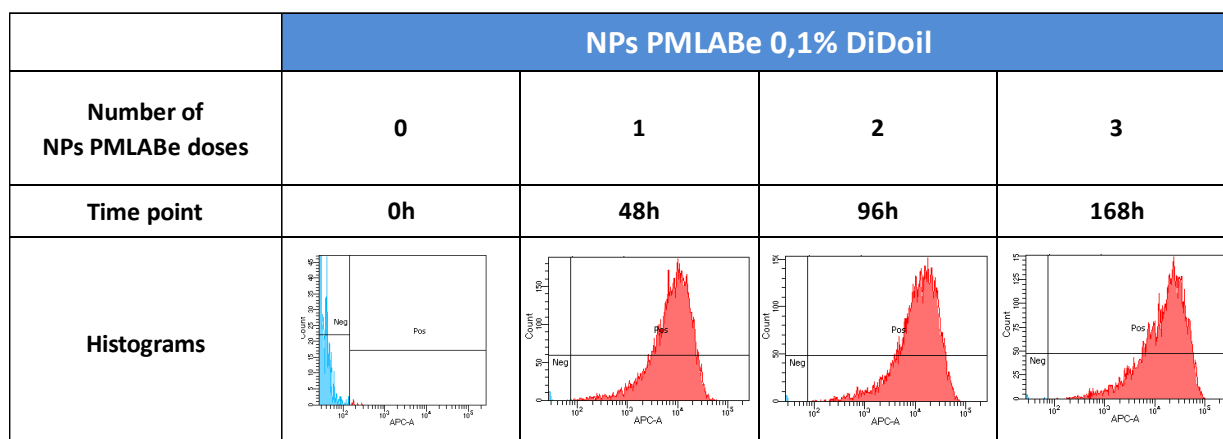


Figure 74 : Histogrammes représentant le nombre de cellules en fonction de l'intensité de fluorescence suite à l'incubation des macrophages humains avec soit, 0, 1, 2 ou 3 doses des NPs PMLABe 0,1wt% DiDoil.

Après avoir validé cette procédure de cytométrie en flux, j'ai évalué la toxicité des NPs sur les macrophages après 168h en utilisant le test ATP de viabilité cellulaire. Les résultats sont présentés dans la figure 75.

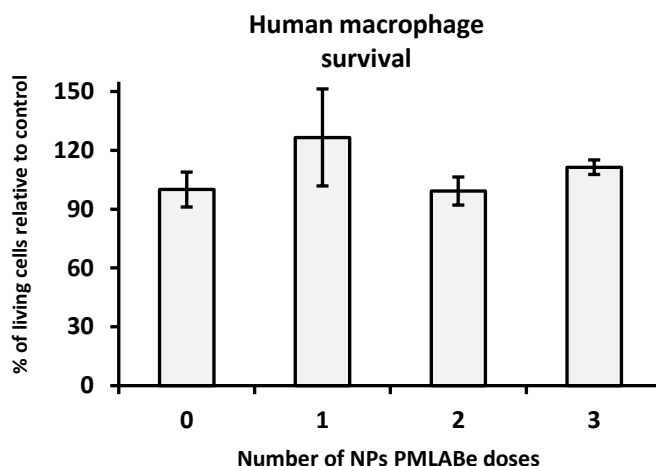


Figure 75 : Evaluation de la viabilité cellulaire des macrophages humains issus d'un donneur (n=1) sur une période de 168h sans exposition (0) ou après expositions 1, 2 ou 3 fois à des NPs PMLABe. La viabilité cellulaire est mesurée par le contenu relatif en ATP rapporté aux cultures contrôles non traitées.

Ces données démontrent que la viabilité cellulaire ne change pas en fonction du nombre de doses administrées, ce qui indique que les expositions multiples des cellules aux NPs ne conduisent pas des effets cytotoxiques.

Nous avons ensuite réalisé le protocole présenté en Figure 73 en utilisant les macrophages dérivés des monocytes de deux donneurs différents (G et F) sont représentés (Figure 76). Des résultats différents ont été obtenus avec les deux donneurs. En effet, alors que les cellules des deux donneurs internalisent d'une façon similaire à celle observée précédemment suite à la première exposition aux NPs, les cellules du donneur G continuent à accumuler des NPs après chaque changement de milieu et addition de nouvelles NPs. Par contre, les cellules du donneur F ne présentent pas ou peu d'augmentation de leur fluorescence après les additions de NPs à 48h et 96 h suggérant qu'un phénomène de saturation du processus d'internalisation des NPs soit survenu après 48h. Le prélèvement du milieu à 48h contenant des NPs ensuite incubé avec des cellules naïves permet une augmentation de la moyenne de fluorescence des cellules, ce qui implique que ce milieu de culture contient toujours des NPs aptes à être captées par les cellules. Ces résultats soulignent à nouveau les différences interindividuelles observées entre les macrophages humains, dérivés de différents donneurs, en culture primaire bien que ces cellules soient toutes obtenues à partir de donneurs « sains ».

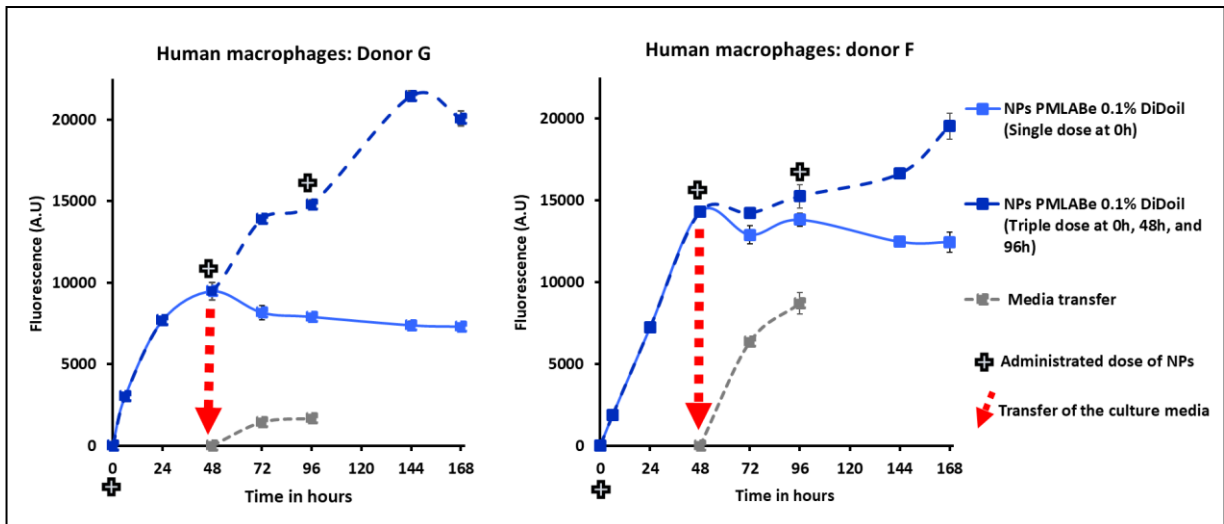


Figure 76 : Graphes représentant les moyennes de fluorescence de macrophages issus de deux donneurs différents suite à des traitements réitérés par des NPs PMLABe 0,1 wt% DiDoil appliqués aux temps 0, 48 et 96 heures.

Néanmoins, les macrophages d'un donneur montrent un fort ralentissement de la captation de NPs lors d'une seconde et troisième incubation en présence de NPs suggérant que le processus d'internalisation puisse être un phénomène saturable. Ces résultats restent préliminaires et il sera nécessaire de réaliser de nouvelles cultures à partir de « buffy coat » d'autres sujets pour vérifier ces comportements d'internalisation et les corrélés à d'éventuelles caractéristiques cellulaires des macrophages et/ou données liés aux patients.

Des expériences similaires ont été réalisées avec les cellules HepaRG en vérifiant tout d'abord la viabilité cellulaire après 2 expositions consécutives des cellules aux NPs (Fig. 77).

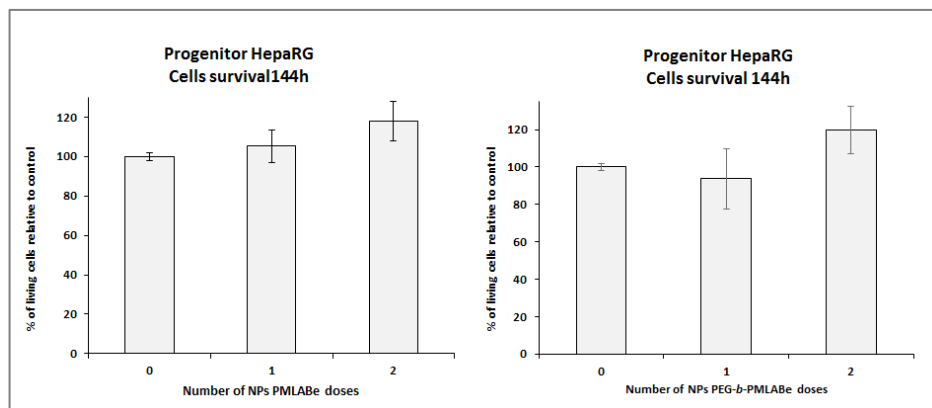


Figure 77 : Evaluation de la viabilité cellulaire des cellules HepaRG sur une période de 144h sans exposition (0) ou après expositions 1 ou 2 à des NPs PMLABe et PEG-b- PMLABe. La viabilité cellulaire est mesurée par le contenu relatif en ATP rapporté aux cultures contrôles non traitées.

Nous avons ensuite réalisé une double exposition des cellules HepaRG aux NPs PMLABe et PEG-b- PMLABe afin d'évaluer l'évolution de l'internalisation sur une période de 144h

(Fig. 78). Comme attendu, les cellules captent beaucoup plus efficacement les NPs PMLABe comparativement aux NPs PEG-*b*- PMLABe pendant les 48h de la première incubation. La seconde addition des NPs PMLABe est suivie d'une internalisation beaucoup plus faible mesurée à 120 et 144 h. La captation des NPs PEG-*b*- PMLABe reste faible avec un profil pratiquement linéaire indiquant une captation proportionnelle au temps d'incubation.

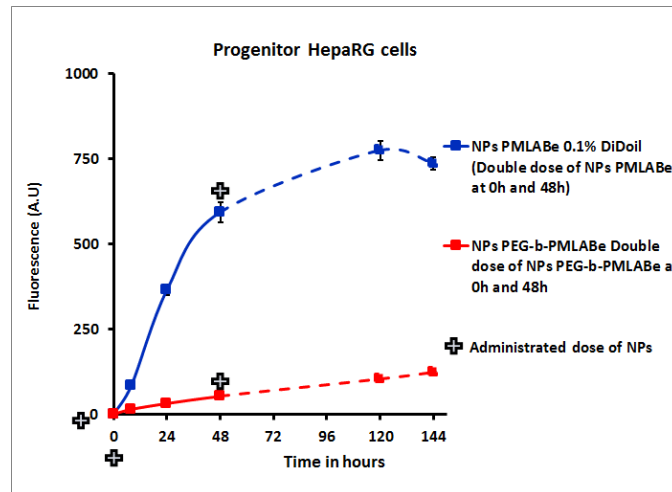


Figure 78 : Graphes représentant les moyennes de fluorescence de macrophages issus de deux donneurs différents suite à des traitements réitérés par des NPs PMLABe 0,1 wt% DiDoil appliqués aux temps 0, 48 et 96 heures.

Ces expériences utilisant les cellules HepaRG, comme celles réalisées avec les macrophages, sont préliminaires et doivent être renouvelées pour établir une analyse statistique solide. Cependant, l'internalisation des NPs PMLABe dans ces cellules semble présenter un phénomène de saturation qui intervient assez rapidement après 48h.

3.2.5 Identification du mécanisme de captation des NPs à base de dérivés du PMLABe mis en jeu dans les cellules d'hépatome et les macrophages humains.

Après avoir évalué la captation des NPs PMLABe par cytométrie en flux, le but était de vérifier si les NPs sont bien internalisées par les cellules, ou si elles sont adsorbées sur la membrane cytoplasmique de la cellule. Nous avons réalisé des expériences de microscopie à réfraction et microscopie confocale en marquant les noyaux des cellules avec le Hoesch et en traitant ces cellules avec les NPs marquées par le DiDoil 1wt% dans les macrophages humains (Fig. 79) et en microscopie à réfraction et microscopie électronique en transmission dans les cellules HepaRG (Fig. 80).

Les images obtenues en microscopie à réfraction (Fig. 79 et 80) permettent de visualiser les organites cellulaires à fort coefficient de réfraction comme les mitochondries et lysosomes sous formes de grains blancs alors que les NPs PMLABe sont détectées par la fluorescence émise par le DiDoil. Ces documents montrent une intense fluorescence émise par les NPs fortement concentrée dans une large zone du cytoplasme, parfois plus restreinte en zone périnucléaire, dans les macrophages (Fig. 79). Dans les cellules HepaRG, la fluorescence est plus faible et visible sous forme de points dans le cytoplasme le long de fibres du cytosquelette ou d'agrégats en zone périnucléaire (Fig. 80). La microscopie confocale permet de positionner les agrégats de NPs dans les macrophages en zones périnucléaire (Fig. 79 C, D).

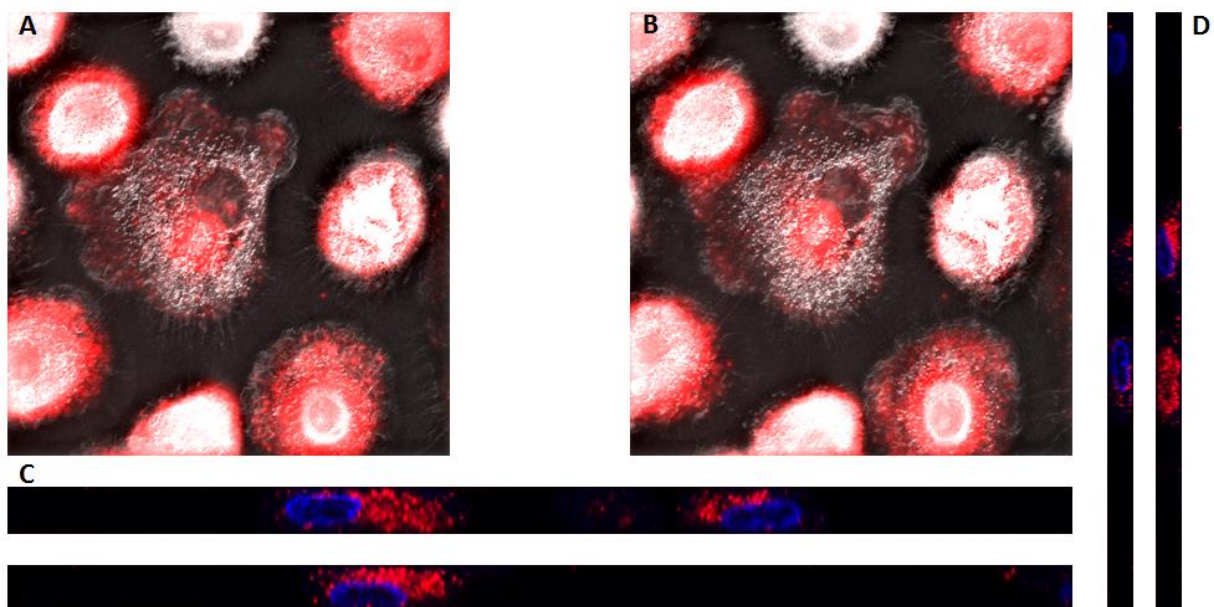


Figure 79 : A : Détection des NPs PMLABe dans des macrophages humains en utilisant la technique de microscopie à réfraction à deux temps séparés de quelques secondes (A et B) et en microscopie confocale en projection orthogonale (C, D). Le bleu représente les noyaux des cellules marqués par le Hoechst et le rouge représente les NPs marqués par le fluorochrome DiDoil.

L'utilisation de NPs PMLABe biotinylées a permis de détecter les NPs dans les cellules HepaRG après fixation et perméabilisation en utilisant de la streptavidine couplé à une peroxydase et une réaction de précipitation de la diaminobenzidine, substrat de la peroxydase. Ces cellules ont ensuite été étudiées en microscopie électronique à transmission (Fig 80B). Dans de nombreuses cellules, il est possible d'observer l'accumulation de grains bruns/noirs correspondant à des agrégats de NPs présents dans des structures vésiculaires, possiblement des lysosomes.

L'ensemble de ces résultats apporte des arguments forts pour conclure à l'internalisation des NPs dans les 2 types cellulaires.

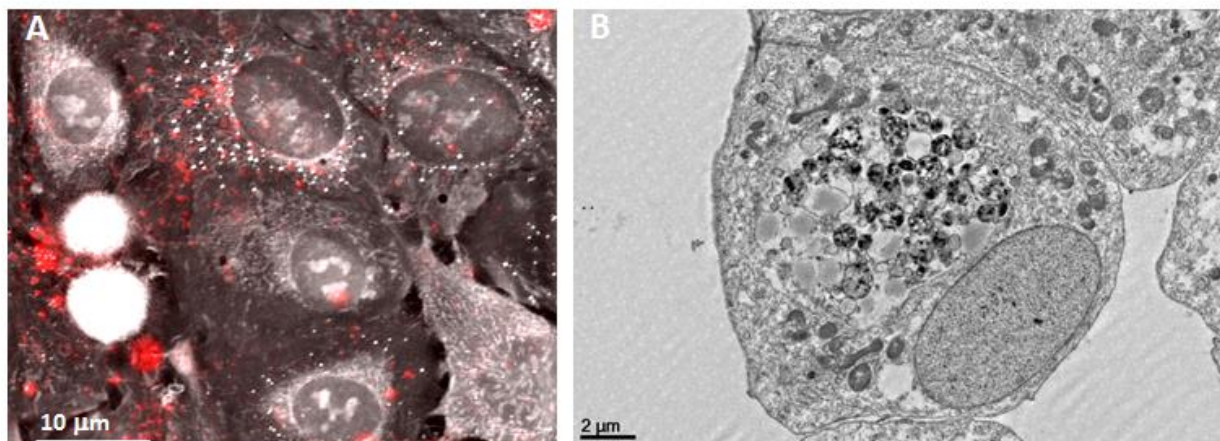


Figure 80 : A : Détection des NPs PMLABe dans des cellules HepaRG en utilisant la technique de microscopie à réfraction (A). Le rouge représente les NPs marquées par le fluorochrome DiDoil. Détection des NPs PMLABe biotinylées dans des cellules HepaRG par microscopie électronique à transmission. Les NPs biotinylées ont été détectées par de la streptavidine couplée à la peroxydase et l'utilisation du substrat formant un précipité brun/noir, la diaminobenzidine. Les grains noirs représentent les NPs internalisées par les cellules.

Pour caractériser le mécanisme d'internalisation cellulaire (mécanisme d'endocytose), j'ai utilisé deux inhibiteurs de pinocytose nommé chlorpromazine et génistéine ainsi qu'un inhibiteur de phagocytose nommé latrunculin. Les inhibiteurs ont été dilués dans le mélange NPs PMLABe 1 wt% DiDoil et milieu de culture à des concentrations différentes, le mélange a été ensuite incubé avec les cellules pour une durée de 4h. La chlorpromazine est un médicament antipsychotique dérivé de la phénothiazine qui inhibe la pinocytose médiée par la clathrine (EMC) dans les cellules par un mécanisme inconnu (Fig. 81) ³⁰⁹.

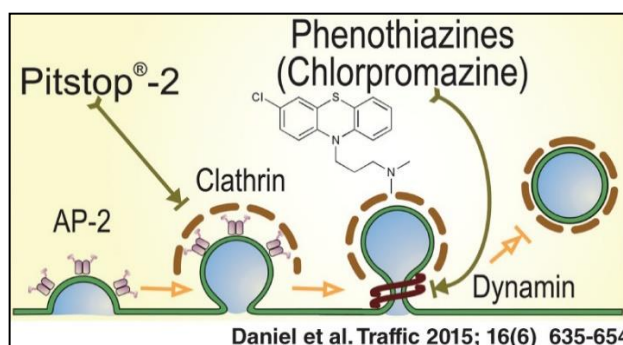


Figure 81 : Inhibition de l'endocytose médiée par la clathrine sous l'effet de la chlorpromazine ³⁰⁹.

Par ailleurs, la génistéine, qui possède des applications multiples en médecine, est un inhibiteur de la tyrosine kinase utilisé pour inhiber la pinocytose médiée par les cavéoles ³¹⁰. La latrunculine A, une toxine d'une éponge de la mer Rouge s'est révélée être un inhibiteur très puissant de la phagocytose par des macrophages normaux et activés ainsi que par des leucocytes polymorphonucléaires. Cette molécule inhibe la polymérisation de l'actine ³¹¹ (Fig.82).

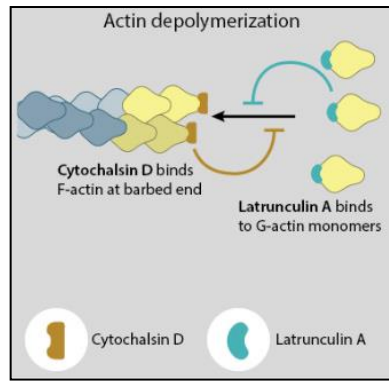


Figure 82 : Inhibition de la polymérisation d'actine par la latrunculine A ³¹².

J'ai tout d'abord évalué la toxicité de ces 2 molécules par le test ATP de viabilité cellulaire ainsi que leurs effets sur la captation des NPs PMLABe 1wt% DiDoil. Les résultats des expériences réalisées sur les HepaRG progénitrices sont présentés dans la figure 83.

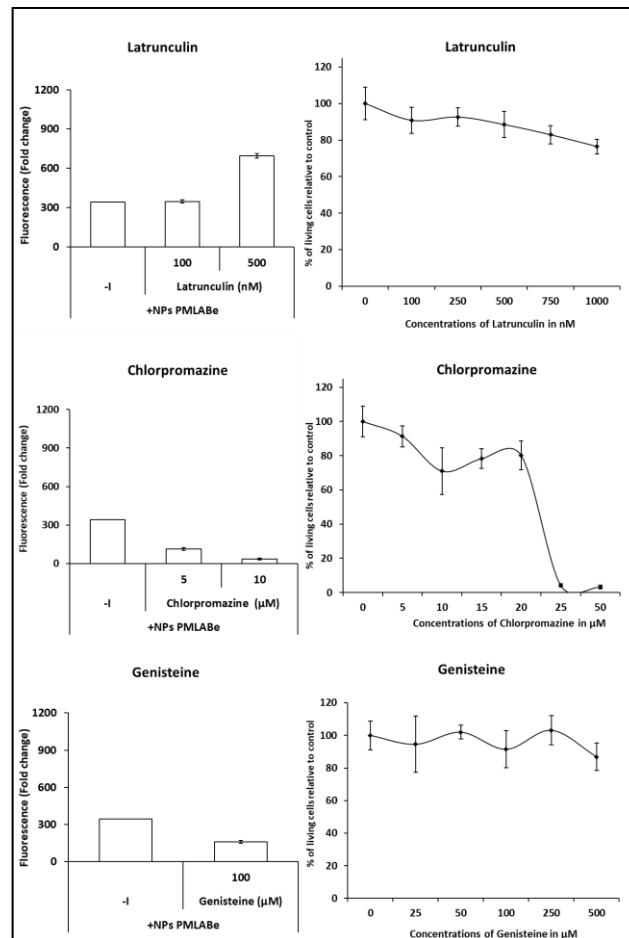


Figure 83 : A gauche, graphes illustrant la moyenne de fluorescence (en % par rapport au control (-I) des cellules HepaRG incubées avec des NPs PMLABe 1wt% DiDoil pendant 4h en présence soit d'inhibiteurs de phagocytose (Latrunculine) ou d'endocytose (Chlorpromazine et Génistéine) à des différentes concentrations. Condition sans inhibiteur (-I). A droite, les résultats des tests ATP de viabilité cellulaire réalisés suite à l'incubation des cellules HepaRG progénitrices avec les différentes concentrations d'inhibiteurs.

Les résultats des tests ATP montrent que la chlorpromazine induit une forte toxicité des cellules HepaRG à une dose comprise entre 20 et 25 μM . Les deux autres inhibiteurs ont montré qu'ils sont faiblement voire non toxiques sur les cellules HepaRG.

L'inhibiteur de la phagocytose, la latrunculine ne fait pas diminuer la moyenne de fluorescence cellulaire, au contraire la concentration de 500 nM fait augmenter la captation, confirmant que l'internalisation des NPs PMLABe par les cellules HepaRG ne se fait pas par phagocytose. L'addition des inhibiteurs de pinocytose aux cellules HepaRG incubées avec des NPs PMLABe induit une diminution de la fluorescence cellulaire, ce qui indique que l'internalisation des NPs implique bien un processus de pinocytose.

Des expériences similaires ont été réalisées sur les macrophages humains (Fig. 84).

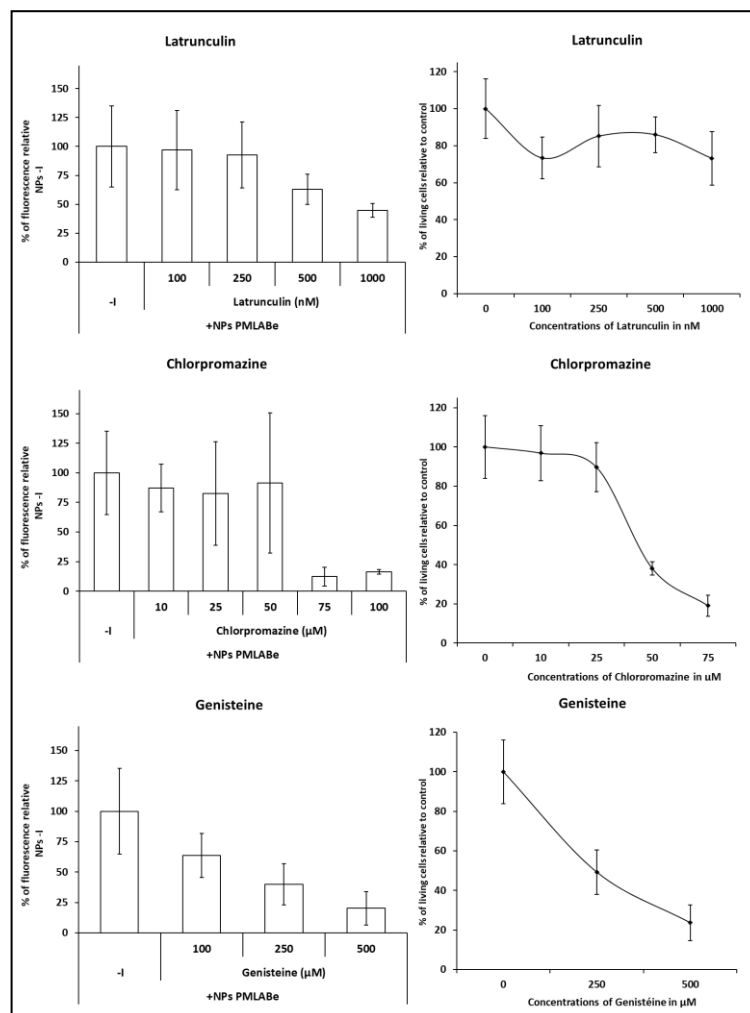


Figure 84 : A gauche, graphes illustrant la moyenne de fluorescence (en % par rapport au control (-I) des macrophages incubées avec des NPs PMLABe 1wt% DiDoil pendant 4h en présence soit d'inhibiteurs de phagocytose (Latrunculine) ou d'endocytose (Chlorpromazine et Génistéine) à des différentes concentrations. Condition sans inhibiteur (-I). A droite, les résultats des tests ATP de viabilité cellulaire réalisés suite à l'incubation des macrophages avec les différentes concentrations d'inhibiteurs.

Les tests de viabilité cellulaire montrent que les deux inhibiteurs d'endocytose induisent une forte toxicité dans les cultures de macrophages humains. Cette toxicité s'observe avec la génistéine à 250 μM et avec la chlorpromazine entre 25 et 50 μM . Il conviendra donc d'ajuster les concentrations d'inhibiteurs afin de pouvoir évaluer l'internalisation des NPs à des doses présentant des toxicités plus faibles. Toutefois, dans ces expériences préliminaires, nous avons évalué la captation des NPs PMLABe sur la fraction des cellules viables par cytométrie de flux.

La moyenne de fluorescence des macrophages a diminué de façon dose dépendante en présence de latrunculine ce qui indique qu'au moins une partie de l'internalisation des NPs PMLABe par les macrophages humains survient par phagocytose. En présence de génistéine et de chlorpromazine, il est plus difficile d'établir une conclusion ferme au regard de leur forte toxicité. Cependant, la diminution d'intensité relative de la fluorescence de la fraction cellulaire viable est confirmée en microscopie confocale (Fig. 85) suggérant fortement que l'internalisation des NPs PMLABe dans ces cellules se fait à la fois par pinocytoses et phagocytose.

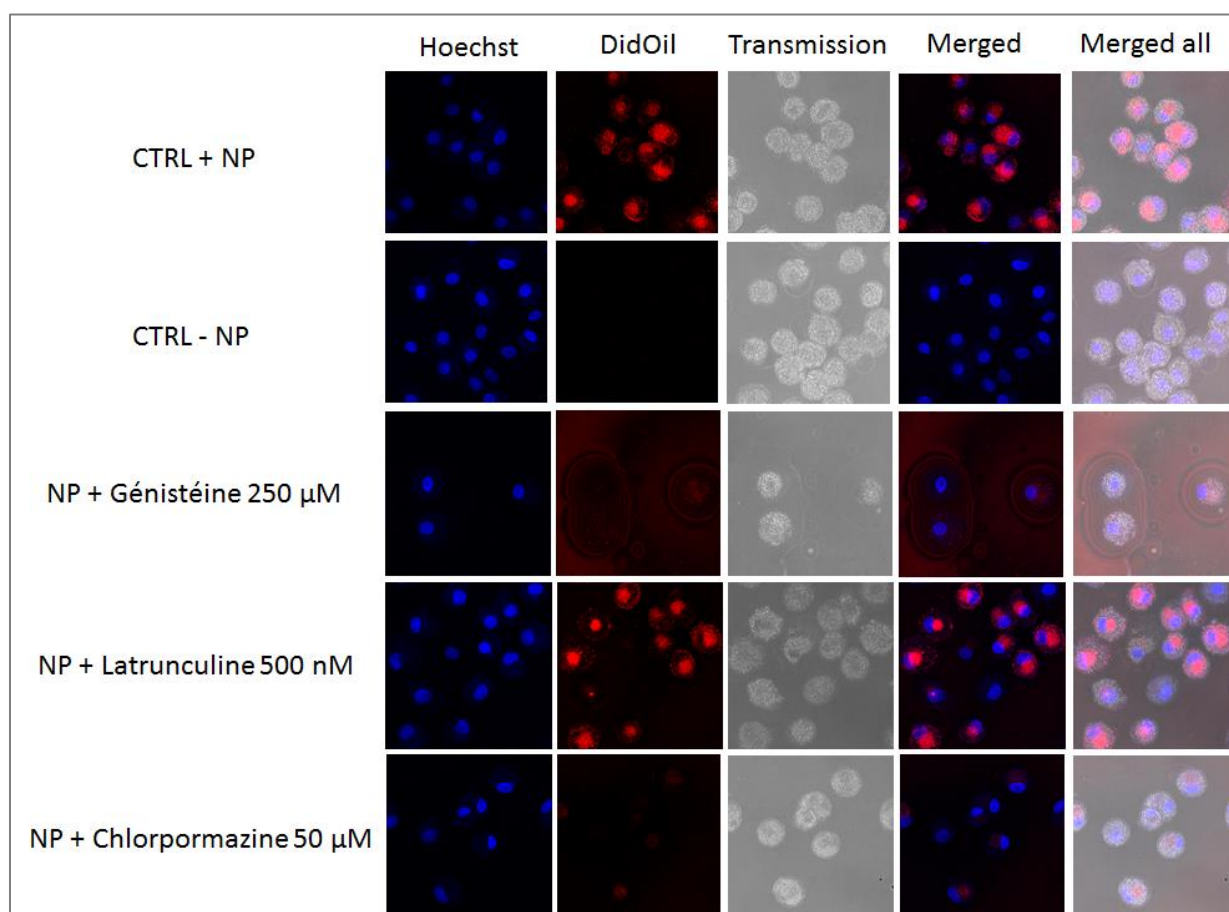


Figure 85 : Visualisation des NPs par microscopie confocale en absence (CTRL+NP) ou en présence d'inhibiteurs de phagocytose (Latrunculine, 500 nM) ou d'endocytose (Chlorpromazine à 50 μM , et Génistéine à 250 μM). Le bleu représente les noyaux des cellules marquées par le Hoechst et le rouge représente les NPs marquées par le fluorochrome DiDiOil.

3.2.6 Discussion

Dans cette partie de mon travail de thèse, j'ai évalué la cinétique d'accumulation intracellulaire des NPs incubées avec les cellules HepaRG et les macrophages humains à la concentration de 25 µg/mL dans le but d'identifier des facteurs clefs régulant l'internalisation des NPs *in vitro*. Parmi ces facteurs, j'ai étudié l'impact de la présence d'une couronne de PEG à la surface des NPs sur leur captation par les cellules d'hépatome HepaRG et les macrophages humains et j'ai caractérisé le mécanisme d'internalisation des NPs par les deux modèles cellulaires en utilisant des inhibiteurs de l'endocytose et de la phagocytose. Ces résultats s'inscrivent dans le cadre des études menées par notre équipe sur l'utilisation des NPs pour le ciblage du carcinome hépatocellulaire et leur internalisation par les cellules de Kupffer, macrophages résidents du foie³¹³. En 2016 et dans le cadre d'un travail de recherche sur la distribution de NPs à base de PLGA dans le foie, Park et *al.*, ont constaté que les cellules de Kupffer étaient les principales agents de captation des NPs, suivies par les cellules endothéliales sinusoidales et les cellules étoilées³¹³.

Nos résultats montrent que la captation des NPs par les macrophages est très rapide dès les premières heures qui suivent le début de l'incubation, avec une efficacité d'internalisation très supérieure à celle observée dans les cellules HepaRG. L'incubation des macrophages issus de différents donneurs de sang a abouti à des résultats relativement hétérogènes en termes de captation, indiquant une importante variabilité interindividuelle. Cependant, la captation des NPs PEGylées (NPs PEG-*b*-PMLABe) était largement inférieure à celle des NPs non PEGylées (NPs PMLABe) dans les deux modèles cellulaires utilisés tout au long des cinétiques réalisées. Cette observation confirme l'effet inhibiteur de la couronne de PEG à la surface des NPs PMLABe sur leur captation par les deux modèles cellulaires. Cette conclusion est en accord avec un vaste ensemble de données obtenues sur l'effet de la couronne de PEG sur la captation de NPs *in vitro*^{314, 315} et *in vivo*^{316, 317} par divers lignées et types cellulaires.

Ensuite, et pour expliquer en détails l'effet du PEG sur la captation des NPs PMLABe par les deux modèles cellulaires, nous avons préparé deux lots additionnels de NPs : un lot de NPs préparés à partir d'un mélange de 75 wt% de PMLABe et de 25 wt% de PEG-*b*-PMLABe (**NPs 25% PEG**) et un autre lot de NPs préparées à partir d'un mélange de 50 wt% de PMLABe et de 50 wt% de PEG-*b*-PMLABe (**NPs 50% PEG**). L'incubation de ces NPs avec les cellules HepaRG progénitrices pendant 24h montre bien la diminution de la captation des NPs PMLABe en fonction du pourcentage de PEG présent sur leur surface. Cette observation indique qu'il existe une relation dose-effet entre le pourcentage de PEG présent à la surface des NPs et la captation de ces NPs par les cellules HepaRG progénitrices. Ces résultats sont en accord avec

ceux présentés par Pelaz et *al.*, 2015 illustrant l'effet de la densité de PEG sur la captation de NPs de FePt par des fibroblastes 3T3 ²⁹⁸.

La même expérience réalisée sur des macrophages humains a abouti à des courbes totalement différentes. L'incubation des macrophages avec des NPs 0%, 25 % et 50% PEG conduit à des taux de captation très proches (différences négligeables de niveaux de fluorescence), tandis-que l'incubation de ces cellules avec les NPs 100% PEG conduit à une captation significativement moins importante par rapport à celle observée avec le reste des NPs. Ces observations indiquent l'absence de relation dose-effet entre le pourcentage de PEG présent à la surface des NPs et la captation de ces NPs par les macrophages humains et démontre que l'effet de furtivité recherché pour les NPs PMLABe PEGylées ne s'obtient qu'avec une forte densité de PEG.

Ensuite, en s'appuyant sur des travaux de la littérature montrant que l'opsonisation des NPs par les protéines sériques et la formation d'une couronne protéique accroît leur reconnaissance et leur captation par les macrophages du système RES ^{10, 11, 12}. Par conséquent, j'ai postulé que l'opsonisation des NPs PMLABe par les protéines du SVF *in vitro* favorisait leur captation par les macrophages. Pour vérifier cette hypothèse, j'ai réalisé les mêmes expériences en exposant les deux modèles cellulaires aux NPs 0%, 25%, 50% et 100% PEG diluées dans un milieu de culture contenant ou non du SVF. Dans les 2 conditions (+/- SVF), nous observons une la relation dose-effet entre le pourcentage de PEG présent à la surface des NPs et leur captation par les HepaRG progénitrices. Cependant, l'internalisation est beaucoup plus efficace en absence qu'en absence de sérum pour les NPs 0% et 25% PEG suggérant que l'opsonisation des NPs par les protéines du sérum, facilitée par l'absence de PEG ou une faible densité, réduit la captation des NPs par les cellules HepaRG progénitrices. Ces résultats sont en contradiction avec certaines études de captation de NPs *in vitro* ³¹⁸. Dans une étude publiée en 2010, Albanese et *al.*, ont constaté que les NPs d'or rugueuses présentent un niveau d'opsonisation plus important que les NPs d'or lisses, ce qui est à l'origine d'une captation plus importante des NPs rugueuses *in vitro* par les cellules microgliales neuronales par rapport aux NPs lisses ³¹⁸.

Le profil des courbes de captation de ces NPs par les macrophages humains est moins affecté par l'absence ou la présence de SVF comparativement aux effets observés pour les cellules HepaRG. Cependant, nous avons observé une diminution partielle de la captation en présence de sérum sans qu'il y ait de corrélation entre la densité en PEG et le degré de captation comme en présence de sérum. Cette diminution de captation est plus significative lorsque nous avons utilisé des NPs PMLABe totalement PEGylées, suggérant qu'une partie de l'effet protecteur du PEG vis-à-vis de la reconnaissance par les macrophages serait médié par l'opsonisation, même faible, des NPs PMLABe PEGylées. Une couronne de PEG dense en surface des NPs semble donc interagir avec

les protéines du SVF pour contribuer à limiter la captation des NPs PMLABe par les macrophages humains, ce qui constitue une conclusion en contradiction avec notre postulat de départ et la littérature ²⁰³.

Dans la suite du travail et pour lancer une étude visant à évaluer l'impact des expositions multiples des macrophages humains et cellules HepaRG aux NPs, j'ai sélectionné les NPs PMLABe (0% PEG) étant les NPs les mieux captées par ces modèles cellulaires. Nous avons déterminé le profil de captation des NPs PMLABe à moyen termes (6 ou 7 jours) suite à des doses multiples de NPs. Ces expériences, bien que préliminaires, suggèrent que la captation des NPs puissent être un processus saturable dans les cellules HepaRG. Cette expérience originale également réalisée sur 2 lots de macrophages issus de donneurs différents qui montrent dans un cas une internalisation continue suite à 3 expositions aux NPs, et, dans le second cas, un fort ralentissement de la captation dès la seconde exposition. Les profils des courbes variant de façon opposée en fonction du donneur, il sera indispensable de poursuivre l'étude en utilisant des cellules issues de nouveaux donneurs.

Dans le but de vérifier l'internalisation des NPs marquées par le DiDoil, une question posée régulièrement dans nos présentations d'équipe et en séminaires extérieurs, nous avons utilisé différentes techniques de microscopie pour aborder cette question qui est également à relier au mécanisme cellulaire permettant l'internalisation des NPs. Nos données de microscopie apportent des arguments concordant pour conclure à une internalisation des NPs dans nos deux modèles cellulaires. De plus, nous avons utilisé l'inhibiteur de phagocytose "latranculin" et les deux inhibiteurs d'endocytose "chlorpromazine" et "genistéine" pour caractériser le mécanisme de captation mis en jeu par les cellules. Les résultats montrent que l'internalisation des NPs PMLABe par les macrophages se fait par phagocytose et pinocytose à la fois, tandis que la pinocytose, par des voies dépendantes des clathrines (inhibée par la chlorpromazine) et indépendantes (inhibée par la génistéine), est le mécanisme principal mis en jeu par les HepaRG progénitrices. Ces données expliquent les grandes différences observées entre les deux modèles cellulaires en termes de vitesse de captation et de taux d'accumulation intracellulaire de NPs macropinocytose tandis que les cellules NIH3T3 les internalisent par pinocytose médiée par les clathrines ³¹⁹.

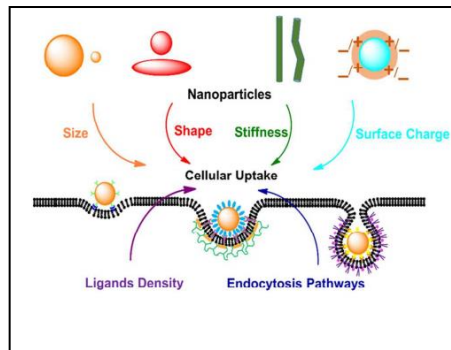


Figure 86 : Facteurs liés aux NPs et influençant le mécanisme d'internalisation des NPs ³²⁰.

La littérature indique que le mécanisme d'internalisation des NPs dépend du type cellulaire, de la taille de NPs ainsi que d'autres facteurs liés à la forme de la nanoparticule (Fig. 86). Par exemple, la phagocytose de NPs se fait majoritairement par les cellules phagocytaires, sachant que ce mécanisme est prépondérant pour les NPs de taille supérieure à 500 nm ³²⁰. Dans d'autres types cellulaires comme les cellules HeLa, l'internalisation des NPs lipidiques survient via la macropinocytose ³¹⁹.

3.3 Chapitre 3. Evaluation *in vitro* d'une nouvelle famille de NPs biodégradables à base de dérivés du poly(acide diméthylmalique)

3.3.1 Contexte générale de l'étude

La toxicité des NPs reste un obstacle important face au succès de la nanomédecine. Dans le cas des NPs polymères, la toxicité résulte en partie de la toxicité des amorceurs organométalliques utilisés dans les réactions de polymérisation. Le poly(acide diméthyle malique) et ses dérivés semblent être des bons candidats pour l'élaboration de nanovecteurs encapsulant des médicaments, cependant leur synthèse via des réactions aROP de β -lactones α , α' , β -substitués, implique l'usage des amorceurs organométalliques potentiellement toxiques. Pour limiter la toxicité, la deuxième approche mise en jeu dans ce projet de thèse consiste à utiliser des amorceurs organiques dans les réactions (aROP). L'acide pyrène acétique activé par une base phosphazène (P₄-*t*-Bu) constitue un exemple de ce type d'amorceurs. Dans ce contexte et grâce à une collaboration avec Ali Khalil (ENSCR-France) et Olivier Coulembier (Université de MONS-Belgique), nous avons synthétisé deux homopolymères hydrophobes (le PdiMeMLA_{Be30} et le PdiMeMLA_{He30}) ainsi que deux copolymères à blocs amphiphiles différent entre eux par la longueur respective des deux blocs (le PdiMeMLA_{27-b}-PdiMeMLA_{He50}, et le PdiMeMLA_{54-b}-PdiMeMLA_{He29}). La technique de nanoprécipitation a été utilisée pour préparer les NPs correspondantes. La toxicité et la captation de ces NPs par des cellules HepaRG progénitrices et différenciées ont été évaluées.

3.3.2 Synthesis of poly(dimethylmalic acid) homo- and copolymers to produce biodegradable nanoparticles for drug delivery: Cell uptake and biocompatibility evaluation in human HepaRG hepatoma cells.

1 Article

2 **Synthesis of poly(dimethylmalic acid) homo- and**
3 **copolymers to produce biodegradable nanoparticles**
4 **for drug delivery: Cell uptake and biocompatibility**
5 **evaluation in human HepaRG hepatoma cells.**

6 Ali Khalil^{1,2†}, Saad Saba^{3†}, Catherine Ribault³, Manuel Vlach³, Pascal Loyer^{3*}, Olivier
7 Coulembier^{1,*}, Sandrine Cammas-Marion^{2,3*}

8 ¹ Laboratory of Polymeric and Composite Materials, Center of Innovation and Research in Materials and
9 Polymers (CIRMAP), University of Mons (UMons), Place du Parc 23, 7000 Mons, Belgium.

10 ² Univ Rennes, ENSCR, CNRS, ISCR (Institut des Sciences Chimiques de Rennes) - UMR 6226, 35000 Rennes,
11 France.

12 ³ INSERM, INRAE, Univ Rennes, Institut NUMECAN (Nutrition Metabolisms and Cancer) UMR_A 1341,
13 UMR_S 1241, F-35000 Rennes, France.

14

15 * Correspondence: *Sandrine.marion.1@ensc-rennes.fr* (S.C.M.); *olivier.coulembier@umons.ac.be* (O.C.);
16 *pascal.loyer@univ-rennes1.fr* (P.L.)

17

18 † Ali Khalil and Saad Saba have contributed to this work equally.

19 § Current address: LCPM, UMR CNRS/Université de Lorraine 7375, BP 20451, 54000 Nancy, France

20

21 Received: date; Accepted: date; Published: date

22 **Abstract:** Hydrophobic and amphiphilic derivatives of the biocompatible and biodegradable
23 poly(dimethylmalic acid) (PdiMeMLA), varying by the nature of the lateral chains and the length
24 of each block, respectively, have been synthesized by anionic ring-opening polymerization (aROP)
25 of the corresponding monomers using an initiator/base system, which allowed a very good control
26 over the (co)polymers' characteristics (molar masses, dispersity, nature of end-chains).
27 Hydrophobic and core-shell nanoparticles (NPs) have been then prepared by nanoprecipitation of
28 hydrophobic homopolymers and amphiphilic block copolymers, respectively. Negatively charged
29 NPs, showing hydrodynamic diameters (Dh) between 50 and 130 nm and narrow size distributions
30 ($0.08 < PDI < 0.22$) depending on the (co)polymers nature, have been obtained and characterized by
31 dynamic light scattering (DLS), zetametry and transmission electron microscopy (TEM). Finally,
32 cytotoxicity and cellular uptake of the obtained NPs were evaluated *in vitro* using the hepatoma
33 HepaRG cell line. Our results showed that both cytotoxicity and cellular uptake were influenced by
34 the nature of the (co)polymer constituting the NPs.

35 **Keywords:** Poly(dimethylmalic acid) derivatives; polymeric nanoparticles; HepaRG cells; *In vitro*
36 cytotoxicity; cellular uptake.

37

38 1. Introduction

39 The field of nanotechnologies has grown exponentially in the past decades with the production
40 of a plethora of nanoobjects for biomedical applications including drug delivery. The rationale for
41 drug delivery using nanoparticles (NPs) is based on the fact that most chemotherapies distribute
42 evenly throughout the body resulting in low plasma drug concentration, limited bioavailability at
43 the site where it is needed, rapid disposal, and side-effects in healthy organs [1]. The design of NPs
44 embedding drugs appears as a suitable strategy to achieve prolonged plasma concentration of
45 therapeutic payloads and a higher bioavailability [2]. In addition, the discovery of the Enhanced
46 Permeability and Retention (EPR) effect [3-5], defining the extravasation of nanovectors through the
47 disorganized blood vessels within solid tumors, further supported the principle of drug-loaded NPs
48 in rodent models of cancers, which opened perspectives for improving therapeutic indexes of
49 vectorized chemotherapies [3-5].

50 With the aim of improving cancers diagnostic and therapy, design of stealth and/or targeted
51 nanovectors has led to the publication of a large body of research's works that hardly translated to
52 humans so far [6-8]. To reach clinical application, nanoparticles (NPs) having a wide range of
53 chemistry and architecture (lipids or polymers nanocarriers, inorganic or viral NPs) have been
54 proposed for cancer therapy and imaging [9,10]. Among all the developed NPs, those formulated
55 from hydrophobic homopolymers and amphiphilic block copolymers present a real interest as a
56 result of the versatility in the structure (homopolymers, block-copolymers, star-shaped (co)polymers,
57 etc.) and chemistry (polyesters, polypeptides, polycyanoacrylates, etc.) of the constituting polymeric
58 materials, which can be adjusted to the selected applications by modifying various parameters
59 including the monomers features, the polymerization procedure, the nature of end-chain and/or side-
60 chain groups (chemical modifications) [7,11-15].

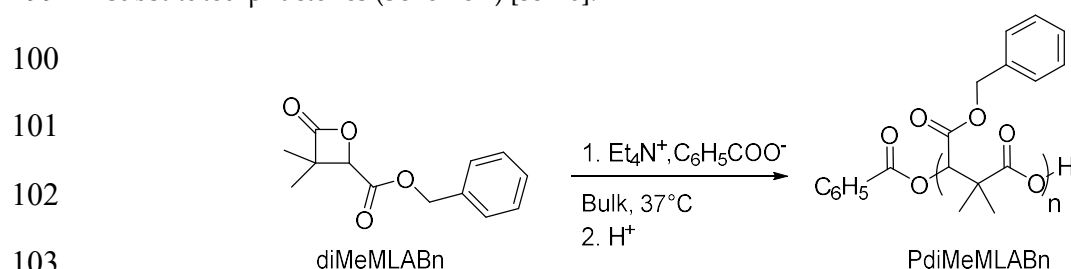
61 After systemic injection, many plasma proteins form a protein corona at the surface of NPs in a
62 process named opsonization. The binding of protein involves non-specific interactions with
63 abundant plasma proteins such as albumin, but also the recognition by antibodies and proteins of the
64 complement system [16,17], which is part of the innate immune system enhancing the activity of the
65 mononuclear phagocyte system (MPS) to clear pathogens from the body. In order to minimize the
66 opsonization and the non-specific scavenging by MPS, NPs' features have been optimized through
67 the modulation of their size, shape [1], surface charge [4] and chemical structure [3,5].

68 When amphiphilic block copolymers are concerned, poly(ethylene glycol), PEG, often plays the
69 role of hydrophilic segments exposed at the surface of the NPs resulting in the "stealth" behavior of
70 the corresponding PEG-based NPs towards opsonins and extending their systemic lifetime [16,17].
71 Indeed, the PEG segments associated to water molecules form a hydrating layer [18], which acts as a
72 steric shield to prevent the binding of serum opsonins and delay the uptake by MPS. Furthermore,
73 the PEG corona often increases the hydrodynamic diameter of the NPs thereby decreasing the renal
74 clearance [19]. Although the use of PEG has been approved by the US Food and Drug Administration
75 (FDA) for applications in humans [20], this polymer is very slowly degraded conducting to the
76 production of antibody against PEG, even in the blood of healthy donors, probably as a result of the
77 presence of PEG in commercially available products such as cosmetics [21,22]. The presence of such
78 antibody anti-PEG might thus compromise the efficiency of treatments using PEGylated nanovectors.
79 In addition, the unpredicted clearance times of PEGylated compounds lead to accumulation of high
80 molar mass compounds in the liver [23] with unknown toxicological consequences over a long period
81 of time [24].

82 Consequently, many studies have been conducted to replace PEG by other hydrophilic blocks
83 such as dextran [25] or poly(malic acid) [26-28]. Therefore, the synthesis of well-defined amphiphilic
84 block copolymers constituted only by (bio)degradable and biocompatible polymers is of great
85 interest. In this context, chemical or bio-sourced polyesters have long grasped substantial interest for

86 macromolecular science and medical applications because of their specific characteristics, such as
 87 mechanical properties, (bio)degradability and biocompatibility [29]. Chemical polyesters can be
 88 synthesized by: *i*) polycondensation requiring long reaction times and leading to polyesters with
 89 limited molar masses and broad dispersities [30,31], *ii*) bacteria fermentation possessing no control
 90 on structure and molar masses of the polymers [32], or through *iii*) ring-opening polymerization
 91 (ROP) of the corresponding cyclic esters [33]. Among those cyclic esters, β -lactones, 4-membered ring
 92 cyclic esters, have high ring strain easing their ROP, thus offering the possibilities to obtain a wide
 93 variety of structures in terms of nature of repeating units (homo and copolymers), end-groups and
 94 molar masses (adjusted by the ratio monomer/initiator) [33,34].

95 Known for its biocompatibility, dimethylmalic acid can be used to prepare vast range of α,α,β -
 96 substituted- β -lactones, whose ROP reactions allow to prepare well-defined biodegradable polymers.
 97 However, only few reports have been published on such topic, mainly by Barbaud and collaborators
 98 who used tetraethylammonium benzoate to initiate the anionic ROP (aROP) of different α,α,β -
 99 substituted- β -lactones (Scheme 1) [35-40].



104 **Scheme 1.** aROP of diMeMLABn in presence of tetraethylammonium benzoate as initiator.

105 Despite the control over dispersities, molar masses and structures of the resulting polymers,
 106 the major drawback in the use of such initiator for the aROP of the above cited monomers is its
 107 potential toxicity towards human cells [41].

108 In this context, the objectives of the present work were to: *i*) synthesize two α,α,β -substituted- β -
 109 lactones with different dandling functions (benzyl and hexyl); *ii*) set-up initiator systems that initiate
 110 aROP of these monomers to obtain well-defined hydrophobic homopolymers and amphiphilic block
 111 copolymers; *iii*) formulate and characterize the different types of polymeric NPs obtained from either
 112 hydrophobic homopolymers or amphiphilic block copolymers; and *iv*) evaluate *in vitro* cytotoxicity
 113 and cellular uptake of these NPs using the human HepaRG hepatoma cell line.

114

115 2. Materials and Methods

116 2.1. Materials and apparatus.

117 After purification, diMeMLABn and diMeMLAHe lactones were stored at $-35\text{ }^\circ\text{C}$. 1-Pyreneacetic
 118 acid (PyCOOH, 98%, Aldrich) was dried at $80\text{ }^\circ\text{C}$ overnight under vacuum. Tetrahydrofuran (THF,
 119 Labsan, 99%) was dried using an MBraun solvent purification system under N_2 . 1-Tert-butyl-4,4,4-
 120 tris(dimethylamino)-2,2-bis[tris(dimethylamino) phosphoranyl-idenamino]-2 Λ^5 ,4 Λ^5 -catenadi
 121 (phosphazene) (P₄-*t*-Bu, Sigma, 1M in hexane under argon) was dried by hexane solvent evaporation.
 122 All chemicals were stored and used in a glovebox ($< 3\text{ ppm O}_2$, $< 1\text{ ppm H}_2\text{O}$).

123 **Infrared spectroscopy:** Fourier Transform Infra-Red (FT-IR) measurements were performed
 124 using a Bruker Tensor 27 FT-IR spectrometer using a spectral width ranging from 600 to $4,000\text{ cm}^{-1}$, a
 125 resolution of 4 cm^{-1} and an accumulation of 32 scans.

126 **Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy:** $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz) spectra were recorded using a
 127 Bruker AMX-500 apparatus at room temperature and were referenced internally relative to SiMe_4 (δ
 128 0 ppm) using the residual solvent resonances.

129 **Size Exclusion Chromatography:** Size exclusion chromatography (SEC) was performed in a
130 THF/NEt₃ (2w% of triethylamine, NEt₃) mixture at 35°C using a Triple Detection Polymer
131 Laboratories liquid chromatograph equipped with a refractive index (ERMA 7517), a capillary
132 viscometry, a light scattering RALS (Viscotek T-60) (Polymer Laboratories GPC-RI/CV / RALS) and
133 an automatic injector (Polymer Laboratories GPC-RI/UV) and four columns : a PL gel 10 µm guard
134 column and three PL gel Mixed-B 10 µm columns (linear columns for separation of molar masses
135 ranging from 500 to 10⁶ g/mol).

136 **Dynamic Light Scattering:** Dynamic light scattering (DLS) and zetametry measurements are
137 performed on a Nano-sizer ZS90 (Malvern) at 25°C, with a He-Ne laser at 633nm and a detection
138 angle of 90°C.

139 **Transmission electron microscopy:** Transmission electron microscopy (TEM) images were
140 recorded using a Jeol 2100 microscope equipped with a Glatan Orius 200D camera using a 200 KeV
141 accelerating voltage on the THEMIS platform (ISCR – Rennes). Each sample was deposited on a
142 Formvar-carbon film coated on a 300 mesh copper grid. After 6 min, the excess of sample was
143 removed and a staining was realized with phosphotungstic acid (1 v%).
144

145 2.2. Synthesis of monomers and (co)polymers.

146 **Synthesis of diMeMLABn and diMeMLAHe:** The selected lactones, diMeMLABn and
147 diMeMLAHe, were synthesized from diethyloxal propionate (Scheme 2) as previously described [35-
148 40], and characterized by FT-IR and ¹H-NMR.

149 *diMeMLABn 6:*

150 FT-IR: 1,750 cm⁻¹, ν_{CO} ester; 1,850 cm⁻¹, ν_{CO} lactone.

151 ¹H-NMR (500 MHz, CD₃COCD₃, δ ppm): 1.12 (s, 3H, CH₃), 1.50 (s, 3H, CH₃), 4.90 (s, 1H, CH), 5.25 (s,
152 2H, CH₂), 7.30-7.50 (m, 5H, C₆H₅).

153 *diMeMLAHe 7:*

154 FT-IR: 1,750 cm⁻¹, ν_{CO} ester; 1,850 cm⁻¹, ν_{CO} lactone.

155 ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, δ ppm): 0.80 (t, 3H, CH₃), 1.25-1.40 (m, 9H, CH₃+3*CH₂), 1.50 (s, 3H, CH₃),
156 4.20-4.25 (t, 2H, CH₂), 4.13 (s, 1H, CH).

157 **Synthesis of PdiMeMLABn₃₀:** In glove box, 1-pyreneacetic acid (2.6 mg, 0.011 mmol, 1 equiv.)
158 and P₄-*t*-Bu (2.1 mg, 0.008mmol, ≈ 1equiv.) were introduced in a vial and dissolved in THF (0.5 mL).
159 In another vial, 82 mg of diMeMLABe (0.352 mmol, 32 equiv.) were dissolved in 1 mL of dry THF.
160 The two solutions were mixed ([diMeMLABe]₀=0.16 M) at room temperature for an appropriate
161 reaction time. The resulting mixture was concentrated to dryness under vacuum. The
162 PdiMeMLABn₃₀ homopolymer was precipitated in cold ethanol. The homopolymer samples were
163 characterized (¹H-NMR and SEC), and kept under inert atmosphere at 4°C.

164 ¹H-NMR (500 MHz, CD₃COCD₃, δ ppm): 1.15 (m, 3nH, CH₃), 1.23 (m, 3nH, CH₃), 4.5 (s, 2H, Pyrene-
165 CH₂), 5.14 (m, 2nH, CH₂), 5.3 (m, 1nH, CH), 7.35 (m, 5nH, C₆H₅), 7.98-8.34 (m, 9H, pyrene); M_{NMR} =
166 7,000 g/mol, n = 30.

167 SEC (THF/NEt₃, 1 mL/min): Mn = 2,700 g/mol; Đ = 1.20.

168 **Synthesis of PdiMeMLAHe₃₀:** In glove box, 1-pyreneacetic acid (1.8 mg, 0.0069 mmol, 1 equiv.)
169 and P₄-*t*-Bu (2.1 mg, 0.0068 mmol, ≈ 1 equiv.) were introduced in a vial and dissolved in THF (1 mL).
170 In another vial, 52 mg of diMeMLAHe (0.228 mmol, 33 equiv.) were dissolved in 2 mL of dry THF.
171 The two solutions were mixed ([diMeMLAHe]₀=0.15 M) at room temperature for an appropriate
172 reaction time. The resulting mixture was concentrated to dryness under vacuum. The recovered
173 PdiMeMLAHe₃₀ homopolymer was then precipitated in cold heptane. The homopolymer samples
174 were characterized (¹H-NMR and SEC), and kept under inert atmosphere at 4 °C.

175 ¹H-NMR (500 MHz, CD₃COCD₃, δ ppm): 0.91 (m, 3nH, CH₃-CH₂), 1.34 (m, 9nH, CH₃, 3*CH₂), 1.39 (m,
176 3nH, CH₃), 1.66 (m, 2nH, CH₂), 4.17 (m, 2nH, CH₂-O), 4.5 (s, 2H, Pyrene-CH₂), 5.34 (m, 1nH, CH),
177 8.03-8.42 (m, 9H, pyrene); M_{NMR} = 6,800 g/mol, n = 30.

178 SEC (THF/NEt₃, 1 mL/min): Mn = 5,500 g/mol; Đ = 1.16.

179 **Synthesis of amphiphilic block copolymers:** In glove box, 1-pyreneacetic acid (1.8 mg, 0.0069
180 mmol, 1 equiv.) and P₄-*t*-Bu (4.3 mg, 0.0068mmol, ≈ 1equiv.) were introduced in a vial and dissolved

181 in THF (0.5 mL). In another vial, 50 mg of diMeMLAHe (0.226 mmol, 32 equiv., for the copolymer
 182 PdiMeMLABn_{54-b}-PdiMeMLAHe₂₉) or 77 mg of diMeMLAHe (0.339 mmol, 49 equiv., for the
 183 copolymer PdiMeMLABn_{27-b}-PdiMeMLAHe₅₀) were dissolved in 1 mL of dry THF. The two solutions
 184 were mixed ([diMeMLAHe]₀=0.16 M) at room temperature for an appropriate reaction time. After
 185 full conversion (determined by FTIR), a solution of 80 mg of diMeMLABn (0.345 mmol, 49 equiv., for
 186 the copolymer PdiMeMLABn_{54-b}-PdiMeMLAHe₂₉) in 0.8 mL THF or a solution of 39 mg of
 187 diMeMLABn (0.166 mmol, 24 equiv., for the copolymer PdiMeMLABn_{27-b}-PdiMeMLAHe₅₀) in 0.39
 188 mL of THF was added to the reaction mixture ([diMeMLABn]=0.16M). After full conversion, the
 189 resulting mixture was concentrated to dryness under vacuum. The recovered PdiMeMLABn_n-b-
 190 PdiMeMLAHe_m copolymer was dissolved in a minimum amount of acetone and then precipitated in
 191 cold ethanol. The copolymer samples were characterized (¹H-NMR and SEC), and kept under inert
 192 atmosphere at 4 °C.

193 ¹H-NMR (500 MHz, CD₃COCD₃, δ ppm, identical for both block copolymers excepted the relative
 194 integration values): 0.89 (m, 3H, CH₃-CH₂), 1.30 (m, 18H, 4*CH₃, 3*CH₂), 1.65 (m, 2H, -CH₂-CH₂-O),
 195 4.14 (m, 2H, -CH₂-CH₂-O), 4.55 (s, 2H, Pyrene-CH₂), 5.12 (m, 2H, C₆H₅-CH₂-O), 5.29 (m, 2H, 2*CH),
 196 7.34 (m, 5H, C₆H₅), 8.04-8.41 (m, 9H, pyrene);

197 $M_{NMRPdiMeMLABn} = 12,600$ g/mol ($n = 54$), $M_{NMRPdiMeMLAHe} = 6,600$ g/mol ($m = 29$)

198 $M_{NMRPdiMeMLABn} = 6,400$ g/mol ($n = 27$), $M_{NMRPdiMeMLAHe} = 11,800$ g/mol ($m = 50$)

199 SEC (THF/NEt₃, 1 mL/min)

200 PdiMeMLABn_{54-b}-PdiMeMLAHe₂₉: $M_n = 12,000$ g/mol; $\bar{D} = 1.25$.

201 PdiMeMLABn_{27-b}-PdiMeMLAHe₅₀: $M_n = 7,400$ g/mol; $\bar{D} = 1.31$.

202 Both hydrophobic copolymers were then subjected to catalytic hydrogenolysis allowing the
 203 specific deprotection of the carboxylic acid lateral groups. They were dissolved in a THF/Ethanol
 204 (50/50 v/v%) mixture and 20 wt% of Pd/C (relative amount to benzyl groups) were added. The
 205 mixtures were placed under atmospheric pressure of H₂ and left under vigorous stirring overnight.
 206 The black suspensions were filtered over celite to eliminate the Pd/C and solvents were evaporated
 207 under vacuum thus leading to the expected amphiphilic block copolymers characterized by ¹H-NMR.
 208 ¹H-NMR (500 MHz, CD₃COCD₃, δ ppm, identical for both block copolymers excepted the relative
 209 integration values): 0.89 (m, 3H, CH₃-CH₂), 1.30 (m, 18H, 4*CH₃, 3*CH₂), 1.65 (m, 2H, -CH₂-CH₂-O),
 210 4.14 (m, 2H, -CH₂-CH₂-O), 4.55 (s, 2H, Pyrene-CH₂), 5.29 (m, 2H, 2*CH), , 8.04-8.41 (m, 9H, pyrene);

211 $M_{NMRPdiMeMLA} = 7,720$ g/mol ($n = 54$), 50%; $M_{NMRPdiMeMLAHe} = 6,600$ g/mol ($m = 29$), 50%.

212 $M_{NMRPdiMeMLA} = 3,850$ g/mol ($n = 27$), 25%; $M_{NMRPdiMeMLAHe} = 11,800$ g/mol ($m = 50$), 75%.

213

214 2.3. Formulation of nanoparticles

215 **Empty nanoparticle formulations based on hydrophobic homopolymers:** In an Eppendorf, 2.5
 216 mg of homopolymer were dissolved in 150 μL DMF and added dropwise to 2 mL of distilled water
 217 under 1,400 rpm stirring speed. The solution was stirred for 20 minutes. The solution was then passed
 218 through a G25 Sephadex column leading to 3.5 mL NPs' suspensions which were characterized by
 219 DLS, zetametry and TEM.

220 NPs PdiMeMLABn₃₀: $M = 7,000$ g/mol; Final concentration = 0.714 mg/mL; Dh = 110 nm; PDI = 0.15;
 221 Zeta potential = - 34 mV.

222 NPs PdiMeMLAHe₃₀: $M = 6,800$ g/mol; Final concentration = 0.714 mg/mL; Dh = 140 nm; PDI = 0.07;
 223 Zeta potential = - 47 mV.

224 **Empty nanoparticle formulations based on amphiphilic block copolymers:** In a vial, 10 mg of
 225 PdiMeMLA_{54-b}-PdiMeMLAHe₂₉ or 5 mg of PdiMeMLA_{27-b}-PdiMeMLAHe₅₀ were solubilized in 1 mL
 226 of acetone then added dropwise to 2 mL of aqueous phase under 1,400 rpm stirring speed. The
 227 solution was stirred for 20 minutes and acetone was removed under reduced pressure. The final
 228 volumes of the NPs' suspensions were adjusted to 2 mL (if necessary) by addition of the needed
 229 volume of aqueous phase.

230 NPs PdiMeMLA_{54-b}-PdiMeMLAHe₂₉: $M = 14,600$ g/mol; Final concentration = 5 mg/mL; Aqueous
 231 phase: water; Dh = 50 nm; PDI = 0.08; Zeta potential = - 36 mV.

232 NPs PdiMeMLA_{27-b}-PdiMeMLAHe₅₀: M = 15,500 g/mol; Final concentration = 2.5 mg/mL; Aqueous
233 phase: PBS; Dh = 110 nm; PDI = 0.20; Zeta potential = - 32 mV.

234 **DiR loaded nanoparticle formulations based on hydrophobic homopolymers:** In an
235 Eppendorf, 2.5 mg of homopolymer were solubilized in 135.5 µL of DMF and 14.5 µL of a DiR/DMF
236 solution at a concentration of 1 mg/mL (0.5 wt% of the mass of the polymer) were added. This mixture
237 was then added dropwise to 2 mL of distilled water under 1,400 rpm stirring speed. The solution was
238 stirred for 20 minutes. The solution was then passed through a G25 Sephadex column leading to 3.5
239 mL of DiR loaded NPs' suspensions which were characterized by DLS and zetametry.

240 NPs PdiMeMLABn₃₀[DiR]: M = 7,000 g/mol; Final concentration = 0.714 mg/mL; Dh = 130 nm; PDI =
241 0.11; Zeta potential = - 37 mV.

242 NPs PdiMeMLAHe₃₀[DiR]: M = 6,800 g/mol; Final concentration = 0.714 mg/mL; Dh = 110 nm; PDI =
243 0.12; Zeta potential = - 53 mV.

244 **DiR loaded nanoparticle formulations based on amphiphilic block copolymers:** In a vial, 10
245 mg PdiMeMLA_{54-b}-PdiMeMLAHe₂₉ or 5 mg of PdiMeMLA_{27-b}-PdiMeMLAHe₅₀ were solubilized in a
246 total volume of 1 mL of acetone: 900 µL of acetone and 100 µL of a DiR/acetone at 1mg/mL (1 wt% of
247 the mass of the block copolymer) for the PdiMeMLA_{54-b}-PdiMeMLAHe₂₉ block copolymer; 950 µL of
248 acetone and 50 µL of a DiR/acetone at 1mg/mL (1 wt% of the mass of the block copolymer) for the
249 PdiMeMLA_{27-b}-PdiMeMLAHe₅₀ block copolymer. These solutions were then added dropwise to 2
250 mL of aqueous phase under 1,400 rpm stirring speed. The solution was stirred for 20 minutes and
251 acetone was removed under reduced pressure. The samples were then passed through a G25
252 Sephadex column leading to 3.5 mL of DiR loaded NPs' suspensions which were characterized by
253 DLS and zetametry.

254 NPs PdiMeMLA_{54-b}-PdiMeMLAHe₂₉[DiR]: M = 14,600 g/mol; Final concentration = 2.857 mg/mL;
255 Aqueous phase: water; Dh = 60 nm; PDI = 0.09; Zeta potential = - 30 mV.

256 NPs PdiMeMLA_{27-b}-PdiMeMLAHe₅₀[DiR]: M = 15,500 g/mol; Final concentration = 1.429 mg/mL;
257 Aqueous phase: PBS; Dh = 130 nm; PDI = 0.18; Zeta potential = - 48 mV.

258

259 2.4. *In vitro* assays

260 **HepaRG culture:** For all the studies, proliferating progenitor HepaRG cells were seeded at a
261 density of 3.10⁴ cells/cm² and cultured as previously described [42-44], in William's E medium (Lonza)
262 supplemented with 50 units/mL penicillin and 50 µg/mL streptomycin, 2 mM of glutamine (Gibco),
263 5 mg/L of insulin (Sigma), 10⁻⁵ mM hydrocortisone hemisuccinate and 10% of fetal calf serum (Lonza).
264 Two weeks after plating, the cells were maintained for two more weeks in the same William's E
265 medium further supplemented with 2% dimethylsulfoxide (DMSO) in order to obtain the full
266 hepatocyte differentiation [42-44].

267 **In vitro DiR loaded NPs uptake by HepaRG cells:** For the cell uptake assay of NPs, HepaRG
268 cells were plated in 24 well plates and cultured as mentioned above. The culture medium of HepaRG
269 cells was renewed and PdiMeMLABn-based NPs loaded with DiR were added to the wells for 24 h.
270 After incubation, culture media were discarded, the cell monolayers were washed once with PBS then
271 detached with trypsin and analyzed by flow cytometry using a Becton Dickinson le LSRFortessa™
272 X-20 (cytometry core facility of the Biology and Health Federative research structure Biosit, Rennes,
273 France). Dot plots of forward scatter (FSC: x axis, size of events), the side scatter (SSC: y axis, structure
274 of events) allowed to gate the viable cells prior detecting the fluorescence emitted by DiR-loaded NPs
275 using the BV786-1A channel. Two parameters were analyzed: the percentage of positive cells that
276 internalized NPs and the intensity of fluorescence (mean of fluorescence) reflecting the accumulation
277 of fluorescent NPs within the cells.

278 **In vitro NPs cytotoxicity assays using HepaRG cells:** Cell viability was assessed by measuring
279 the relative intracellular ATP content using CellTiter-Glo Luminescent Cell viability assay (Promega).
280 After treatment, cells were incubated with the CellTiter-Glo reagent for 10 min. Lysate was
281 transferred to an opaque mutli-well plate and luminescent signal was quantified at 540 nm using the
282 Polarstar Omega microplate reader (BMG Labtech). Cell viabilities in treated cells were expressed as

283 the percentage of the luminescence values obtained in untreated cells, which were arbitrary set as
 284 100%.

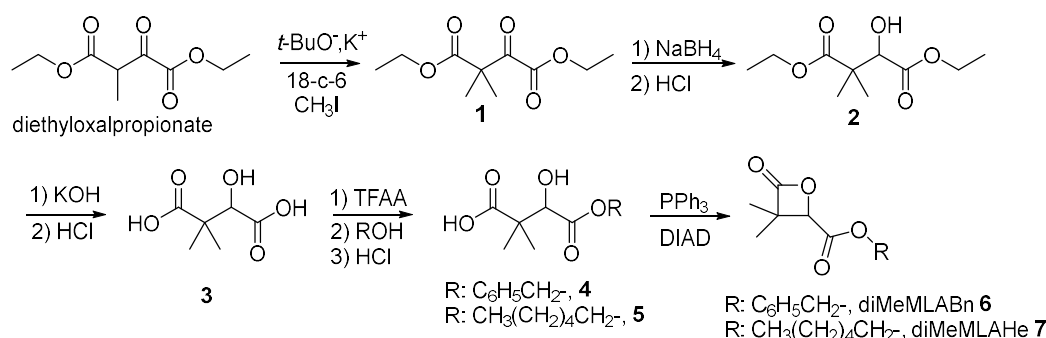
285 **Statistical analyses:** Statistical analyses were performed using a one-way Anova followed by
 286 the Kruskal–Wallis post-test or Dunn’s multiple comparison tests. Statistically significant variations
 287 after treatment were compared with controls using Student’s t test with Excel software. * $p < 0.05$; **
 288 $p < 0.01$.
 289

290 3. Results and discussion

291 The general objective of this work was to prepare biocompatible and (bio)degradable
 292 macromolecular systems prepared from (co)polymers whose repeating units derive from
 293 dimethylmalic acid, a biocompatible and low molar mass molecule, by anionic ring-opening
 294 polymerization (aROP) of α,α,β -trisubstituted β -lactones. Indeed, it was shown that the presence of
 295 two methyl groups on the ring of these monomers leads to a better control of the polymerization
 296 reaction by avoiding back side attack transfer reaction (α deprotonation in anionic propagation
 297 reaction) on the polymer chain [35-40].

298 3.1. Synthesis and characterization of diMeMLABn and diMeMLAHe

299 The selected α,α,β -trisubstituted β -lactones were synthesized starting from
 300 diethyloxalpropionate, following a procedure initially described by Barbaud *et al.* (Scheme 2) [35].



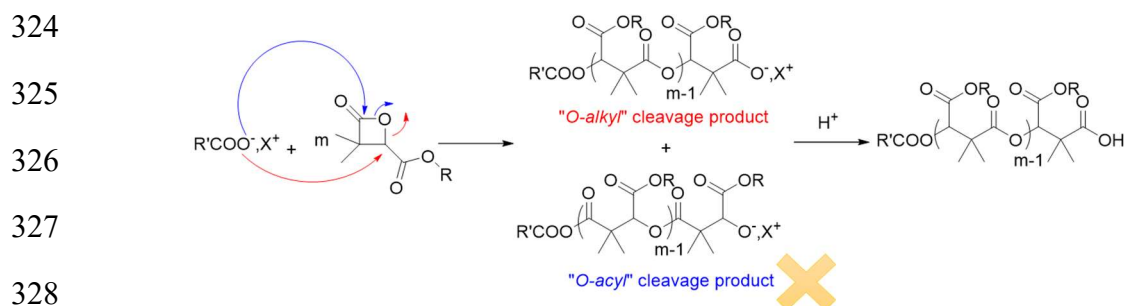
301 **Scheme 2.** Synthetic route to benzyl and hexyl dimethylmalolactonates.

302 The benzyl dimethylmalolactonate (diMeMLABn, **6**) was synthesized to lead either to a
 303 hydrophobic homopolymer or, after catalytic hydrogenolysis, to the hydrophilic block of the
 304 amphiphilic block copolymer, while the hexyl dimethylmalolactonate (diMeMLAHe, **7**) was
 305 synthesized to constitute both the hydrophobic homopolymer and the hydrophobic block of the
 306 amphiphilic block copolymer. As shown in Scheme 2, diethyloxalpropionate was transformed to
 307 diethyl-3,3-dimethyl-2-ketosuccinate **1** in presence of potassium *tert*-butoxide, methyl iodide and 18-
 308 crown-6 ether (18-c-6). The ketosuccinate **1** was reacted with sodium borohydride to lead to diethyl-
 309 3,3-dimethylmalate **2** whose ester functional groups were hydrolyzed under basic conditions to lead
 310 to 3,3-dimethylmalic acid **3**. The diacid **3** was then treated with trifluoroacetic anhydride (TFAA)
 311 followed by the addition of the selected alcohol, benzyl alcohol or 1-hexyl alcohol, leading to the
 312 corresponding monoesters **4** and **5** which were transformed into the expected diMeMLABn **6** and
 313 diMeMLAHe **7** by Mistunobu reaction [33,34]. After purifications, the two synthesized lactones
 314 showed $^1\text{H-NMR}$ spectra in agreement with those given in the literature [35,36].

315 3.2. Synthesis and characterization of hydrophobic homopolymers and amphiphilic block copolymers based on 316 PdiMeMLA derivatives

317 The next step of the present work was to prepare well-defined and well-characterized
 318 dimethylmalic acid-based homo- and block copolymers for applications as drug delivery systems.

319 Therefore, the polymerization procedure has to be controlled (molar masses and polymers structures)
 320 with no-side reactions, and anionic polymerization is a perfect tool to polymerize β -lactones in a
 321 controlled way [45]. Such monomers are generally polymerized by aROP in presence a carboxylated
 322 initiator ($\text{RCOO}^- \text{X}^+$), instead of an alkoxide initiator, via an "O-alkyl" bound cleavage of the
 323 monomer, leading quantitatively to carboxylic acid end-capped (co)polymers (Scheme 3).



329 **Scheme 3.** aROP of α,α,β -trisubstituted β -lactones in presence of a carboxylated initiator.

330 Since the (co)polymers prepared may be used for biomedical application, the biocompatibility
 331 of the resulting products is of prime importance. To that end, carboxylate initiators were prepared
 332 from carboxylic acid deprotonated by phosphazene bases. The reason behind choosing phosphazene
 333 bases as deprotonating agents of carboxylic acid is their high basic character (high pK_b values).
 334 Indeed, phosphazene bases are organobases that contain a central phosphorous atom [P(V)] bonded
 335 to four nitrogen functions of three amine and one imine substituents. They are classified as P_n bases,
 336 based on the number (n) of phosphorous atoms in the molecule. Their basicity is reflected by the
 337 number of the triaminoiminophosphorane units: P_4 bases, the strongest of the phosphazene bases,
 338 show basicity comparable to organolithium compounds ($^{\text{MeCN}}\text{pK}_{\text{BH}^+}$ of P_4 -*t*-Bu, = 41.9, $^{\text{MeCN}}\text{pK}_{\text{BH}^+}$ of P_1 -
 339 *t*-Bu = 26.9) [46-50]. Beside the choice of the deprotonating agent, the selection of the carboxylic acid
 340 (initiator) is also crucial, and 1-pyreneacetic acid has been selected as a non-halogenated carboxylic
 341 acid. By comparing the efficiency of the couples 1-pyreneacetic acid/ P_1 -*t*-Bu and 1-pyreneacetic
 342 acid/ P_4 -*t*-Bu for the aROP of diMeMLABn in terms of polymerization rate and control, P_4 -*t*-Bu
 343 phosphazene base has been chosen as deprotonating agent because it leads to 100% monomer
 344 conversion in few hours with a good control over the molar masses and polymer structure, while the
 345 couple 1-pyreneacetic acid/ P_1 -*t*-Bu allowed the conversion of only 50% of diMeMLABn in 2.5 days
 346 [48]. Assuming that the pyrenecarboxylate moieties initiated the polymerization reaction,
 347 experimental molar masses can be calculated by $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy from the relative intensity of
 348 methine group of the diMeMLABn monomer repeating units at $\delta = 5.3$ ppm (peak "b") and proton
 349 signals of the initiating pyrene ring (peaks "f") in the range of $\delta = 7.9$ -8.3 ppm (Figure S1).

350 In this context, diMeMLABn and diMeMLAHe were thus polymerized using this 1-pyreneacetic
 351 acid/ P_4 -*t*-Bu initiator/base couple, with a ratio monomer/initiator selected to obtain homopolymers
 352 with a theoretical molar mass of 7,500 g/mol (Table 1).

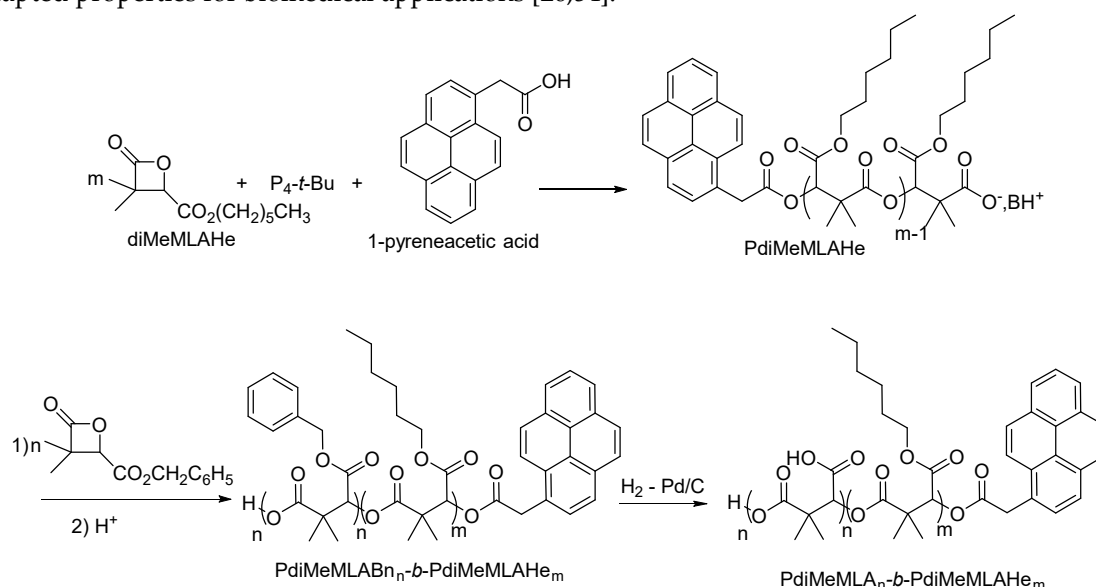
353 **Table 1.** Characteristics of PdiMeMLABn₃₀ and PdiMeMLAHe₃₀.

Homopolymer	[Monomer]:[1-pyreneacetic acid]:[P_4 - <i>t</i> -Bu]	$M_{n, \text{theo}}$ (g/mol)	$M_{n, \text{NMR}}^a$ (g/mol)	$M_{n, \text{SEC}}^b$ (g/mol)	Đ^b
PdiMeMLABn ₃₀	32:1:1	7,500	7,000	2,700	1.20
PdiMeMLAHe ₃₀	33:1:1	7,500	6,800	5,500	1.16

354 ^a Determined by $^1\text{HNMR}$. ^b SEC analysis in THF/ NEt_3 (2w% of NEt_3) at 35°C.

355 The $^1\text{H-NMR}$ spectra and SEC chromatograms of the purified homopolymers agreed with both the
 356 homopolymer structures and molar masses. The molar masses calculated from the $^1\text{H-NMR}$ spectra
 357 (Table 2) are closed to the theoretical ones while the homopolymers' dispersities (measured by SEC)
 358 are low ($\text{Đ} \leq 1.20$) attesting of the good control of both polymerization reactions. However, it is
 359 important to note that despite drastic purification procedures, traces of $\text{P}_4\text{-}t\text{-Bu}$ are present in
 360 PdiMeMLABn_{30} and PdiMeMLAHe_{30} samples as highlighted by the presence of peaks corresponding
 361 to this phosphazene base in both $^1\text{H-NMR}$ spectra (around 2.9 mol% of $\text{P}_4\text{-}t\text{-Bu}$ for each
 362 homopolymer).

363 Incorporating two monomers with different physicochemical properties in one copolymer is of
 364 great interest, especially for biomedical applications. Copolymerization brings the advantages and
 365 properties of both monomers into one macromolecular structure, and several copolymers have
 366 already been synthesized and used for biomedical applications [28,36-38,52,53]. Since we have
 367 previously shown the effectiveness of the 1-pyreneacetic acid/ $\text{P}_4\text{-}t\text{-Bu}$ initiator/base system for the
 368 homopolymerization of both diMeMLABn & diMeMLAHe, the same initiator/base system has been
 369 selected to polymerize sequentially diMeMLAHe and diMeMLABn in two ratios allowing to
 370 modulate the hydrophobic/hydrophilic balance of the final amphiphilic block copolymers (Scheme
 371 4). Indeed, this balance is a key parameter for the preparation of well-defined nanoobjects showing
 372 adapted properties for biomedical applications [26,54].



373 **Scheme 4.** Synthetic procedure leading to amphiphilic block copolymers.

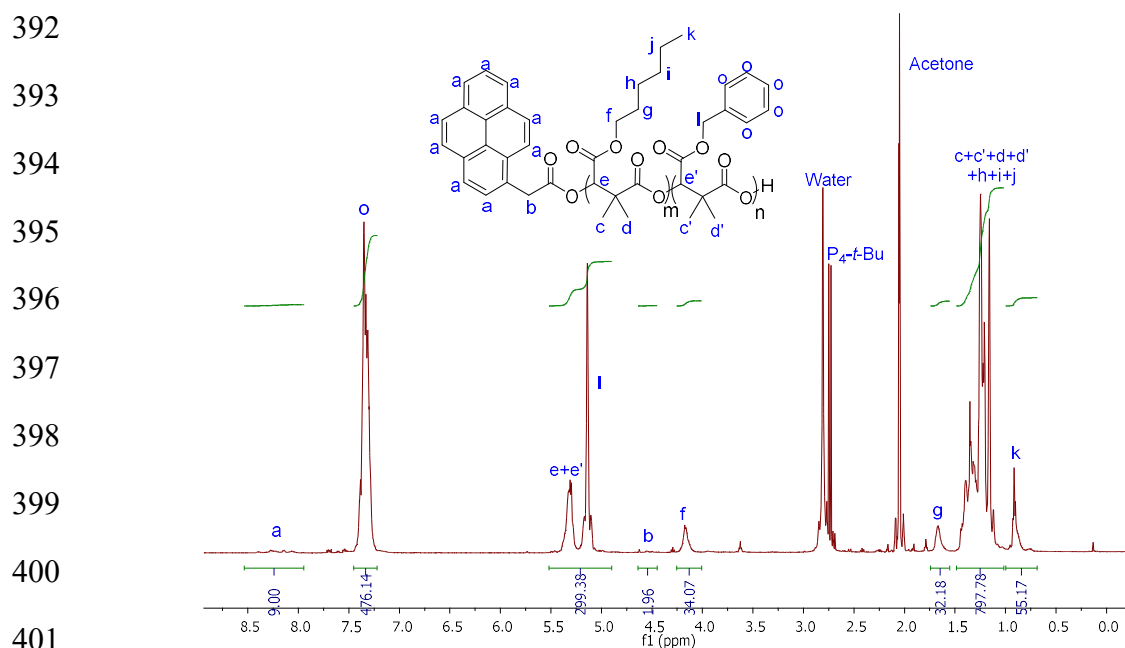
374 Therefore, diMeMLAHe was polymerized first using 1-pyreneacetic acid/ $\text{P}_4\text{-}t\text{-Bu}$ initiator/base
 375 system. Once all this lactone was consumed, as attested by the disappearance of the lactonic band at
 376 $1,850\text{ cm}^{-1}$ on the FT-IR spectrum, the diMeMLABn was added into the reaction mixture in order to
 377 build the second block. As shown in Table 2, two diMeMLAHe/diMeMLABn initial ratios were used,
 378 thus leading to two block copolymers having similar global molar masses but different lengths of
 379 each block.

380 **Table 2.** Characteristics of the two amphiphilic block copolymers prepared by sequential aROP of
 381 diMeMLAHe and diMeMLABn using 1-pyreneacetic acid/ $\text{P}_4\text{-}t\text{-Bu}$ system.

Entry	[diMeMLAHe] ₀ / [diMeMLABn] ₀ initial ratio	Theoretical values		Experimental values		M_n^b (g/mol)	Đ^b
		$M_{\text{PdiMeMLAHe}}$ (g/mol)	$M_{\text{PdiMeMLABn}}$ (g/mol)	$M_{\text{PdiMeMLAHe}}^a$ (g/mol)	$M_{\text{PdiMeMLABn}}^a$ (g/mol)		
1	32:49	7,300	11,500	6,600	12,600	12,000	1.25
2	49:24	11,100	5,700	11,800	6,400	7,400	1.31

382 ^a Determined by $^1\text{H NMR}$. ^b SEC analysis in THF/NEt₃ (2w% of NEt₃) at 35°C.

383 In the $^1\text{H-NMR}$ spectrum of PdiMeMLABn₅₄-b-PdiMeMLAHe₂₉ (Table 2, Entry 1), signals “H_i” and
 384 “H_i” directly allow determining the composition of each block while their comparison to the signal
 385 “H_a” gives access to the molar mass of each block (Figure 1). As indicated by the results from Table
 386 2, theoretical molar masses of each block are in good agreement with those calculated from $^1\text{H-NMR}$
 387 spectra. Moreover, the low dispersity ($\text{Đ} \leq 1.31$) of both samples demonstrated the good control of
 388 these sequential aROPs and the effective synthesis of the selected block copolymers with the expected
 389 structures. However, as for homopolymers, $^1\text{H-NMR}$ spectra have highlighted the presence of
 390 phosphazene base P₄-t-Bu traces (around 1 mol% in each sample) in the purified block copolymers
 391 despite the drastic purification procedures which were applied.



402 **Figure 1.** $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Acetone- d_6 , 23 °C) spectrum of PdiMeMLABn₅₄-b-PdiMeMLAHe₂₉ (Table 2,
 403 Entry 1)

404 Because of the presence of ester bounds in block copolymers back-bone and lateral chains,
 405 catalytic hydrogenolysis using palladium on activated charcoal has been selected as mild and specific
 406 deprotection method of benzyl esters [55]. Both hydrophobic block copolymers were thus submitted
 407 to catalytic hydrogenolysis in presence of 20wt% of Pd/C under atmospheric pressure of hydrogen,
 408 thus leading to the expected amphiphilic block copolymers, PdiMeMLA₅₄-b-PdiMeMLAHe₂₉ and
 409 PdiMeMLA₂₇-b-PdiMeMLAHe₅₀ (Table 3).

410 **Table 3.** Characteristics of PdiMeMLA₅₄-b-PdiMeMLAHe₂₉ and PdiMeMLA₂₇-b-PdiMeMLAHe₅₀.

Block copolymers	M_{PdiMeMLA}^a (g/mol)	$M_{\text{PdiMeMLAHe}}^a$ (g/mol)	M_{global} (g/mol)	diMeMLA/ diMeMLAHe
PdiMeMLA ₅₄ -b-PdiMeMLAHe ₂₉	7,720 (n = 54)	6,600 (m = 29)	14,320	50/50
PdiMeMLA ₂₇ -b-PdiMeMLAHe ₅₀	3,850 (n = 27)	11,800 (n = 50)	15,650	25/75

411 ^a Determined by $^1\text{H NMR}$.

412

413 3.3. Formulation and characterization of nanoparticles

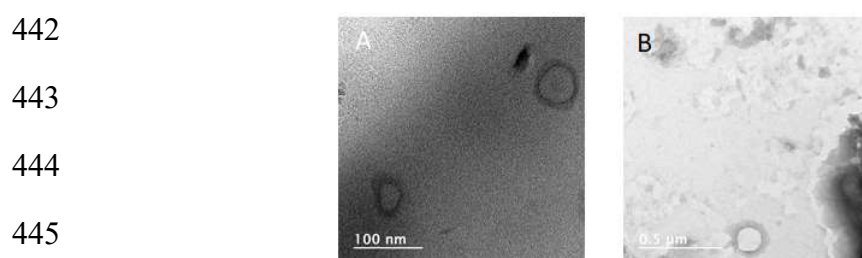
414 Towards the end of the 1980s, Kataoka *et al.* have described the preparation of polymeric NPs from
 415 amphiphilic macromolecules for the delivery of bioactive molecules (drugs, fluorescent probes,

416 proteins etc.) [56]. Several more or less complex methods are used to formulate NPs, among which
 417 nanoprecipitation of hydrophobic and amphiphilic block copolymers, first described by Fessi *et al.*
 418 [57,58], were used by Barbaud *et al.* to prepare Warfarin-loaded NPs from random or block
 419 copolymers based on PdiMeMLA derivatives [59]. Nanoprecipitation conditions were slightly
 420 modified to be adjusted to the physico-chemical properties of hydrophobic homopolymers and
 421 amphiphilic block copolymers produced in this work. Indeed, the synthesized homopolymers and
 422 amphiphilic block copolymers exhibit much lower global molar masses than the ones used by
 423 Barbaud *et al.* [58]. Hydrophobic homopolymers, dissolved in DMF, were added dropwise into
 424 distilled water under vigorous stirring for 20 minutes. The obtained NPs suspensions were purified
 425 by exclusion chromatography through a Sephadex column to obtain NPs suspensions with a final
 426 concentration of 0.714 mg/mL, analyzed by DLS and zetametry (Table 4). The PdiMeMLAHe₃₀ based
 427 NPs have a slightly higher hydrodynamic diameter (Dh) than the one observed for PdiMeMLABn₃₀
 428 based NPs (Table 4). Due to the linear and flexible character of the hexyl lateral chains, compaction
 429 of the polymeric chains to form the NPs might be lower than the one observed with the benzyl lateral
 430 chains of the PdiMeMLABn₃₀ based NPs. However, PdiMeMLAHe₃₀ are of interest to study the effect
 431 of the lateral chains' nature of both drug encapsulation efficiency and NPs cytotoxicity. Besides, both
 432 batches of NPs suspensions have a low dispersity (PDI < 0.20) demonstrating the good homogeneity
 433 of the NPs. On the other hand, the value of zeta potential is an important indication of the stability of
 434 the NPs. Indeed, the higher the magnitude of zeta potential is, the more stable the NPs are [60].

435 **Table 4.** Characteristics of NPs suspensions prepared from PdiMeMLABn₃₀ and PdiMeMLAHe₃₀

Polymers	Dh (nm)	PDI	Zeta potential (mV)
PdiMeMLABn ₃₀	100	0.19	- 37
PdiMeMLAHe ₃₀	130	0.12	- 53

436 All the prepared NPs exhibit negative zeta potential ranging from -37 to -53 mV highlighting their
 437 good stability. The negatively charged surface might be partially generated from carboxylate
 438 functional end groups of homopolymers coming from their synthesis via the aROP of the
 439 corresponding monomer. Finally, the TEM images confirm both the size of these NPs and the low
 440 sample dispersity and that NPs based on PdiMeMLABn₃₀ and PdiMeMLAHe₃₀ exhibited a spherical
 441 shape (Figure 2).



446 **Figure 2.** TEM images of A) PdiMeMLABn₃₀, and B) PdiMeMLAHe₃₀ based NPs.

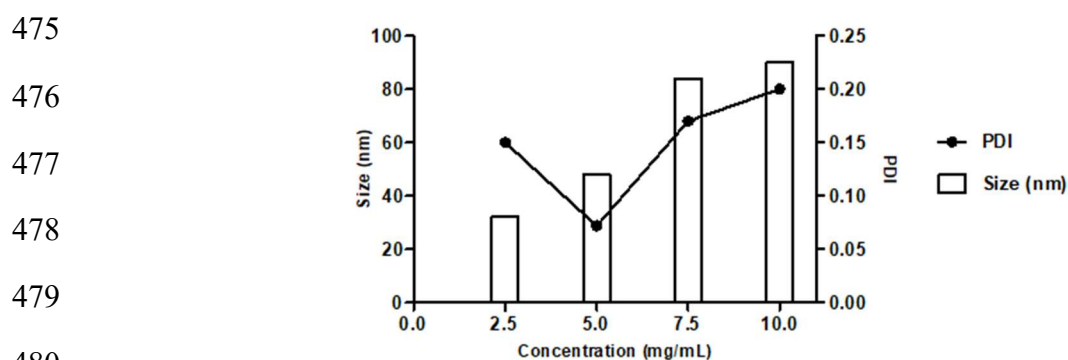
447 Amphiphilic block copolymers containing hydrophilic and hydrophobic blocks are widely used
 448 to prepare NPs having a core-shell structure with the hydrophilic segment constituting a hydrophilic
 449 corona, which reduces the recognition by the immune system, whereas the hydrophobic segment
 450 drives the formation of NPs through hydrophobic interactions constituting the inner core in which
 451 hydrophobic drugs can be encapsulated. Therefore, PdiMeMLA_{54-b}-PdiMeMLAHe₂₉ and
 452 PdiMeMLA_{27-b}-PdiMeMLAHe₅₀ have been used to formulate the corresponding core-shell NPs by
 453 nanoprecipitation (Table 5), with conditions adjusted to the nature of the considered amphiphilic

454 block copolymers. For PdiMeMLA_{27-b}-PdiMeMLAHe₅₀ block copolymer, well-defined NPs have
 455 been obtained when PBS at pH 7.2 was used as aqueous phase. Moreover, we have shown that the
 456 block copolymer concentration in the organic phase (5 mg/mL and 10 mg/mL), and consequently in
 457 the aqueous phase (2.5 mg/mL and 5 mg/mL), has no influence on both the hydrodynamic diameter
 458 (around 110 nm) and dispersity (PDI around 0.20) of the resulting NPs suspensions (data not shown).
 459 PdiMeMLA_{27-b}-PdiMeMLAHe₅₀ based NPs were thus prepared at a final block copolymers
 460 concentration in PBS of 2.5 mg/mL.

461 **Table 5.** Characteristics of NPs suspension prepared by nanoprecipitation of amphiphilic block copolymers.

Copolymers	Dh (nm)	PDI	Zeta potential (mV)
PdiMeMLA _{54-b} -PdiMeMLAHe ₂₉	50	0.08	- 36
PdiMeMLA _{27-b} -PdiMeMLAHe ₅₀	150	0.17	- 32

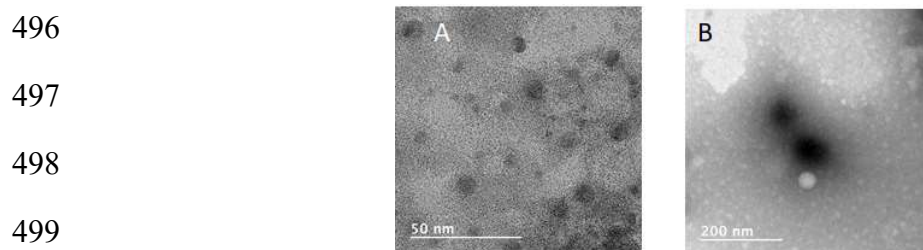
462 Conversely, PdiMeMLA_{54-b}-PdiMeMLAHe₂₉ block copolymers lead to well-defined NPs when water
 463 was used as non-solvent. We have also studied the influence of initial and final block copolymer
 464 concentration on NPs hydrodynamic diameter and dispersity. Four initial concentrations (5, 10, 15
 465 and 20 mg/mL) in acetone have been tested. After evaporation of the acetone under vacuum, the
 466 resulting nanoparticle suspensions, with block copolymer concentration of 2.5, 5, 7.5 and 10 mg/mL,
 467 were analyzed by DLS (Figure 3). When the concentration increased from 2.5 to 10 mg/mL, the NPs
 468 hydrodynamic diameter increased from 30 to 100 nm, while the PDI values first decreased from 0.2
 469 to a minimum inflection point of PDI value of 0.07 and then increased up to 0.2. In aqueous solutions,
 470 amphiphilic molecules orientate themselves so that the hydrophobic blocks are removed from the
 471 aqueous environment in order to achieve a state of minimum free energy. As the concentration of
 472 block copolymer in solution increases, the free energy of the system begins to rise due to unfavorable
 473 interactions between water molecules and the hydrophobic region of the amphiphilic block
 474 copolymer resulting in the formation of micelles.



481 **Figure 3.** Variation of hydrodynamic diameter and PDI of PdiMeMLA_{54-b}-PdiMeMLAHe₂₉ based NPs with
 482 different final concentrations in water.

483 The same variation in size and PDI values of polymeric NPs upon nanoprecipitation, as shown in
 484 Figure 3, was reported for the nanoprecipitation of PCL [61]. Considering that well-defined (lowest
 485 PDI) NPs with diameters as small as possible (10-1,000 nm) are required for drug delivery application,
 486 the batch prepared by nanoprecipitation of PdiMeMLA_{54-b}-PdiMeMLAHe₂₉ at the concentration of 5
 487 mg/mL and producing NPs with a hydrodynamic diameter of ~50 nm and the lowest PDI (~ 0.07) is
 488 the best condition compared to the three others. The negative zeta potential of NPs constituted by
 489 PdiMeMLA-based block copolymers are generated by the presence of negatively charged carboxylate

490 anions handling from the hydrophilic block of the copolymer. These results are comparable with the
 491 ones obtained for poly(malic acid)-*b*-poly(3-hydroxybutyrate) (PMLA-*b*-PHB) block copolymer-
 492 based NPs for which it was reported a negative values of zeta potential with values varying from -32
 493 mV to -52 mV [39]. As shown by Figure 4, NPs formed by PdiMeMLA-based block copolymers also
 494 display quite a round shape with lower diameter than those observed by DLS. The hydrophilic
 495 corona are not visible by TEM because images are taken in a dry state.



500 **Figure 4.** TEM images of A) PdiMeMLA₅₄-*b*-PdiMeMLAHe₂₉, and B) PdiMeMLA₂₇-*b*-PdiMeMLAHe₅₀ based
 501 NPs.

502 With the goal to evaluate the *in vitro* cell uptake of these NPs, the fluorescence probe 1,1'-
 503 dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindotricarbocyanine iodide (DiR) has been embedded into
 504 hydrophobic homopolymers and amphiphilic block copolymers based NPs using nanoprecipitation
 505 methods established for the formulation of the corresponding empty NPs. Therefore, DiR was added
 506 into the organic solvent containing homopolymers or block copolymers and the blue/green
 507 DiR/(co)polymers solutions were nanoprecipitated. The blue/green slightly turbid NPs suspensions
 508 were passed through a G25 Sephadex column in order to eliminate the unloaded DiR, which is
 509 retained on the top of the column. We have shown that nearly all the DiR was encapsulated into the
 510 core of NPs since no free DiR was detected on the top of the Sephadex column. DiR-loaded
 511 hydrophobic homopolymers and amphiphilic block copolymers NPs were next analyzed by DLS
 512 (Table 6). The encapsulation of the fluorescence probe had no influence on both the hydrodynamic
 513 diameter and dispersity since both empty and DiR-loaded NPs have similar hydrodynamic diameters
 514 and dispersities. Before performing *in vitro* cell assays, stability of NPs suspensions was also
 515 measured to evaluate their stability under storage at 4 °C and after incubation at 37 °C. Only slight
 516 fluctuations in the values of hydrodynamic diameter and PDI were recorded highlighting the obvious
 517 excellent stability of these NPs under the incubation conditions (data not shown).

518 **Table 6.** Characteristics of DiR-loaded NPs suspensions.

Polymers	DiR (wt%)	Dh (nm)	PDI
PdiMeMLABn ₃₀	0.5	110	0.15
PdiMeMLAHe ₃₀	0.5	120	0.13
PdiMeMLA ₅₄ - <i>b</i> -PdiMeMLAHe ₂₉	1	50	0.07
PdiMeMLA ₂₇ - <i>b</i> -PdiMeMLAHe ₅₀	1	120	0.20

519

520 3.4. *In vitro* cell viability assays

521 The liver is the major site of metabolism of xenobiotics prior to their elimination from the body
 522 and, as such, the toxicity of NPs is important to evaluate using hepatic cell models. In order to assess
 523 the biocompatibility of the NPs produced in this work, we used the human HepaRG hepatoma cell
 524 line. The HepaRG cells are undifferentiated bipotent progenitor cells actively proliferating that have
 525 the ability to differentiate into quiescent hepatocyte-like cells [43,44], which express most of the liver
 526 specific functions including drug metabolism enzymes [62-65]. The HepaRG cells are considered to
 527 be one of the most relevant hepatic cell models to examine the cytotoxic effect of xenobiotics both in

528 proliferating progenitor and differentiated quiescent cells as well as the cellular uptake of polymeric
529 NPs [53].

530 The progenitor (Figure 5) and the differentiated (Figure 6) cells have been exposed for 24 hours
531 to various concentrations of NPs prepared from different PdiMeMLA (co)polymers. Influences of the
532 nature of lateral groups, benzyl and hexyl, of the hydrophobic homopolymers, and the
533 hydrophilic/hydrophobic molar mass ratio of the block copolymer PdiMeMLA-*b*-PdiMeMLAHe, on
534 cell's viability have been evaluated by measuring the intracellular content in ATP.

535

536

537

538

539

540

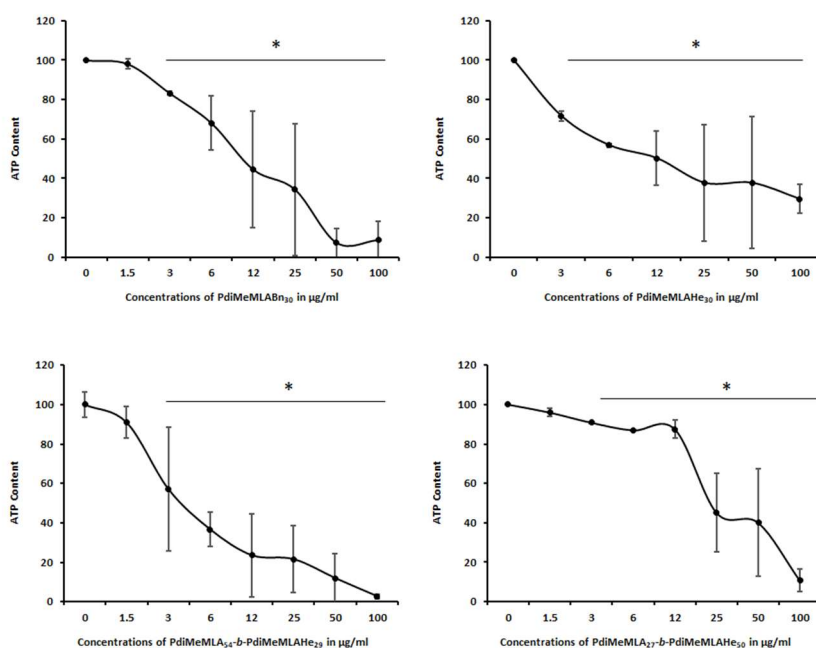
541

542

543

544

545



546 **Figure 5.** Progenitor HepaRG cell viability evaluated by measuring the ATP content at 24 h of incubation with
547 increasing concentrations of (co)polymers PdiMeMLA₅₄-*b*-PdiMeMLAHe₂₉, PdiMeMLA₂₇-*b*-PdiMeMLAHe₅₀,
548 PdiMeMLABn₃₀ and PdiMeMLAHe₃₀ NPs. Statistics: **p*<0.05 for treated cultures versus untreated control
549 cultures (0).

550 In progenitor HepaRG cells (Figure 5), the ATP content decreased in a dose-dependent manner
551 for both the hydrophobic homopolymers and block copolymer PdiMeMLA-*b*-PdiMeMLAHe derived
552 NPs. For the homopolymer-based NPs, the IC₅₀ values (Table 7) revealed that PdiMeMLAHe₃₀ based
553 NPs are the least toxic one with an IC₅₀ of 23.56 ± 2.12 µg/mL, while the IC₅₀ of PdiMeMLABn₃₀ based
554 NPs was much lower at 6.95 ± 2.2 µg/mL. These data suggested that the nature of lateral groups of
555 the hydrophobic homopolymers derivated from PdiMeMLA has a significant effect on the
556 cytotoxicity of the corresponding NPs towards progenitor HepaRG cells. For PdiMeMLA₂₇-*b*-
557 PdiMeMLAHe₅₀ NPs and PdiMeMLA₅₄-*b*-PdiMeMLAHe₂₉ NPs, the IC₅₀ found were 22.11 ± 0.84 and
558 4.65 ± 0.49 µg/mL, respectively, demonstrating that the PdiMeMLA₅₄-*b*-PdiMeMLAHe₂₉-based NPs
559 were much more toxic and that hydrophilic/hydrophobic molar mass ratio of block copolymer
560 PdiMeMLA-*b*-PdiMeMLAHe strongly impacted the cell viability of progenitor HepaRG cells. The
561 PdiMeMLA₂₇-*b*-PdiMeMLAHe₅₀ NPs were the least toxic since no significant decrease in the ATP
562 content was observed up to 12 µg/mL.

563

564

565

Table 7. Values of IC₅₀ of the homopolymer- and amphiphilic block copolymer-based NPs in HepaRG cells.

NPs	PdiMeMLA _{54-b} - PdiMeMLAHe ₂₉	PdiMeMLA _{27-b} - PdiMeMLAHe ₅₀	PdiMeMLABn ₃₀	PdiMeMLAHe ₃₀
IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	4.65 \pm 0.49	22.11 \pm 0.84	6.95 \pm 2.2	23.56 \pm 2.12

567

568 Unexpectedly, the same concentrations of hydrophobic homopolymers and block copolymer
569 PdiMeMLA-*b*-PdiMeMLAHe derived NPs showed no significant toxic effects towards differentiated
570 HepaRG cells after 24 h of incubation up to 100 $\mu\text{g/mL}$ of (co)polymers (Figure 6).

571

572

573

574

575

576

577

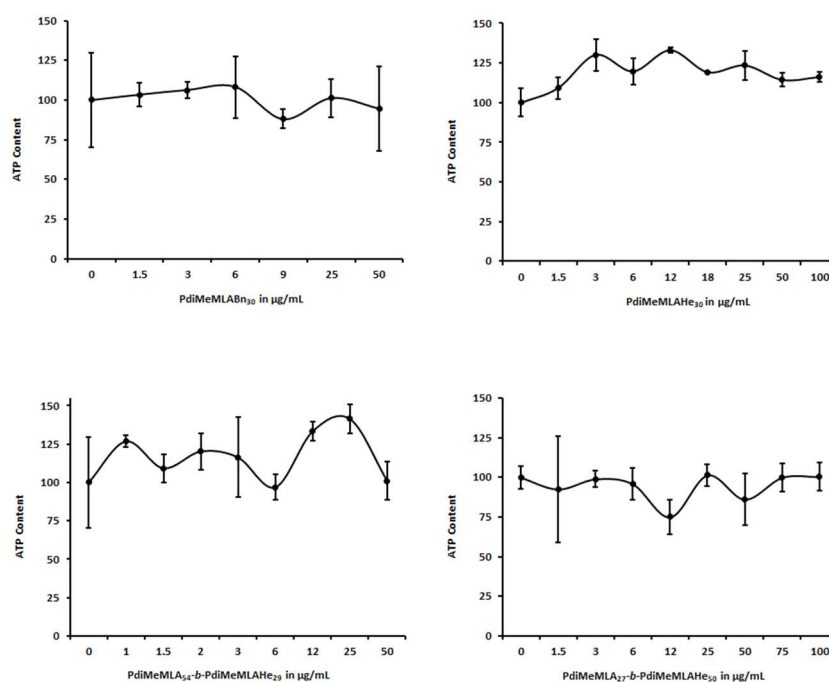
578

579

580

581

582

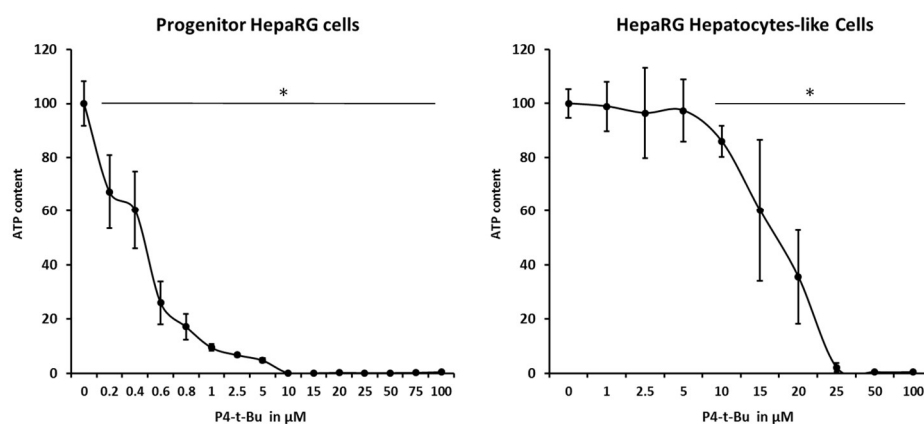


583 **Figure 6.** Differentiated HepaRG cell viability evaluated by measuring the ATP content at 24 h of incubation
584 with increasing concentrations of (co)polymers PdiMeMLA_{54-b}-PdiMeMLAHe₂₉, PdiMeMLA_{27-b}-
585 PdiMeMLAHe₅₀, PdiMeMLABn₃₀ and PdiMeMLAHe₃₀ NPs.

586 Such difference and behavior can be explained by the strong phenotypical changes between
587 progenitor and differentiated HepaRG cells. In contrast to progenitor HepaRG cells that actively
588 proliferate but show low expression levels of liver specific functions, differentiated hepatocyte-like
589 HepaRG cells are quiescent and metabolically competent cells expressing most phase I, II and III
590 detoxifying enzymes [62-64]. It can be postulated that the detoxifying machinery of differentiated
591 HepaRG cells catabolize and eliminate the polymers and organic compounds used during the
592 synthesis and/or that the (co)polymers are more toxic towards proliferating cells.

593 Since ¹H-NMR spectra of hydrophobic homopolymers and amphiphilic block copolymers have
594 highlighted the presences of P₄-*t*-Bu traces, we also evaluated the toxicity generated by this base in
595 order to provide a possible explanation for the cytotoxicity observed with NPs especially in
596 progenitor HepaRG cells. Both progenitor and differentiated HepaRG cells were thus incubated with
597 increasing concentrations of the base, and cell viabilities were determined using the ATP test (Figure
598 7). P₄-*t*-Bu triggered a strong cytotoxicity in progenitor HepaRG cells with an IC₅₀ at 0.55 \pm 0.1 μM

599 while the toxicity of the base was much weaker in differentiated cells with an IC_{50} found at $16.65 \pm$
 600 $1.89 \mu\text{M}$. These data suggest that the traces of $P_4-t\text{-Bu}$ detected in the polymeric materials may
 601 contribute to the observed toxicities in progenitor HepaRG cells.



602

603 **Figure 7.** Progenitor and differentiated HepaRG cell viability evaluated by measuring the ATP content at 24 h
 604 of incubation with increasing concentrations of $P_4-t\text{-Bu}$. Statistics: $*p < 0.05$ for treated cultures versus untreated
 605 control cultures (0).

606 We next evaluated the cell uptake of homopolymer- and amphiphilic block copolymer-based
 607 NPs in both progenitor and differentiated HepaRG cells (Figure 8). Because of the significant
 608 cytotoxicity of some NPs towards progenitor HepaRG cells, we selected 3 concentrations (3, 6 and 25
 609 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of DiR-loaded NPs to assess their cell internalisation. After incubation of cells with NPs for
 610 24, the viable cells were analysed by flow cytometry and 2 parameters were measured, the percentage
 611 of cells that had internalized fluorescent NPs (positive cells) and the mean of fluorescence reflecting
 612 the levels of NP's accumulation in positive cells (Figure 8).

613 We found that the 4 NPs were much more internalized in progenitor cells than in differentiated cells
 614 since all cells were positive for PdiMeMLA_{27-b}-PdiMeMLAHe₅₀ NPs at polymer concentrations of 25
 615 and 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and for PdiMeMLAHe₃₀ NPs at 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. At the lowest concentration of 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$,
 616 70% of progenitor cells were positive for PdiMeMLA_{27-b}-PdiMeMLAHe₅₀ NPs. Interestingly,
 617 PdiMeMLA_{54-b}-PdiMeMLAHe₂₉ NPs that induced a strong cytotoxicity are relatively well
 618 internalized in progenitor cells at 3 and 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The PdiMeMLABn₃₀ and PdiMeMLAHe₃₀ NPs
 619 showed much weaker uptake in progenitor cells with the exception of the PdiMeMLAHe₃₀ NPs at 25
 620 $\mu\text{g}/\text{mL}$, for which all cells were positive. As expected, the intensity of fluorescence correlated with
 621 the percentages of positive cells with the highest means of fluorescence found for the PdiMeMLA_{54-b}-
 622 PdiMeMLAHe₂₉ and PdiMeMLA_{27-b}-PdiMeMLAHe₅₀ NPs at the concentrations of 3 and 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$
 623 and for PdiMeMLA_{27-b}-PdiMeMLAHe₅₀ and PdiMeMLAHe₃₀ NPs at the highest polymer
 624 concentration of 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

625

626

627

628

629

630

631

632

633

634

635

636

637

638

639

640

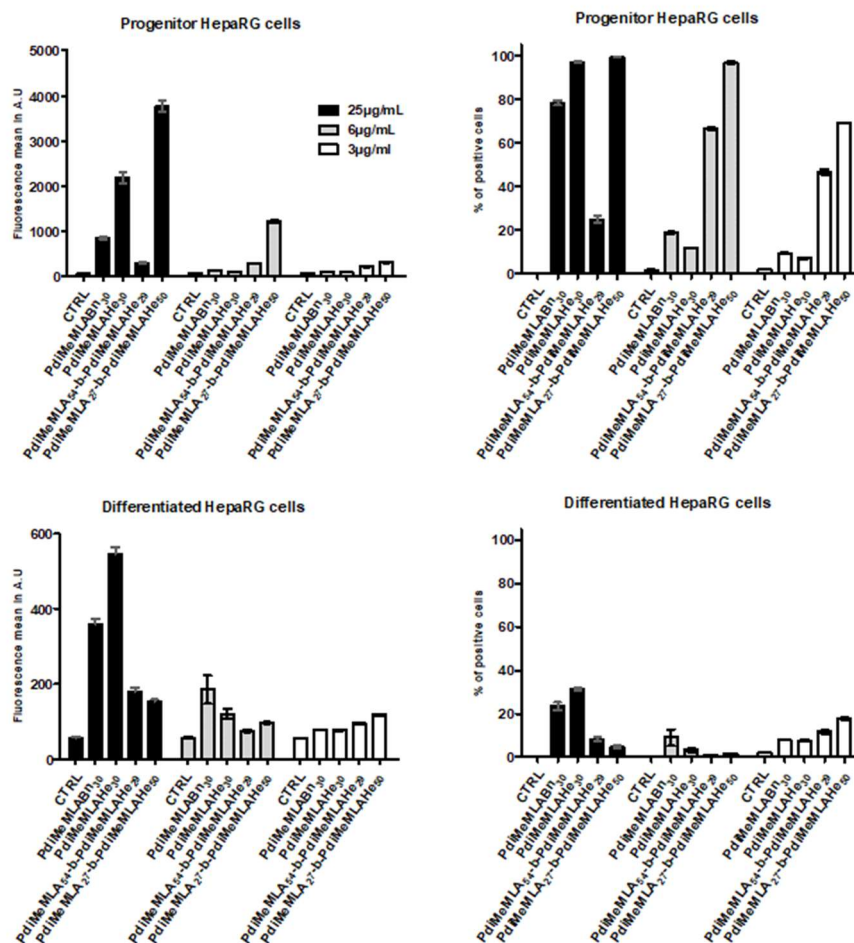
641

642

643

644

645



646

647

648

649

Figure 8. Percentages of positive cells and fluorescence intensities (arbitrary units, A.U.) measured for each DiR-loaded NPs in progenitor and differentiated HepaRG cells. NPs were prepared from the amphiphilic block copolymers PdiMeMLA₅₄-*b*-PdiMeMLAHe₂₉ and PdiMeMLA₂₇-*b*-PdiMeMLAHe₅₀, and the homopolymers PdiMeMLABn₃₀ and PdiMeMLAHe₃₀.

650

651

652

653

654

655

656

657

658

The higher cell uptake of PdiMeMLA₂₇-*b*-PdiMeMLAHe₅₀ NPs compared to that observed for PdiMeMLAHe₃₀ NPs allows us to assume that the hydrophilic block eases the cell uptake of NPs whereas absence of any protective hydrophilic shell causes decrease in uptake. It is noteworthy that Huang *et al.* [65] have reported that NPs constituted by PMLABn allow a much higher uptake than NPs formulated from PEG-*b*-PMLABe. In the present study, the hydrophilic block composed by polymeric chains having carboxylic acid lateral groups confers a quite high negative surface charge (-30 to -42 mV) to the corresponding NPs compared to a quite neutral surface charge for PEG-*b*-PMLABe based NPs (-8 mV) [65]. The negative surface charge may allow more interaction with cell's plasma membrane to explain the higher uptake of NPs prepared from such block copolymers.

659

660

661

662

663

664

665

666

667

In contrast, the NP's internalization was less efficient in differentiated HepaRG cells since the highest percentages of positive cells were observed for PdiMeMLABn₃₀ and PdiMeMLAHe₃₀ NPs at the concentration in polymers of 25 µg/mL. It is noteworthy that the highest cell uptake in progenitor versus differentiated HepaRG cells were not obtained with the same NPs since PdiMeMLA₂₇-*b*-PdiMeMLAHe₅₀ NPs were well internalized in progenitor cells while cell uptake was more efficient for PdiMeMLAHe₃₀ NPs in differentiated cells. In addition, the low cell uptake of all NPs by differentiated HepaRG cells also provided another explanation for the lower cytotoxicity observed in this cell model postulating that the decrease in cell viability is triggered by the accumulation of NPs within the cells.

668 Following the demonstration that DiR-loaded NPs were internalized with much higher efficiencies
 669 in progenitor HepaRG cells compared to their differentiated cell counterparts, we next compared the
 670 IC₅₀ of the homopolymer- and amphiphilic block copolymer-based NPs in progenitor HepaRG cells,
 671 the estimated percentage of residual P₄-t-Bu (% mol) associated with (co)polymers and the
 672 percentages of cells that internalized fluorescent NPs in cultures exposed with 6 and 25 µg/mL of
 673 (co)polymers to further analyze whether lower IC₅₀ correlated with higher NP's cell uptake and
 674 higher amounts of P₄-t-Bu (Table 8). Although the amounts of the catalyst present in the batches of
 675 NPs are difficult to quantify precisely, we estimated that amounts of P₄-t-Bu varied from 0.94 to 2.94
 676 % mol in the different batches of (co)polymers. Our data indicated that the IC₅₀ did not correlate with
 677 the amounts of P₄-t-Bu detected in the (co)polymers or the incubation with either the homopolymer-
 678 or amphiphilic block copolymer-based NPs. The toxicity was not related either to the level of NPs
 679 uptake, since we found similar levels of toxicity for PdiMeMLA₂₇-b-PdiMeMLAHe₅₀ and
 680 PdiMeMLAHe₃₀ based NPs while the internalization levels were different, and a higher cytotoxicity
 681 of PdiMeMLAHe₃₀ based NPs with a lower NP's internalization (Table 7).

682 This toxicity could also be linked to the physicochemical properties of NPs such as size, surface
 683 charge or shape. For example, the most toxic NPs PdiMeMLA₅₄-b-PdiMeMLAHe₂₉ has a size much
 684 smaller than other NPs (50 nm). Concerning the toxicity linked to the surface charge, it has been
 685 discovered that cationic NPs cause a more pronounced disturbance of the integrity of the plasma
 686 membrane, mitochondrial and lysosomal lesions and induce the production of a higher number of
 687 autophagosomes than anionic NPs [66]. Additional studies will be necessary to further characterize
 688 the physicochemical parameters of our NPs.

689

690 **Table 8.** Comparison of the IC₅₀ of the homopolymer- and amphiphilic block copolymer-based NPs in
 691 progenitor HepaRG cells, the estimated percentage of P₄-t-Bu (% mol) found in ¹H-NMR spectra of
 692 (co)polymers and the percentages of cells that internalized fluorescent NPs (% of positive cells) quantified by
 693 flow cytometry in cultures exposed with 6 and 25 µg/mL of (co)polymers.

NPs	PdiMeMLA ₅₄ -b- PdiMeMLAHe ₂₉	PdiMeMLA ₂₇ -b- PdiMeMLAHe ₅₀	PdiMeMLABn ₃₀	PdiMeMLAHe ₃₀
IC ₅₀ (µg/mL)	4.65 ± 0.49	22.11 ± 0.84	6.95 ± 2.2	23.56 ± 2.12
P ₄ -t-Bu (% mol)	1.3	0.94	2.94	2.87
Positive cells (%)	At 6 µg/mL	66.6	96.9	18.75
	At 25 µg/mL	24.8	99.5	78.4

694

695 3. Conclusions

696 In the present study, we report for the first time the synthesis of PdiMeMLA-based (co)polymers
 697 used to formulate NPs and to perform detailed analyses of their cell uptake and impact on cell
 698 viability in progenitor and differentiated HepaRG cells. We have observed cytotoxicity of NPs
 699 prepared from the hydrophobic homopolymers and amphiphilic block copolymer based NPs in
 700 HepaRG progenitor cells that may be triggered by the intracellular accumulation of NPs, the
 701 remaining traces of P₄-t-Bu found in NPs batches and the low detoxification metabolism of these cells.
 702 Our results also suggest that the hydrophilic/hydrophobic ratio could play a role in the cytotoxicity
 703 observed with NPs formulated from the different PdiMeMLA-*b*-PdiMeMLAHe copolymers.

704 The studies of the NPs' uptake by HepaRG cells have shown the significant differences in
705 efficiency between homopolymers and amphiphilic block copolymer based NPs since the highest cell
706 uptake in progenitor cells was obtained with the PdiMeMLA_{27-b}-PdiMeMLAHe₅₀ NPs while cell
707 uptake was more efficient for PdiMeMLAHe₃₀ NPs in differentiated cells suggesting that the
708 differentiation status of hepatic cells strongly modifies the NPs-plasma membrane interaction and
709 the cell process of NP's internalization of PdiMeMLA (co)polymers-based NPs.

710

711 4. Patents

712 **Supplementary Materials:** The following are available online at www.mdpi.com/xxx/s1, Figure S1: ¹H NMR
713 (500 MHz, Acetone-d₆, 23 °C) spectrum of PdiMeMLABn.

714 **Author Contributions:** Conceptualization, S.C.M., O.C., and P.L.; methodology, A.K., S.S., C.R. and M.V.;
715 software, A.K., S.S., C.R. and M.V.; validation, S.C.M., O.C., and P.L.; formal analysis, S.C.M., O.C., and P.L.;
716 investigation, A.K., S.S., C.R. and M.V.; resources, C.R. and M.V.; data curation, A.K., S.S., C.R., M.V., S.C.M.,
717 P.L. and O.C.; writing—original draft preparation, S.C.M., P.L. and O.C.; writing—review and editing, S.C.M.,
718 P.L. and O.C.; visualization, S.C.M., P.L. and O.C.; supervision, S.C.M., P.L. and O.C.; project administration,
719 S.C.M. and O.C.; funding acquisition, S.C.M., P.L. and O.C. All authors have read and agreed to the published
720 version of the manuscript.

721 **Acknowledgments:** This work was funded by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale
722 (Inserm), l'École Nationale Supérieure de Chimie de Rennes (ENSCR, France), the Centre National de la
723 Recherche Scientifique (CNRS), comités départementaux de la Ligue contre le Cancer du Grand Ouest (comités
724 17 et 35) and PHC Tournesol program (project NanoVect, n° 39595YM) [Ministère de l'Europe et des Affaires
725 étrangères (MEAE), Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (MESRI),
726 Wallonie-Bruxelles International (WBI), Fonds de la Recherche Scientifique (F.R.S.-FNRS)]. Ali Khalil received a
727 fellowship from the Région Bretagne (France) and the University of Mons (Belgium) while Saad Saba obtained
728 a fellowship from the Islamic Center Association for Guidance and Higher Education (Lebanon). O.C. is Senior
729 Research Associate for the F.R.S.-FNRS of Belgium. We would like to thank the cytometry core facility of the
730 Biology and Health Federative research structure Biosit, Rennes, France.

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

732

733 **References**

- 734 1. Blanco, E.; Shen, H.; Ferrari, M. Principles of nanoparticles design for overcoming biological barriers to
735 drug delivery. *Nat. Biotech.* 2015, 33, 941-951.
- 736 2. Bobo, D.; Robinson, K.J.; Islam, J.; Thurecht, K.J.; Corrie, S.R. Nanoparticle-Based Medicines: A Review of
737 FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date. *Pharm. Res.* 2016, 33, 2373-2387.
- 738 3. Moghini, S.M.; Hunter, A.C.; Murray, J.C. Long-circulating and target-specific nanoparticles: Theory to
739 practice. *Pharmacol. Rev.* 2001, 53, 283-318.
- 740 4. Arvizo, R.R.; Miranda, O.R.; Moyano, D.F.; Walden, C.A.; Giri, K.; Bhattacharya, R.; Robertson, J.D.; Rotello,
741 V.M.; Reid, J.M.; Mukherjee, P. Modulating pharmacokinetics, tumor uptake and biodistribution by
742 engineered nanoparticles. *PLoS One.* 2011, 6, e24374.
- 743 5. Mahon, E.; Salvati, A.; Baldelli Bombelli, F.; Lynch, I.; Dawson, K.A. Designing the nanoparticles-
744 biomolecule interface for "targeting and therapeutic delivery". *J. Control. Rel.* 2012, 161, 164-174.
- 745 6. Pearce, A.K.; O'Reilly, R.K. Insights into active targeting of nanoparticles in drug delivery: advances in
746 clinical studies and design considerations for cancer nanomedicine. *Bioconjugate Chem.* 2019, 30, 2300-2311.
- 747 7. Englert, C.; Brendel, J.C.; Majdanski, T.C.; Yildirim, T.; Schubert, S.; Gottschaldt, M.; Windhab, N.; Schubert,
748 U.S. Pharmacopolymers in the 21st century: synthetic polymers in drug delivery applications. *Prog. Polym.*
749 *Sci.* 2018, 87, 107-164.
- 750 8. Venditto, V.J.; Szoka Jr., F.C. Cancer nanomedicines: so many papers and so few drugs! *Adv. Drug Deliv.*
751 *Rev.* 2013, 65, 80-88.
- 752 9. Khan, H.A.; Sakharkar, M.K.; Nayak, A.; Kishore, U.; Khan, A. Nanoparticles for biomedical applications:
753 an overview. In *Nanomaterials: nanostructured materials for biomedical applications*. Roger Narayan Ed.,
754 Woodhead publishing, Elsevier Ltd., 2018, pp. 357-377.
- 755 10. Wicki, A.; Witzigmann, D.; Balasubramanian, V.; Huwyler, J. Nanomedicine in cancer therapy: challenges,
756 opportunities, and clinical applications. *J. Control. Release.* 2015, 200, 138-157.
- 757 11. Copi, S.; Amalraj, A.; Sukumaran, N.P.; Haponiuk, J.T.; Thomas, S. Biopolymers and their composites for
758 drug delivery: a brief overview. *Macromol. Symp.* 2018, 180, 1800114 (1-14).
- 759 12. Chen, W.; Zhou, S.; Ge, L.; Wu, W.; Jiang, X. Translatable high drug loading drug delivery systems based
760 on biocompatible polymers nanocarriers. *Biomacromolecules.* 2018, 19, 1732-1742.
- 761 13. Nair, P.R. Delivering combination chemotherapies and targeting oncogenic pathways via polymeric drug
762 delivery systems. *Polymers.* 2019, 11, 630 (1-34).
- 763 14. Loyer, P.; Cammas-Marion, S. Natural and synthetic poly(malic acid)-based derivatives: a family of versatile
764 biopolymers for the design of drug nanocarriers. *J Drug Target.* 2014, 22(7), 556-575.
- 765 15. Casajus, H.; Saba, S.; Vlach, M.; Vène, E.; Ribault, C.; Tranchimand, S.; Nugier-Chauvin, C.; Dubreucq, E.;
766 Loyer, P.; Cammas-Marion, S.; Lepareur, N. Cell Uptake and Biocompatibility of Nanoparticles Prepared
767 from Poly(benzyl malate) (Co)polymers Obtained through Chemical and Enzymatic Polymerization in
768 Human HepaRG Cells and Primary Macrophages. *Polymers (Basel).* 2018, 10(11), 1244.
- 769 16. Owens, D.E.; Peppas, N.A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric
770 nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 2006, 307, 93-102.
- 771 17. Tenzer, S.; Docter, D.; Kuharev, J.; Musyanovych, A.; Fetz, V.; Hecht, R.; Schlenk, F.; Fischer, D.; Kiouptsi,
772 K.; Reinhardt, C.; Landfester, K.; Schild, H.; Maskos, M.; Knauer, S.K.; Stauber, R.H. Rapid formation of
773 plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. *Nat. NanoTechnol.* 2013, 8, 772-781.
- 774 18. Harris, J.M.; Chess, R.B. Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nat. Rev.* 2003, 2, 214-221.
- 775 19. Veronese, F.M. Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions. *Biomaterials* 2001, 22,
776 405-417.
- 777 20. Kolate, A.; Baradia, D.; Patil, S.; Vhora, I.; Kore, G.; Misra, A. PEG - A versatile conjugating ligand for drugs
778 and drug delivery systems. *J. Control. Release.* 2014, 192, 67-81.
- 779 21. Liu, S.; Jiang, S. Chemical conjugation of zwitterionic polymers protects immunogenic enzyme and
780 preserves bioactivity without polymer-specific antibody response. *Nano Today.* 2016, 11, 285-291.
- 781 22. Armstrong, J.K.; Hempel, G.; Koling, S.; Chan, L.S.; Fisher, T.; Meiselman, H.J.; Garratty, G. Antibody
782 against poly(ethylene glycol) adversely affects PEG-asparaginase therapy in acute lymphoblastic leukemia
783 patients. *Cancer*, 2007, 110, 103-111.
- 784 23. Dams, E.T.; Laverman, P.; Oyen, W.J.; Storm, G.; Scherphof, G.L.; van Der Meer, J.W.; Corstens, F.H.;
785 Boerman, O.C. Accelerated blood clearance and altered biodistribution of repeated injections of sterically
786 stabilized liposomes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2000, 292, 1071-1079.

- 787 24. Kawai, F. Microbial degradation of polyethers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002, *58*, 30-38.
- 788 25. Huh, M.S.; Lee, E.J.; Koo, H.; Yhee, J.Y.; Oh, K.S.; Son, S.; Lee, S.; Kim, S.H.; Kwon, I.C.; Kim, K.
- 789 Polysaccharide-Based Nanoparticles for Gene Delivery. *Top. Curr. Chem.* 2017, *375* (2), 1-19.
- 790 26. Cammas, S.; Béar, M.M.; Harada, A.; Guérin, Ph., Kataoka, K. New macromolecular micelles based on
- 791 degradable amphiphilic block copolymers. *Macromol. Chem. Phys.* 2000, *201*(3), 355-364.
- 792 27. Martinez Barbosa, M.E.; Cammas, S.; Appel, M.; Ponchel, G. Investigation of the degradation mechanisms
- 793 of poly(malic acid) esters in vitro and their related cytotoxicities on J774 macrophages. *Biomacromolecules.*
- 794 2004, *5*, 137-143.
- 795 28. Barouti, G.; Khalil, A.; Orione, C.; Jarnouen, K.; Cammas-Marion, S.; Loyer, P.; Guillaume S.M.
- 796 Poly(trimethylene carbonate)/poly(malic acid) amphiphilic diblock copolymers as original biocompatible
- 797 nanoparticles." *Chem. A Europ. J.*, 2016, *22*, 2819-2830.
- 798 29. Zia, K.M.; Noreen, A.; Zuber, M.; Tabasum, S.; Mujahid, M. Recent Developments and Future Prospects on
- 799 Bio-Based Polyesters Derived from Renewable Resources: A Review. *Int. J. Biol. Macromol.* 2016, *82*, 1028-
- 800 1040.
- 801 30. Ikada, Y.; Tsuji, H. Biodegradable Polyesters for Medical and Ecological Applications. *Macromol. Rapid*
- 802 *Commun.* 2000, *21*, 117-132.
- 803 31. Highly, N.C.P.; Films, R.P. Preparation and characterization of acetylated Nanocrystalline cellulose-
- 804 reinforced polylactide highly regular porous films. 2018, *13* (4), 8432-8443.
- 805 32. Manitchotpitit, P.; Skory, C.D.; Peterson, S.W.; Price, N.P.J.; Vermillion, K.E.; Leathers, T.D. Poly(β -L-malic
- 806 acid) production by diverse phylogenetic clades of *Aureobasidium Pullulans*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*
- 807 2012, *39*, 125-132.
- 808 33. Hall Jr, H.K.; Scheneider, A.K. Polymerization of cyclic esters, urethans, ureas and imides. *J. Am. Chem. Soc.*
- 809 1958, *80*, 6409-6412.
- 810 34. Khalil, A.; Cammas-Marion, S.; Coulembier, O. Organocatalysis applied to the ring-opening
- 811 polymerization of β -lactones: a brief overview. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* 2019, *57*, 657-672.
- 812 35. Barbaud, C.; Guerrouache, M.; Guérin, Ph. Synthesis of novel α,α',β -trisubstituted β -lactones. *Tetrahedron*
- 813 *Lett.* 2002, *43*, 9513-9515.
- 814 36. Barbaud, C.; Faÿ, F.; Abdillah, F.; Randriamahefa, S.; Guérin, P. Synthesis of new homopolyester and
- 815 copolyesters by anionic ring-opening polymerization of α,α',β -trisubstituted β -lactones. *Macromol. Chem.*
- 816 *Phys.* 2004, *205* (2), 199-207.
- 817 37. Ouhib, F.; Randriamahefa, S.; Guérin, P.; Barbaud, C. Synthesis of new statistical and block co-polyesters
- 818 by ROP of α,α,β -trisubstituted β -lactones and their characterizations. *Des. Monomers Polym.* 2005, *8* (1), 25-
- 819 35.
- 820 38. Schott, M. A.; Domurado, M.; Leclercq, L.; Barbaud, C.; Domurado, D. Solubilization of water-insoluble
- 821 drugs due to random amphiphilic and degradable poly(dimethylmalic acid) derivatives. *Biomacromolecules*
- 822 2013, *14* (6), 1936-1944.
- 823 39. Belibel, R.; Barbaud, C. Synthesis and characterizations of hemiditactic homopolymers derived of poly(3-
- 824 allyl-3-methylmalic acid): an example of a new class of polymer's ditacticity. *J. Polym. Sci. Part A Polym.*
- 825 *Chem.* 2017, *55* (14), 2408-2418.
- 826 40. Belibel, R.; Barbaud, C. Synthesis of new optically active α,α',β -trisubstituted- β -lactones as monomers for
- 827 stereoregular biopolyesters. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, 2015, *53* (22), 2586-2597.
- 828 41. Tetraethylammonium. Available on line: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB08837> (access on 2 November
- 829 2018).
- 830 42. Gripon, P.; Rumin, S.; Urban, S.; Le Seyec, J.; Glaise, D.; Cannie, I.; Guyomard, C.; Lucas, J.; Trepo, C.;
- 831 Guguen-Guillouzo, C. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.*
- 832 *S. A.* 2002, *99*, 15655-15660.
- 833 43. Cerec, V.; Glaise, D.; Garnier, D.; Morosan, S.; Turlin, B.; Drenou, B.; Gripon, P.; Kremsdorf, D.; Guguen-
- 834 Guillouzo, C.; Corlu, A. Transdifferentiation of hepatocyte-like cells from the human hepatoma HepaRG
- 835 cell line through bipotent progenitor. *Hepatology* 2007, *45*, 957-967.
- 836 44. Corlu, A.; Loyer, P. Culture Conditions Promoting Hepatocyte Proliferation and Cell Cycle
- 837 Synchronization. *Methods Mol. Biol.* 2015, 1250, 27-51.
- 838 45. Coulembier, O.; Degée, Ph.; Cammas-Marion, S.; Guérin, Ph.; Dubois, Ph. New amphiphilic poly[(R,S)- β -
- 839 malic acid-*b*- ϵ -caprolactone] diblock copolymers by combining anionic and coordination-insertion ring-
- 840 opening polymerization. *Macromolecules.* 2002, *35*, 9896-9903.

- 841 46. Zhang, L.; Nederberg, F.; Messman, J.M.; Pratt, R.C.; Hedrick, J.L.; Wade, C.G. Organocatalytic
842 stereoselective ring-opening polymerization of lactide with dimeric phosphazene bases. *J. Am. Chem. Soc.*
843 2007, *129*, 12610-12611.
- 844 47. Zhang, L.; Nederberg, F.; Pratt, R.C.; Waymouth, R.M.; Hedrick, J.L.; Wade, C.G. Phosphazene bases: a
845 new category of organocatalysts for the living ring-opening polymerization of cyclic esters. *Macromolecules.*
846 2007, *40*, 4154-4158.
- 847 48. De Winter, J.; Coulembier, O.; Gerbaux, P.; Dubois, Ph. High molecular weight poly(α,α',β -trisubstituted
848 β -lactones) as generated by metal-free phosphazene catalysts. *Macromolecules.* 2010, *43*, 10291-10296.
- 849 49. Yang, H.; Xu, J.; Pispas, S.; Zhang, G. Hybrid copolymerization of ϵ -caprolactone and methyl methacrylate.
850 *Macromolecules.* 2012, *45*, 3312-3317.
- 851 50. Kawalec, M.; Coulembier, O.; Gerbaux, P.; Sobata, M.; De Winter, J.; Dubois, Ph.; Kowalczyk, M.; Kurcok,
852 P. Trace do matter – Purity of 4-methyl-2-oxetanone and its effect on anionic ring-opening polymerization
853 as evidence by phosphazene superbase catalysis. *Reac. Funct. Polym.* 2012, *72*, 509-520.
- 854 51. Xu, J.; Yang, H.; Zhang, G. Synthesis of poly(ϵ -caprolactone-co-methacrylic acid) copolymer via
855 phosphazene-catalyzed hybrid copolymerization. *Macromol. Chem. Phys.* 2013, *214*, 378-385.
- 856 52. Giammona, G.; Craparo, E.F. Biomedical applications of polylactide (PLA) and its copolymers. *Molecules.*
857 2018, *23*, 6-8.
- 858 53. Vène, E.; Barouti, G.; Jarnouen, K.; Gicquel, T.; Rauch, C.; Ribault, C.; Guillaume, S.M.; Cammas-Marion,
859 S.; Loyer P. Opsonisation of nanoparticles prepared from poly(β -hydroxybutyrate) and poly(trimethylene
860 carbonate)-*b*-poly(malic acid) amphiphilic diblock copolymers: Impact on the in vitro cell uptake by
861 primary human macrophages and HepaRG hepatoma cells. *Int. J. Pharm.* 2016, *513*, 38-452.
- 862 54. Barouti, G.; Jarnouen, K.; Cammas-Marion, S.; Loyer, P.; Guillaume, S.M. Polyhydroxyalkanoate-based
863 amphiphilic diblock copolymers as original biocompatible nanovectors. *Polym. Chem.*, 2015, *6*, 5414-5429.
- 864 55. Caron, A.; Braud, C.; Bunel, C.; Vert, M. Blocky structure of copolymers obtained by Pd/C catalyzed
865 hydrogenolysis of benzyl protecting groups as shown by sequence-selective hydrolytic degradation in
866 poly(β -malic acid) derivatives. *Polymer.* 1990, *31*, 1797-1802.
- 867 56. Kataoka, K.; Kwon, G.S.; Yokoyama, M.; Okano, T.; Sakurai, Y. Block copolymer micelles as vehicles for
868 drug delivery. *J Control Release* 1993, *24*, 119-132.
- 869 57. Thioune, O.; Fessi, H.; Devissaguet, J.P.; Puisieux, F. Preparation of pseudolatex by nanoprecipitation:
870 influence of the solvent nature on intrinsic viscosity and interaction constant. *Int. J. Pharm.* 1997, *146*, 233-
871 238.
- 872 58. Martínez Rivas, C.J.; Tarhini, M.; Badri, W.; Miladi, K.; Greige-Gerges, H.; Nazari, Q.A.; Galindo Rodríguez,
873 S.A.; Román, R.Á.; Fessi, H.; Elaissari, A. Nanoprecipitation process: from encapsulation to drug delivery.
874 *Int. J. Pharm.* 2017, *532*, 66-81.
- 875 59. Msolli, I.; Belibel, R.; Chauvet, F.; Maaroufi, M.R.; Barbaud, C. Synthesis of nanoparticles based on
876 PDMLLA derivative copolymers and study of warfarin encapsulation and controlled release. *RCS Adv.*
877 2017, *7*, 6704-6711.
- 878 60. Bhattacharjee, S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *J. Control. Release* 2016, *235*,
879 337-351.
- 880 61. Limayem Blouza, I.; Charcosset, C.; Sfar, S.; Fessi, H. Preparation and characterization of spirinolactone-
881 loaded nanocapsules for paediatric use. *Int. J. Pharm.* 2006, *325*, 124-131.
- 882 62. Aninat, C.; Piton, A.; Glaise, D.; Le Charpentier, T.; Langouet, S.; Morel, F.; Guguen-Guillouzo, C.;
883 Guillouzo, A. Expression of cytochrome P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human
884 hepatoma HepaRG cells. *Drug Metab. Dispos.* 2006, *34*, 75-83.
- 885 63. Quesnot, N.; Bucher, S.; Gade, C.; Vlach, M.; Vène, E.; Valenca, S.; Gicquel, T.; Holst, H.; Robin, M.A.; Loyer,
886 P. Production of chlorzoxazone glucuronides via cytochrome P4502E1 dependent and independent
887 pathways in human hepatocytes. *Arch. Tox.* 2018, *92*, 3077-3091.
- 888 64. Vlach, M.; Quesnot, N.; Dubois-Pot-Schneider, H.; Ribault, C.; Verres, Y.; Petitjean, K.; Rauch, C.; Morel, F.;
889 Robin, M.A.; Corlu, A.; Loyer, P. Cytochrome P450 1A1/2, 2B6 and 3A4 HepaRG Cell-Based Biosensors to
890 Monitor Hepatocyte Differentiation, Drug Metabolism and Toxicity. *Sensors (Basel).* 2019, *19*, 2245.
- 891 65. Huang, Z.H.; Laurent, V.; Chetouani, G.; Ljubimova, J.Y.; Holler, E.; Benvegna, T.; Loyer, P.; Cammas-
892 Marion, S. New functional degradable and bio-compatible nanoparticles based on poly(malic acid)
893 derivatives for site-specific anti-cancer drug delivery. *Int. J. Pharm.* 2012, *423*, 84-92.

- 894 66. Fröhlich, E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *Int J*
895 *Nanomedicine* 2012, 7, 5577–5591.
896



© 2020 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

897

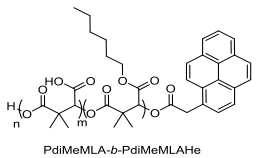
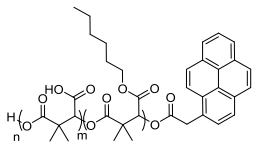
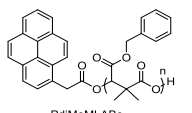
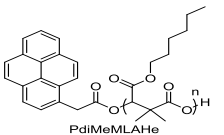
3.3.3 Discussion

Nous avons synthétisé deux homopolymères hydrophobes (le PdiMeMLA_{Be30} et le PdiMeMLAHe₃₀) ainsi que deux copolymères à blocs amphiphiles blocs (le PdiMeMLA_{27-b-PdiMeMLAHe50}, et le PdiMeMLA_{54-b-PdiMeMLAHe29}), et préparé les NPs correspondantes par la technique de nanoprécipitation

Le but de ce travail était d'évaluer la toxicité et la captation de cette nouvelle série de NPs par des cellules HepaRG progénitrices et différenciées.

Afin de faciliter la citation des NPs, nous avons attribué un code à chaque NPs (Tableau 1).

Tableau 1 : Caractéristiques et codes des polymères et NPs étudiés.

(Co)polymer	Chemical structure	Molar mass (g/mol)	Concentration (mg/ml)	Dh (nm)	PDI
PdiMeMLA_{54-b-PdiMeMLAHe29}	 PdiMeMLA-b-PdiMeMLAHe	14 600	5	50	0,08
PdiMeMLA_{27-b-PdiMeMLAHe50}	 PdiMeMLA-b-PdiMeMLAHe	15 500	2,5	150	0,17
PdiMeMLA_{Be30}	 PdiMeMLA _{Be}	7 000	0,714	110	0,15
PdiMeMLA_{He30}	 PdiMeMLA _{He}	6 800	0,714	140	0,07

L'évaluation de la toxicité des NPs sur les cellules HepaRG par le test de viabilité cellulaire montre que toutes les NPs testées présentent une certaine toxicité, en particulier sur les cellules HepaRG progénitrices. Cette toxicité varie largement d'une nanoparticule et une autre (Tableau. 2). Le calcul des valeurs de la concentration inhibitrice 50 (IC₅₀) montre que les NPs à base du copolymère à bloc amphiphile PdiMeMLA_{54-b-PdiMeMLAHe29} et celles à base de

l'homopolymère PdiMeMLABe₃₀ sont les plus toxiques avec des IC₅₀ de l'ordre de 4,6 et 7 µg/mL.

Nous avons tenté d'établir une corrélation entre leurs caractéristiques physicochimiques, leur niveau de captation par les cellules, le pourcentage de P_{4-t}-Bu (%mol) présent dans les formulations et leur toxicité. Dans le but de déterminer l'origine de la toxicité observée, nous avons d'abord évalué la relation possible entre l'IC₅₀ et la quantité résiduelle de P_{4-t}-Bu dans chaque lot de NPs. Nos résultats montrent que la toxicité n'est pas liée directement à la quantité de base P_{4-t}-Bu des lots de NPs. Par exemple, pour des quantités quasi-égales de P_{4-t}-Bu dans les co-polymères à bloc, nous trouvons des niveaux de toxicité très différents (Tableau 2). De plus, les NPs de PdiMeMLAHe₃₀ contiennent le plus fort taux de catalyseur mais présente la plus faible cytotoxicité.

Tableau 2 : Les différentes valeurs d'IC₅₀, pourcentages molaires de P_{4-t}-Bu et le pourcentage de cellules ayant internalisées des NPs, obtenues suite à l'incubation des cellules HeparG progénitrices avec les différentes NPs pour 48h.

Polymers		PdiMeMLA ₅₄ -b-PdiMeMLAHe ₂₉	PdiMeMLA ₂₇ -b-PdiMeMLAHe ₅₀	PdiMeMLABe ₃₀	PdiMeMLAHe ₃₀
IC 50 (µg/ml)		4,65	22,11	6,95	23,5
Molar percentage of P _{4-t} -Bu (%mol)		1,3	0,94	2,94	2,87
Percentage of positive cells	At 6 µg/mL	66.6	96.9	18.75	11.75
	At 25 µg/mL	24.8	99.5	78.37	97.27

Cette toxicité semble être également indépendante du fait que la nanoparticule soit préparée à partir d'homopolymère ou de copolymère à bloc amphiphile. Cette toxicité n'est pas non plus liée au niveau de captation des NPs, où nous trouvons que pour des niveaux de toxicité similaire (PdiMeMLA₂₇-b-PdiMeMLAHe₅₀ et PdiMeMLAHe₃₀), les niveaux de captation sont différents. A ce stade de l'étude, nous ne pouvons donc pas conclure sur un paramètre principal qui déclenche la cytotoxicité des NPs.

Cette toxicité pourrait alors être en lien avec les propriétés physicochimiques des NPs telles que la taille, la charge de surface ou la forme. A titre d'exemple, la NP la plus toxique PdiMeMLA₅₄-b-PdiMeMLAHe₂₉ possède une taille largement inférieure aux autres NPs (50 nm). Concernant la toxicité liée à la charge de surface, il a été découvert que les NPs cationiques provoquent une perturbation plus prononcée de l'intégrité de la membrane plasmique, des lésions mitochondriales et lysosomiales plus fortes et induire la production d'un nombre plus élevé d'autophagosomes que les NPs anioniques ³²¹. Des études complémentaires seront nécessaires pour caractériser plus finement les paramètres physicochimiques de nos NPs.

De plus, la toxicité de ces NPs a été évaluée sur les cellules HepaRG différenciées. Nos résultats montrent l'absence de toxicité des NPs à base de poly(acide diméthylmalique) sur ces cellules. Cette biocompatibilité pourrait être expliquée par le fait que les cellules HepaRG différenciées expriment un bagage enzymatique permettant un métabolisme de ces NPs et des contaminants organiques limitant ainsi leurs toxicités ³²².

Nous avons également comparé la captation des NPs par les cellules HepaRG progénitrices et différenciées. Nos résultats mettent en évidence que les NPs sont beaucoup mieux captées par les cellules progénitrices que les cellules différenciées, ce qui pourrait être en lien avec l'activité de prolifération des cellules progénitrices et leur grande plasticité. De plus, nos résultats montrent que les NPs PdiMeMLAHe₃₀ sont les mieux captées dans les 2 modèles cellulaires alors que les NPs PdiMeMLA₂₇-b-PdiMeMLAHe₅₀ issues de copolymères à bloc amphiphile sont les plus captées par les cellules progénitrices et les moins bien captées par les cellules différenciées. Ce qui montre que le degré de captation est également dicté par le statut de prolifération et de différenciation des cellules et pas seulement par les caractéristiques structurales et physicochimiques des NPs.

Pour conclure, nous avons produit un ensemble de 4 lots de NPs dont certaines présentent des niveaux de cytotoxicités et de captation objectivement variables en fonction des cellules mais qui sont, pour certaines, bien tolérées et relativement bien captées par les cellules hépatiques HepaRG. Une étude étendue à d'autres modèles cellulaires et des cellules primaires sera nécessaire pour évaluer plus en détail la pertinence de ces NPs pour des études de ciblage des cellules hépatiques normales et cancéreuses *in vivo*.

4 Discussion générale et perspectives

Le domaine de la nanomédecine est un domaine interdisciplinaire qui pourrait conduire à l'amélioration de dispositifs médicaux et d'administration de médicaments ainsi qu'au développement d'applications pour les diagnostics précoces ou traitements d'une large gamme de pathologies avec une grande spécificité, efficacité et une personnalisation dans l'objectif d'améliorer la prise en charge du patient ³⁶.

Le développement de la nanomédecine en thérapie anticancéreuse est une des plus importantes applications des nanoparticules (NPs). Cette application se conçoit aujourd'hui principalement par la vectorisation des principes actifs via des NPs souvent renommées nanovecteurs dans ce contexte ⁹⁰. La vectorisation de principes actifs par des nanovecteurs vise à cibler spécifiquement les cellules tumorales sans toucher aux cellules saines du corps. Trois formes de ciblage thérapeutiques existent : le ciblage passif, le ciblage actif et le ciblage via un stimulus extérieur. Ces types sont déterminés par la nature de la nanoparticule conçue. Toutefois quel que soit le type adopté, le ciblage thérapeutique par des NPs apporterait un ensemble d'avantages par rapport à la chimiothérapie classique, dans le but de limiter les effets secondaires et d'améliorer l'efficacité du traitement et les conditions de vie du patient ⁸.

Cependant, l'emploi de la vectorisation des principes actifs en thérapie anticancéreuse s'associe à plusieurs défis qui, à ce jour, restreignent l'efficacité des formulations nanomédicales dont nous disposons. Trois "challenges" essentiels existent dans le domaine de la nanomédecine thérapeutique anticancéreuse : les challenges liés au système immunitaire, à la nano-toxicité et au microenvironnement tumoral. L'interaction entre les NPs et le système immunitaire est liée directement au mode d'administration des formulations nanomédicales qui se fait principalement par voie intraveineuse. L'entrée des NPs dans le sang est immédiatement suivie d'une opsonisation des NPs par les protéines sanguines tel que les immunoglobulines et les protéines du complément. Ce mécanisme facilite la reconnaissance des NPs par les cellules phagocytaires du système RES puis leur phagocytose, limitant ainsi la distribution vers les organes cibles et leur efficacité thérapeutique ¹⁵⁰. De plus, le manque de biocompatibilité de certaines NPs pourrait conduire à des effets néfastes chez les patients, en contradiction avec le concept de la nanomédecine ayant pour but la réduction des effets secondaires causés par la diffusion sur l'ensemble de l'organisme des chimiothérapies administrées de façon classique par voie systémique ¹⁵⁹. Finalement, il est important de noter que la nature de la pathologie traitée impose ses propres challenges. A titre d'exemple, les cancers solides sont définis par le développement d'une masse plus ou moins volumineuse de cellules tumorales dans un

microenvironnement spécifique. Ce microenvironnement tumoral se caractérise par la présence d'un ensemble de cellules non tumorales (comme les macrophages associés à la tumeur et les fibroblastes associés à la tumeur) et souvent d'une abondante matrice extracellulaire qui peut être spécifique de la tumeur ¹²⁵. Ces deux éléments constituent des barrières cellulaires et moléculaires qui limitent la faculté des NPs à atteindre les cellules tumorales. La conséquence en est une diminution de la biodisponibilité du principe actif encapsulé et par suite une diminution de l'efficacité thérapeutique de la nanoformulation médicale ¹²⁵.

De nombreux travaux ont été réalisés afin de synthétiser des macromolécules pour produire de nouvelles formulations et pour définir des caractéristiques physicochimiques des NPs permettant de surmonter les différentes barrières limitant le ciblage tumoral. Il est essentiel de formuler les NPs à partir de matière(s) biodégradable(s). Différentes NPs polymères constituent des formulations qui peuvent être utilisées dans le domaine de la thérapie anti-cancéreuse avec de nombreux essais cliniques et précliniques ²¹⁹. Le poly(acide malique) et ses dérivés sont des polymères caractérisés par leur caractère biocompatible et biodégradable, ce qui les rend des candidats excellents pour l'élaboration de systèmes de vectorisation de principes actifs.

Le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement du carcinome hépatocellulaire constitue un des thèmes de recherche de l'institut NuMeCan. Ce thème de recherche comporte à la fois un volet clinique et une recherche préclinique. Dans le contexte des études précliniques, nous avons décidé de concevoir des nanovecteurs à base de polymère dans une stratégie de vectorisation de chimiothérapie anticancéreuse et possiblement de vectorisation de radioéléments. Dans cet objectif, nous avons développé de nouveaux copolymères à base de polyesters biocompatibles et biodégradables dérivés du poly(acide malique) (PMLA) pour formuler des nanoparticules (NPs) qui pourront être évaluées en tant que systèmes d'administration de médicaments pour cibler le CHC. Ce travail avait pour but d'étudier de nouveaux nanovecteurs et de caractériser leur toxicité et leur captation par des cellules en culture, donc leur aptitude à franchir et surmonter les barrières biologiques et biochimiques déjà décrites. Le choix des modèles cellulaires était relatif au type de la pathologie évaluée. Nous avons choisi les cellules HepaRG en tant qu'un modèle cellulaire représentatif des cellules d'hépatome humain. Les macrophages humains qui phagocytent les NPs dans le sang et réduisent leurs efficacités thérapeutiques ont été également choisi dans ce projet de thèse.

Le caractère biocompatible des polyesters aliphatiques était primordial dans le choix que nous avons fait pour préparer les NPs polymères. Ce choix est très important dans le cas de

l'application thérapeutique anticancéreuse de NPs, au regard de la toxicité associée à certaines NPs utilisées en nanomédecine ¹⁵⁹. La synthèse des polyesters aliphatique se faisant généralement par des réactions aROP catalysées par des amorceurs organométalliques, les quantités résiduelles d'amorceurs dans les lots de NPs pourraient entraîner des toxicités prononcées. Dans le chapitre 1 et dans le but d'éviter cette toxicité, nous avons synthétisé des polymères à base de dérivés du PMLABe par une voie enzymatique, en partant de monomères racémiques et optiquement actifs. La voie chimique de synthèse a été également utilisée pour pouvoir comparer les NPs à base de polymères issus des deux méthodes. L'absence de toxicité à moyen et court terme pour cette série de NPs était un résultat notable de ce travail. Ce résultat confirme la biocompatibilité des NPs préparées et par suite leur capacité à surmonter le critère de toxicité. Parmi les NPs élaborées, plusieurs ont montré des niveaux de captation remarquables, notamment les NPs non PEGylées issues de polymères préparés par la voie enzymatique de synthèse. Notons que l'accumulation des NPs reflète largement l'efficacité du système de vectorisation conçue. En conclusion, ce travail a abouti à l'élaboration de systèmes de vectorisation efficaces en termes de biocompatibilité et de captation par les cellules hépatiques *in vitro*. La poursuite de cette étude est engagée dans l'équipe avec différentes perspectives. Nous prévoyons des expériences de caractérisations de la structure des NPs par la technique de MET, pour pouvoir établir un lien entre la forme (aplatit, sphérique, rectangulaire...) de ces NPs et l'efficacité de la captation cellulaire. Nous souhaitons également évaluer les NPs les plus efficaces en termes de captation pour évaluer leur biodistribution chez la souris saine et, à moyen terme, de tester le ciblage de tumeurs hépatiques toujours chez la souris.

Dans la continuité de ce projet de thèse, nous avons choisi les NPs PMLABe et PEG-*b*-PMLABe (équivalentes aux NPs 1 et NPs 3 dans le chapitre 1) pour poursuivre l'évaluation de l'efficacité de ces NPs en tant que système de vectorisation de principe actif. Cette évaluation a été réalisée dans le chapitre 2, sous la forme d'un travail original qui avait le but d'évaluer outre que la biocompatibilité des NPs PMLABe, l'impact des barrières biologiques liées à la captation des NPs PMLABe dans le cas du CHC. Le choix des deux NPs avait le but de tester l'effet du PEG qui est largement utilisé en nanomédecine, sur la captation des NPs PMLABe. L'évaluation de la captation de NPs PEGylées a été faite dans le but de savoir si l'ajout de PEG apporte des avantages en termes de captation pour ce système de vectorisation. Cette étude a conclu que la captation des deux NPs augmente en fonction de temps. Cette augmentation reflète la stabilité de ces NPs pendant au moins 120h dans le milieu de culture, ce qui a été

récemment confirmé par des études de DLS au sein de notre équipe (données non montrées dans ce manuscrit). La stabilité des NPs est un facteur très important dans l'application thérapeutique, ce facteur affecte le comportement et la fonction des NPs ce qui résulte d'un effet sur l'efficacité de ces systèmes de vectorisation ³²³.

Nous avons essayé de caractériser l'accumulation intracellulaire des NPs PMLABe dans les deux modèles cellulaires et d'évaluer la possible existence d'un phénomène de saturation des cellules après plusieurs expositions aux NPs. Ce phénomène est clairement observé chez les cellules HepaRG, par contre la grande variabilité entre les donneurs a limité l'évaluation d'un tel phénomène chez les macrophages humains. Des études supplémentaires sont requises pour les macrophages pour mieux caractériser ce phénomène.

La présence de PEG réduit la captation des NPs PMLABe d'une façon dose dépendante par les cellules HepaRG et dose-indépendante par les macrophages humains (inhibition forte observée à un pourcentage de 100% uniquement), cette notion peut fournir une solution thérapeutique au problème de la déviation des NPs vers les organes du système RES, dans le cas où un phénomène de saturation des macrophages par les NPs 50% PEG serait confirmé. Dans cette situation, les macrophages pourraient être saturés par des NPs 50% (dont la captation est plus faible par les cellules HepaRG), puis poursuivre le traitement par l'administration d'une dose « secondaire » de NPs PMLABe non PEGylées pour mieux cibler les cellules d'hépatomes. Cette expérience peut être réalisée *in vitro* en utilisant un modèle de culture HepaRG-macrophages. Au sein de l'équipe TGTC nous avons anticipé ce travail en optimisant ce système de co-culture HepaRG-macrophages. Ce même modèle peut servir pour une évaluation plus profonde de l'effet du microenvironnement tumoral, qui peut être crée par l'interaction entre les deux types cellulaire *in vitro*. Nous envisageons également évaluer le phénomène de saturation cellulaire au travers d'une expérience qui consiste tout d'abord à incuber les cellules avec des NPs PMLABe dans une expérience d'exposition multiples aux NPs, avant de réaliser une dernière incubation de ces cellules avec d'autres édifices macromoléculaires comme des microsphères de polystyrène ou des bactéries. Enfin, nous évaluerons les effets d'expositions multiples des cellules HepaRG et macrophages aux NPs PMLABe sur l'expression de gènes spécifiques de ces cellules en relation avec les métabolismes hépatiques et la production de cytokines des macrophages.

Dans ce même chapitre, nous avons pu conclure que l'opsonisation des NPs PMLABe par les protéines sanguines réduit leur captation par les macrophages humains. Cette caractéristique semble être très spécifique et originale pour les NPs PMLABe, du fait que pour la majorité des

NPs évaluées dans le contexte des applications thérapeutiques, l'opsonisation augmente leur captation par les macrophages humains²⁰³. Cette réduction pourrait limiter l'accumulation des NPs PMLABe dans les organes du système RES et augmenter par conséquent la biodisponibilité des NPs PMLABe par rapport à la majorité des NPs utilisées dans des applications thérapeutiques. Cependant des études *in vivo* sont requises pour confirmer et valider les résultats obtenus *in vitro*.

Enfin, et dans le but de surmonter le problème de toxicité déjà décrit, nous avons développé dans un troisième projet qui visait à élaborer des systèmes de vectorisation biocompatibles. Dans cet objectif, les amorceurs organométalliques ont été remplacés cette fois par des amorceurs organiques « non toxiques » pour synthétiser des polymères à bases de dérivés du poly(acide diméthylmalique). La toxicité et la captation des NPs élaborées ont été évaluées par des cellules HepaRG progénitrices et différenciées. Ces NPs ont cependant montré des niveaux de toxicités relativement élevés, ce qui limitera leur usage pour des applications thérapeutiques *in vivo*. Cependant, un résultat important a été révélé dans cette étude, représenté par le niveau de captation des NPs significativement moins important par les HepaRG différenciées par rapport aux HepaRG progénitrices. Ce résultat semble refléter l'effet du statut de différenciation et prolifération des cellules différenciées mais constitue une observation originale qui va être étudiée plus en détail dans l'équipe afin d'identifier les déterminants « cellulaires » de cette importante différence dans l'internalisation des NPs.

En conclusion, les NPs PMLABe pourraient représenter un exemple très réussi de système de vectorisation efficace pour le ciblage du carcinome hépatocellulaire. Toutefois, la conception de systèmes de vectorisation idéaux pour le traitement du CHC reste un objectif très difficile à atteindre, d'où la nécessité de poursuivre la recherche dans ce domaine, notamment en développant des modèles *in vivo* chez l'animal qui doivent prendre en considération les différents défis imposés par ce genre d'applications biomédicales.

5 Références bibliographiques

1. Médecine dans l'Égypte antique. *Wikipédia* (2019).
2. Sui, J. *et al.* Long Non-Coding RNA Linc-USP16 Functions As a Tumour Suppressor in Hepatocellular Carcinoma by Regulating PTEN Expression. *Cell. Physiol. Biochem.* **44**, 1188–1198 (2017).
3. Colagrande, S. *et al.* Challenges of advanced hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* **22**, 7645–7659 (2016).
4. Raza, A. & Sood, G. K. Hepatocellular carcinoma review: current treatment, and evidence-based medicine. *World J. Gastroenterol.* **20**, 4115–4127 (2014).
5. Blanco, E., Shen, H. & Ferrari, M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nat. Biotechnol.* **33**, 941–951 (2015).
6. Fang, J., Nakamura, H. & Maeda, H. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **63**, 136–151 (2011).
7. Shi, J., Kantoff, P. W., Wooster, R. & Farokhzad, O. C. Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. *Nat. Rev. Cancer* **17**, 20–37 (2017).
8. Wicki, A., Witzigmann, D., Balasubramanian, V. & Huwyler, J. Nanomedicine in cancer therapy: challenges, opportunities, and clinical applications. *J Control Release* **200**, 138–157 (2015).
9. Cedervall, T. *et al.* Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 2050–2055 (2007).
10. Moghimi, S. M., Hunter, A. C. & Andresen, T. L. Factors controlling nanoparticle pharmacokinetics: an integrated analysis and perspective. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **52**, 481–503 (2012).

11. Mortimer, G. M. *et al.* Cryptic Epitopes of Albumin Determine Mononuclear Phagocyte System Clearance of Nanomaterials. *ACS Nano* **8**, 3357–3366 (2014).
12. Ren, J. *et al.* Precision Nanomedicine Development Based on Specific Opsonization of Human Cancer Patient-Personalized Protein Coronas. *Nano Lett.* **19**, 4692–4701 (2019).
13. Jones, S. W. *et al.* Nanoparticle clearance is governed by Th1/Th2 immunity and strain background. *J. Clin. Invest.* **123**, 3061–3073 (2013).
14. Tiwari, J. N., Tiwari, R. N. & Kim, K. S. Zero-dimensional, one-dimensional, two-dimensional and three-dimensional nanostructured materials for advanced electrochemical energy devices. *Progress in Materials Science* **57**, 724–803 (2012).
15. Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y. S., Dufresne, A. & Danquah, M. K. Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. *Beilstein J. Nanotechnol.* **9**, 1050–1074 (2018).
16. Boisseau, P. & Loubaton, B. Nanomedicine, Nanotechnology in medicine. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences* (2011).
17. Heiligtag, F. J. & Niederberger, M. The fascinating world of nanoparticle research. *Materials Today* **16**, 262–271 (2013).
18. Walter, P. *et al.* Early Use of PbS Nanotechnology for an Ancient Hair Dyeing Formula. *Nano Lett.* **6**, 2215–2219 (2006).
19. Johnson-McDaniel, D., Barrett, C. A., Sharafi, A. & Salguero, T. T. Nanoscience of an Ancient Pigment. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 1677–1679 (2013).
20. Boverhof, D. R. *et al.* Comparative assessment of nanomaterial definitions and safety evaluation considerations. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **73**, 137–150 (2015).
21. 14:00-17:00. ISO/TS 80004-1:2010. ISO
<http://www.iso.org/cms/render/live/en/sites/isoorg/contents/data/standard/05/12/51240.html>.

22. EUR-Lex - 32011R1043 - EN - EUR-Lex. <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2011/1043/oj>.
23. Carbon-Based Nanomaterials. in *Essentials in Nanoscience and Nanotechnology* 189–236 (John Wiley & Sons, Ltd, 2016). doi:10.1002/9781119096122.ch5.
24. Zhang, L., Wang, L., Jiang, Z. & Xie, Z. Synthesis of size-controlled monodisperse Pd nanoparticles via a non-aqueous seed-mediated growth. *Nanoscale Research Letters* **7**, 312 (2012).
25. Pan, D., Wang, Q. & An, L. Controlled synthesis of monodisperse nanocrystals by a two-phase approach without the separation of nucleation and growth processes. *J. Mater. Chem.* **19**, 1063–1073 (2009).
26. Li, C., Adamcik, J. & Mezzenga, R. Biodegradable nanocomposites of amyloid fibrils and graphene with shape-memory and enzyme-sensing properties. *Nature Nanotech* **7**, 421–427 (2012).
27. Zhang, J., Langille, M. R. & Mirkin, C. A. Synthesis of Silver Nanorods by Low Energy Excitation of Spherical Plasmonic Seeds. *Nano Lett.* **11**, 2495–2498 (2011).
28. Gokarna, A. *et al.* Highly crystalline urchin-like structures made of ultra-thin zinc oxide nanowires. *RSC Adv.* **4**, 47234–47239 (2014).
29. Zhou, J. *et al.* Three-Dimensional Tungsten Oxide Nanowire Networks. *Advanced Materials* **17**, 2107–2110 (2005).
30. Hey, A. *Feynman And Computation*. (CRC Press, 2018).
31. Lee, J. E., Lee, N., Kim, T., Kim, J. & Hyeon, T. Multifunctional Mesoporous Silica Nanocomposite Nanoparticles for Theranostic Applications. *Acc. Chem. Res.* **44**, 893–902 (2011).
32. Barrak, H. *et al.* Synthesis, characterization, and functionalization of ZnO nanoparticles by N-(trimethoxysilylpropyl) ethylenediamine triacetic acid (TMSEDTA): Investigation

- of the interactions between Phloroglucinol and ZnO@TMS EDTA. *Arabian Journal of Chemistry* (2016) doi:10.1016/j.arabjc.2016.04.019.
33. Mansha, M. *et al.* Synthesis of In₂O₃/graphene heterostructure and their hydrogen gas sensing properties. *Ceramics International* **42**, 11490–11495 (2016).
 34. Ganesh, M., Hemalatha, P., Peng, M. M. & Jang, H. T. One pot synthesized Li, Zr doped porous silica nanoparticle for low temperature CO₂ adsorption. *Arabian Journal of Chemistry* **10**, S1501–S1505 (2017).
 35. Tinkle, S. *et al.* Nanomedicines: addressing the scientific and regulatory gap. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1313**, 35–56 (2014).
 36. Pelaz, B. *et al.* Diverse Applications of Nanomedicine. *ACS Nano* **11**, 2313–2381 (2017).
 37. Bleeker, E. A. J. *et al.* Considerations on the EU definition of a nanomaterial: Science to support policy making. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **65**, 119–125 (2013).
 38. Sapsford, K. E., Tyner, K. M., Dair, B. J., Deschamps, J. R. & Medintz, I. L. Analyzing nanomaterial bioconjugates: a review of current and emerging purification and characterization techniques. *Anal. Chem.* **83**, 4453–4488 (2011).
 39. Schaak, R. E. & Williams, M. E. Full disclosure: the practical side of nanoscale total synthesis. *ACS Nano* **6**, 8492–8497 (2012).
 40. Kovalenko, M. V. *et al.* Prospects of nanoscience with nanocrystals. *ACS Nano* **9**, 1012–1057 (2015).
 41. Mulvaney, P., Parak, W. J., Caruso, F. & Weiss, P. S. Standardizing Nanomaterials. *ACS Nano* **10**, 9763–9764 (2016).
 42. Paul, W. & Sharma, C. P. 8 - Inorganic nanoparticles for targeted drug delivery. in *Biointegration of Medical Implant Materials* (ed. Sharma, C. P.) 204–235 (Woodhead Publishing, 2010). doi:10.1533/9781845699802.2.204.

43. Li, W. *et al.* AuNPs as an important inorganic nanoparticle applied in drug carrier systems. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* **47**, 4222–4233 (2019).
44. Sperling, R. A., Gil, P. R., Zhang, F., Zanella, M. & Parak, W. J. Biological applications of gold nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* **37**, 1896–1908 (2008).
45. de Mello Donegá, C. Synthesis and properties of colloidal heteronanocrystals. *Chem Soc Rev* **40**, 1512–1546 (2011).
46. Algar, W. R., Susumu, K., Delehanty, J. B. & Medintz, I. L. Semiconductor quantum dots in bioanalysis: crossing the valley of death. *Anal. Chem.* **83**, 8826–8837 (2011).
47. Huang, H.-C., Barua, S., Sharma, G., Dey, S. K. & Rege, K. Inorganic nanoparticles for cancer imaging and therapy. *Journal of Controlled Release* **155**, 344–357 (2011).
48. Hawe, A., Hulse, W. L., Jiskoot, W. & Forbes, R. T. Taylor Dispersion Analysis Compared to Dynamic Light Scattering for the Size Analysis of Therapeutic Peptides and Proteins and Their Aggregates. *Pharm Res* **28**, 2302–2310 (2011).
49. Su, H., Koo, J. M. & Cui, H. One-component nanomedicine. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society* (2015) doi:10.1016/j.jconrel.2015.09.056.
50. Younes, A. *et al.* Brentuximab Vedotin (SGN-35) for Relapsed CD30-Positive Lymphomas. *New England Journal of Medicine* **363**, 1812–1821 (2010).
51. Younes, A. *et al.* Results of a Pivotal Phase II Study of Brentuximab Vedotin for Patients With Relapsed or Refractory Hodgkin’s Lymphoma. *JCO* **30**, 2183–2189 (2012).
52. Papachristos, A., Pippa, N., Demetzos, C. & Sivolapenko, G. B. Antibody-drug conjugates: a mini-review. The synopsis of two approved medicines. *Drug delivery* (2016) doi:10.3109/10717544.2014.998323.
53. Rawat, M., Singh, D., Saraf, S. & Saraf, S. Nanocarriers: Promising Vehicle for Bioactive Drugs. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **29**, 1790–1798 (2006).

54. Pradhan, M., Singh, D. & Singh, M. R. Novel colloidal carriers for psoriasis: Current issues, mechanistic insight and novel delivery approaches. *Journal of Controlled Release* **170**, 380–395 (2013).
55. Liposome. *Wikipedia* (2020).
56. Akbarzadeh, A. *et al.* Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett* **8**, 102 (2013).
57. Sharma, A. & Sharma, U. S. Liposomes in drug delivery: Progress and limitations. *International Journal of Pharmaceutics* **154**, 123–140 (1997).
58. Charrois, G. J. R. & Allen, T. M. Drug release rate influences the pharmacokinetics, biodistribution, therapeutic activity, and toxicity of pegylated liposomal doxorubicin formulations in murine breast cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1663**, 167–177 (2004).
59. Kong, G. *et al.* Efficacy of liposomes and hyperthermia in a human tumor xenograft model: importance of triggered drug release. *Cancer Res.* **60**, 6950–6957 (2000).
60. Li, L. *et al.* Triggered content release from optimized stealth thermosensitive liposomes using mild hyperthermia. *J Control Release* **143**, 274–279 (2010).
61. Lu, X., Wu, D., Li, Z. & Chen, G.-Q. Polymer nanoparticles. *Progress in molecular biology and translational science* (2011) doi:10.1016/B978-0-12-416020-0.00007-3.
62. Svenson, S. & Tomalia, D. A. Dendrimers in biomedical applications—reflections on the field. *Advanced Drug Delivery Reviews* **64**, 102–115 (2012).
63. Micelle. *Wikipedia* (2019).
64. Singh, D. & Singh, M. R. Development of antibiotic and debriding enzyme-loaded PLGA microspheres entrapped in PVA-gelatin hydrogel for complete wound management. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology* **40**, 345–353 (2012).
65. Letchford, K. & Burt, H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and

- polymersomes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **65**, 259–269 (2007).
66. Suffredini, G., East, J. E. & Levy, L. M. New Applications of Nanotechnology for Neuroimaging. *American Journal of Neuroradiology* **35**, 1246–1253 (2014).
67. Loyer, P. & Cammas-Marion, S. Natural and synthetic poly(malic acid)-based derivatives: A family of versatile biopolymers for the design of drug nanocarriers. *Journal of Drug Targeting* **22**, 556 (2014).
68. Steinmetz, N. F. Viral nanoparticles as platforms for next-generation therapeutics and imaging devices. *Nanomedicine* **6**, 634–641 (2010).
69. Nanomedicine : European Science Foundation. <http://archives.esf.org/coordinating-research/forward-looks/biomedical-sciences-med/completed-forward-looks-in-biomedical-sciences/nanomedicine.html>.
70. Reimer, P. & Balzer, T. Ferucarbotran (Resovist): a new clinically approved RES-specific contrast agent for contrast-enhanced MRI of the liver: properties, clinical development, and applications. *Eur Radiol* **13**, 1266–1276 (2003).
71. Wagner, V., Dullaart, A., Bock, A.-K. & Zweck, A. The emerging nanomedicine landscape. *Nat. Biotechnol.* **24**, 1211–1217 (2006).
72. Chiribiri, A. *et al.* Visualization of the cardiac venous system using cardiac magnetic resonance. *Am. J. Cardiol.* **101**, 407–412 (2008).
73. Accomasso, L., Gallina, C., Turinetti, V. & Giachino, C. Stem Cell Tracking with Nanoparticles for Regenerative Medicine Purposes: An Overview. *Stem Cells Int* **2016**, 7920358 (2016).
74. Kee, P. H. & Danila, D. CT imaging of myocardial scar burden with CNA35-conjugated gold nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **14**, 1941–1947 (2018).

75. Kenemans, P., Yedema, C. A., Bon, G. G. & von Mensdorff-Pouilly, S. CA 125 in gynecological pathology--a review. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **49**, 115–124 (1993).
76. Nath, S. & Mukherjee, P. MUC1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression. *Trends Mol Med* **20**, 332–342 (2014).
77. Ge, S. *et al.* A disposable immunosensor device for point-of-care test of tumor marker based on copper-mediated amplification. *Biosens Bioelectron* **43**, 425–431 (2013).
78. Duncan, R. & Gaspar, R. Nanomedicine(s) under the microscope. *Mol. Pharm.* **8**, 2101–2141 (2011).
79. Kafshdooz, T., Kafshdooz, L., Akbarzadeh, A., Hanifehpour, Y. & Joo, S. W. Applications of nanoparticle systems in gene delivery and gene therapy. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* **44**, 581–587 (2016).
80. Chen, J., Guo, Z., Tian, H. & Chen, X. Production and clinical development of nanoparticles for gene delivery. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* **3**, (2016).
81. Park, T. G., Jeong, J. H. & Kim, S. W. Current status of polymeric gene delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* **58**, 467–486 (2006).
82. Liyanage, P. Y. *et al.* Nanoparticle-mediated targeted drug delivery for breast cancer treatment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **1871**, 419–433 (2019).
83. Kaul, G. & Amiji, M. Cellular Interactions and In Vitro DNA Transfection Studies with Poly(ethylene glycol)-Modified Gelatin Nanoparticles. *JPharmSci* **94**, 184–198 (2005).
84. Kneuer, C. *et al.* A Nonviral DNA Delivery System Based on Surface Modified Silica-Nanoparticles Can Efficiently Transfect Cells in Vitro. *Bioconjugate Chem.* **11**, 926–932 (2000).

85. Riley, M. K. & Vermerris, W. Recent Advances in Nanomaterials for Gene Delivery—A Review. *Nanomaterials (Basel)* **7**, (2017).
86. Moini, J. Chapter 6 - Type 1 Diabetes. in *Epidemiology of Diabetes* (ed. Moini, J.) 75–90 (Elsevier, 2019). doi:10.1016/B978-0-12-816864-6.00006-7.
87. Rapoport, M. J. *et al.* Interleukin 4 reverses T cell proliferative unresponsiveness and prevents the onset of diabetes in nonobese diabetic mice. *J. Exp. Med.* **178**, 87–99 (1993).
88. Balasa, B. *et al.* A Mechanism for IL-10-Mediated Diabetes in the Nonobese Diabetic (NOD) Mouse: ICAM-1 Deficiency Blocks Accelerated Diabetes. *The Journal of Immunology* **165**, 7330–7337 (2000).
89. Ko, K. S., Lee, M., Koh, J. J. & Kim, S. W. Combined Administration of Plasmids Encoding IL-4 and IL-10 Prevents the Development of Autoimmune Diabetes in Nonobese Diabetic Mice. *Molecular Therapy* **4**, 313–316 (2001).
90. R, N. & K, B. Bringing nanomedicines to market: regulatory challenges, opportunities, and uncertainties. *Nanomedicine* **2**, 127–136 (2006).
91. Moghimi, S. M., Hunter, A. C. & Murray, J. C. Nanomedicine: current status and future prospects. *FASEB J.* **19**, 311–330 (2005).
92. Lammers, T., Hennink, W. E. & Storm, G. Tumour-targeted nanomedicines: principles and practice. *Br J Cancer* **99**, 392–397 (2008).
93. Zhou, Y., Peng, Z., Seven, E. S. & Leblanc, R. M. Crossing the blood-brain barrier with nanoparticles. *Journal of Controlled Release* **270**, 290–303 (2018).
94. Vizirianakis, I. S. Nanomedicine and personalized medicine toward the application of pharmacotyping in clinical practice to improve drug-delivery outcomes. *Nanomedicine* **7**, 11–17 (2011).
95. Lanctôt, K. L. *et al.* Efficacy and safety of cholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease: a meta-analysis. *CMAJ* **169**, 557–564 (2003).

96. Desai, A. K. & Grossberg, G. T. Diagnosis and treatment of Alzheimer's disease. *Neurology* **64**, S34-39 (2005).
97. Joshi, S. A., Chavhan, S. S. & Sawant, K. K. Rivastigmine-loaded PLGA and PBCA nanoparticles: preparation, optimization, characterization, in vitro and pharmacodynamic studies. *Eur J Pharm Biopharm* **76**, 189–199 (2010).
98. Odiba, A. *et al.* Therapeutic nanomedicine surmounts the limitations of pharmacotherapy. *Open Medicine* **12**, 271–287 (2017).
99. Health (US), N. I. of & Study, B. S. C. *Understanding Cancer*. (National Institutes of Health (US), 2007).
100. Grazie, M. L., Biagini, M. R., Tarocchi, M., Polvani, S. & Galli, A. Chemotherapy for hepatocellular carcinoma: The present and the future. *World Journal of Hepatology* **9**, 907–920 (2017).
101. Balogh, J. *et al.* Hepatocellular carcinoma: a review. *J Hepatocell Carcinoma* **3**, 41–53 (2016).
102. Llovet, J. M., Montal, R., Sia, D. & Finn, R. S. Molecular therapies and precision medicine for hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Clin Oncol* **15**, 599–616 (2018).
103. Costentin, C. E. *et al.* Geographical Disparities of Outcomes of Hepatocellular Carcinoma in France: The Heavier Burden of Alcohol Compared to Hepatitis C. *Dig. Dis. Sci.* **65**, 301–311 (2020).
104. Llovet, J. M. *et al.* Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* **2**, 16018 (2016).
105. European Association for the Study of the Liver. Electronic address: easloffice@easloffice.eu & European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* **69**, 182–236 (2018).

106. Bruix, J., Sherman, M. & American Association for the Study of Liver Diseases. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology* **53**, 1020–1022 (2011).
107. Bruix, J., Han, K.-H., Gores, G., Llovet, J. M. & Mazzaferro, V. Liver cancer: Approaching a personalized care. *J Hepatol* **62**, S144–S156 (2015).
108. Llovet, J. M. *et al.* Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **359**, 378–390 (2008).
109. Golombek, S. K. *et al.* Tumor targeting via EPR: Strategies to enhance patient responses. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **130**, 17–38 (2018).
110. Gabizon, A. *et al.* Prolonged circulation time and enhanced accumulation in malignant exudates of doxorubicin encapsulated in polyethylene-glycol coated liposomes. *Cancer Res.* **54**, 987–992 (1994).
111. Lehner, R., Wang, X., Marsch, S. & Hunziker, P. Intelligent nanomaterials for medicine: carrier platforms and targeting strategies in the context of clinical application. *Nanomedicine* **9**, 742–757 (2013).
112. Batist, G., Barton, J., Chaikin, P., Swenson, C. & Welles, L. Myocet (liposome-encapsulated doxorubicin citrate): a new approach in breast cancer therapy. *Expert Opin Pharmacother* **3**, 1739–1751 (2002).
113. Barenholz, Y. Doxil®--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. *J Control Release* **160**, 117–134 (2012).
114. Rom, J. *et al.* Efficacy and toxicity profile of pegylated liposomal doxorubicin (Caelyx) in patients with advanced breast cancer. *Anticancer Drugs* **25**, 219–224 (2014).
115. Ning, Y.-M. *et al.* Liposomal doxorubicin in combination with bortezomib for relapsed or refractory multiple myeloma. *Oncology (Williston Park, N.Y.)* **21**, 1503–1508; discussion 1511, 1513, 1516 passim (2007).

116. James, N. D. *et al.* Liposomal doxorubicin (Doxil): an effective new treatment for Kaposi's sarcoma in AIDS. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* **6**, 294–296 (1994).
117. Petre, C. E. & Dittmer, D. P. Liposomal daunorubicin as treatment for Kaposi's sarcoma. *Int J Nanomedicine* **2**, 277–288 (2007).
118. Rueda Domínguez, A., Olmos Hidalgo, D., Viciano Garrido, R. & Torres Sánchez, E. Liposomal cytarabine (DepoCyte) for the treatment of neoplastic meningitis. *Clin Transl Oncol* **7**, 232–238 (2005).
119. De Luca, R., Profita, G. & Cicero, G. Nab-paclitaxel in pretreated metastatic breast cancer: evaluation of activity, safety, and quality of life. *Onco Targets Ther* **12**, 1621–1627 (2019).
120. De Luca, R., Blasi, L., Alù, M., Gristina, V. & Cicero, G. Clinical efficacy of nab-paclitaxel in patients with metastatic pancreatic cancer. *Drug Des Devel Ther* **12**, 1769–1775 (2018).
121. Zarogoulidis, P. *et al.* Nab-paclitaxel as First Line Treatment for NSCLC in Elderly Patients More Than 75 Years Old. *J Cancer* **8**, 1673–1678 (2017).
122. Autio, K. A. *et al.* Safety and Efficacy of BIND-014, a Docetaxel Nanoparticle Targeting Prostate-Specific Membrane Antigen for Patients With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: A Phase 2 Clinical Trial. *JAMA Oncol* **4**, 1344–1351 (2018).
123. Zhang, X. *et al.* Trastuzumab-Coated Nanoparticles Loaded With Docetaxel for Breast Cancer Therapy. *Dose Response* **17**, (2019).
124. Stirland, D. L., Nichols, J. W., Miura, S. & Bae, Y. H. Mind the gap: a survey of how cancer drug carriers are susceptible to the gap between research and practice. *J Control Release* **172**, 1045–1064 (2013).

125. Cheng, Z., Zaki, A. A., Hui, J. Z., Muzykantov, V. R. & Tsourkas, A. Multifunctional Nanoparticles: Cost versus benefit of adding targeting and imaging capabilities. *Science* **338**, 903–910 (2012).
126. Matsumura, Y. & Maeda, H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res.* **46**, 6387–6392 (1986).
127. Tee, J. K. *et al.* Nanoparticles' interactions with vasculature in diseases. *Chem. Soc. Rev.* **48**, 5381–5407 (2019).
128. Folkman, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* **285**, 1182–1186 (1971).
129. Verheul, H. M. & Pinedo, H. M. The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in tumor angiogenesis and early clinical development of VEGF-receptor kinase inhibitors. *Clin. Breast Cancer* **1 Suppl 1**, S80-84 (2000).
130. Nagy, J. A., Chang, S.-H., Dvorak, A. M. & Dvorak, H. F. Why are tumour blood vessels abnormal and why is it important to know? *Br. J. Cancer* **100**, 865–869 (2009).
131. Hashizume, H. *et al.* Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am. J. Pathol.* **156**, 1363–1380 (2000).
132. Torchilin, V. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **63**, 131–135 (2011).
133. Prabhakar, U. *et al.* Challenges and key considerations of the enhanced permeability and retention effect for nanomedicine drug delivery in oncology. *Cancer Res.* **73**, 2412–2417 (2013).
134. Kerr, C. Epigenetics is the Future for Cancer Research. *Medium* <https://medium.com/@cameronkerr/epigenetics-is-the-future-for-cancer-research-b1821e956188> (2018).

135. Engelberth, S. A., Hempel, N. & Bergkvist, M. Development of nanoscale approaches for ovarian cancer therapeutics and diagnostics. *Crit Rev Oncog* **19**, 281–315 (2014).
136. Hirsjärvi, S., Passirani, C. & Benoit, J.-P. Passive and active tumour targeting with nanocarriers. *Curr Drug Discov Technol* **8**, 188–196 (2011).
137. Xiong, X. Y., Gong, Y. C., Li, Z. L., Li, Y. P. & Guo, L. Active Targeting Behaviors of Biotinylated Pluronic/Poly(Lactic Acid) Nanoparticles In Vitro through Three-Step Biotin–Avidin Interaction. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **22**, 1607–1619 (2011).
138. Byrne, J. D., Betancourt, T. & Brannon-Peppas, L. Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 1615–1626 (2008).
139. Yoo, J., Park, C., Yi, G., Lee, D. & Koo, H. Active Targeting Strategies Using Biological Ligands for Nanoparticle Drug Delivery Systems. *Cancers (Basel)* **11**, (2019).
140. Chen, H. *et al.* Anti-HER2 antibody and ScFvEGFR-conjugated antifouling magnetic iron oxide nanoparticles for targeting and magnetic resonance imaging of breast cancer. *Int J Nanomedicine* **8**, 3781–3794 (2013).
141. Ku, S. H., Kim, K., Choi, K., Kim, S. H. & Kwon, I. C. Tumor-Targeting Multifunctional Nanoparticles for siRNA Delivery: Recent Advances in Cancer Therapy. *Advanced Healthcare Materials* **3**, 1182–1193 (2014).
142. Clarke, S. J. & Rivory, L. P. Clinical pharmacokinetics of docetaxel. *Clin Pharmacokinet* **36**, 99–114 (1999).
143. Holme, M. N. *et al.* Shear-stress sensitive lenticular vesicles for targeted drug delivery. *Nature Nanotechnology* **7**, 536–543 (2012).
144. Jhaveri, A., Deshpande, P. & Torchilin, V. Stimuli-sensitive nanopreparations for combination cancer therapy. *J Control Release* **190**, 352–370 (2014).

145. Bakalova, R., Zhelev, Z., Aoki, I. & Saga, T. Tissue redox activity as a hallmark of carcinogenesis: from early to terminal stages of cancer. *Clin. Cancer Res.* **19**, 2503–2517 (2013).
146. Prasad, P. *et al.* Multifunctional albumin-MnO₂ nanoparticles modulate solid tumor microenvironment by attenuating hypoxia, acidosis, vascular endothelial growth factor and enhance radiation response. *ACS Nano* **8**, 3202–3212 (2014).
147. Thomas, S. N. *et al.* Exosomal Proteome Profiling: A Potential Multi-Marker Cellular Phenotyping Tool to Characterize Hypoxia-Induced Radiation Resistance in Breast Cancer. *Proteomes* **1**, 87–108 (2013).
148. Loomis, K., McNeeley, K. & Bellamkonda, R. V. Nanoparticles with targeting, triggered release, and imaging functionality for cancer applications. *Soft Matter* **7**, 839–856 (2011).
149. Ko, H. *et al.* Tumor microenvironment-specific nanoparticles activatable by stepwise transformation. *J Control Release* **234**, 68–78 (2016).
150. Behzadi, S. *et al.* Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell. *Chem. Soc. Rev.* **46**, 4218–4244 (2017).
151. Chow, A., Brown, B. D. & Merad, M. Studying the mononuclear phagocyte system in the molecular age. *Nature Reviews Immunology* **11**, 788–798 (2011).
152. Aggarwal, P., Hall, J. B., McLeland, C. B., Dobrovolskaia, M. A. & McNeil, S. E. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Adv Drug Deliv Rev* **61**, 428–437 (2009).
153. Frank, M. M. & Fries, L. F. The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunol. Today* **12**, 322–326 (1991).
154. Vene, E. *et al.* Opsonisation of nanoparticles prepared from poly(β -hydroxybutyrate) and poly(trimethylene carbonate)-*b*-poly(malic acid) amphiphilic diblock copolymers: Impact

- on the in vitro cell uptake by primary human macrophages and HepaRG hepatoma cells. *Int J Pharm* 438–452 (2016).
155. Morgan, B. P. Physiology and pathophysiology of complement: progress and trends. *Crit Rev Clin Lab Sci* **32**, 265–298 (1995).
 156. Owens, D. E. & Peppas, N. A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* **307**, 93–102 (2006).
 157. Ilium, L., Hunneyball, I. M. & Davis, S. S. The effect of hydrophilic coatings on the uptake of colloidal particles by the liver and by peritoneal macrophages. *International Journal of Pharmaceutics* **29**, 53–65 (1986).
 158. Peracchia, M. T. *et al.* Visualization of in vitro protein-rejecting properties of PEGylated stealth polycyanoacrylate nanoparticles. *Biomaterials* **20**, 1269–1275 (1999).
 159. Wolfram, J. *et al.* Safety of Nanoparticles in Medicine. *Curr Drug Targets* **16**, 1671–1681 (2015).
 160. Wolfram, J. *et al.* The nano-plasma interface: Implications of the protein corona. *Colloids Surf B Biointerfaces* **124**, 17–24 (2014).
 161. Shang, L., Wang, Y., Jiang, J. & Dong, S. pH-dependent protein conformational changes in albumin:gold nanoparticle bioconjugates: a spectroscopic study. *Langmuir* **23**, 2714–2721 (2007).
 162. Shang, W. *et al.* Cytochrome c on Silica Nanoparticles: Influence of Nanoparticle Size on Protein Structure, Stability, and Activity. *Small* **5**, 470–476 (2009).
 163. Shang, W., Nuffer, J. H., Dordick, J. S. & Siegel, R. W. Unfolding of Ribonuclease A on Silica Nanoparticle Surfaces. *Nano Lett.* **7**, 1991–1995 (2007).
 164. Mahmoudi, M. *et al.* Irreversible changes in protein conformation due to interaction with superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Nanoscale* **3**, 1127–1138 (2011).

165. Sun, B., Wang, X., Ji, Z., Li, R. & Xia, T. NLRP3 Inflammasome Activation Induced by Engineered Nanomaterials. *Small* **9**, 1595–1607 (2013).
166. Schroder, K. & Tschopp, J. The inflammasomes. *Cell* **140**, 821–832 (2010).
167. Bryant, C. & Fitzgerald, K. A. Molecular mechanisms involved in inflammasome activation. *Trends Cell Biol.* **19**, 455–464 (2009).
168. Mayer-Barber, K. D. *et al.* Caspase-1 independent IL-1 β production is critical for host resistance to mycobacterium tuberculosis and does not require TLR signaling in vivo. *J. Immunol.* **184**, 3326–3330 (2010).
169. Morishige, T. *et al.* The effect of surface modification of amorphous silica particles on NLRP3 inflammasome mediated IL-1 β production, ROS production and endosomal rupture. *Biomaterials* **31**, 6833–6842 (2010).
170. Lunov, O. *et al.* Amino-functionalized polystyrene nanoparticles activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages. *ACS Nano* **5**, 9648–9657 (2011).
171. Sharp, F. A. *et al.* Uptake of particulate vaccine adjuvants by dendritic cells activates the NALP3 inflammasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 870–875 (2009).
172. Yang, E.-J., Kim, S., Kim, J. S. & Choi, I.-H. Inflammasome formation and IL-1 β release by human blood monocytes in response to silver nanoparticles. *Biomaterials* **33**, 6858–6867 (2012).
173. Yan, L., Gu, Z. & Zhao, Y. Chemical mechanisms of the toxicological properties of nanomaterials: generation of intracellular reactive oxygen species. *Chem Asian J* **8**, 2342–2353 (2013).
174. Chen, R. *et al.* Endoplasmic Reticulum Stress Induced by Zinc Oxide Nanoparticles Is an Earlier Biomarker for Nanotoxicological Evaluation. *ACS Nano* **8**, 2562–2574 (2014).
175. Zhang, W. *et al.* Unraveling Stress-Induced Toxicity Properties of Graphene Oxide and the Underlying Mechanism. *Advanced Materials* **24**, 5391–5397 (2012).

176. Zhang, Y.-N., Poon, W., Tavares, A. J., McGilvray, I. D. & Chan, W. C. W. Nanoparticle–liver interactions: Cellular uptake and hepatobiliary elimination. *Journal of Controlled Release* **240**, 332–348 (2016).
177. Soo Choi, H. *et al.* Renal clearance of quantum dots. *Nature Biotechnology* **25**, 1165–1170 (2007).
178. Sadauskas, E. *et al.* Protracted elimination of gold nanoparticles from mouse liver. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **5**, 162–169 (2009).
179. Balasubramanian, S. K. *et al.* Biodistribution of gold nanoparticles and gene expression changes in the liver and spleen after intravenous administration in rats. *Biomaterials* **31**, 2034–2042 (2010).
180. Yao, Y., Zang, Y., Qu, J., Tang, M. & Zhang, T. The Toxicity Of Metallic Nanoparticles On Liver: The Subcellular Damages, Mechanisms, And Outcomes. *Int J Nanomedicine* **14**, 8787–8804 (2019).
181. Juweid, M. *et al.* Micropharmacology of monoclonal antibodies in solid tumors: direct experimental evidence for a binding site barrier. *Cancer Res.* **52**, 5144–5153 (1992).
182. Weinstein, J. N. & van Osdol, W. Early intervention in cancer using monoclonal antibodies and other biological ligands: micropharmacology and the ‘binding site barrier’. *Cancer Res.* **52**, 2747s–2751s (1992).
183. Xenaki, K. T., Oliveira, S. & van Bergen en Henegouwen, P. M. P. Antibody or Antibody Fragments: Implications for Molecular Imaging and Targeted Therapy of Solid Tumors. *Front. Immunol.* **8**, (2017).
184. Lee, H., Fonge, H., Hoang, B., Reilly, R. M. & Allen, C. The effects of particle size and molecular targeting on the intratumoral and subcellular distribution of polymeric nanoparticles. *Mol. Pharm.* **7**, 1195–1208 (2010).

185. Miao, L. *et al.* The Binding Site Barrier Elicited by Tumor-Associated Fibroblasts Interferes Disposition of Nanoparticles in Stroma-Vessel Type Tumors. *ACS Nano* (2016) doi:10.1021/acsnano.6b02776.
186. Cabral, H. *et al.* Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size. *Nature Nanotechnology* **6**, 815–823 (2011).
187. Junttila, M. R. & de Sauvage, F. J. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature* **501**, 346–354 (2013).
188. Yuan, F. *et al.* Microvascular Permeability and Interstitial Penetration of Sterically Stabilized (Stealth) Liposomes in a Human Tumor Xenograft. *Cancer Res* **54**, 3352–3356 (1994).
189. Yokoi, K. *et al.* Capillary-wall collagen as a biophysical marker of nanotherapeutic permeability into the tumor microenvironment. *Cancer Res* **74**, 4239–4246 (2014).
190. Kalluri, R. & Zeisberg, M. Fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 392–401 (2006).
191. van Waarde, A. *et al.* Potential applications for sigma receptor ligands in cancer diagnosis and therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1848**, 2703–2714 (2015).
192. Prutki, M. *et al.* Altered iron metabolism, transferrin receptor 1 and ferritin in patients with colon cancer. *Cancer Lett.* **238**, 188–196 (2006).
193. Jain, R. K., Martin, J. D. & Stylianopoulos, T. The role of mechanical forces in tumor growth and therapy. *Annu Rev Biomed Eng* **16**, 321–346 (2014).
194. Boucher, Y., Baxter, L. T. & Jain, R. K. Interstitial pressure gradients in tissue-isolated and subcutaneous tumors: implications for therapy. *Cancer Res.* **50**, 4478–4484 (1990).
195. Griffon-Etienne, G., Boucher, Y., Brekken, C., Suit, H. D. & Jain, R. K. Taxane-induced apoptosis decompresses blood vessels and lowers interstitial fluid pressure in solid tumors: clinical implications. *Cancer Res.* **59**, 3776–3782 (1999).

196. Netti, P. A., Roberge, S., Boucher, Y., Baxter, L. T. & Jain, R. K. Effect of transvascular fluid exchange on pressure-flow relationship in tumors: a proposed mechanism for tumor blood flow heterogeneity. *Microvasc. Res.* **52**, 27–46 (1996).
197. Zhang, B., Hu, Y. & Pang, Z. Modulating the Tumor Microenvironment to Enhance Tumor Nanomedicine Delivery. *Front Pharmacol* **8**, (2017).
198. Holback, H. & Yeo, Y. Intratumoral Drug Delivery with Nanoparticulate Carriers. *Pharm Res* **28**, 1819–1830 (2011).
199. Sun, Q. *et al.* Integration of nanoassembly functions for an effective delivery cascade for cancer drugs. *Adv. Mater. Weinheim* **26**, 7615–7621 (2014).
200. Sun, Q., Radosz, M. & Shen, Y. Challenges in design of translational nanocarriers. *J Control Release* **164**, 156–169 (2012).
201. Park, J. H. *et al.* Polymeric nanomedicine for cancer therapy. *Progress in Polymer Science* **33**, 113–137 (2008).
202. Salahpour Anarjan, F. Active targeting drug delivery nanocarriers: Ligands. *Nano-Structures & Nano-Objects* **19**, 100370 (2019).
203. Mozar, F. S. & Chowdhury, E. H. PEGylation of Carbonate Apatite Nanoparticles Prevents Opsonin Binding and Enhances Tumor Accumulation of Gemcitabine. *J Pharm Sci* **107**, 2497–2508 (2018).
204. Singh, R. & Lillard, J. W. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Experimental and Molecular Pathology* **86**, 215–223 (2009).
205. Vauthier, C., Dubernet, C., Chauvierre, C., Brigger, I. & Couvreur, P. Drug delivery to resistant tumors: the potential of poly(alkyl cyanoacrylate) nanoparticles. *Journal of Controlled Release* **93**, 151–160 (2003).
206. Ehrlich, P. *Collected studies on immunity*. (J. Wiley & sons; [etc., etc.], 1906).

207. Torchilin, V. P. Multifunctional nanocarriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **58**, 1532–1555 (2006).
208. Hoffman, A. S. The origins and evolution of ‘controlled’ drug delivery systems. *J Control Release* **132**, 153–163 (2008).
209. Liu, S., Maheshwari, R. & Kiick, K. L. Polymer-Based Therapeutics. *Macromolecules* **42**, 3–13 (2009).
210. Malam, Y., Loizidou, M. & Seifalian, A. M. Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. *Trends in Pharmacological Sciences* **30**, 592–599 (2009).
211. Misra, R., Acharya, S. & Sahoo, S. K. Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy. *Drug Discovery Today* **15**, 842–850 (2010).
212. Etheridge, M. L. *et al.* The big picture on nanomedicine: the state of investigational and approved nanomedicine products. *Nanomedicine* **9**, 1–14 (2013).
213. Kumari, A., Yadav, S. K. & Yadav, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **75**, 1–18 (2010).
214. Ulery, B. D., Nair, L. S. & Laurencin, C. T. Biomedical Applications of Biodegradable Polymers. *J Polym Sci B Polym Phys* **49**, 832–864 (2011).
215. Jin, S.-E., Jin, H.-E. & Hong, S.-S. Targeted Delivery System of Nanobiomaterials in Anticancer Therapy: From Cells to Clinics. *BioMed Research International* vol. 2014 e814208 <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/814208/> (2014).
216. Chiellini, F., Piras, A. M., Errico, C. & Chiellini, E. Micro/nanostructured polymeric systems for biomedical and pharmaceutical applications. *Nanomedicine (Lond)* **3**, 367–393 (2008).
217. Xu, L. & Anchordoquy, T. CLINICAL TRIALS AND TRANSLATIONAL MEDICINE COMMENTARY: Drug Delivery Trends in Clinical Trials and Translational Medicine:

- Challenges and Opportunities in the Delivery of Nucleic Acid-Based Therapeutics. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **100**, 38–52 (2011).
218. Ringsdorf, H. Structure and properties of pharmacologically active polymers. *Journal of Polymer Science: Polymer Symposia* **51**, 135–153 (1975).
219. Duncan, R. & Vicent, M. J. Polymer therapeutics-prospects for 21st century: The end of the beginning. *Advanced Drug Delivery Reviews* **65**, 60–70 (2013).
220. Duncan, R. & Vicent, M. J. Do HEMA copolymer conjugates have a future as clinically useful nanomedicines? A critical overview of current status and future opportunities. *Advanced Drug Delivery Reviews* **62**, 272–282 (2010).
221. Kataoka, K. *et al.* Doxorubicin-loaded poly(ethylene glycol)-poly(beta-benzyl-L-aspartate) copolymer micelles: their pharmaceutical characteristics and biological significance. *J Control Release* **64**, 143–153 (2000).
222. Kataoka, K., Harada, A. & Nagasaki, Y. Block copolymer micelles for drug delivery: Design, characterization and biological significance. *Advanced Drug Delivery Reviews* **64**, 37–48 (2012).
223. Kwon, G. S. & Kataoka, K. Block copolymer micelles as long-circulating drug vehicles. *Advanced Drug Delivery Reviews* **16**, 295–309 (1995).
224. Matsumura, Y. & Kataoka, K. Preclinical and clinical studies of anticancer agent-incorporating polymer micelles. *Cancer Science* **100**, 572–579 (2009).
225. Cabral, H. & Kataoka, K. Progress of drug-loaded polymeric micelles into clinical studies. *Journal of Controlled Release* **190**, 465–476 (2014).
226. Kabanov, A. V. *et al.* A new class of drug carriers: micelles of poly(oxyethylene)-poly(oxypropylene) block copolymers as microcontainers for drug targeting from blood in brain. *Journal of Controlled Release* **22**, 141–157 (1992).

227. Kabanov, A. V. *et al.* Micelle Formation and Solubilization of Fluorescent Probes in Poly(oxyethylene-b-oxypropylene-b-oxyethylene) Solutions. *Macromolecules* **28**, 2303–2314 (1995).
228. Kabanov, A. V., Batrakova, E. V. & Alakhov, V. Y. Pluronic® block copolymers for overcoming drug resistance in cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews* **54**, 759–779 (2002).
229. Kabanov, A. V., Batrakova, E. V. & Alakhov, V. Y. Pluronic® block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. *Journal of Controlled Release* **82**, 189–212 (2002).
230. WOJCIK, R. T. PREPARATION AND PROPERTIES OF POLY BETA-(L-MALIC ACID) AND ITS BENZYL ESTER: FUNCTIONAL POLYESTERS OF POTENTIAL BIOMEDICAL IMPORTANCE. *Doctoral Dissertations Available from Proquest* 1–382 (1984).
231. Cammas, S. *et al.* Polymers of malic acid and 3-alkylmalic acid as synthetic PHAs in the design of biocompatible hydrolyzable devices. *Int. J. Biol. Macromol.* **25**, 273–282 (1999).
232. Cammas-Marion, S. & Guérin, P. Design of malolactonic acid esters with a large spectrum of specified pendant groups in the engineering of biofunctional and hydrolyzable polyesters. *Macromolecular Symposia* **153**, 167–186 (2000).
233. Jaffredo, C. G. & Guillaume, S. M. Benzyl β -malolactonate polymers: a long story with recent advances. *Polym. Chem.* **5**, 4168–4194 (2014).
234. Fischer, H., Erdmann, S. & Holler, E. An unusual polyanion from Physarum polycephalum that inhibits homologous DNA polymerase alpha in vitro. *Biochemistry* **28**, 5219–5226 (1989).

235. Cammas, S. *et al.* Natural poly(L-malic acid): NMR shows a poly(3-hydroxy acid)-type structure. *Macromolecules* **26**, 4681–4684 (1993).
236. Lee, B.-S. *et al.* Polycefin, a New Prototype of a Multifunctional Nanoconjugate Based on Poly(β -l-malic acid) for Drug Delivery. *Bioconjug Chem* **17**, 317–326 (2006).
237. Ljubimova, J. Y. *et al.* Toxicity and efficacy evaluation of multiple targeted polymalic acid conjugates for triple-negative breast cancer treatment. *J Drug Target* **21**, 956–967 (2013).
238. Ding, H. *et al.* Polymalic acid nanobioconjugate for simultaneous immunostimulation and inhibition of tumor growth in HER2/neu-positive breast cancer. *Journal of Controlled Release* **171**, 322–329 (2013).
239. Duncan, R. Drug-polymer conjugates: potential for improved chemotherapy. *Anti-Cancer Drugs* **3**, 175–210 (1992).
240. Ding, H. *et al.* Inhibition of brain tumor growth by intravenous poly(β -l-malic acid) nanobioconjugate with pH-dependent drug release. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 18143–18148 (2010).
241. Patil, R. *et al.* MRI Virtual Biopsy and Treatment of Brain Metastatic Tumors with Targeted Nanobioconjugates: Nanoclinic in the Brain. *ACS Nano* **9**, 5594–5608 (2015).
242. He, B. & Chan-Park, M. B. Synthesis and Characterization of Functionalizable and Photopatternable Poly(ϵ -caprolactone-co-RS- β -malic acid). *Macromolecules* **38**, 8227–8234 (2005).
243. Poon, Y. F., Cao, Y., Zhu, Y., Judeh, Z. M. A. & Chan-Park, M. B. Addition of β -Malic Acid-Containing Poly(ethylene glycol) Dimethacrylate To Form Biodegradable and Biocompatible Hydrogels. *Biomacromolecules* **10**, 2043–2052 (2009).

244. He, B., Bei, J. & Wang, S. Synthesis and characterization of a functionalized biodegradable copolymer: poly(l-lactide-co-RS- β -malic acid). *Polymer* **44**, 989–994 (2003).
245. He, B., Bei, J. & Wang, S. Morphology and degradation of biodegradable poly(L-lactide-co- β -malic acid). *Polymers for Advanced Technologies* **14**, 645–652 (2003).
246. He, B., Wan, Y., Bei, J. & Wang, S. Synthesis and cell affinity of functionalized poly(l-lactide-co- β -malic acid) with high molecular weight. *Biomaterials* **25**, 5239–5247 (2004).
247. He, B., Poon, Y. F., Feng, J. & Chan-Park, M. B. Synthesis and characterization of functionalized biodegradable poly(DL-lactide-co-RS-beta-malic acid). *J Biomed Mater Res A* **87**, 254–263 (2008).
248. Lai, K., He, B. & Gu, Z. PREPARATION AND CELL COMPATIBILITY OF FUNCTIONALIZED BIODEGRADABLE POLY(DL-LACTIDE-co-RS- β -MALIC ACID). *Chinese J. Polym. Sci.* **26**, 177–186 (2008).
249. Liu, Y. *et al.* Blood compatibility evaluation of poly(d,l-lactide-co-beta-malic acid) modified with the GRGDS sequence. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **75**, 370–376 (2010).
250. Wang, W. *et al.* A novel copolymer poly(lactide-co-beta-malic acid) with extended carboxyl arms offering better cell affinity and hemacompatibility for blood vessel engineering. *Tissue Eng Part A* **15**, 65–73 (2009).
251. Cammas, S., Renard, I., Langlois, V. & Guéri, P. Poly(β -malic acid): obtaining high molecular weights by improvement of the synthesis route. *Polymer* **37**, 4215–4220 (1996).
252. Venkatraj, N., Nanjan, M. J., Loyer, P., Chandrasekar, M. J. N. & Marion, S. C. Poly(malic acid) bearing Doxorubicin and N-Acetyl Galactosamine as a site-specific prodrug for targeting hepatocellular carcinoma. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **28**, 1140–1157 (2017).

253. Barritault, D., FR, Caruelle, J.-P. & FR. United States Patent: 6689741 - Biocompatible polymers, process for their preparation and compositions containing them. (2004).
254. Estanqueiro, M., Amaral, M. H., Conceição, J. & Sousa Lobo, J. M. Nanotechnological carriers for cancer chemotherapy: the state of the art. *Colloids Surf B Biointerfaces* **126**, 631–648 (2015).
255. *Solvents and Self-Organization of Polymers*. (Springer Netherlands, 1996). doi:10.1007/978-94-009-0333-3.
256. Esposito, C., Crema, A., Ponzetto, A., Murtas, G. & Carloni, G. Multifunctional anti-cancer nano-platforms are moving to clinical trials. *Curr. Drug Metab.* **14**, 583–604 (2013).
257. Yokoyama, M. *et al.* Characterization and anticancer activity of the micelle-forming polymeric anticancer drug adriamycin-conjugated poly(ethylene glycol)-poly(aspartic acid) block copolymer. *Cancer Res.* **50**, 1693–1700 (1990).
258. Lanz-Landázuri, A. *et al.* Poly(methyl malate) Nanoparticles: Formation, Degradation, and Encapsulation of Anticancer Drugs. *Macromol Biosci* **11**, 1370–1377 (2011).
259. Lanz-Landázuri, A. *et al.* Modification of Microbial Polymalic Acid With Hydrophobic Amino Acids for Drug-Releasing Nanoparticles. *Macromol Chem Phys* **213**, 1623–1631 (2012).
260. Stolnik, S. *et al.* The preparation of sub-200 nm biodegradable colloidal particles from poly(β -malic acid-co-benzyl malate) copolymers and their surface modification with Poloxamer and Poloxamine surfactants. *Journal of Controlled Release* **30**, 57–67 (1994).
261. Stolnik, S. *et al.* The colloidal properties of surfactant-free biodegradable nanospheres from poly(β -malic acid-co-benzyl malate)s and poly(lactic acid-co-glycolide). *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **97**, 235–245 (1995).

262. Stolnik, S. *et al.* Nanospheres prepared from poly(β -malic acid) benzyl ester copolymers: evidence for their in vitro degradation. *J Mater Sci: Mater Med* **7**, 161–166 (1996).
263. Osanai, S. & Nakamura, K. Effects of complexation between liposome and poly(malic acid) on aggregation and leakage behaviour. *Biomaterials* **21**, 867–876 (2000).
264. Nottelet, B., Tommaso, C. D., Mondon, K., Gurny, R. & Möller, M. Fully biodegradable polymeric micelles based on hydrophobic- and hydrophilic-functionalized poly(lactide) block copolymers. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **48**, 3244–3254 (2010).
265. Wang, L., Jia, X., Liu, X., Yuan, Z. & Huang, J. Synthesis and characterization of a functionalized amphiphilic diblock copolymer: MePEG-b-poly(DL-lactide-co-RS- β -malic acid). *Colloid Polym Sci* **285**, 273–281 (2006).
266. Wang, L., Neoh, K.-G., Kang, E.-T., Shuter, B. & Wang, S.-C. Biodegradable magnetic-fluorescent magnetite/poly(dl-lactic acid-co- α,β -malic acid) composite nanoparticles for stem cell labeling. *Biomaterials* **31**, 3502–3511 (2010).
267. Bouclier, C. *et al.* Physicochemical Characteristics and Preliminary in Vivo Biological Evaluation of Nanocapsules Loaded with siRNA Targeting Estrogen Receptor Alpha. *Biomacromolecules* **9**, 2881–2890 (2008).
268. Yang, X., Grailer, J. J., Pilla, S., Steeber, D. A. & Gong, S. Tumor-Targeting, pH-Responsive, and Stable Unimolecular Micelles as Drug Nanocarriers for Targeted Cancer Therapy. *Bioconjugate Chem.* **21**, 496–504 (2010).
269. Zhao, Z. *et al.* Biodegradable Nanoparticles Based on Linoleic Acid and Poly(β -malic acid) Double Grafted Chitosan Derivatives as Carriers of Anticancer Drugs. *Biomacromolecules* **10**, 565–572 (2009).

270. Wang, B., He, C., Tang, C. & Yin, C. Effects of hydrophobic and hydrophilic modifications on gene delivery of amphiphilic chitosan based nanocarriers. *Biomaterials* **32**, 4630–4638 (2011).
271. Pounder, R. J., Willcock, H., Jeong, N. S., O'Reilly, R. K. & Dove, A. P. Stereocomplexation in novel degradable amphiphilic block copolymer micelles of poly(ethylene oxide) and poly(benzyl α -malate). *Soft Matter* **7**, 10987–10993 (2011).
272. Martinez Barbosa, M. E., Cammas, S., Appel, M. & Ponchel, G. Investigation of the Degradation Mechanisms of Poly(malic acid) Esters in Vitro and Their Related Cytotoxicities on J774 Macrophages. *Biomacromolecules* **5**, 137–143 (2004).
273. Cammas-Marion, S., Béar, M.-M., Harada, A., Guérin, P. & Kataoka, K. New macromolecular micelles based on degradable amphiphilic block copolymers of malic acid and malic acid ester. *Macromolecular Chemistry and Physics* **201**, 355–364 (2000).
274. Huang, Z. W. *et al.* New functional degradable and bio-compatible nanoparticles based on poly(malic acid) derivatives for site-specific anti-cancer drug delivery. *Int J Pharm* **423**, 84–92 (2012).
275. Loyer, P., Bedhouche, W., Huang, Z. W. & Cammas-Marion, S. Degradable and biocompatible nanoparticles decorated with cyclic RGD peptide for efficient drug delivery to hepatoma cells in vitro. *Int J Pharm* **454**, 727–737 (2013).
276. Reddy, L. H. & Couvreur, P. Nanotechnology for therapy and imaging of liver diseases. *Journal of Hepatology* **55**, 1461–1466 (2011).
277. Le Droumaguet, B. *et al.* Versatile and Efficient Targeting Using a Single Nanoparticulate Platform: Application to Cancer and Alzheimer's Disease. *ACS Nano* **6**, 5866–5879 (2012).

278. Patil, Y. B., Toti, U. S., Khdair, A., Ma, L. & Panyam, J. Single-step surface functionalization of polymeric nanoparticles for targeted drug delivery. *Biomaterials* **30**, 859–866 (2009).
279. Kim, S. Y., Cho, S. H., Lee, Y. M. & Chu, L.-Y. Biotin-conjugated block copolymeric nanoparticles as tumor-targeted drug delivery systems. *Macromol. Res.* **15**, 646–655 (2007).
280. Yang, W., Cheng, Y., Xu, T., Wang, X. & Wen, L. Targeting cancer cells with biotin–dendrimer conjugates. *European Journal of Medicinal Chemistry* **44**, 862–868 (2009).
281. Jérôme, C. & Lecomte, P. Recent advances in the synthesis of aliphatic polyesters by ring-opening polymerization. *Advanced Drug Delivery Reviews* **60**, 1056–1076 (2008).
282. Nuyken, O. & Pask, S. D. Ring-Opening Polymerization—An Introductory Review. *Polymers* **5**, 361–403 (2013).
283. Schott, M.-A., Domurado, M., Leclercq, L., Barbaud, C. & Domurado, D. Solubilization of Water-Insoluble Drugs Due to Random Amphiphilic and Degradable Poly(dimethylmalic acid) Derivatives. *Biomacromolecules* **14**, 1936–1944 (2013).
284. Belibel, R. & Barbaud, C. Synthesis and characterizations of hemiditactic homopolymers derived of poly(3-allyl-3-methylmalic acid): An example of a new class of polymer's ditacticity. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **55**, 2408–2418 (2017).
285. Casajus, H., Tranchimand, S., Wolbert, D., Nugier-Chauvin, C. & Cammas-Marion, S. Optimization of lipase-catalyzed polymerization of benzyl malolactonate through a design of experiment approach. *Journal of Applied Polymer Science* **134**, (2017).
286. Shoda, S., Uyama, H., Kadokawa, J., Kimura, S. & Kobayashi, S. Enzymes as Green Catalysts for Precision Macromolecular Synthesis. *Chem. Rev.* **116**, 2307–2413 (2016).
287. Multicomponent reactions for the synthesis of some nitrogenous heterocyclic compounds and studies of their biological activities.

288. Cerec, V. *et al.* Transdifferentiation of hepatocyte-like cells from the human hepatoma HepaRG cell line through bipotent progenitor. *Hepatology* **45**, 957–967 (2007).
289. Aninat, C. *et al.* Expression of cytochromes P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells. *Drug Metab. Dispos.* **34**, 75–83 (2006).
290. Gripon, P. *et al.* Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 15655–15660 (2002).
291. Corlu, A. & Loyer, P. Culture Conditions Promoting Hepatocyte Proliferation and Cell Cycle Synchronization. *Methods Mol. Biol.* **1250**, 27–51 (2015).
292. Tavares, A. J. *et al.* Effect of removing Kupffer cells on nanoparticle tumor delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **114**, E10871–E10880 (2017).
293. Gicquel, T. *et al.* IL-1 β production is dependent on the activation of purinergic receptors and NLRP3 pathway in human macrophages. *FASEB J.* **29**, 4162–4173 (2015).
294. Martínez Rivas, C. J. *et al.* Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery. *Int J Pharm* **532**, 66–81 (2017).
295. Thioune, O., Fessi, H., Devissaguet, J. P. & Puisieux, F. Preparation of pseudolatex by nanoprecipitation: Influence of the solvent nature on intrinsic viscosity and interaction constant. *International Journal of Pharmaceutics* **146**, 233–238 (1997).
296. Barbaud, C., Guerrouache, M. & Guérin, P. Synthesis of novel α,α',β -trisubstituted β -lactones. *Tetrahedron Letters* **43**, 9513–9515 (2002).
297. Belibel, R. & Barbaud, C. Synthesis of new optically active α,α',β -trisubstituted- β -lactones as monomers for stereoregular biopolyesters. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **53**, 2586–2597 (2015).
298. Pelaz, B. *et al.* Surface Functionalization of Nanoparticles with Polyethylene Glycol: Effects on Protein Adsorption and Cellular Uptake. *ACS Nano* **9**, 6996–7008 (2015).

299. Thevenot, J., Troutier, A.-L., David, L., Delair, T. & Ladavière, C. Steric stabilization of lipid/polymer particle assemblies by poly(ethylene glycol)-lipids. *Biomacromolecules* **8**, 3651–3660 (2007).
300. Vlach, M. *et al.* Cytochrome P450 1A1/2, 2B6 and 3A4 HepaRG Cell-Based Biosensors to Monitor Hepatocyte Differentiation, Drug Metabolism and Toxicity. *Sensors (Basel)* **19**, (2019).
301. Guguen-Guillouzo, C. & Guillouzo, A. General review on in vitro hepatocyte models and their applications. *Methods Mol. Biol.* **640**, 1–40 (2010).
302. Quesnot, N. *et al.* Production of chlorzoxazone glucuronides via cytochrome P4502E1 dependent and independent pathways in human hepatocytes. *Arch. Toxicol.* **92**, 3077–3091 (2018).
303. Kanebratt, K. P. & Andersson, T. B. HepaRG cells as an in vitro model for evaluation of cytochrome P450 induction in humans. *Drug Metab. Dispos.* **36**, 137–145 (2008).
304. Dubois-Pot-Schneider, H. *et al.* Inflammatory cytokines promote the retrodifferentiation of tumor-derived hepatocyte-like cells to progenitor cells. *Hepatology* **60**, 2077–2090 (2014).
305. Herold, D. A., Keil, K. & Bruns, D. E. Oxidation of polyethylene glycols by alcohol dehydrogenase. *Biochem. Pharmacol.* **38**, 73–76 (1989).
306. Jones, M. & Leroux, J. Polymeric micelles - a new generation of colloidal drug carriers. *Eur J Pharm Biopharm* **48**, 101–111 (1999).
307. Gref, null *et al.* ‘Stealth’ corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids Surf B Biointerfaces* **18**, 301–313 (2000).

308. Zambaux, M. F., Bonneaux, F., Gref, R., Dellacherie, E. & Vigneron, C. MPEO-PLA nanoparticles: effect of MPEO content on some of their surface properties. *J. Biomed. Mater. Res.* **44**, 109–115 (1999).
309. Daniel, J. A. *et al.* Phenothiazine-Derived Antipsychotic Drugs Inhibit Dynamin and Clathrin-Mediated Endocytosis. *Traffic* **16**, 635–654 (2015).
310. Thors, L., Eriksson, J. & Fowler, C. J. Inhibition of the cellular uptake of anandamide by genistein and its analogue daidzein in cells with different levels of fatty acid amide hydrolase-driven uptake. *Br. J. Pharmacol.* **152**, 744–750 (2007).
311. Oliveira, C. A., Kashman, Y. & Mantovani, B. Effects of latrunculin A on immunological phagocytosis and macrophage spreading-associated changes in the F-actin/G-actin content of the cells. *Chem. Biol. Interact.* **100**, 141–153 (1996).
312. steve. What factors influence actin filament length and treadmilling. *MBInfo* <https://www.mechanobio.info/cytoskeleton-dynamics/what-is-the-cytoskeleton/what-are-actin-filaments/what-factors-influence-actin-filament-length-and-treadmilling/>.
313. Park, J.-K. *et al.* Cellular distribution of injected PLGA-nanoparticles in the liver. *Nanomedicine* **12**, 1365–1374 (2016).
314. Zhang, Y., Kohler, N. & Zhang, M. Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake. *Biomaterials* **23**, 1553–1561 (2002).
315. Xie, J., Xu, C., Kohler, N., Hou, Y. & Sun, S. Controlled PEGylation of Monodisperse Fe₃O₄ Nanoparticles for Reduced Non-Specific Uptake by Macrophage Cells. *Advanced Materials* **19**, 3163–3166 (2007).
316. Daou, T. J., Li, L., Reiss, P., Josserand, V. & Texier, I. Effect of Poly(ethylene glycol) Length on the in Vivo Behavior of Coated Quantum Dots. *Langmuir* **25**, 3040–3044 (2009).

317. Lipka, J. *et al.* Biodistribution of PEG-modified gold nanoparticles following intratracheal instillation and intravenous injection. *Biomaterials* **31**, 6574–6581 (2010).
318. Albanese, A., Sykes, E. A. & Chan, W. C. W. Rough around the edges: the inflammatory response of microglial cells to spiky nanoparticles. *ACS Nano* **4**, 2490–2493 (2010).
319. Gilleron, J. *et al.* Image-based analysis of lipid nanoparticle-mediated siRNA delivery, intracellular trafficking and endosomal escape. *Nat. Biotechnol.* **31**, 638–646 (2013).
320. Zhao, J. & Stenzel, M. H. Entry of nanoparticles into cells: the importance of nanoparticle properties. *Polym. Chem.* **9**, 259–272 (2018).
321. Fröhlich, E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *Int J Nanomedicine* **7**, 5577–5591 (2012).
322. Marion, M.-J., Hantz, O. & Durantel, D. The HepaRG cell line: biological properties and relevance as a tool for cell biology, drug metabolism, and virology studies. *Methods Mol. Biol.* **640**, 261–272 (2010).
323. Martínez, R. *et al.* Chapter 2 - Nanoparticle behavior and stability in biological environments. in *Nanoparticles for Biomedical Applications* (eds. Chung, E. J., Leon, L. & Rinaldi, C.) 5–18 (Elsevier, 2020). doi:10.1016/B978-0-12-816662-8.00002-3.

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques et codes des polymères et NPs étudiés.	135
Tableau 2 : Les différentes valeurs d'IC ₅₀ , pourcentages molaires de P ₄ -t-Bu et le pourcentage de cellules ayant internalisées des NPs, obtenues suite à l'incubation des cellules HepaRG progénitrices avec les différentes NPs pour 48h.	136

Liste des Figures

Figure 1 : Différence entre taille nanométrique et taille micrométrique ¹⁶	3
Figure 2 : Nanomatériaux avec différentes morphologies : (A) NPs nanoporeuses à base de Pd (Pd) ^{24,25} , copyright Zhang et al. ; license Springer, 2012, (B) Nanofeuilles à base de graphène (2d) ²⁶ , copyright 2012, Springer Nature, (C), Nanotiges à base d'Ag (1d) ²⁷ , copyright 2011, American Chemical Society, (D) Nanofibres de Poly(oxyde d'éthylène) assemblées par « jet spinning » , reproduit d'après Nanoletters 2010 (E) Nanotiges oursins à base de ZnO, reproduites à partir de Gokarna et al. 2014 ²⁸ , (F) Réseau de nanofils à base de WO ₃ (3d) ²⁹ , copyright 2005 Wiley-VCH.....	5
Figure 3 : Représentation schématique des différents types de NPs utilisées en médecine ⁸ ...	8
Figure 4 : Illustration schématique des NPs inorganiques les plus utilisées ⁴³	8
Figure 5 : Illustration schématique des six différents types de conjugués vecteurs-médicaments ⁴⁹	9
Figure 6 : Représentation schématique du brentuximab. Cit-val : liaison Citrulline-valine ; chlgc1-Cys-Sh : Igg1 ⁵²	10
Figure 7 : Différentes NPs lipidiques utilisées en médecine. Les NPs lipidiques solides sont abrégées “SLN” pour Solid Lipid NPs ; les vecteurs lipidiques nanostructurés sont abrégés “NLC” pour nanostructured lipid carrier ⁵⁴	11
Figure 8 : Illustration schématique de la structure d'un liposome ⁵⁵	11
Figure 9 : Différentes formes de NPs polymères utilisées en médecine ⁵⁴	12
Figure 10 : Structure des micelles polymères représentatives du groupe de NPs auto-assemblées ⁶³	13
Figure 11 : Structures des NPs polymères. A : nanosphères polymères ; B : nanocapsules polymères ⁶⁶	14
Figure 12 : Représentation schématique de la variété de VNPs utilisées actuellement en nanomédecine ⁶⁸ . Nous citons : les virus icosaédriques des plantes comme le virus de la mosaïque de brome (Brome mosaic virus) [BMV], le “virus de la mosaïque de niébé (Cowpea chlorotic mottle virus) [CCMV]”, le “Cowpea mosaic virus (CPMV)”, le “Hibiscus chlorotic ringspot virus (HCRSV), le “ Red clover necrotic mottle virus (RCNMV). Nous citons aussi les bactériophages icosaédriques : le MS2 et le Q β et le phage M13. Les virus des plantes en bâtonnet : le “Potato virus X (PVX)” et le “Tobacco mosaic virus (TMV)” ⁶⁸	15
Figure 13 : Les trois domaines principaux des applications de la nanomédecine ³⁶	16

Figure 14 : Illustration schématique des GNPs-CNA35 et leurs applications dans l'imagerie du myocarde et de ses vaisseaux sanguins ⁷⁴ .	17
Figure 15 : A : Représentation schématique de la préparation du biosenseur. B : Illustration schématique de la récupération de la fluorescence des QDs ⁷⁷ .	19
Figure 16 : Schéma représentant le processus de transfert de gènes via des NPs ⁸⁰ .	20
Figure 17 : Illustration schématique de la capacité des NPs à traverser la barrière hémato-encéphalique ⁹³ .	23
Figure 18 : Les différentes étapes de développement de la tumeur ⁹⁹ .	25
Figure 19 : Le système BCLC de détermination du stade de la maladie et de la stratégie thérapeutique. * Les patients à un stade très précoce (stade 0) sont considérés les premiers candidats pour une ablation s'il n'y a pas de contre-indications pour une transplantation de foie. DDLT, deceased donor liver transplantation (Transplantation de foie de donneur décédé); ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group (Groupe d'oncologie coopérative de l'Est) ; LDLT, living donor liver transplantation (Transplantation de foie de donneur vivant) ; M1, M1 metastasis (métastases M1); N1, N1 lymph node (ganglion lymphatique); OS, overall survival (survie globale). ‡ Les patients classés Child-Pugh (class A) doivent être les premiers candidats pour une transplantation de foie. § Migration au stade du traitement (considère le prochain traitement efficace dans l'algorithme quand les thérapie précédentes échouent) ^{104, 107} .	27
Figure 20 : Agents de chimio thérapie conventionnels de faible masse molaire vs nanomédecine basée sur l'effet EPR ¹⁰⁹ .	28
Figure 21 : Vascularisation normale vs vascularisation tumorale. A : représentation schématique d'une vascularisation normale qui a lieu systématiquement sans refoulement de sang. B : représentation schématique d'une vascularisation anormale montrant des signes d'impasses et de refoulement de sang. Le changement de couleur représente le degré d'oxygénation du sang à l'intérieur des vaisseaux sanguins. Ce changement montre une diminution graduelle du niveau d'oxygène. Toutefois, des changements erratiques dans le degré d'oxygénation du sang sont souvent observés dans les vaisseaux sanguins anormaux. Dans ces vaisseaux plusieurs régions montrent une augmentation et une diminution graduelle du niveau d'oxygène indiquant des refoulements possibles et une insuffisance de transport d'oxygène au tissu tumoral ¹²⁷ .	31
Figure 22 : Démonstration schématique de l'effet EPR ¹³⁴ .	32
Figure 23 : Représentation schématique de la structure du liposome PEGylé encapsulant la doxorubicine (Doxil®). Les pentagones jaunes représentent les molécules de doxorubicine	

encapsulées dans le cœur hydrophile du liposome protégé par le methoxy-poly(éthylène glycol). ¹³⁵	32
Figure 24 : Concept du ciblage thérapeutique actif représenté par Liyanage . et al. (2019) ⁸² .	33
Figure 25 : Illustration schématique du mécanisme d’internalisation de NPs dans le cas du ciblage thérapeutique actif. (A) ligands sur les nanoparticules ; (B) début de l’internalisation du complexe NPs-récepteur par le mécanisme d’endocytose médiée par un récepteur et le transport vésiculaire par des endosomes. (C) Nanoparticule internalisée dans la cellule et commençant à libérer sa charge dans la cellule ciblée ¹³⁹	34
Figure 26 : Illustration schématique des eTmab-PPLNs et leur captation cellulaire. “eTmab-PPLNs” indiquent les NPs (PPLNs) [PLGA/PEI/lipid nanoparticles] conjuguées électrostatiquement au Trastuzumab. PLGA : Poly(D,L-acide lactique-co-acide glycolique). DTX (Docetaxel). PEI: poly(éthylène-imine). Tmab :Trastuzumab. Egg-PC: phosphatidylcholine issue des œufs de poulet ¹²³	35
Figure 27 : Ciblage thérapeutique de la tumeur par des systèmes de vectorisation sensibles aux stimuli. A : circulation des nanovecteurs dans le sang. B : en arrivant à la tumeur les nanovecteurs subissent l’effet d’un stimulus lié souvent au microenvironnement tumoral (Hypoxie, acidose, hyperthermie...). C : le stimulus entraîne la dégradation du nanovecteur et donc la libération du médicament encapsulé.....	36
Figure 28 : Caractéristiques du microenvironnement tumoral ^{146,147}	37
Figure 29 : Illustration de la structure du polymère utilisé pour préparer les CC-NPs.....	37
Figure 30 : Illustration schématique de la performance des NPs réticulées et charge-convertibles (CC-NPs) dans la circulation sanguine systémique ¹⁴⁹	38
Figure 31 : Illustration schématique de l’opsonisation et de la phagocytose des NPs ¹⁵⁰	39
Figure 32 : Illustration schématique des effets toxiques majeurs qui peuvent être induits par un sous-ensemble de NPs. Ces effets peuvent être représentés au niveau moléculaire, cellulaire ou tissulaire ¹⁵⁹	41
Figure 33 : Le processus d’activation de l’inflammasome ¹⁶⁵	43
Figure 34 : Représentation schématique de l’influence des NPs ZnO sur l’homéostasie cellulaire et leur activation de la voie de signalisation de stress au niveau du réticulum endoplasmique (endoplasmic reticulum) [ER] ¹⁷⁴	45
Figure 35 : Schéma des voies de clairance des NPs. Les flèches pleines indiquent les interactions les plus probables, les flèches en pointillés indiquent une interaction possible ¹⁷⁶	46

Figure 36 : Représentation schématique du trajet de l'anticorps ou du fragment de l'anticorps après administration ¹⁸³ .	48
Figure 37 : Représentation schématique de la tumeur et du microenvironnement tumoral ¹⁸⁷ .	49
Figure 38 : Illustration schématique représentant l'ensemble des facteurs liés au microenvironnement tumoral qui forme des barrières contre l'entrée des NPs. ECM : Extracellular Matrix. IFP : Interstitial fluid pressure ¹⁹⁸ .	51
Figure 39 : (A) Les cinq étapes du CAPIR dans la libération ciblée de principe(s) actif(s). (B) Les propriétés requises pour qu'une nanomédecine soit capable d'accomplir les cinq étapes de la cascades CAPIR ¹⁹⁹ .	52
Figure 40 : Ensemble de barrières biologiques limitant le ciblage thérapeutique par les NPs. MDR : Multi-drug resistance ⁵ .	53
Figure 41 : Illustration schématique de l'effet de l'opsonisation et de son inhibition par le PEG in vivo ²⁰³ .	54
Figure 42 : Structure du PMLA.	57
Figure 43 : Structure des alkylmalolactonate	57
Figure 44: Structure du modèle de « prodrogue » macromoléculaire de Ringsdorf ²¹⁹ .	58
Figure 45: Structure des Polycefim TM .	59
Figure 46 : Structure de la nanoplateforme de synthèse ayant des propriétés facteurs de croissance des fibroblastes ^{231, 232, 253} .	63
Figure 47 : Structure cœur/couronne des nanoplateformes.	64
Figure 48 : Structure of PLGA.	65
Figure 49 : Structure des PMLABe, PMLAiPr, PMLAnHe, PMLAHe et P(MLA-co-MLAHe).	71
Figure 50 : Structure des copolymères à bloc amphiphiles : PMLA ₄₃ -b-poly(malate de butyle) ₇ , PMLA ₄₃ -b-poly(malate de butyle) ₁₀ et PMLA ₈₃ -b-poly(malate de butyle) ₁₄ .	73
Figure 51 : Structure des PMABe ₆₈ , PEG ₄₂ -b-PMLABe ₆₈ et Biot-PEG ₆₂ -b-PMLABe ₇₅ .	74
Figure 52 : Structure de l'assemblage Peptide-Biot-Strep-Biot-NPs.	75
Figure 53 : Cellules HepaRG : des progénitrices bipotentes se différenciant en hépatocytes & cholangiocytes.	82
Figure 54 : Macrophages humains différenciés à partir de monocytes CD44+ .	82
Figure 55 : Synthèse du malate de benzyle.	83
Figure 56 : Synthèse enzymatique du PMLABe P4, P5, P6 et P7 et du PEG ₁₇ -b-PMLABe ₄₅ P8.	85
Figure 57 : Synthèse des monomères diMeMLABe et diMeMLAHe.	89

Figure 58: Illustration schématique du test de viabilité cellulaire “ATP”	92
Figure 59: Illustration schématique du protocole expérimental suivi pour évaluer la captation de NPs par cytométrie en flux.	93
Figure 60 : A : Histogrammes représentant la moyenne de fluorescence pour l’ensemble des cellules (gauche), et le pourcentage des cellules positives (droite) suite à l’incubation des HepaRG progénitrices et des macrophages humains avec les différents types de NPs. B : Tableau représentant les différents types de NPs préparées et leurs caractéristiques physicochimiques (Polymères d’origine, diamètre hydrodynamique, indice de polydispersité, et mode de synthèse).	101
Figure 61 : A. Progression des cellules de la lignée HepaRG à différents stades. Au jour 1, cellules progénitrices proliférantes. Au Jour 6, les cellules atteignent la confluence et arrêtent de proliférer par inhibition de contact. Au Jour 14, les cellules commencent à engager la différenciation. A ce stade, la culture est soit repiquée etensemencée à faible densité, soit 2% de DMSO sont ajoutés dans le milieu de culture pour potentialiser la différenciation. Au bout de 14 jours de culture supplémentaires, les cellules atteignent leur niveau de différenciation maximal (Jour 31); B. Immunoblot montrant l’évolution de l’expression protéique de fonctions spécifiques de l’hépatocyte entre le jour 1 et le jour 31.	103
Figure 62 : Schéma expérimental de l’exposition des cellules HepaRG aux NPs pendant les 30 jours de culture. Les cellules ont été exposées à 7 traitements réitérés, 4 pendant les 2 premières semaines et 3 pendant les 2 dernières lors de la potentialisation de leur différenciation par le DMSO à 2%. Les traitements ont été réalisés en ajoutant des NPs en nombre variable pour obtenir une concentration finale en polymère de 1µM. Les analyses ont consisté à réaliser un test de viabilité au MTT à différents temps et à extraire des ARN totaux à 3 temps (jours 7, 14 et 27) afin d’analyser l’impact sur la différenciation par l’étude de marqueurs géniques.	104
Figure 63 : RT-qPCR évaluant l’impact sur la différenciation des cellules HepaRG par l’étude de marqueurs géniques des fonctions hépatocytaires. Les traitements ont été réalisés en ajoutant des NPs en nombre variable pour obtenir une concentration finale en polymère de 1µM. Les analyses ont consisté à déterminer l’expression relative des différents gènes ramenée à la condition contrôle (cellules non exposées au NPs) au temps jour 7 (cellules proliférantes). L’analyse en qPCR a été réalisée aux temps 7, 14 (cellules confluentes quiescentes) et 30 jours (cellules différenciées).	105
Figure 64 : Protocole suivi pour la réalisation des cinétiques de captation de NPs par les cellules HepaRG progénitrices et les macrophages humains.	108

Figure 65 : Illustration schématique expliquant le déplacement du signal fourni par cytométrie en flux de la zone négative M1 à la zone positive M2 suite au traitement par les NPs fluorescentes.....	109
Figure 66 : Captation des NPs PMLABe et des NPs PEG-b-PMLABe par des HepaRG progénitrices (gauche) et des macrophages humains (droite). Les cellules HepaRG ont été incubées avec les NPs pendant 24h, et les macrophages ont été incubés avec les NPs pendant 8h. Les digrammes en battons représentent le % des cellules positives (ayant capté les NPs) tandis que la partie inférieure représente la moyenne de fluorescence reflétant l'accumulation intracellulaire des NPs.....	110
Figure 67 : Illustration schématique de la préparation de NPs à base de PMLABe ayant différents pourcentages de PEG en surface.....	111
Figure 68 : Effet du % de PEG sur la captation des NPs par des HepaRG progénitrices. Les cellules ont été traitées par des NPs ayant des pourcentages différents de PEG (0%, 25%, 50%, 100%). La partie supérieure de la figure présente les histogrammes représentant le % des cellules positives tandis que la partie inférieure représente la moyenne de fluorescence reflétant l'accumulation intracellulaire des NPs. La partie gauche de la figure représentent les expériences réalisées en absence de sérum de veau fœtal (-FCS) dans le milieu de culture des cellules traitées, tandis que la partie droite représente les expériences faites en présence de SVF (+FCS) dans le milieu de culture.....	112
Figure 69 : Effet du % de PEG sur la captation des NPs par des macrophages humains issus de quatre donneurs différents. Les cellules ont été traitées par des NPs ayant des pourcentages différents de PEG (0%, 25%, 50%, 100%). Les colonnes 1 et 3 de la figure contiennent les histogrammes représentant le % des cellules positives tandis que les colonnes 2 et 4 représentent la moyenne de fluorescence (en Fold change) reflétant l'accumulation intracellulaire des NPs. La partie gauche de la figure représente les expériences réalisées en absence de sérum de veau fœtal (SVF) dans le milieu de culture des cellules traitées,	113
Figure 70 : Graphes représentant le nombre de cellules en fonction de l'intensité de fluorescence suite au traitement par les NPs PMLABe, dans le cas des cellules HepaRG (à 0h, 24h et 48h) et les macrophages humains (à 0h, 8h, 24h) soit en présence soit en absence de sérum de veau fœtal (SVF).....	115
Figure 71 : Graphes représentant le nombre de cellules en fonction de l'intensité de fluorescence suite au traitement par les NPs PEG-b-PMLABe, dans le cas des cellules HepaRG (à 0h, 24h et 48h) et les macrophages humains (à 0h, 8h, 24h) soit en présence soit en absence de sérum de veau fœtal (SVF).	116

Figure 72 : Histogrammes représentant le nombre de cellules en fonction de l'intensité de fluorescence suite à l'incubation des macrophages humains soit avec des NPs PMLABe 0,1% DiDoil soit avec le mélange NPs 1% DiDoil - NPs vides (1 :9).....	117
Figure 73 : Schéma représentant le protocole expérimental suivi pour les différentes cinétiques de traitements réitérés.....	118
Figure 74 : Histogrammes représentant le nombre de cellules en fonction de l'intensité de fluorescence suite à l'incubation des macrophages humains avec soit, 0, 1, 2 ou 3 doses des NPs PMLABe 0,1wt% DiDoil.....	118
Figure 75 : Evaluation de la viabilité cellulaire des macrophages humains issus d'un donneur (n=1) sur une période de 168h sans exposition (0) ou après expositions 1, 2 ou 3 fois à des NPs PMLABe. La viabilité cellulaire est mesurée par le contenu relatif en ATP rapporté aux cultures contrôles non traitées.....	119
Figure 76 : Graphes représentant les moyennes de fluorescence de macrophages issus de deux donneurs différents suite à des traitements réitérés par des NPs PMLABe 0,1 wt% DiDoil appliqués aux temps 0, 48 et 96 heures.....	120
Figure 77 : Evaluation de la viabilité cellulaire des cellules HepaRG sur une période de 144h sans exposition (0) ou après expositions 1 ou 2 à des NPs PMLABe et PEG-b- PMLABe. La viabilité cellulaire est mesurée par le contenu relatif en ATP rapporté aux cultures contrôles non traitées.....	120
Figure 78 : Graphes représentant les moyennes de fluorescence de macrophages issus de deux donneurs différents suite à des traitements réitérés par des NPs PMLABe 0,1 wt% DiDoil appliqués aux temps 0, 48 et 96 heures.....	121
Figure 79 : A : Détection des NPs PMLABe dans des macrophages humains en utilisant la technique de microscopie à réfraction à deux temps séparés de quelques secondes (A et B) et en microscopie confocale en projection orthogonale (C, D). Le bleu représente les noyaux des cellules marquées par le Hoechst et le rouge représente les NPs marquées par le fluorochrome DiDoil.....	122
Figure 80 : A : Détection des NPs PMLABe dans des cellules HepaRG en utilisant la technique de microscopie à réfraction (A). Le rouge représente les NPs marquées par le fluorochrome DiDoil. Détection des NPs PMLABe biotinylées dans des cellules HepaRG par microscopie électronique à transmission. Les NPs biotinylées ont été détectées par de la streptavidine couplée à la peroxydase et l'utilisation du substrat formant un précipité brun/noir, la diaminobenzidine. Les grains noirs représentent les NPs internalisées par les cellules.....	123

Figure 81 : Inhibition de l'endocytose médiée par la clathrine sous l'effet de la chlorpromazine 309	123
Figure 82 : Inhibition de la polymérisation d'actine par la latrunculine A ³¹²	124
Figure 83 : A gauche, graphes illustrant la moyenne de fluorescence (en % par rapport au control (-I) des cellules HepaRG incubées avec des NPs PMLABe 1wt% DiDoil pendant 4h en présence soit d'inhibiteurs de phagocytose (Latrunculine) ou d'endocytose (Chlorpromazine et Génistéine) à des différentes concentrations. Condition sans inhibiteur (-I). A droite, les résultats des tests ATP de viabilité cellulaire réalisés suite à l'incubation des cellules HepaRG progénitrices avec les différentes concentrations d'inhibiteurs.	124
Figure 84 : A gauche, graphes illustrant la moyenne de fluorescence (en % par rapport au control (-I) des macrophages incubées avec des NPs PMLABe 1wt% DiDoil pendant 4h en présence soit d'inhibiteurs de phagocytose (Latrunculine) ou d'endocytose (Chlorpromazine et Génistéine) à des différentes concentrations. Condition sans inhibiteur (-I). A droite, les résultats des tests ATP de viabilité cellulaire réalisés suite à l'incubation des macrophages avec les différentes concentrations d'inhibiteurs.....	125
Figure 85 : Visualisation des NPs par microscopie confocale en absence (CTRL+NP) ou en présence d'inhibiteurs de phagocytose (Latrunculine, 500 nM) ou d'endocytose (Chlorpromazine à 50µM, et Génistéine à 250µM). Le bleu représente les noyaux des cellules marquées par le Hoechst et le rouge représente les NPs marquées par le fluorochrome DiDoil.	126
Figure 86 : Facteurs liés aux NPs et influençant le mécanisme d'internalisation des NPs ³²⁰	130

Nanoparticules à base de dérivés du poly(acide malique) : Evaluation de la captation et de la toxicité sur les cellules d'hépatome HepaRG et les macrophages humains

Mots clés : Nanoparticules, Poly(acide malique), HepaRG, Macrophages, Cytotoxicité, Captation

Résumé : Le poly(acide malique) et ses dérivés sont des polymères aux propriétés de biocompatibilité et de bio(dégradabilité) remarquables, qui en font des candidats de choix pour l'élaboration de systèmes de vectorisation de principes actifs. Une première partie de ce doctorat a été consacrée à l'évaluation de la biocompatibilité et de la captation de nanoparticules (NPs) fluorescentes formées à partir de poly(malate de benzyle) (PMLABe) obtenus par polymérisation soit chimique soit enzymatique du malolactonate de benzyle par des cellules hépatiques HepaRG et des macrophages humains primaires. .

Toutes les NPs sont peu toxiques, mais les niveaux de captation par les cellules HepaRG et les macrophages varient considérablement en fonction des caractéristiques physico-chimiques des NPs. Un second objectif était d'évaluer l'influence du taux de PEGylation de NPs à base de PMLABe et de PEG-*b*-PMLABe sur leur captation cellulaire. Enfin, nous avons évalué la biocompatibilité et la captation de NPs à base de dérivés hydrophobes et amphiphiles du poly(acide diméthylmalique) : les niveaux de toxicité et d'internalisation semblent être relatifs aux caractéristiques physico-chimiques des NPs.

Nanoparticles based on poly(malic acid) derivatives: Evaluation of the uptake and toxicity on HepaRG hepatoma cells and human macrophages.

Keywords : Nanoparticles, Poly(malic acid), HepaRG, Macrophages, Cytotoxicity, Uptake

Abstract : Poly(malic acid) and its derivatives are polymers with outstanding biocompatibility and bio(degradability) properties, which make them promising candidates for the development of drug delivery systems. The first part of this thesis was devoted to the evaluation of the biocompatibility and the uptake of fluorescent nanoparticles (NPs) formed from poly(benzyl malate) (PMLABe), obtained by either chemical or enzymatic polymerization of benzyl malolactonate, by HepaRG hepatoma cells and primary human macrophages.

All NPs are not very toxic, but the levels of uptake by HepaRG cells and macrophages vary considerably depending on the physicochemical characteristics of NPs. A second objective was to evaluate the influence of the PEGylation rate of NPs based on PMLABe and PEG-*b*-PMLABe on their cell uptake. Finally, we evaluated the biocompatibility and the internalization of NPs based on hydrophobic and amphiphilic derivatives of poly(dimethylmalic acid): the levels of toxicity and internalization seem to be depending on the physicochemical characteristics of NPs.