



HAL
open science

Nouvelles stratégies thérapeutiques localisées et capables d'inhiber la 6-O-méthylguanine-ADN-méthyltransférase (MGMT) pour améliorer la prise en charge post-résection du glioblastome

Marion Sicot

► To cite this version:

Marion Sicot. Nouvelles stratégies thérapeutiques localisées et capables d'inhiber la 6-O-méthylguanine-ADN-méthyltransférase (MGMT) pour améliorer la prise en charge post-résection du glioblastome. Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers, 2023. Français. NNT : 2023ANGE0033 . tel-04470747

HAL Id: tel-04470747

<https://theses.hal.science/tel-04470747>

Submitted on 21 Feb 2024

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'UNIVERSITÉ D'ANGERS

SOUS LE SCEAU DE

LA COMUE ANGERS – LE MANS

ECOLE DOCTORALE N  605

Biologie-Santé

Spécialité : Sciences Pharmaceutiques

Par

Marion SICOT

Nouvelles stratégies thérapeutiques localisées et capables d'inhiber la 6-O-méthylguanine-ADN-méthyltransférase (MGMT) pour améliorer la prise en charge post-résection du glioblastome

Thèse présentée et soutenue à Angers, le 16 novembre 2023

Unité de recherche : Micro et Nanom decines Translationnelles, INSERM 1066 - CNRS 6021, UNIV Angers

Rapporteurs avant soutenance :

Pr. Aurélie Malzert-Fréon
Pr. Yann Corvis

Professeure, HDR, Université de Caen Normandie
Professeur, HDR, Université Paris Cité

Composition du Jury :

Présidente : Dr. Julie Gavard
Examineur.rice.s : Pr. Aurélie Malzert-Fréon
Pr. Yann Corvis
Dir. de thèse : Dr Guillaume Bastiat

Directrice de Recherche 1 CNRS, HDR, Nantes Université
Professeure, HDR, Université de Caen Normandie
Professeur, HDR, Université Paris Cité
Maître de Conférences des Universités, HDR, Université d'Angers

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



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

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

Ces conditions d'utilisation (attribution, pas d'utilisation commerciale, pas de modification) sont symbolisées par les icônes positionnées en pied de page.



Je voudrais tout d'abord remercier les membres du jury, Pr Aurélie Malzert-Fréon, Dr Julie Gavard et Pr Yohann Corvis. Je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers chacun d'entre vous pour avoir accepté de faire partie du jury de ma thèse et vous remercie pour l'attention particulière que vous avez portée à ma thèse et pour le temps que vous avez consacré à l'évaluation de mon travail.

Je tiens aussi à remercier mon directeur de thèse, Dr Guillaume Bastiat, pour sa précieuse guidance au cours de ces trois dernières années. Ton dévouement à ma réussite académique et professionnelle a été tout simplement exceptionnel. Ton soutien constant et ta foi en mes capacités m'ont permis de développer mes compétences en recherche, mais m'ont aussi inculqué une confiance en moi qui s'étend au-delà du monde académique. Les voyages que tu m'as permis de faire dans le cadre de ma recherche resteront parmi les expériences les plus enrichissantes de ma vie. Enfin, je tiens à te remercier pour ta patience, ta disponibilité et ton soutien indéfectible, même dans les moments les plus exigeants de ma thèse. Je suis profondément reconnaissante d'avoir eu la chance de travailler avec toi.

Je tiens à prendre un moment pour exprimer ma sincère gratitude envers chacun des membres du laboratoire pour l'expérience enrichissante que j'ai eue en travaillant avec vous. Mon parcours au laboratoire a été marqué par des moments inoubliables et des rencontres précieuses. Un grand merci à Isabelle. Les moments que j'ai passés à travailler à tes côtés ont été très sympathiques. Ton enthousiasme contagieux a rendu chaque jour au laboratoire un peu meilleur. J'apprécie sincèrement nos échanges les souvenirs que nous avons partagés. Marie et Alexandre, votre réactivité et votre professionnalisme ont été remarquables. Même à l'autre bout du monde, vous avez toujours été là pour résoudre les problèmes et faciliter les choses. Nolwenn et David, je tiens à m'excuser pour toutes les péripéties que nous avons traversées avec l'UPLC, mais je vous suis reconnaissante pour votre patience et votre collaboration. J'adresse également mes remerciements à tous les doctorants actuels et passés du laboratoire. Je vous souhaite à tous le meilleur dans vos projets futurs et j'espère que nos chemins se croiseront à nouveau.

Je tiens aussi à adresser un merci tout particulier à Adélie, Sam, Audrey, Sébastien et Pierre. Merci pour tous les bons moments que nous avons partagés au cours de mon séjour au laboratoire. Les discussions passionnantes, les rires partagés et les verres levés resteront des souvenirs précieux pour moi. Adélie et Sébastien, je vous souhaite tout le courage et la détermination nécessaires, ce sera bientôt votre tour mais je suis convaincue que vous vous en sortirez très bien !

Un grand merci à mes amis pour tous les moments que nous avons partagés ensemble au fil des années. Les week-ends, les soirées, les aventures et les souvenirs que nous avons créés resteront gravés dans ma mémoire pour toujours. Alexia, Louisa, Teddy, Tom, Justine, Simon, Élise, Sandy, Joris, Thomas, Céline, Kory et Hugues, vous êtes une source constante de joie, de soutien et d'amitié. Vos rires, vos conversations et votre présence chaleureuse ont été très importants. A très vite pour fêter ça !

Enfin je voudrais aussi remercier ma famille pour le soutien inestimable que vous m'avez apporté tout au long de ma vie, en particulier pendant mon parcours académique. Vous êtes une source constante de force, d'inspiration et d'amour, et je ne saurais exprimer à quel point je suis reconnaissante. Julie, ta joie de vivre est contagieuse et ton épanouissement me remplit de fierté. Tu es devenue une personne extraordinaire, et je suis extrêmement heureuse de voir tout ce que tu as accompli. Je te félicite pour ton parcours et je te souhaite le meilleur dans tout ce que tu entreprends. Papa, nos discussions, parfois scientifiques et parfois non, ont été des moments précieux pour moi. Ta présence et ton soutien ont été inestimables. Merci d'avoir été toujours là pour moi. Maman, merci de toujours répondre présente quand j'en ai besoin. Je suis éternellement admirative de ton courage et de ta résilience qui resteront un modèle pour moi. On fête aussi cette année la fin officielle d'une sacrée épreuve, la suite ne peut maintenant qu'être exceptionnelle, et je suis impatiente de vivre de nouveaux moments spéciaux avec vous. Enfin, je tiens à vous dire que je vous aime tous profondément. Votre amour et votre soutien sont le pilier de ma vie.

Un tout dernier merci à Lucas. Merci du fond du cœur d'être là. Ta présence, ton amour et ta bienveillance sont des éléments essentiels pour moi, et je ne saurais exprimer à quel point je suis reconnaissante de t'avoir à mes côtés. Encore une fois, merci pour tout ce que tu fais et d'être la personne que tu es.

Sommaire

AVANT-PROPOS	5
CHAPITRE 1 : Glioblastome, thérapies localisées et objectifs de la thèse.....	7
CHAPITRE 2 : Nouvelle architecture d'hydrogels de nanocapsules lipidiques : la réticulation par liaison covalente	35
CHAPITRE 3 : 6-O-méthylguanine-ADN-méthyltransférase : son rôle essentiel mais ambivalent, et son inhibition	63
CHAPITRE 4 : Hydrogel de nanoparticules inhibant la 6-O-méthylguanine-ADN-méthyltransférase comme implant post-opératoire dans la prise en charge du glioblastome – les premiers essais	93
CHAPITRE 5 : Nanoprécipités d'acide ursolique pour la sensibilisation des cellules de glioblastome résistantes au temozolomide	125
CHAPITRE 6 : Pistes d'amélioration des nanoprecipites d'acide ursolique pour la prise en charge des patients atteints de glioblastome résistant au temozolomide : le ciblage et le dépôt local.....	157
DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	193

Avant-propos

Le glioblastome (GBM) est la forme la plus agressive et mortelle des tumeurs cérébrales primaires chez les adultes, classée comme une tumeur de gliome de grade IV par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Il représente la moitié des tumeurs malignes du système nerveux central, avec une incidence relativement faible d'environ 3,23 cas pour 100 000 personnes. Le GBM est caractérisé par une croissance rapide, une forte migration cellulaire, une plasticité, une infiltration et une hétérogénéité inter-patient, ce qui limite considérablement les options de traitement. Malgré des avancées dans les traitements tels que la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie, la médiane de survie des patients atteints de GBM est très limitée, d'environ 8 mois qui s'étend à seulement 15 mois avec le protocole thérapeutique actuel. Les cellules tumorales ont la capacité de développer une résistance aux médicaments, ce qui limite l'efficacité des traitements et peut entraîner des rechutes. C'est le cas par exemple de la résistance au témozolomide (TMZ) induite par une trop forte expression de la 6-O-méthylguanine-ADN méthyltransférase (MGMT) et qui concerne environ la moitié des patients. De plus, le GBM est situé dans le cerveau, et le franchissement de la barrière hémato-encéphalique (BHE) pour la plupart des traitements cliniques est difficile. Cette maladie représente donc un défi majeur en neuro-oncologie.

Ce projet de recherche vise à élaborer une technologie de type hydrogel implantable destinée à répondre aux besoins thérapeutiques durant la période critique de 4 à 6 semaines qui s'écoule entre la résection chirurgicale et le début du protocole standard de traitement. L'innovation centrale de ce projet réside dans l'administration d'implants hydrogel contenant des molécules actives directement dans la cavité de résection pendant l'intervention chirurgicale. Ces hydrogels ont pour objectif d'améliorer la sensibilité des patients aux agents de chimiothérapie actuellement utilisés et de freiner la croissance des cellules résiduelles autour de la zone de résection. Ils seront développés de manière à permettre un contrôle précis des taux de libération des molécules actives, que ces molécules soient des agents chimiothérapeutiques ou, comme dans ce cas, des inhibiteurs de la MGMT visant à rendre les patients plus réceptifs au TMZ malgré leur résistance antérieure.

Le **Chapitre 1** de ces travaux s'intéressera au GBM dans sa généralité, aux difficultés rencontrées lors de l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques et aux solutions que peuvent apporter les applications locales telles que des hydrogels. C'est dans ce contexte que des formulations d'hydrogels sans polymère, uniquement à base de nanocapsules lipidiques (NCLs), ont été récemment développées au laboratoire MINT - INSERM U1066 / CNRS 6021, pour le traitement local et la libération prolongée et dirigées contre le glioblastome. Les résultats prometteurs de ce projet porté Dr Guillaume Bastiat au laboratoire MINT - INSERM U1066 / CNRS 6021, également directeur de cette thèse, seront détaillés dans ce chapitre. Néanmoins plusieurs pistes d'amélioration de ces hydrogels sont envisageables, correspondant aux objectifs de ce travail de thèse, et seront présentés.

Partant de ce concept d'hydrogels à base de NCLs par association non covalente, nous avons dans un premier temps décidé d'explorer la formulation de réseaux tridimensionnels formés par l'association covalente des NCLs. Nous avons émis l'hypothèse que l'organisation covalente des nanoparticules pourrait former des architectures avec des caractéristiques attrayantes en matière de résistance mécanique. Le **Chapitre 2** présentera ces hydrogels de NCLs par liaison covalente avec des groupements thiol-maléimide. L'effet de la composition et de la concentration des NCLs, de la nature des agents de réticulation et du rapport molaire thiol/maléimide sur les propriétés viscoélastiques des hydrogels sera évalué. Les propriétés de diffusion au sein des hydrogels et leur taux de gonflement seront aussi analysés.

Une seconde piste d'amélioration des hydrogels de NCLs formulés par liaison non covalente pourrait être d'y incorporer des molécules actives. La réponse des patients atteints de GBM au protocole thérapeutique standard est en partie dépendante de leur taux d'expression de la MGMT. En effet, une expression trop importante de cette dernière entraîne l'annihilation des effets du témozolomide. C'est dans ce contexte que nous avons proposé d'améliorer ces hydrogels en y incorporant un inhibiteur de la MGMT. Le **Chapitre 3** présentera le mode d'action de la MGMT, les barrières que peuvent entraîner sa surexpression dans le traitement du GBM et les différents inhibiteurs disponibles pour y remédier.

Le **Chapitre 4** traitera du choix de l'inhibiteur : l'acide ursolique (AU), de la formulation de NCLs en suspension et d'hydrogels de NCLs contenant cet inhibiteur, des difficultés rencontrées quant à sa solubilité, sa libération à partir des hydrogels et de son activité d'inhibiteur de la MGMT sur des cellules de GBM.

Les obstacles rencontrés pour la formulation des NCLs contenant l'AU nous ont poussé à revoir notre formulation et à envisager des nanoparticules différentes : des nanoprecipités. Le **Chapitre 5** présentera ces nouveaux nano-objets, leur formulation, leur caractérisation, la mise au point d'une méthode de suivi de ces nanoprecipités et leur capacité à potentialiser les effets du TMZ.

L'amélioration de cette formulation de nanoprecipités a ensuite été envisagée par l'ajout d'un peptide de ciblage, le NFL-TBS.40-63 et les nanoprecipités ont été inclus dans des hydrogels thermosensibles. Ces résultats seront présentés dans le **Chapitre 6**, où les nanoprecipités modifiés et les hydrogels seront caractérisés, la libération des nanoprecipités à partir des hydrogels sera étudiée et leur cytotoxicité sera analysée *in vitro* sur des cellules de GBM.

Finalement, le dernier chapitre de **discussion générale** et de **perspectives** permettra d'examiner les résultats sous un angle plus large, de tirer des conclusions essentielles, et de proposer des orientations futures pour l'avancement du développement d'implants destinés à la prise en charge des patients atteints de GBM.



Chapitre 1

Glioblastome, thérapies localisées et objectifs de la thèse

Table des matières

LE GLIOBLASTOME	10
1. Classification et épidémiologie.....	10
2. Symptômes et diagnostic.....	11
3. Traitements	11
4. Obstacles au traitement.....	13
5. Stratégie locale.....	16
HYDROGELS	19
1. Hydrogels chargés en micelles polymère	19
2. Hydrogels chargés en nanoparticules polymère	20
3. Hydrogels chargés en nanoparticules magnétiques.....	20
4. Hydrogels chargés en liposomes	21
5. Hydrogels chargés en nanocapsules lipidiques.....	22
OBJECTIFS DE LA THESE	25
BIBLIOGRAPHIE	26

Le glioblastome

1. Classification et épidémiologie

Le glioblastome (GBM) est un des 120 types de tumeurs du système nerveux central et est classé au plus haut grade (IV) selon l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) [2]. Depuis 2021, la classification proposée par l'OMS a été actualisée et indique que le GBM doit avoir un gène de l'IDH sauvage (codant pour l'enzyme *isocitrate dehydrogenase*) avec : i) une prolifération microvasculaire ou ii) de la nécrose ou iii) une mutation du promoteur du gène TERT (codant pour l'enzyme *telomerase reverse transcriptase*) ou iv) une amplification du gène de l'EGFR (codant pour la protéine *epidermal growth factor receptor*) ou v) une altération du nombre de copies des chromosomes 7 et 10 [1,2]. Il s'agit de la tumeur cérébrale la plus commune chez l'adulte et elle représente environ 50% des tumeurs primaires malignes (figure 1-1) [1].

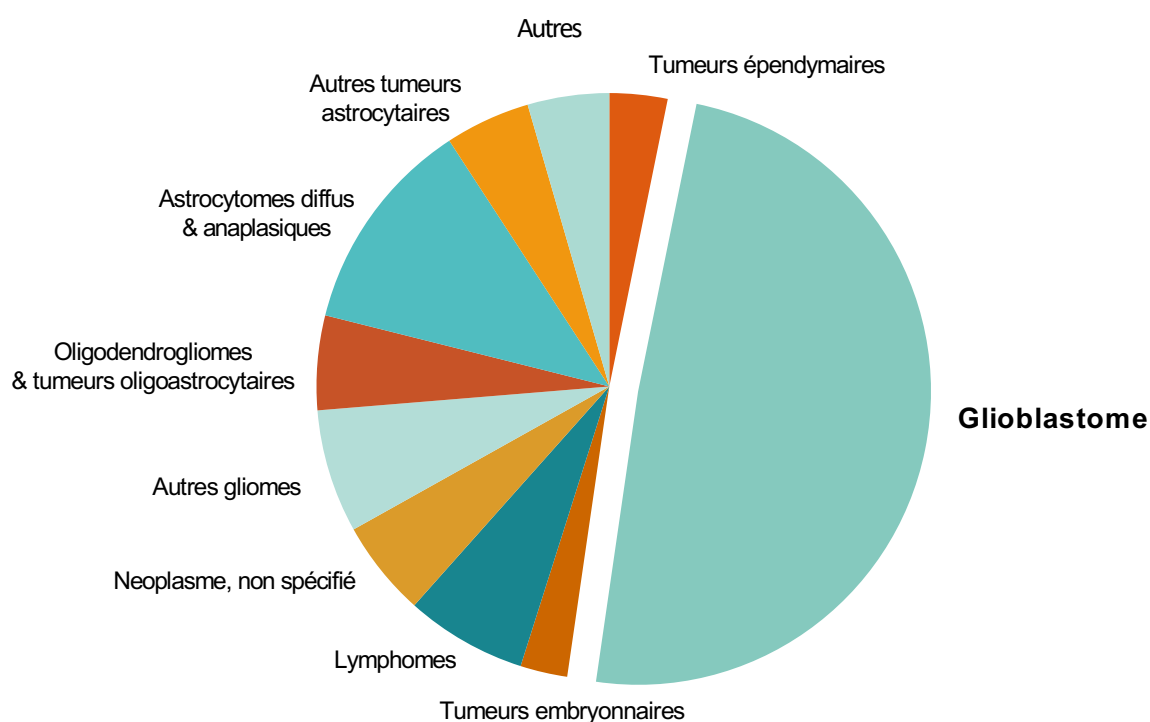


Figure 1-1. Le glioblastome représente 50% des tumeurs du système nerveux central. Distribution des tumeurs primaires malignes du système nerveux central effectuée par caractérisation histologique, *CBTRUS Statistical Report: US Cancer Statistics - NPCR and SEER, 2014–2018* (figure adaptée de Ostrom *et al.*, 2021 [1]).

Il existe deux sous-types de GBM. Le sous-type dit primaire apparaît plutôt chez le sujet âgé qui représente environ 90% des patients. Le sous-type dit secondaire apparaît à la suite de tumeurs astrocytaires de plus bas grade ou d'astrocytomes anaplasiques. Il représente environ 10% des personnes atteintes de GBM, avec une proportion plus importante de patients jeunes [3]. Peu d'éléments sont aujourd'hui considérés comme des causes pouvant entraîner le développement d'un GBM et seules les radiations ionisantes à faible dose sont

admises comme pouvant causer son apparition [4,5]. L'incidence du GBM est relativement faible (3,23 pour 100 000) [1] par rapport à d'autres cancers tels que le cancer du sein (environ 100 pour 100 000) ou de la prostate (environ 80 pour 100 000) [6]. Malgré sa faible incidence, le GBM reste encore aujourd'hui une des tumeurs les plus difficiles à traiter [7]. La médiane de survie pour les patients atteints de GBM (quel que soit le traitement) est de 8 mois aux Etats-Unis avec des taux de survie à 1, 5 et 10 ans autour de 43, 7 et 5%, respectivement, selon une étude statistique du *Central Brain Tumor Registry of the United States* (CBTRUS) menée entre 2014 et 2018 [1,8]. Des résultats similaires sont retrouvés en France métropolitaine en 2018 : les taux de survie à 1, 5 et 10 ans étaient respectivement de 56, 8 et 5% [9].

2. Symptômes et diagnostic

Les symptômes du GBM sont variés et sont généralement liés aux fonctions exécutées par les zones altérées du cerveau. Les symptômes les plus visibles tels que des troubles du langage ou de la vision par exemples, sont souvent associés à des tumeurs de plus petite taille se développant dans l'aire de Broca ou dans le lobe occipital. Lorsque d'autres zones du cerveau sont touchées, les symptômes comme des troubles de l'humeur, de la fatigue, des pertes de mémoire, etc., peuvent être plus difficiles à identifier comme étant principalement liés à un GBM. En général, ces symptômes sont associés à des tumeurs de plus grosse taille et sont plutôt retrouvées dans le lobe frontal ou temporal ainsi que dans le corps calleux. Il est également possible de retrouver des céphalées et des crises d'épilepsie dans le tableau clinique du GBM [7,10].

Le diagnostic du GBM est avant tout basé sur de l'imagerie médicale et en particulier l'imagerie à résonance magnétique (IRM), la tomodensitométrie (TDM) et la tomographie par émission de positons (TEP). L'IRM permet particulièrement de discriminer le GBM d'autres lésions cérébrales. Cependant l'imagerie médicale seule n'est pas suffisante pour affirmer un diagnostic de GBM. Des analyses tissulaires sont indispensables [7,11]. Ces analyses sont effectuées à partir d'échantillons de tissus tumoraux récupérés soit par biopsie, soit à l'issue de la résection chirurgicale de la tumeur. A partir de ces échantillons sont recherchés des marqueurs histopathologiques du GBM tels que l'expression de GFAP (*glial acidic fibrillary protein*), une morphologie astrocytaire, une activité proliférative importante, des zones nécrotiques, etc. [7,11-13]. Des marqueurs pronostiques sont aussi recherchés tels que la mutation de IDH, la codélétion 1p/q19, l'hyperméthylation du promoteur de la 6-O-méthylguanine-ADN méthyltransférase (MGMT), etc. [13].

3. Traitements

Les traitements approuvés par la *Food and Drug Administration* (FDA) contre le GBM sont rares en raison principalement de la difficulté à traiter les pathologies cérébrales étant donnée la barrière hémato-encéphalique (BHE) qui protège le système nerveux central [14]. Dans le cadre d'un schéma thérapeutique systémique, seules quelques molécules thérapeutiques ont la capacité de franchir cette barrière pour atteindre les zones tumorales

à traiter. La lomustine (CCNU) a été approuvée en 1976 pour une administration par voie orale (80-110 mg/m² toutes les 6 semaines). La carmustine (BCNU) a été approuvée en 1977 pour une administration par voie intraveineuse (150-200 mg/m² toutes les 6 semaines). Ce sont des agents alkylants non spécifiques qui déclenchent l'apoptose dans les cellules en division [15,16]. Cependant, ces traitements n'apportent aucun avantage par rapport à la radiothérapie seule, et présentent des effets indésirables importants tels qu'une toxicité hématologique pour la CCNU et une altération de la moelle osseuse, ainsi que des toxicités pulmonaires et oculaires pour la BCNU.

Un autre traitement systémique approuvé en 2009 est un anticorps thérapeutique : le bévécizumab (administration intraveineuse, 10 mg/kg toutes les 2 semaines) [17]. Il est utilisé pour traiter l'œdème symptomatique et la nécrose causée par la radiothérapie. Cependant, ce traitement présente des effets secondaires graves tels que de l'hypertension, des événements thromboemboliques, des perforations gastro-intestinales, des saignements cérébraux et une protéinurie.

Le GBM est aujourd'hui traité en suivant le protocole de Stupp rédigé en 2005 [18]. Ce protocole intervient à la suite d'une résection chirurgicale maximale lorsque la tumeur est atteignable sans risque d'atteinte irréversible sur d'autres régions cérébrales. Une pause de 4 à 6 semaines est ensuite observée et démarre le protocole de radiothérapie et de chimiothérapie au témozolomide (TMZ). Le TMZ est administré quotidiennement par voie orale (dose : 75 mg/m²/jour), pendant 49 jours et est associé à une radiothérapie (5 jours par semaine). Enfin, après une pause de 28 jours, 6 cycles de 28 jours sont réalisés pendant lesquels le patient est traité pendant 5 jours consécutifs par TMZ (dose : 150-200 mg/m²/jour). Le TMZ est un agent alkylant sous forme de prodrogue. La prodrogue est absorbée intacte puis est métabolisée en 3-méthyl-(triazén-1-yl)imidazole-4-carboxamide qui va ensuite réagir avec de l'eau pour former 2 composés : le 5-aminoimidazole-4-carboxamide et le cation méthyldiazonium. C'est ce dernier qui va entraîner des méthylations de l'ADN sur 3 positions précises : les positions 7-N des guanines, 3-N des adénines et 6-O des guanines. La méthylation sur la position 6-O des guanines est très toxique et mutagène pour la cellule [19,20]. Ce traitement présente également des toxicités systémiques, mais moins sévères que celles observées pour la CCNU et la BCNU [18]. Parmi tous les agents thérapeutiques concomitants et/ou adjuvants approuvés, le TMZ a montré la meilleure efficacité thérapeutique en clinique, avec une médiane de survie de 14,6 mois et un taux de survie à 5 ans de 10%, confirmé par une récente méta-analyse [21]. Cependant, ce protocole standard ne permet pas l'élimination complète du GBM car la récurrence tumorale survient dans la plupart des cas, généralement à proximité de la zone de résection tumorale [22].

Le GBM est l'un des cancers les plus coûteux à traiter [23], ce qui est d'autant plus irrationnel que cette tumeur reste incurable à ce jour. Étant donné que le franchissement de la BHE reste un véritable défi malgré les efforts déployés, comme l'utilisation de nanosystèmes d'administration de médicaments, les scientifiques ont exploré d'autres stratégies pour améliorer l'efficacité thérapeutique, dont certaines ont été approuvées par la FDA. De nombreuses techniques ont été développées de manière pour optimiser cette résection chirurgicale. C'est le cas par exemple de la chirurgie éveillée qui permet de diminuer les risques d'atteinte neurologique importante [24], ou de la chirurgie avec l'acide 5-aminolévulinique (5-ALA) qui permet de mieux définir la zone d'exérèse

[25–27]. En effet, le 5-ALA est un agent d'imagerie intraopératoire, approuvé en 2017 permettant une meilleure visualisation du GBM et d'autres tissus de gliome malins pendant la chirurgie [28]. Il s'agit d'un précurseur naturel de l'hémoglobine qui entraîne l'accumulation de porphyrines fluorescentes dans les tissus épithéliaux et dans les tissus tumoraux [29], particulièrement dans les tissus malins de gliomes. La fluorescence des porphyrines peut être détectée par un microscope au moment de la chirurgie de manière à visualiser les cellules tumorales résiduelles en temps réel [26,30]. Des essais cliniques ont montré que l'utilisation de la chirurgie guidée par fluorescence avec le 5-ALA permettait des résections plus complètes par rapport à la chirurgie conventionnelle à la lumière blanche. En effet, les patients opérés avec le 5-ALA ont subi des résections plus complètes dans 65% des cas contre 36% des cas pour les patients sans cet agent fluorescent [26]. Également, en complément du protocole de Stupp, les traitements tumoraux par champs électriques ont été approuvés par la FDA en 2011 [31]. Cette approche consiste à appliquer un champ électrique alternatif de basse intensité sur le cuir chevelu des patients pour perturber la mitose des cellules tumorales. Malgré des résultats prometteurs en matière de survie globale [32], cette stratégie thérapeutique n'a pas été incluse dans le protocole standard en raison d'avantages marginaux, de coûts élevés et d'inconvénients pour les patients [33].

4. Obstacles au traitement

Certains obstacles rendent le traitement du GBM difficile. La malignité du GBM est essentiellement due à des modifications chromosomiales, à une localisation de la tumeur désavantageuse et la présence de barrières biologiques, à une importante hétérogénéité qui entraîne la sélection de clones résistants infiltrants et très prolifératifs, aux cellules tumorales de type souche et enfin à la forte immunosuppression aux abords de la tumeur (figure 1-2) [34–36]. Premièrement, la localisation anatomique de la tumeur empêche sa résection totale de manière à préserver au maximum les fonctions cérébrales. Les cellules résiduelles (non réséquées) sont ensuite capables de proliférer et de former une nouvelle tumeur : une récurrence [18,37]. De même, les barrières physiologiques entravent l'efficacité des traitements proposés. C'est le cas notamment de la BHE saine ou tumorale (BHET). La BHE est une interface hautement sélective entre le flux sanguin et le cerveau, responsable du maintien de l'homéostasie cérébrale et de la protection contre les substances nocives. Cette barrière a été envisagée pour la première fois par Ehrlich en 1885 lorsqu'il a observé que les colorants injectés par voie intraveineuse ne teignaient pas le tissu cérébral comme ils le faisaient pour d'autres tissus [38]. Des recherches ultérieures menées par Goldman en 1913, qui a injecté ces colorants dans le liquide céphalorachidien (LCR), ont confirmé la présence de cette barrière en révélant cette fois-ci une coloration du cerveau sans coloration des autres tissus [38].

La BHE n'est pas uniforme dans tout le cerveau en raison des capillaires fenêtrés dans les organes circumventriculaires (OCV), et elle joue un rôle central dans la régulation des échanges de molécules entre le sang et le cerveau [39]. Composée d'un réseau de cellules endothéliales de capillaires cérébraux (CECC) [40], de péricytes, d'astrocytes et de cellules neuronales [41–43], la principale fonction de la BHE est d'empêcher le transport paracellulaire, maintenant ainsi un environnement contrôlé pour le cerveau [44,45].

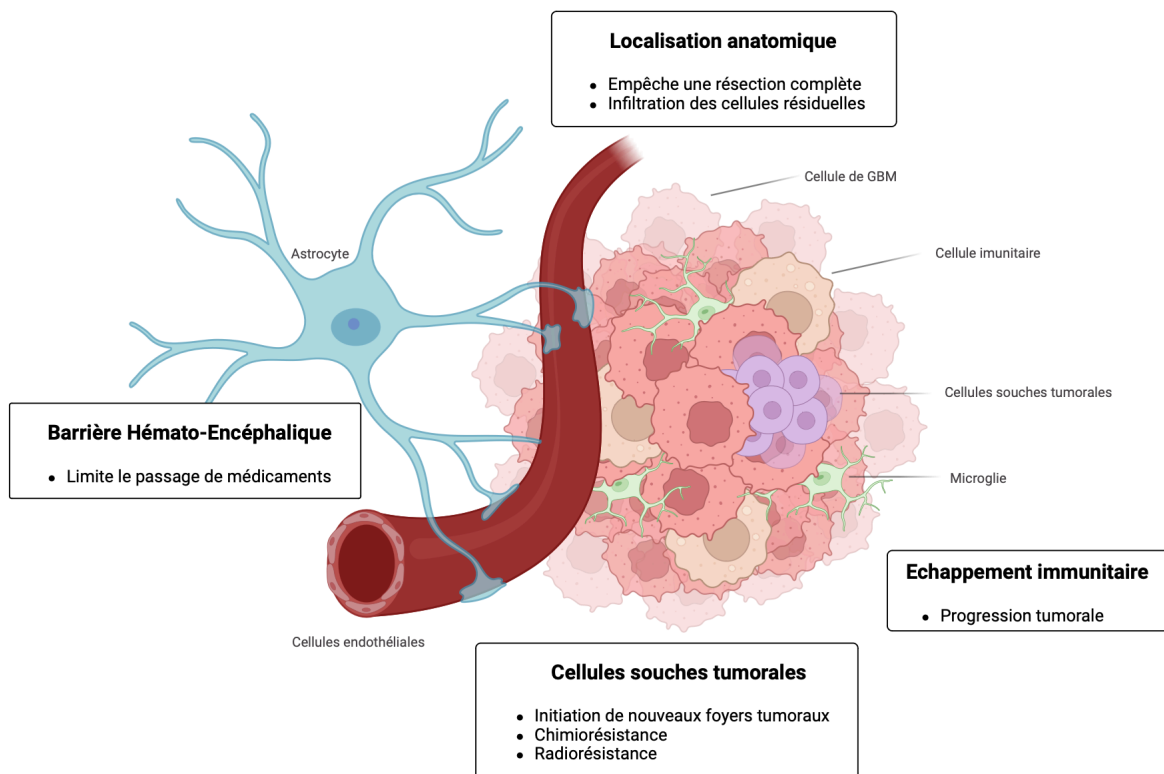


Figure 1-2. De nombreux obstacles empêchent le traitement curatif du GBM. Le GBM est une pathologie difficile à traiter en raison de sa localisation anatomique et de la nature infiltrante des cellules de GBM, de la capacité de ces cellules à échapper au contrôle immunitaire du fait de la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires par exemple, des cellules souches tumorales qui sont capables de créer une nouvelle tumeur même après le traitement et de la barrière hémato-encéphalique qui empêche l'entrée de molécules actives dans le cerveau (figure adaptée de Cruz *et al.* 2022 et réalisée avec BioRender.com [34]).

Dans des conditions physiologiques, la BHE est composée, du sang vers le cerveau, de 3 barrières consécutives : le glycocalyx, l'endothélium et le compartiment extravasculaire [46,47]. Le glycocalyx est une structure gélatineuse accolée à l'endothélium et qui empêche l'adhésion des cellules circulantes et le passage de grosses molécules [46-49]. L'endothélium est composé de cellules interconnectées par des jonctions serrées qui limitent la diffusion paracellulaire à des molécules polaires et de petite taille telles que l'eau, la glycérine et l'urée par exemple [47,50].

Les CECC sont les principaux composants de la BHE, caractérisés par des jonctions serrées qui restreignent le passage à la fois de petites et de grandes molécules du sang vers le cerveau. Contrairement aux cellules endothéliales périphériques, les CECC ont un transport transcellulaire limité en raison de facteurs tels que le faible transport vésiculaire et l'activité métabolique élevée [51]. Les astrocytes, entourant les CECC, jouent un rôle crucial dans l'induction et le maintien des propriétés de la BHE [40-42]. Les péricytes, qui partagent la membrane basale des capillaires avec les CECC, contribuent aussi à l'intégrité de la BHE et possèdent une activité phagocytaire, ajoutant ainsi de la sélectivité à la barrière [39,43].

Les mécanismes de passage de la BHE sont essentiels pour maintenir son intégrité et influencer le transport de médicaments vers le cerveau. Le transport transmembranaire à travers la BHE implique divers mécanismes. La diffusion passive est le mécanisme initial, permettant aux petites molécules lipophiles ayant des caractéristiques spécifiques de traverser librement la BHE [52]. Cependant, de nombreux nutriments nécessitent des transporteurs situés sur les membranes luminales et abluminales pour traverser la BHE. Certains transporteurs à diffusion facilitée utilisent le gradient de concentration des molécules pour faciliter leur diffusion. D'autres transporteurs actifs nécessitent de l'énergie, apportée grâce aux mitochondries abondantes du côté luminal des CECC [53,54]. Il s'agit de mécanismes de passage médiés par les transporteurs ou médiés par les récepteurs, comprenant des systèmes d'entrée et de sortie, apportant des nutriments ou éliminant des déchets ou des molécules potentiellement toxiques [55-58].

En effet, deux types de mouvements se produisent à la BHE : le mouvement sang-cerveau et le mouvement cerveau-sang. Le mouvement sang-cerveau transporte des nutriments clés tels que le glucose, les acides aminés et les vitamines dans le parenchyme cérébral en utilisant des transporteurs à diffusion facilitée tels que le *glucose transporter 1* (GLUT), le *monocarboxylate transporter 1* (MCT1) ou le *large neutral amino acid transporter 1* (LAT1) par exemple [53,59]. Par contre, les transporteurs d'efflux empêchent de nombreuses substances d'entrer dans le liquide interstitiel du cerveau et sont une caractéristique essentielle de la BHE [59]. Les transporteurs de la famille des cassettes de liaison à l'ATP (ABC), tels que la P-glycoprotéine, sont essentiels pour l'efflux et sont responsables de l'élimination d'une grande proportion de molécules. Ce transporteur, bien qu'exprimé de chaque côté de la BHE est principalement localisé au niveau de la membrane luminale et sert de transporteur d'efflux principal pour énormément de substrats incluant une grande partie de molécules liposolubles [60]. Ceci contribue à expliquer la raison pour laquelle beaucoup de molécules thérapeutiques potentielles n'ont finalement pas été retenues après essais cliniques et ce, du fait d'une mauvaise perméabilité de la BHE [61]. Les macromolécules essentielles pour le cerveau ne peuvent pas emprunter les voies présentées ci-dessus et utilisent plutôt les mécanismes de transport médié par les récepteurs. Divers récepteurs se situent sur les CECC, tels que les récepteurs de l'insuline et les récepteurs de la transferrine, facilitant le transport ciblé par transcytose vers des régions cérébrales spécifiques [62]. Ces transporteurs sont essentiels pour l'homéostasie cérébrale. Ils seront aussi pris en compte lors du développement de stratégies cliniques pour optimiser les réponses aux médicaments et minimiser les interactions médicamenteuses [63].

La BHET correspond à une barrière hémato-encéphalique altérée notamment par surexpression de VEGF (*vascular endothelial growth factor*), des capacités de filtration moins performantes et donc une barrière rendue moins imperméable [64,65]. Bien que la BHET soit plus perméable aux potentielles substances actives devant être administrées, elle est hautement hétérogène d'un patient à l'autre, évolue au cours de la pathologie et peut être contrebalancée par des régions de la BHE surexprimant *a contrario* des transporteurs d'efflux prévenant l'entrée de molécules thérapeutiques dans le cerveau [14,66].

Les cellules souches tumorales présentent aussi un obstacle majeur dans le traitement du GBM. Ce sont des cellules issues d'une sous-population tumorale capables de se renouveler, d'initier plusieurs phénotypes et de former des foyers tumoraux [34,67]. Ces cellules sont particulièrement résistantes aux diverses

chimiothérapies et à la radiothérapie. Elles expriment par exemple entre 32 et 56 fois plus la MGMT, responsable de la résistance au TMZ [68,69], des gènes anti-apoptotiques et des cytokines immunosuppressives [34,70].

5. Stratégie locale

Certaines stratégies thérapeutiques ont été proposées pour faire face aux obstacles détaillés dans le sous-chapitre précédent. C'est le cas par exemple de la délivrance intratumorale directe. De manière générale, le GBM ne produit pas de métastase probablement en raison de la faible espérance de vie des patients et de la présence de la BHE [35,71,72]. L'administration locale de médicament paraît alors une solution appropriée d'autant plus qu'une méta-analyse de 2023 montre que les approches locales dans le traitement du GBM sont plus efficaces que les approches systémiques [73]. Chen *et al.* ont par exemple comparé l'effet antitumoral de l'irinotecan par administration systémique ou locale sur un modèle de souris athymiques portant des tumeurs issues de patients (GBM43 et SF7796). Pour les deux types de tumeurs, l'administration locale a permis d'augmenter la médiane de survie, la faisant passer de 27 à 55 jours pour les tumeurs GBM43 et de 48 à 58 jours pour les tumeurs SF7796, par rapport à l'administration systémique [74]. De même, Zhang *et al.* ont aussi comparé l'efficacité antitumorale de microsphères de TMZ sur des rats portant des tumeurs C6. Ici aussi, l'administration locale a permis d'augmenter la médiane de survie, passant de 27 jours pour l'administration systémique à 47 jours pour l'administration locale [75]. Cette stratégie locale permet entre autres de s'affranchir des inconvénients liés aux propriétés de la BHE et/ou la BHET, de limiter les effets indésirables liés à une administration par voie systémique et d'augmenter la dose d'actif au niveau du site tumoral [76,77]. En revanche, cette stratégie présente aussi des inconvénients tels que la faible diffusion dans les tissus, la nécessité d'injections répétées pour respecter la fenêtre thérapeutique, les risques de saignements, de toxicité ou encore d'infection.

Ainsi, l'approche locale accompagnée d'une libération prolongée dans le traitement du GBM a aussi été étudiée depuis un certain nombre d'années. Il n'existe actuellement qu'une seule forme implantable sur le marché dans le cadre du traitement du GBM : l'implant Gliadel[®], développé par la compagnie Arbor Pharmaceuticals LLC (Atlanta, GA, Etats-Unis). Il a été approuvé par la FDA aux États-Unis dès 1996 et a reçu son Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) en France en 1998. Ce dispositif implantable se compose d'un mélange de copolymère de 1,3-bis-(p-carboxyphénoxy)-propane à dégradation lente et d'acide sébacique à dégradation rapide, dans un rapport de 20/80 (*m/m*) sous le nom de Polifeprosan 20. Cette combinaison de copolymère et de BCNU est formulée sous forme de microsphères, pressées pour former des pastilles de 1,4 cm de diamètre et 1 mm d'épaisseur [78,79]. En administrant le BCNU directement dans la cavité tumorale, ce dispositif contourne la BHE et permet d'atteindre des concentrations plus élevées de la substance active à proximité des cellules tumorales. L'objectif premier de cet implant était de se substituer à une administration systémique de BCNU qui présente d'importants effets secondaires. L'implant propose alors une administration locale et prolongée de la substance active.

Une première étude de phase II, menée entre 1987 et 1988 sur 21 patients souffrant de GBM en rechute, a établi que la dose efficace de BCNU à administrer pour observer une amélioration de la survie était de 7,7 mg par implant, avec un maximum de 8 implants soit une dose totale de 61,6 mg administrée localement [78] (figure 1-3). Par la suite, une étude de phase III conduite entre 1989 et 1992 et a impliqué 145 patients atteints de GBM en rechute [80]. Soixante-treize patients ont reçu des implants placebo tandis que 72 patients ont reçu des implants de BCNU. Six mois après l'implantation, la survie était de 56 % chez les patients traités avec les implants de BCNU, contre 36 % chez ceux traités avec des placebos. Des études similaires ont été menées chez des patients récemment diagnostiqués avec un GBM [81,82]. Entre 1997 et 1999, 101 patients ont été traités avec des implants de BCNU et 106 avec des implants placebo. La médiane de survie était de 11,4 mois pour les patients sous placebo et de 13,5 mois pour ceux traités avec les implants de BCNU [82]. Des combinaisons thérapeutiques différentes ont ensuite été testées chez des patients récemment diagnostiqués. Une étude menée entre 1997 et 2006 a démontré qu'une combinaison des implants Gliadel® avec le protocole de Stupp (33 patients) offrait une médiane de survie plus élevée (20,7 mois) que celle des patients traités uniquement avec le protocole de Stupp (14,7 mois pour 45 patients). Cette augmentation était encore plus significative chez les patients de moins de 70 ans (30 patients) qui ont survécu en moyenne 21,3 mois comparé à 12,4 mois pour ceux traités avec les implants Gliadel® et la radiothérapie (pas de TMZ) (112 patients) [83].

Cependant, l'implantation des implants Gliadel® a été associée à plusieurs effets secondaires, dont une cicatrisation difficile des plaies, des œdèmes cérébraux, une hypertension intracrânienne, des méningites et des crises d'épilepsie [84,85]. Certains de ces effets pourraient résulter des caractéristiques intrinsèques de l'implant. Par exemple, sa rigidité pourrait causer de microdéchirures lorsque les implants bougent dans le cerveau, après leur implantation [86], compromettant ainsi l'intégrité de la BHE et conduisant à des œdèmes [87,88]. De plus, l'implant ne peut être positionné à proximité du système ventriculaire, car il pourrait migrer et entraîner une hydrocéphalie obstructive. Enfin, le contenu de l'implant peut être libéré de manière non homogène en fonction des conditions dans le cerveau, laissant derrière lui des produits de dégradation. Bien que la BCNU soit censée être libérée sur environ 3 semaines, des études *in vivo* ont montré que 74 % de la substance active est libérée au cours des 7 premiers jours [89]. De plus, des modèles précliniques ont révélé que la diffusion de la BCNU depuis l'implant se limite à 3 à 12 mm dans les tissus environnants [84,90,91]. *In vitro*, le polyfeprosan 20 montre une dégradation d'environ 60 % après 6 semaines, mais peu d'études ont examiné la dégradation totale des implants *in vivo* [79,89]. Chez les patients, plus de 70 % du copolymère est dégradé dans les 3 semaines suivant l'implantation. Cependant, des réopérations et des autopsies ont révélé que le polymère peut persister jusqu'à 232 jours après l'implantation (*Food and Drug Administration*. Référence ID3358686. Disponible sur : <https://www.fda.gov/>, consulté le 21 août 2023).

Malgré les avantages des implants Gliadel® par rapport à l'administration intraveineuse de la BCNU en matière de sécurité et d'efficacité [79,92], et bien que de nombreuses études cliniques aient confirmé l'efficacité de la combinaison des implants Gliadel® avec le protocole de Stupp contre le GBM nouvellement diagnostiqué [93], son utilisation clinique reste controversée en raison de l'équilibre complexe entre les risques, les avantages et les coûts [85,87]. Cette méthode est de moins en moins utilisée en Europe en première intention et ne représente pas la solution idéale pour la thérapie du GBM. En effet, une étude clinique récente a montré que les

améliorations chirurgicales dans la résection du GBM peuvent limiter voire annuler les avantages des implants Gliadel®, sans réduire leurs effets indésirables. La médiane de survie des patients avec ou sans implants Gliadel® après une chirurgie guidée par fluorescence (5-ALA) n'était pas significativement différente (14,2 et 14,3 mois, respectivement). Les patients ayant reçu les implants Gliadel® avaient tendance à développer davantage d'infections au niveau de la plaie chirurgicale (15,4 % contre 7,1 %) [94]. De plus, cette stratégie thérapeutique est dépendante du statut de méthylation du promoteur et de l'expression de la MGMT puisque la BCNU est un agent alkylant au même titre que le TMZ. Les patients traités avec les implants Gliadel® ayant un promoteur de la MGMT hyperméthylé (faible expression de la MGMT) ont une médiane de survie significativement plus élevée que les patients ayant un promoteur non méthylé (surexpression de la MGMT) [95].

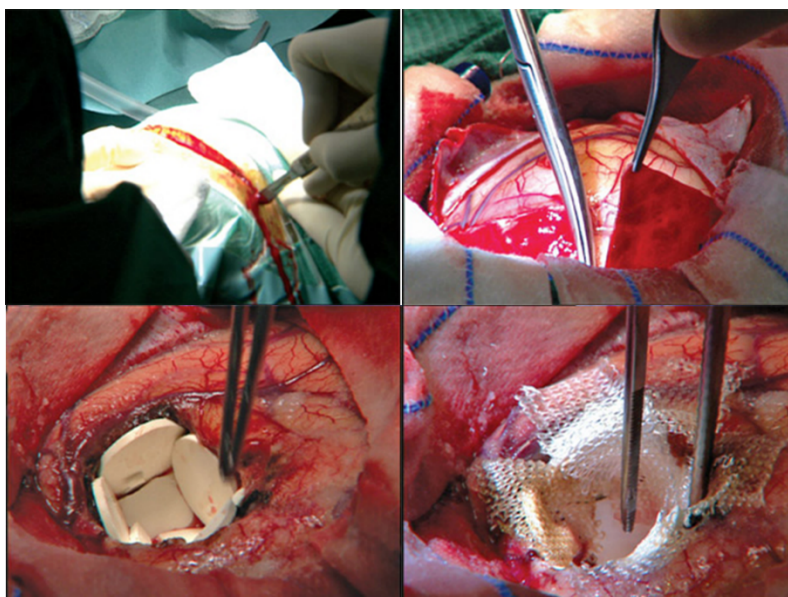


Figure 1-3. Procédure d'implantation de l'implant Gliadel®. Dans un premier temps, la tumeur est réséquée, puis jusqu'à 8 implants sont disposés le long de la cavité de résection et sont maintenus avec du Surgicel® (gaze hémostatique) [96].

Mettre en place un traitement local directement au niveau de la zone tumorale demeure une solution particulièrement prometteuse pour améliorer la distribution des médicaments. La méta-analyse dirigée par Wang *et al.* a en effet démontré que l'administration locale est nettement plus efficace que l'administration systémique et ceci indépendamment des médicaments utilisés, des systèmes de délivrance de ces médicaments et des modèles précliniques *in vivo* [73]. Même si cela ne suffit pas à éliminer toutes les cellules cancéreuses, la résection de la tumeur crée une cavité dans laquelle le neurochirurgien peut insérer directement un implant contenant un agent thérapeutique. À la différence d'une solution liquide injectée dans la cavité, l'implant permet une libération continue de la substance active en direction des cellules tumorales résiduelles. Ainsi, les implants Gliadel®, étant les seuls implants approuvés par la FDA, peuvent servir d'étude de cas, et il est nécessaire de surmonter leurs limitations pour améliorer les stratégies locales et sécurisées de délivrance médicamenteuse. Parmi ces faiblesses, la rigidité de l'implant pourrait être réduite en optant pour un hydrogel dont les propriétés viscoélastiques pourraient être adaptées au tissu cérébral environnant.

Hydrogels

Les hydrogels sont des structures tridimensionnelles constituées par des réticulations covalentes ou non de polymères hydrophiles synthétiques ou naturels dans un environnement aqueux [97]. Les propriétés des hydrogels telles que la bioadhésion, la biodégradabilité, la biocompatibilité, etc., peuvent être adaptées grâce à la grande diversité des polymères, ce qui rend ces hydrogels particulièrement adaptés pour des applications à plus ou long terme sur des tissus biologiques [98]. La biocompatibilité, particulièrement dans le tissu cérébral [99], et la libération de molécules actives [100], peuvent aussi être modulées par la nature et la distribution des réticulations de manière à produire des hydrogels avec des propriétés viscoélastiques et des rigidités très variables. Ces hydrogels peuvent être utilisés dans de nombreuses applications telles que l'ingénierie et la régénération tissulaire, la culture cellulaire ou encore la délivrance de médicaments [98,100,101]. Ils peuvent contenir des actifs pharmaceutiques hydrophiles ou légèrement lipophiles ainsi que des protéines ou des acides nucléiques [102–104]. Cependant, une majorité des agents cytotoxiques hydrophobes ne peuvent pas être inclus dans les hydrogels en raison de la nature hydrophile du système, ce qui limite leur utilisation dans des stratégies thérapeutiques antitumorales. De manière à s'affranchir de ces limites, les hydrogels peuvent être combinés avec des nanosystèmes. Ces dernières années, les nanovecteurs ont été largement étudiés comme des solutions thérapeutiques contre le GBM [105,106]. Leur taille, leur composition et leur propriété de surface peuvent être ajustées pour transporter des molécules actives hydrophiles et/ou lipophiles vers les cellules tumorales. Ces nanosystèmes peuvent empêcher la dégradation des molécules actives et donc améliorer leur demi-vie tout en réduisant leurs effets indésirables [106].

La combinaison d'hydrogels et de nanovecteurs permet alors le développement de stratégies thérapeutiques combinant les avantages cliniques des deux outils. Plusieurs systèmes similaires ont déjà été testés ces dernières années pour diverses applications, allant du développement de traitements antibactériens et de dispositifs d'anesthésie, au traitement de neuropathies ou encore de troubles cutanés tels que l'acné ou la dermatite atopique [107].

6. Hydrogels chargés en micelles polymère

Les micelles polymère sont formées par autoassemblage de polymères amphiphiles et sont caractérisées par un cœur lipophile stabilisé par les parties hydrophiles des mêmes polymères. Des molécules actives lipophiles peuvent ainsi être chargées dans le cœur des micelles. Des hydrogels photopolymérisables à base de polyéthylène glycol (PEG) diméthacrylate ont été proposés par Fourniols *et al.* en 2015 pour la libération prolongée de TMZ, lui-même encapsulé dans des micelles PEGylées. L'hydrogel est alors polymérisable en moins de 2 min sous lumière ultraviolette et permet une libération prolongée du TMZ par diffusion à travers l'hydrogel. Pendant les 24 premières heures, 45% du TMZ sont libérés puis 20% pendant la semaine suivante de manière prolongée. Les hydrogels contenant le TMZ ont permis d'augmenter l'apoptose et de diminuer la masse tumorale d'environ 90% par rapport aux souris non traitées et d'environ 80% par rapport à une injection intraveineuse de TMZ, dans un

modèle de souris athymique ayant une tumeur sous-cutanée (lignée cellulaire U-87 MG) [108]. D'autres hydrogels, contenant des micelles de monométhoxy PEG-block-acide polylactique (PLA) et chargées en paclitaxel (PTX) ont été formulés à base de gélatine. Les micelles de PTX sont plus toxiques sur des cellules de GBM issues de rats (C6) que le PTX seul (les concentrations inhibitrices médianes (CI50) de PTX sont d'environ 6 et 12 µg/mL pour les micelles de PTX et le PTX seul, respectivement) sûrement par une meilleure internalisation. La libération du PTX est davantage prolongée à partir des hydrogels par rapport aux micelles libres (50 vs 70% après 5 jours de libération). De plus, lorsque l'hydrogel est implanté en sous-cutané chez des rats, aucun problème de biocompatibilité n'a été détecté et l'hydrogel est dégradé en moins de 5 semaines [109]. Kang *et al.* ont développé des hydrogels de copolymères PLA-PEG-PLA thermosensibles, se gélifiant à température corporelle, contenant des micelles PEGylées chargées en doxorubicine. La libération de doxorubicine suit la dégradation de l'hydrogel et est prolongée lorsqu'elle est contenue dans les micelles. A 25 jours 20% de doxorubicine sont libérées lorsque l'hydrogel contient des micelles contre 80% si la doxorubicine est libre dans l'hydrogel. Ces hydrogels ont ensuite été implantés dans un modèle orthotopique de résection tumorale (souris injectées avec la lignée cellulaire U-87 MG puis tumeur retirée après 2 semaines) et toutes les souris ayant reçu le traitement ont survécu plus de 8 semaines alors que les souris ayant reçu l'hydrogel sans micelle de doxorubicine ont une médiane de survie de 34 jours [110].

7. Hydrogels chargés en nanoparticules polymère

Zhao *et al.* ont formulé des hydrogels photopolymérisables contenant des nanoparticules de poly(acide lactique-co-glycolique) chargées en PTX. Le PTX a été libéré progressivement pendant au moins une semaine et la libération totale a été estimée à 4 semaines.

Un modèle de résection tumorale a été utilisé : dans un modèle murin de GBM orthotopique (souris femelles athymiques et lignée cellulaire U-87 MG), la tumeur a été retirée après 13 jours puis les thérapies ont été administrées dans la cavité. La moitié des souris étaient encore vivantes après 150 jours avec les hydrogels de nanoparticules polymère avec du PTX alors que pour les nanoparticules polymère de PTX en suspension (sans hydrogel) la médiane de survie était autour de 70 jours [111]. Ces hydrogels ont ensuite été améliorés par l'ajout de TMZ dans la formulation et ont permis d'obtenir une synergie entre les deux agents de chimiothérapie (TMZ et PTX). La médiane de survie pour le modèle précédemment décrit et pour la combinaison PTX-TMZ dans l'hydrogel est supérieure à 110 jours contre 75 jours pour les gels ne contenant que du TMZ et 90 jours pour les hydrogels ne contenant que du PTX [112].

8. Hydrogels chargés en nanoparticules magnétiques

Les nanoparticules magnétiques permettent de proposer des stratégies thérapeutiques personnalisées dans différentes applications biomédicales. Ces particules peuvent être contrôlées par des champs magnétiques et être utilisées à des fins diagnostique avec de l'imagerie ou pour des applications thérapeutiques [113-115].

In vivo, l'hyperthermie est le fait de chauffer un tissu entre 41 et 45 °C et permet possiblement d'augmenter l'efficacité des thérapies anticancéreuses lorsqu'elle est combinée avec de la chimiothérapie et/ou de la radiothérapie. Meenach *et al.* ont proposé en 2010 une nouvelle stratégie pour induire cette hyperthermie au moyen d'hydrogels contenant des particules magnétiques qui peuvent produire de la chaleur en utilisant un champ magnétique alternatif externe [116]. Les polymères utilisés pour former les hydrogels sont à base de PEG méthacrylate et diméthacrylate, et sont combinés avec des nanoparticules d'oxyde de fer. Il est possible de contrôler les propriétés de gonflement des gels en jouant sur la proportion de PEG et sur le nombre de réticulation. Ces hydrogels sont biocompatibles et leur réponse en matière de production de chaleur dépend de la quantité de nanoparticules d'oxyde de fer et de la puissance du champ magnétique. Les auteurs ont ensuite proposé d'améliorer ces hydrogels en y ajoutant du PTX [117]. La libération du paclitaxel dépend de la structure du gel : il est totalement libéré et de manière prolongée après 22 jours. La combinaison de l'hyperthermie et de la chimiothérapie a permis d'améliorer la toxicité *in vitro* du PTX, en diminuant d'un facteur 6 et 5, le nombre de cellules A549 (lignée cellulaire carcinome pulmonaire) vivantes, par rapport au contrôle et à la condition hydrogel et PTX seul, respectivement. Le bénéfice de cette combinaison n'a malheureusement pas été montré sur des cellules de GBM (lignée cellulaire M059K).

Les nanoparticules magnétiques peuvent aussi être utilisées pour de l'imagerie comme dans les hydrogels proposés par Kim *et al.* [118,119]. Ces hydrogels proposés ici sont à base de poly(organophosphazène), thermosensible et biodégradable, combinés à des nanoparticules de ferrite de cobalt (visualisable par IRM) et un agent chimiothérapeutique : PTX ou SN-38 (métabolite actif de l'irinotecan). Les hydrogels sont injectables, gélifient à température corporelle, sont biocompatibles, biodégradables, permettent une libération prolongée des actifs et sont visualisables par IRM. Le PTX est libéré en corrélation avec la dégradation de l'hydrogel sur une période de 28 jours. De manière similaire, le SN-38 est libéré avec la dégradation de l'hydrogel sur une période plus longue, s'étendant sur 59 jours. Sur des souris athymiques porteuses de tumeurs sous-cutanée ou orthotopique (lignée cellulaire U-87 MG), les deux hydrogels, contenant du PTX ou du SN-38, ont permis d'inhiber la croissance tumorale pendant une vingtaine de jours après administration intratumorale comparativement à 4 jours pour les souris non traitées, moins d'une semaine pour les souris ayant reçu une injection intratumorale de PTX en suspension et 8 jours pour les souris ayant reçu une injection intratumorale de SN-38 en suspension. La visualisation spatiale et temporelle de ces hydrogels par IRM a permis et de suivre et de délimiter les zones cérébrales ayant eu accès au traitement ou non et d'adapter la prise en charge du GBM [118,119].

9. Hydrogels chargés en liposomes

Plusieurs hydrogels contenant des liposomes ont été proposés dans le cadre du traitement du GBM. Des hydrogels thermoréversibles de N-isopropylacrylamide-co-n-butyl méthacrylate (NIPAAmco-BMA) et de PEG contenant des liposomes chargés en doxorubicine ont été formulés. Ces hydrogels à base de liposomes peuvent libérer la doxorubicine pendant environ 50 jours contre 5 jours pour les hydrogels sans liposome. Les hydrogels

ont ensuite été injectés en intratumoral dans des souris mâles athymique porteuses d'une tumeur sous-cutanée (lignée cellulaire U-87 MG) et la croissance tumorale a été inhibée pendant 38 jours contre 14 jours avec les hydrogels contenant la doxorubicine libre [120]. D'autres hydrogels, à base de gélatine, contenant des liposomes encapsulant du TMZ et de l'érastine ont été formulés. L'érastine est un inducteur de la ferroptose et pourrait permettre d'augmenter la sensibilité au TMZ. L'érastine et le TMZ ont été libérés à partir des liposomes contenus dans ces hydrogels pendant au moins 2 semaines et ont permis d'augmenter la médiane de survie (67 jours) par rapport aux hydrogels contenant de liposomes chargés uniquement en TMZ (39 jours) ou chargés uniquement en érastine (54 jours) sur un modèle orthotopique de GBM (lignées cellulaires GL261 et U251) chez des souris C57BL/6J [121].

10. Hydrogels chargés en nanocapsules lipidiques

Les nanocapsules lipidiques (NCLs) peuvent être formulées selon un procédé d'inversion de phases publié et breveté au laboratoire MINT - INSERM U1066 / CNRS 6021 [122,123]. Les NCLs peuvent également être formulées sous forme d'hydrogel en ajoutant à la formulation des agents de réticulation permettant leur autoassemblage. Des hydrogels de NCLs ont été formulés avec de la N-gemcitabine lauramide (Gem-C12) : un agent de réticulation cytotoxique. La Gem-C12 est une forme modifiée, lipophile, de la gemcitabine, qui elle-même est un analogue de la cytidine, dotée de propriétés antitumorales. La Gem-C12 permet d'obtenir des hydrogels de NCLs grâce à la formation de liaisons hydrogène entre les têtes gemcitabine (de la Gem-C12), localisées à la surface des NCLs [124]. Ainsi, les hydrogels sont formés par des interactions inter-nanoparticulaires entre les NCLs, à la manière d'un collier de perles, formant un réseau à 3 dimensions, sans présence de polymère pour former le réseau. Les propriétés rhéologiques de ces hydrogels sont compatibles avec une administration par seringue [124]. Cette organisation présente l'avantage de proposer une libération continue et locale des NCLs et donc des principes actifs nano-encapsulés, tout en ne laissant aucun résidu à l'issue de la dégradation (ou dissolution) des hydrogels, c'est-à-dire après la libération totale des NCLs.

Ces hydrogels ont été utilisés dans le cadre du traitement du GBM. L'objectif de cette approche était de proposer une libération prolongée des actifs antitumoraux de façon à éliminer les cellules résiduelles infiltrantes dans la cavité de résection. Bastiancich *et al.* ont montré en 2016 que ces hydrogels formulés à partir de Gem-C12 permettaient une libération de l'actif pendant environ 1 mois (jusqu'à 77% de Gem-C12 libérée) [125]. L'hydrogel de Gem-C12 a ensuite été injecté en intratumoral, au même titre que des NCLs vides et une suspension de Gem-C12, dans un GBM sous-cutané (lignée cellulaire U-87 MG) greffé chez des souris athymiques. La suspension de Gem-C12 et les NCLs vides n'ont pas eu d'effet significatif sur la masse tumorale comparativement au groupe non traité. En revanche, l'hydrogel de Gem-C12 a entraîné une diminution significative de la masse tumorale sur ce modèle (figure 1-4A). Cet hydrogel est également bien toléré par la souris à court terme puisque ni inflammation, ni apoptose, ni activation de la microglie n'a été observée 1 semaine après l'injection. Cette étude a ensuite été complétée en 2017 afin de montrer la tolérance de l'hydrogel à moyen terme, qui s'est révélée

satisfaisante (à 2 puis 6 mois) [126]. En effet, ni changement comportemental, ni altération neurologique ou morphologique, ni augmentation de l'inflammation, de l'apoptose ou de l'activation de la microglie n'a été observé.

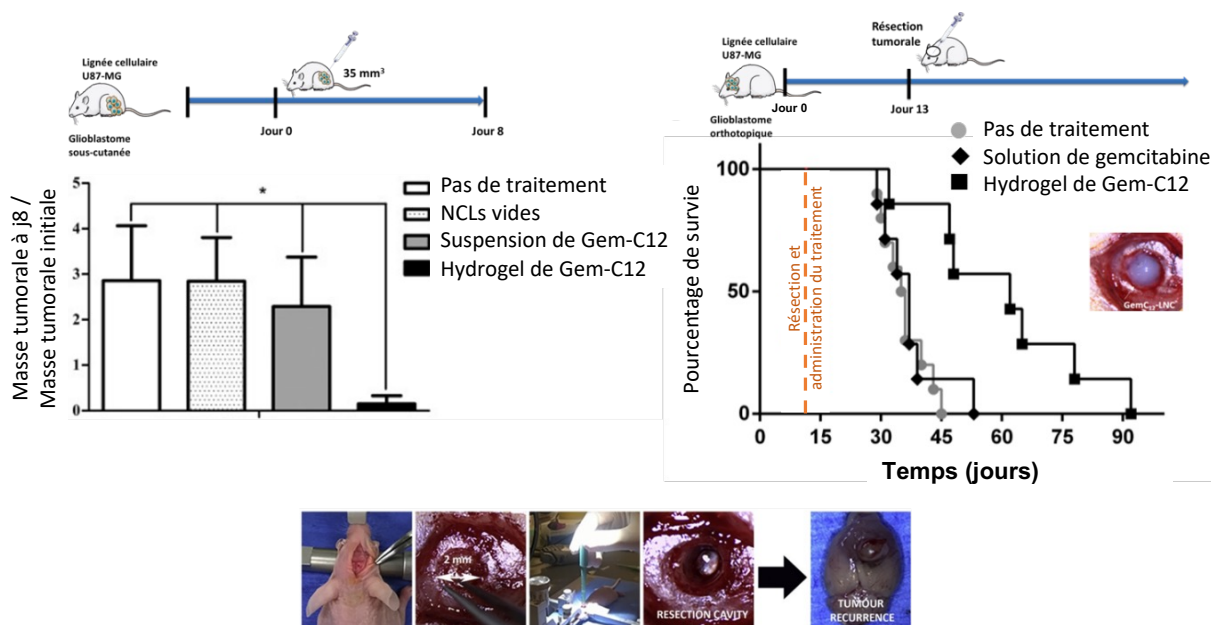


Figure 1-4. Les hydrogels de NCLs contenant de la gemcitabine diminuent la croissance tumorale et améliorent la survie après la résection tumorale d'un GBM sur un modèle murin A) Rapport de la masse tumorale 8 jours après traitement sur la masse tumorale au moment du traitement, après administration intratumorale dans un modèle murin de GBM ectopique (lignée cellulaire U-87 MG). Dose de Gem-C12 : 19,5 mg.kg⁻¹ (n = 5-7 ; moyenne du rapport ± écart-type ; * : p < 0,05). B) Images prises durant la chirurgie de résection tumorale d'un GBM orthotopique (lignée cellulaire U-87 MG) dans un modèle murin. Récurrences tumorales visibles à la périphérie de la résection après autopsie. C) Courbes de survie des souris non traitées ou traitées dans la cavité de résection tumorale : chirurgie réalisée 13 jours post-inoculation tumorale chez modèle murin de GBM orthotopique (lignée cellulaire U-87MG). Dose de gemcitabine de 3 mg.kg⁻¹ (éq. molaire Gem-C12) (n = 7-11) (figure adaptée des publications de Bastiancich *et al.*, 2016, 2017 et Bianco *et al.*, 2017 [125-127]).

L'hydrogel de Gem-C12 a également été testé sur des greffes orthotopiques de GBM (lignée cellulaire U-87 MG) chez des souris athymiques et a montré une amélioration de la médiane de survie. Finalement, afin de se rapprocher au plus près possible de la situation clinique, Bastiancich *et al.* ont développé un modèle de résection de GBM sur un modèle murin (figure 1-4B) [126,127]. Brièvement, des cellules U-87 MG ont été injectées par stéréotaxie entre le striatum et le cortex de souris immunodéprimées, puis la tumeur a été retirée 13 jours après l'inoculation, laissant apparaître la cavité de résection. Après dépôt de l'hydrogel de Gem-C12 dans la cavité de résection, la médiane de survie a été augmentée (63 jours) avec une apparition des récurrences retardée par rapport au contrôle (groupe non traité) (36 jours) et à une solution de gemcitabine non encapsulée (37 jours) (figure 1-4C). La même observation a été faite sur un modèle de rat (lignée cellulaire 9L) pour lesquels l'injection de l'hydrogel de Gem-C12 a décalé voire inhibé l'apparition de récurrence (50% des animaux étaient des longs survivants) [128]. Ces hydrogels ont pu également être associés à d'autres actifs antitumoraux tels que le PTX, encapsulé dans les NCLs, afin d'améliorer leur efficacité. La combinaison de la Gem-C12 et du PTX dans les hydrogels a montré un effet synergique en augmentant la cytotoxicité sur deux lignées cellulaires de

GBM (lignées cellulaires GL261 et 9L) par rapport aux monothérapies [129]. Ces hydrogels ont aussi montré leur efficacité dans d'autres pathologies tumorales telles que le cancer pulmonaire non à petites cellules, pour lequel l'hydrogel, après son administration sous-cutanée, a permis un ciblage des ganglions lymphatiques et de combattre localement les métastases pulmonaires au niveau du médiastin. Par rapport à un traitement conventionnel de gemcitabine par voie systémique, la survie des animaux n'a cependant pas été augmentée. En revanche, une diminution des effets secondaires systémiques a été observée par l'administration de l'hydrogel par voie parentérale sous-cutanée comparativement à l'administration intraveineuse de gemcitabine [130]. Ces hydrogels ont été de nouveau améliorés dans le cadre du traitement contre le GBM par l'ajout d'une composante de ciblage à la formulation. Le peptide NFL-TBS.40-63 (NFL) correspond au site de fixation de la tubuline sur la sous-unité légère des neurofilaments et s'internalise spécifiquement dans différentes lignées de GBM. Le peptide NFL a été associé par adsorption totale et immédiate sur les NCLs et n'a pas entraîné de modification des propriétés mécaniques des hydrogels. Le peptide de ciblage reste adsorbé à la surface des NCLs même après leur libération de l'hydrogel et a permis une meilleure internalisation et une meilleure toxicité de la Gem-C12 sur des cellules de GBM, ainsi qu'une spécificité des cellules de GBM car ne ciblant pas les cellules saines telles que des astrocytes. Ces hydrogels ont retardé et/ou inhibé l'apparition de récurrences sur le modèle de résection cité précédemment (souris athymiques + lignée cellulaire U-87 MG orthotopique), en ciblant les cellules résiduelles autour de la cavité de résection. Tandis que la médiane survie était de 38 jours pour les souris contrôles (non traitées), la présence du peptide NFL dans l'hydrogel de Gem-C12 a permis d'augmenter la médiane de survie : 74 vs 44 jours, comparativement à l'hydrogel de Gem-C12 sans NFL [131].

Objectifs de la thèse

Le GBM est une pathologie très agressive et qui pour le moment n'a pas vu son protocole thérapeutique amélioré depuis la proposition de Stupp *et al.* en 2005. La difficulté à traiter cette pathologie vient notamment de la présence de cellules résiduelles qui échappent à la résection chirurgicale en raison de leur caractère infiltrant, de la présence de barrières biologiques et des chimiorésistances. De nouvelles stratégies thérapeutiques sont alors nécessaires pour palier ces problèmes et l'approche locale semble être une bonne candidate dans ce contexte. L'objectif principal de ce travail est basé sur les travaux précédents effectués sur les hydrogels de NCLs. Ces hydrogels sont implantables dans la cavité de résection au moment de l'exérèse et permettent une libération continue de molécules actives.

Ce travail s'est dans un premier temps concentré sur la conception d'une nouvelle architecture pour ces hydrogels, en proposant un hydrogel de NCLs réticulées par des liaisons covalentes de façon à pouvoir modifier les propriétés viscoélastiques et les profils de libération des molécules en espérant avoir des hydrogels plus stables avec des cinétiques de libérations contrôlables et/ou multiples.

Le deuxième objectif de ce travail vise à compléter la chimiothérapie actuelle. Environ la moitié des patients présentent une résistance à l'agent de chimiothérapie proposé en clinique aujourd'hui : le TMZ. Il est alors envisagé de compléter cette approche locale en formulant des implants hydrogels contenant des molécules capables d'inhiber la résistance aux agents alkylants dans l'optique de sensibiliser les patients résistants au TMZ (figure 1-5).

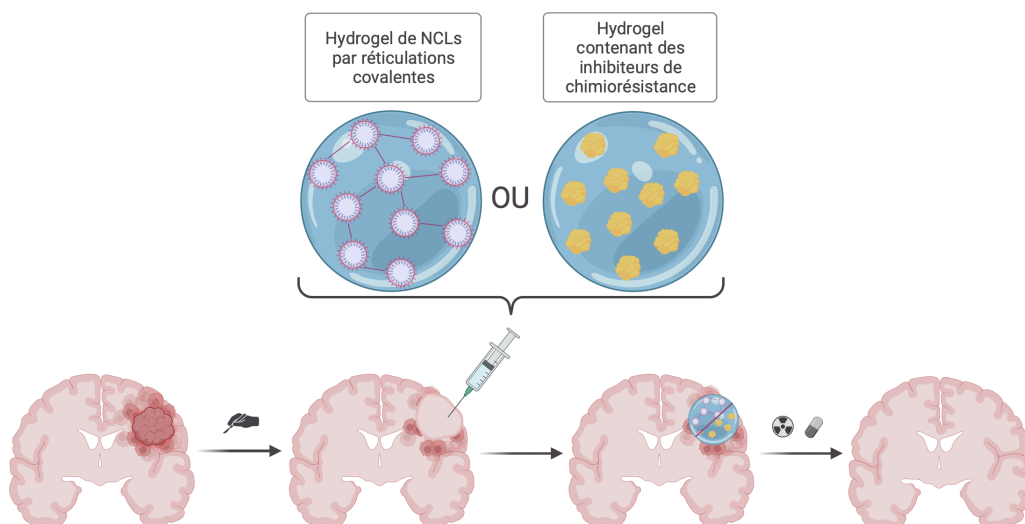


Figure 1-5. Objectifs de cette thèse pour une meilleur prise en charge des patients atteints de GBM. À la suite de l'exérèse chirurgicale de la tumeur, un hydrogel sera implanté dans la cavité. Cet hydrogel pourra être composé de NCLs réticulées par des liaisons covalentes ou d'une forme nanoparticulaire d'un inhibiteur de la résistance au TMZ dispersés dans un hydrogel. Ce traitement comblant le vide thérapeutique entre la chirurgie et le protocole de Stupp pourrait permettre de prévenir l'apparition de récurrences (figure réalisée avec BioRender.com).

Bibliographie

- 1 Ostrom QT, Cioffi G, Waite K, *et al.* CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2014–2018. *Neuro-Oncol* 2021;**23**:iii1–105. doi:10.1093/neuonc/noab200
- 2 Louis DN, Perry A, Wesseling P, *et al.* The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro-Oncol* 2021;**23**:1231–51. doi:10.1093/neuonc/noab106
- 3 Ohgaki H, Kleihues P. The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma. *Clin Cancer Res* 2013;**19**:764–72. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-3002
- 4 Ron E, Modan B, Boice JD, *et al.* Tumors of the Brain and Nervous System after Radiotherapy in Childhood. *N Engl J Med* 1988;**319**:1033–9. doi:10.1056/NEJM198810203191601
- 5 Sadetzki S, Chetrit A, Freedman L, *et al.* Long-Term Follow-up for Brain Tumor Development after Childhood Exposure to Ionizing Radiation for Tinea Capitis. *Radiat Res* 2005;**163**:424–32. doi:10.1667/RR3329
- 6 Defossez G, Le Guyader-Peyrou S, Uhry Z, *et al.* Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018. Synthèse. *Saint-Maurice Santé Publique Fr* Published Online First: 2019.<http://www.santepubliquefrance.fr/>
- 7 Alexander BM, Cloughesy TF. Adult Glioblastoma. *J Clin Oncol* 2017;**35**:2402–9. doi:10.1200/JCO.2017.73.0119
- 8 Miller KD, Ostrom QT, Kruchko C, *et al.* Brain and other central nervous system tumor statistics, 2021. *CA Cancer J Clin* 2021;**71**:381–406. doi:10.3322/caac.21693
- 9 Cowppli-Bony A, Delafosse P, Lacour B, *et al.* Survie des personnes atteintes de cancer en France métropolitaine 1989-2018 – Système nerveux central glioblastomes. *Boulogne-Billancourt Inst Natl Cancer* Published Online First: December 2020.<https://www.santepubliquefrance.fr>
- 10 Chaichana KL, Parker SL, Olivi A, *et al.* Long-term seizure outcomes in adult patients undergoing primary resection of malignant brain astrocytomas: Clinical article. *J Neurosurg* 2009;**111**:282–92. doi:10.3171/2009.2.JNS081132
- 11 Wirsching H-G, Galanis E, Weller M. Glioblastoma. In: *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier 2016. 381–97. doi:10.1016/B978-0-12-802997-8.00023-2
- 12 Louis DN, Perry A, Reifenberger G, *et al.* The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol (Berl)* 2016;**131**:803–20. doi:10.1007/s00401-016-1545-1
- 13 Weller M, van den Bent M, Preusser M, *et al.* EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood. *Nat Rev Clin Oncol* 2021;**18**:170–86. doi:10.1038/s41571-020-00447-z
- 14 Arvanitis CD, Ferraro GB, Jain RK. The blood–brain barrier and blood–tumour barrier in brain tumours and metastases. *Nat Rev Cancer* 2020;**20**:26–41. doi:10.1038/s41568-019-0205-x

- 15 Walker MD, Alexander E, Hunt WE, *et al.* Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas: A cooperative clinical trial. *J Neurosurg* 1978;**49**:333–43. doi:10.3171/jns.1978.49.3.0333
- 16 Hochberg FH. Quality and Duration of Survival in Glioblastoma Multiforme: Combined Surgical, Radiation, and Lomustine Therapy. *JAMA* 1979;**241**:1016. doi:10.1001/jama.1979.03290360032023
- 17 Cohen MH, Shen YL, Keegan P, *et al.* FDA Drug Approval Summary: Bevacizumab (Avastin®) as Treatment of Recurrent Glioblastoma Multiforme. *The Oncologist* 2009;**14**:1131–8. doi:10.1634/theoncologist.2009-0121
- 18 Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, *et al.* Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N Engl J Med* 2005;**352**:987–96. doi:10.1056/NEJMoa043330
- 19 Newlands ES, Stevens MFG, Wedge SR, *et al.* Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. *Cancer Treat Rev* 1997;**23**:35–61. doi:10.1016/S0305-7372(97)90019-0
- 20 Zhang J, F.G. Stevens M, D. Bradshaw T. Temozolomide: Mechanisms of Action, Repair and Resistance. *Curr Mol Pharmacol* 2012;**5**:102–14. doi:10.2174/1874467211205010102
- 21 Feng E, Sui C, Wang T, *et al.* Temozolomide with or without Radiotherapy in Patients with Newly Diagnosed Glioblastoma Multiforme: A Meta-Analysis. *Eur Neurol* 2017;**77**:201–10. doi:10.1159/000455842
- 22 Rapp M, Baernreuther J, Turowski B, *et al.* Recurrence Pattern Analysis of Primary Glioblastoma. *World Neurosurg* 2017;**103**:733–40. doi:10.1016/j.wneu.2017.04.053
- 23 Iacob G, Dinca EB. Current data and strategy in glioblastoma multiforme. *J Med Life* 2009;**2**:386–93.
- 24 De Witt Hamer PC, Robles SG, Zwinderman AH, *et al.* Impact of Intraoperative Stimulation Brain Mapping on Glioma Surgery Outcome: A Meta-Analysis. *J Clin Oncol* 2012;**30**:2559–65. doi:10.1200/JCO.2011.38.4818
- 25 Senders JT, Muskens IS, Schnoor R, *et al.* Agents for fluorescence-guided glioma surgery: a systematic review of preclinical and clinical results. *Acta Neurochir (Wien)* 2017;**159**:151–67. doi:10.1007/s00701-016-3028-5
- 26 Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, *et al.* Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol* 2006;**7**:392–401. doi:10.1016/S1470-2045(06)70665-9
- 27 Eljamel MS. Fluorescence image-guided surgery of brain tumors: Explained step-by-step. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2008;**5**:260–3. doi:10.1016/j.pdpdt.2008.11.003
- 28 Hadjipanayis CG, Stummer W. 5-ALA and FDA approval for glioma surgery. *J Neurooncol* 2019;**141**:479–86. doi:10.1007/s11060-019-03098-y
- 29 Regula J, MacRobert AJ, Gorchein A, *et al.* Photosensitisation and photodynamic therapy of oesophageal, duodenal, and colorectal tumours using 5 aminolaevulinic acid induced protoporphyrin IX--a pilot study. *Gut* 1995;**36**:67–75. doi:10.1136/gut.36.1.67
- 30 Walter S, Susanne S, Simon W, *et al.* Intraoperative Detection of Malignant Gliomas by 5-Aminolevulinic Acid-induced Porphyrin Fluorescence. *Neurosurgery* 1998;**42**:518–26. doi:10.1097/00006123-199803000-00017

- 31 Stupp R, Taillibert S, Kanner AA, *et al.* Maintenance Therapy With Tumor-Treating Fields Plus Temozolomide vs Temozolomide Alone for Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 2015;**314**:2535. doi:10.1001/jama.2015.16669
- 32 Stupp R, Taillibert S, Kanner A, *et al.* Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 2017;**318**:2306. doi:10.1001/jama.2017.18718
- 33 Mehta M, Wen P, Nishikawa R, *et al.* Critical review of the addition of tumor treating fields (TTFields) to the existing standard of care for newly diagnosed glioblastoma patients. *Crit Rev Oncol Hematol* 2017;**111**:60-5. doi:10.1016/j.critrevonc.2017.01.005
- 34 Cruz JVR, Batista C, Afonso B de H, *et al.* Obstacles to Glioblastoma Treatment Two Decades after Temozolomide. *Cancers* 2022;**14**:3203. doi:10.3390/cancers14133203
- 35 Janjua TI, Rewatkar P, Ahmed-Cox A, *et al.* Frontiers in the treatment of glioblastoma: Past, present and emerging. *Adv Drug Deliv Rev* 2021;**171**:108-38. doi:10.1016/j.addr.2021.01.012
- 36 Lim M, Xia Y, Bettegowda C, *et al.* Current state of immunotherapy for glioblastoma. *Nat Rev Clin Oncol* 2018;**15**:422-42. doi:10.1038/s41571-018-0003-5
- 37 Davis M. Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. *Clin J Oncol Nurs* 2016;**20**:S2-8. doi:10.1188/16.CJON.S1.2-8
- 38 de Boer AG, Gaillard PJ. Drug targeting to the brain. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007;**47**:323-55. doi:10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105237
- 39 Begley DJ. Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: the problems and the possibilities. *Pharmacol Ther* 2004;**104**:29-45. doi:10.1016/j.pharmthera.2004.08.001
- 40 Rubin LL, Staddon JM. The cell biology of the blood-brain barrier. *Annu Rev Neurosci* 1999;**22**:11-28. doi:10.1146/annurev.neuro.22.1.11
- 41 Janzer RC, Raff MC. Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature* 1987;**325**:253-7. doi:10.1038/325253a0
- 42 Gaillard PJ, van der Sandt IC, Voorwinden LH, *et al.* Astrocytes increase the functional expression of P-glycoprotein in an in vitro model of the blood-brain barrier. *Pharm Res* 2000;**17**:1198-205. doi:10.1023/a:1026406528530
- 43 Lai C-H, Kuo K-H. The critical component to establish in vitro BBB model: Pericyte. *Brain Res Brain Res Rev* 2005;**50**:258-65. doi:10.1016/j.brainresrev.2005.07.004
- 44 Brightman MW, Reese TS. Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J Cell Biol* 1969;**40**:648-77. doi:10.1083/jcb.40.3.648
- 45 Reese TS, Karnovsky MJ. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol* 1967;**34**:207-17. doi:10.1083/jcb.34.1.207
- 46 Kutuzov N, Flyvbjerg H, Lauritzen M. Contributions of the glycocalyx, endothelium, and extravascular compartment to the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci* 2018;**115**. doi:10.1073/pnas.1802155115

- 47 Belykh E, Shaffer KV, Lin C, *et al.* Blood-Brain Barrier, Blood-Brain Tumor Barrier, and Fluorescence-Guided Neurosurgical Oncology: Delivering Optical Labels to Brain Tumors. *Front Oncol* 2020;**10**:739. doi:10.3389/fonc.2020.00739
- 48 Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, *et al.* The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflug Arch - Eur J Physiol* 2007;**454**:345–59. doi:10.1007/s00424-007-0212-8
- 49 Hubert Louis Haeren R, Elisabeth Maria Van De Ven S, Anna Maria Jacobus Van Zandvoort M, *et al.* Assessment and Imaging of the Cerebrovascular Glycocalyx. *Curr Neurovasc Res* 2016;**13**:249–60. doi:10.2174/1567202613666160504104434
- 50 Sweeney MD, Sagare AP, Zlokovic BV. Blood–brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurol* 2018;**14**:133–50. doi:10.1038/nrneurol.2017.188
- 51 Ciechanover A. Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;**6**:79–87. doi:10.1038/nrm1552
- 52 Pardridge WM. The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx J Am Soc Exp Neurother* 2005;**2**:3–14. doi:10.1602/neurorx.2.1.3
- 53 Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 2006;**7**:41–53. doi:10.1038/nrn1824
- 54 Yi X, Manickam DS, Brynskikh A, *et al.* Agile delivery of protein therapeutics to CNS. *J Control Release Off J Control Release Soc* 2014;**190**:637–63. doi:10.1016/j.jconrel.2014.06.017
- 55 Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Casals D, *et al.* Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;**86**:695–8. doi:10.1073/pnas.86.2.695
- 56 Schinkel AH, Wagenaar E, van Deemter L, *et al.* Absence of the mdr1a P-Glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A. *J Clin Invest* 1995;**96**:1698–705. doi:10.1172/JCI118214
- 57 Borst P, Evers R, Kool M, *et al.* The multidrug resistance protein family. *Biochim Biophys Acta* 1999;**1461**:347–57. doi:10.1016/s0005-2736(99)00167-4
- 58 de Boer AG, van der Sandt ICJ, Gaillard PJ. The role of drug transporters at the blood-brain barrier. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2003;**43**:629–56. doi:10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.140204
- 59 Zlokovic BV. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* 2008;**57**:178–201. doi:10.1016/j.neuron.2008.01.003
- 60 Krol S, Macrez R, Docagne F, *et al.* Therapeutic benefits from nanoparticles: the potential significance of nanoscience in diseases with compromise to the blood brain barrier. *Chem Rev* 2013;**113**:1877–903. doi:10.1021/cr200472g
- 61 Banks WA. From blood-brain barrier to blood-brain interface: new opportunities for CNS drug delivery. *Nat Rev Drug Discov* 2016;**15**:275–92. doi:10.1038/nrd.2015.21
- 62 Furtado D, Björnmalm M, Ayton S, *et al.* Overcoming the Blood-Brain Barrier: The Role of Nanomaterials in Treating Neurological Diseases. *Adv Mater Deerfield Beach Fla* 2018;**30**:e1801362. doi:10.1002/adma.201801362

- 63 Ho RH, Kim RB. Transporters and drug therapy: implications for drug disposition and disease. *Clin Pharmacol Ther* 2005;**78**:260–77. doi:10.1016/j.clpt.2005.05.011
- 64 Hardee ME, Zagzag D. Mechanisms of Glioma-Associated Neovascularization. *Am J Pathol* 2012;**181**:1126–41. doi:10.1016/j.ajpath.2012.06.030
- 65 Plate KH, Scholz A, Dumont DJ. Tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapy in malignant gliomas revisited. *Acta Neuropathol (Berl)* 2012;**124**:763–75. doi:10.1007/s00401-012-1066-5
- 66 Nir I, Levanon D, Iosilevsky G. Permeability of Blood Vessels in Experimental Gliomas: Uptake of ^{99m}Tc-Glucoheptonate and Alteration in Blood-Brain Barrier as Determined by Cytochemistry and Electron Microscopy. *Neurosurgery* 1989;**25**:523–32. doi:10.1227/00006123-198910000-00004
- 67 Abou-Antoun TJ, Hale JS, Lathia JD, et al. Brain Cancer Stem Cells in Adults and Children: Cell Biology and Therapeutic Implications. *Neurotherapeutics* 2017;**14**:372–84. doi:10.1007/s13311-017-0524-0
- 68 Bao S, Wu Q, McLendon RE, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 2006;**444**:756–60. doi:10.1038/nature05236
- 69 Liu G, Yuan X, Zeng Z, et al. Analysis of Gene Expression and Chemoresistance of CD133+ Cancer Stem Cells in Glioblastoma. *Mol Cancer* 2006;**5**:67. doi:10.1186/1476-4598-5-67
- 70 Wu A, Wei J, Kong L-Y, et al. Glioma cancer stem cells induce immunosuppressive macrophages/microglia. *Neuro-Oncol* 2010;**12**:1113–25. doi:10.1093/neuonc/noq082
- 71 Lun M, Lok E, Gautam S, et al. The natural history of extracranial metastasis from glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* 2011;**105**:261–73. doi:10.1007/s11060-011-0575-8
- 72 Ginat DT, Schaefer PW. Imaging guidelines and findings of extracranial glioblastoma. *J Neurooncol* 2014;**118**:9–18. doi:10.1007/s11060-014-1404-7
- 73 Wang Y, Bastiancich C, Newland B. Injectable local drug delivery systems for glioblastoma: a systematic review and meta-analysis of progress to date. *Biomater Sci* 2023;**11**:1553–66. doi:10.1039/D2BM01534J
- 74 Chen P-Y, Ozawa T, Drummond DC, et al. Comparing routes of delivery for nanoliposomal irinotecan shows superior anti-tumor activity of local administration in treating intracranial glioblastoma xenografts. *Neuro-Oncol* 2013;**15**:189–97. doi:10.1093/neuonc/nos305
- 75 Zhang Y-H, Zhang H, Liu J, et al. Temozolomide/PLGA microparticles: a new protocol for treatment of glioma in rats. *Med Oncol Northwood Lond Engl* 2011;**28**:901–6. doi:10.1007/s12032-010-9531-2
- 76 Buahin KG, Brem H. Interstitial chemotherapy of experimental brain tumors: comparison of intratumoral injection versus polymeric controlled release. *J Neurooncol* 1995;**26**:103–10. doi:10.1007/BF01060216
- 77 Levina A, Pires Vieira A, Wijetunga A, et al. A Short-Lived but Highly Cytotoxic Vanadium(V) Complex as a Potential Drug Lead for Brain Cancer Treatment by Intratumoral Injections. *Angew Chem Int Ed* 2020;**59**:15834–8. doi:10.1002/anie.202005458
- 78 Brem H, Mahaley MS, Vick NA, et al. Interstitial chemotherapy with drug polymer implants for the treatment of recurrent gliomas. *J Neurosurg* 1991;**74**:441–6. doi:10.3171/jns.1991.74.3.0441
- 79 Mathiowitz E, Saltzman WM, Domb A, et al. Polyanhydride microspheres as drug carriers. II. Microencapsulation by solvent removal. *J Appl Polym Sci* 1988;**35**:755–74. doi:10.1002/app.1988.070350316

- 80 Brem H, Piantadosi S, Burger PC, *et al.* Placebo-controlled trial of safety and efficacy of intraoperative controlled delivery by biodegradable polymers of chemotherapy for recurrent gliomas. *The Lancet* 1995;**345**:1008–12. doi:10.1016/S0140-6736(95)90755-6
- 81 Valtonen S, Timonen U, Toivanen P, *et al.* Interstitial chemotherapy with carmustine-loaded polymers for high-grade gliomas: a randomized double-blind study. *Neurosurgery* 1997;**41**:44–8; discussion 48-49. doi:10.1097/00006123-199707000-00011
- 82 Westphal M, Hilt DC, Bortey E, *et al.* A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. *Neuro-Oncol* 2003;**5**:79–88. doi:10.1093/neuonc/5.2.79
- 83 McGirt MJ, Than KD, Weingart JD, *et al.* Gliadel (BCNU) wafer plus concomitant temozolomide therapy after primary resection of glioblastoma multiforme. *J Neurosurg* 2009;**110**:583–8. doi:10.3171/2008.5.17557
- 84 Bota DA, Desjardins A, Quinn JA, *et al.* Interstitial chemotherapy with biodegradable BCNU (Gliadel) wafers in the treatment of malignant gliomas. *Ther Clin Risk Manag* 2007;**3**:707–15.
- 85 Perry J, Chambers A, Spithoff K, *et al.* Gliadel wafers in the treatment of malignant glioma: a systematic review. *Curr Oncol Tor Ont* 2007;**14**:189–94. doi:10.3747/co.2007.147
- 86 Fleming AB, Saltzman WM. Pharmacokinetics of the Carmustine Implant: *Clin Pharmacokinet* 2002;**41**:403–19. doi:10.2165/00003088-200241060-00002
- 87 Xing W, Shao C, Qi Z, *et al.* The role of Gliadel wafers in the treatment of newly diagnosed GBM: a meta-analysis. *Drug Des Devel Ther* 2015;**9**:3341–8. doi:10.2147/DDDT.S85943
- 88 Bregy A, Shah AH, Diaz MV, *et al.* The role of Gliadel wafers in the treatment of high-grade gliomas. *Expert Rev Anticancer Ther* 2013;**13**:1453–61. doi:10.1586/14737140.2013.840090
- 89 Domb AJ. Polymeric carriers for regional drug therapy. *Mol Med Today* 1995;**1**:134–9. doi:10.1016/s1357-4310(95)80091-3
- 90 Grossman SA, Reinhard C, Colvin OM, *et al.* The intracerebral distribution of BCNU delivered by surgically implanted biodegradable polymers. *J Neurosurg* 1992;**76**:640–7. doi:10.3171/jns.1992.76.4.0640
- 91 Fung LK, Ewend MG, Sills A, *et al.* Pharmacokinetics of interstitial delivery of carmustine, 4-hydroperoxycyclophosphamide, and paclitaxel from a biodegradable polymer implant in the monkey brain. *Cancer Res* 1998;**58**:672–84.
- 92 Tamargo RJ, Myseros JS, Epstein JI, *et al.* Interstitial chemotherapy of the 9L gliosarcoma: controlled release polymers for drug delivery in the brain. *Cancer Res* 1993;**53**:329–33.
- 93 Ashby LS, Smith KA, Stea B. Gliadel wafer implantation combined with standard radiotherapy and concurrent followed by adjuvant temozolomide for treatment of newly diagnosed high-grade glioma: a systematic literature review. *World J Surg Oncol* 2016;**14**:225. doi:10.1186/s12957-016-0975-5
- 94 Sage W, Guilfoyle M, Luney C, *et al.* Local alkylating chemotherapy applied immediately after 5-ALA guided resection of glioblastoma does not provide additional benefit. *J Neurooncol* 2018;**136**:273–80. doi:10.1007/s11060-017-2649-8
- 95 Lechapt-Zalcman E, Levallet G, Dugué AE, *et al.* O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) promoter methylation and low MGMT-encoded protein expression as prognostic markers in glioblastoma

patients treated with biodegradable carmustine wafer implants after initial surgery followed by radiotherapy w: MGMT in Gliadel-Treated Glioblastoma. *Cancer* 2012;**118**:4545–54. doi:10.1002/cncr.27441

- 96 Implantation Guidelines. <https://gliadel.com/hcp/implantation-guidelines.php> (accessed 26 Jun 2023).
- 97 Peppas NA, Bures P, Leobandung W, *et al.* Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Pharm Verfahrenstechnik EV* 2000;**50**:27–46. doi:10.1016/s0939-6411(00)00090-4
- 98 Chai Q, Jiao Y, Yu X. Hydrogels for Biomedical Applications: Their Characteristics and the Mechanisms behind Them. *Gels Basel Switz* 2017;**3**:E6. doi:10.3390/gels3010006
- 99 Budday S, Sommer G, Birkl C, *et al.* Mechanical characterization of human brain tissue. *Acta Biomater* 2017;**48**:319–40. doi:10.1016/j.actbio.2016.10.036
- 100 Hoffman AS. Stimuli-responsive polymers: biomedical applications and challenges for clinical translation. *Adv Drug Deliv Rev* 2013;**65**:10–6. doi:10.1016/j.addr.2012.11.004
- 101 Zhu J, Marchant RE. Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds. *Expert Rev Med Devices* 2011;**8**:607–26. doi:10.1586/erd.11.27
- 102 Larrañeta E, Stewart S, Ervine M, *et al.* Hydrogels for Hydrophobic Drug Delivery. Classification, Synthesis and Applications. *J Funct Biomater* 2018;**9**:E13. doi:10.3390/jfb9010013
- 103 McKenzie M, Betts D, Suh A, *et al.* Hydrogel-Based Drug Delivery Systems for Poorly Water-Soluble Drugs. *Mol Basel Switz* 2015;**20**:20397–408. doi:10.3390/molecules201119705
- 104 Puente P de la, Fettig N, Luderer MJ, *et al.* Injectable Hydrogels for Localized Chemotherapy and Radiotherapy in Brain Tumors. *J Pharm Sci* 2018;**107**:922–33. doi:10.1016/j.xphs.2017.10.042
- 105 Pourgholi F, Hajivalili M, Farhad J-N, *et al.* Nanoparticles: Novel vehicles in treatment of Glioblastoma. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother* 2016;**77**:98–107. doi:10.1016/j.biopha.2015.12.014
- 106 Karim R, Palazzo C, Evrard B, *et al.* Nanocarriers for the treatment of glioblastoma multiforme: Current state-of-the-art. *J Control Release Off J Control Release Soc* 2016;**227**:23–37. doi:10.1016/j.jconrel.2016.02.026
- 107 Pitorre M, Gondé H, Haury C, *et al.* Recent advances in nanocarrier-loaded gels: Which drug delivery technologies against which diseases? *J Control Release Off J Control Release Soc* 2017;**266**:140–55. doi:10.1016/j.jconrel.2017.09.031
- 108 Fourniols T, Randolph LD, Staub A, *et al.* Temozolomide-loaded photopolymerizable PEG-DMA-based hydrogel for the treatment of glioblastoma. *J Control Release Off J Control Release Soc* 2015;**210**:95–104. doi:10.1016/j.jconrel.2015.05.272
- 109 Tao J, Zhang J, Hu Y, *et al.* A conformal hydrogel nanocomposite for local delivery of paclitaxel. *J Biomater Sci Polym Ed* 2017;**28**:107–18. doi:10.1080/09205063.2016.1250344
- 110 Kang T, Cha GD, Park OK, *et al.* Penetrative and Sustained Drug Delivery Using Injectable Hydrogel Nanocomposites for Postsurgical Brain Tumor Treatment. *ACS Nano* 2023;**17**:5435–47. doi:10.1021/acsnano.2c10094

- 111 Zhao M, Danhier F, Bastiancich C, *et al.* Post-resection treatment of glioblastoma with an injectable nanomedicine-loaded photopolymerizable hydrogel induces long-term survival. *Int J Pharm* 2018;**548**:522–9. doi:10.1016/j.ijpharm.2018.07.033
- 112 Zhao M, Bozzato E, Joudiou N, *et al.* Codelivery of paclitaxel and temozolomide through a photopolymerizable hydrogel prevents glioblastoma recurrence after surgical resection. *J Control Release Off J Control Release Soc* 2019;**309**:72–81. doi:10.1016/j.jconrel.2019.07.015
- 113 Gobbo OL, Sjaastad K, Radomski MW, *et al.* Magnetic Nanoparticles in Cancer Theranostics. *Theranostics* 2015;**5**:1249–63. doi:10.7150/thno.11544
- 114 Wu M, Huang S. Magnetic nanoparticles in cancer diagnosis, drug delivery and treatment. *Mol Clin Oncol* 2017;**7**:738–46. doi:10.3892/mco.2017.1399
- 115 Williams HM. The application of magnetic nanoparticles in the treatment and monitoring of cancer and infectious diseases. *Biosci Horiz Int J Stud Res* 2017;**10**:hxx009. doi:10.1093/biohorizons/hxx009
- 116 Meenach SA, Hilt JZ, Anderson KW. Poly(ethylene glycol)-based magnetic hydrogel nanocomposites for hyperthermia cancer therapy. *Acta Biomater* 2010;**6**:1039–46. doi:10.1016/j.actbio.2009.10.017
- 117 Meenach SA, Shapiro JM, Hilt JZ, *et al.* Characterization of PEG-iron oxide hydrogel nanocomposites for dual hyperthermia and paclitaxel delivery. *J Biomater Sci Polym Ed* 2013;**24**:1112–26. doi:10.1080/09205063.2012.741321
- 118 Kim JI, Kim B, Chun C, *et al.* MRI-monitored long-term therapeutic hydrogel system for brain tumors without surgical resection. *Biomaterials* 2012;**33**:4836–42. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.03.048
- 119 Kim JI, Lee BS, Chun C, *et al.* Long-term theranostic hydrogel system for solid tumors. *Biomaterials* 2012;**33**:2251–9. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.11.083
- 120 Arai T, Benny O, Joki T, *et al.* Novel local drug delivery system using thermoreversible gel in combination with polymeric microspheres or liposomes. *Anticancer Res* 2010;**30**:1057–64.
- 121 Wang Z, Liu Z, Wang S, *et al.* Implantation of hydrogel-liposome nanoplatform inhibits glioblastoma relapse by inducing ferroptosis. *Asian J Pharm Sci* 2023;**18**:100800. doi:10.1016/j.ajps.2023.100800
- 122 Heurtault B. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials* 2003;**24**:4283–300. doi:10.1016/S0142-9612(03)00331-4
- 123 Heurtault B, Saulnier P, Pech B, *et al.* A Novel Phase Inversion-Based Process for the Preparation of Lipid Nanocarriers. *Pharm Res* 2002;**19**:875–80. doi:10.1023/A:1016121319668
- 124 Moysan E, González-Fernández Y, Lautram N, *et al.* An innovative hydrogel of gemcitabine-loaded lipid nanocapsules: when the drug is a key player of the nanomedicine structure. *Soft Matter* 2014;**10**:1767. doi:10.1039/c3sm52781f
- 125 Bastiancich C, Vanvarenberg K, Ucakar B, *et al.* Lauroyl-gemcitabine-loaded lipid nanocapsule hydrogel for the treatment of glioblastoma. *J Controlled Release* 2016;**225**:283–93. doi:10.1016/j.jconrel.2016.01.054
- 126 Bastiancich C, Bianco J, Vanvarenberg K, *et al.* Injectable nanomedicine hydrogel for local chemotherapy of glioblastoma after surgical resection. *J Controlled Release* 2017;**264**:45–54. doi:10.1016/j.jconrel.2017.08.019

- 127 Bianco J, Bastiancich C, Joudiou N, *et al.* Novel model of orthotopic U-87 MG glioblastoma resection in athymic nude mice. *J Neurosci Methods* 2017;**284**:96–102. doi:10.1016/j.jneumeth.2017.04.019
- 128 Bastiancich C, Lemaire L, Bianco J, *et al.* Evaluation of lauroyl-gemcitabine-loaded hydrogel efficacy in glioblastoma rat models. *Nanomed* 2018;**13**:1999–2013. doi:10.2217/nnm-2018-0057
- 129 Bastiancich C, Bozzato E, Luyten U, *et al.* Drug combination using an injectable nanomedicine hydrogel for glioblastoma treatment. *Int J Pharm* 2019;**559**:220–7. doi:10.1016/j.ijpharm.2019.01.042
- 130 Wauthoz N, Bastiat G, Moysan E, *et al.* Safe lipid nanocapsule-based gel technology to target lymph nodes and combat mediastinal metastases from an orthotopic non-small-cell lung cancer model in SCID-CB17 mice. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med* 2015;**11**:1237–45. doi:10.1016/j.nano.2015.02.010
- 131 Gazaille C, Bozzato E, Madadian-Bozorg N, *et al.* Glioblastoma-targeted, local and sustained drug delivery system based on an unconventional lipid nanocapsule hydrogel. *Biomater Adv* 2023;**153**:213549. doi:10.1016/j.bioadv.2023.213549

Chapitre 2

Nouvelle architecture d'hydrogels de nanocapsules lipidiques : la réticulation par liaison covalente

Table des matières

INTRODUCTION	37
MATERIELS ET METHODES	39
1. Matériels	39
2. Formulation des NCLs	39
3. Formulation des hydrogels à base de NCLs	40
4. Caractérisation de la distribution de tailles et du potentiel zêta des NCLs.....	41
5. Propriétés rhéologiques des hydrogels de NCLs	41
6. Caractérisation de la diffusion dans les hydrogels de NCLs en utilisant la technique de <i>Fluorescence Recovery After Photobleaching</i> (FRAP).....	41
7. Dissolution des hydrogels et libération des NCLs	42
8. Étude du taux de gonflement des hydrogels de NCLs	42
9. Statistiques.....	43
RESULTATS ET DISCUSSION	44
1. Formulation des NCLs fonctionnalisées par des fonctions maléimide	44
2. Formulation des hydrogels de NCLs	45
2.1. Effet de la composition et de la concentration des NCLs-Mal sur les propriétés viscoélastiques des hydrogels de NCLs.....	47
2.2. Effet de la nature des agents de réticulation sur les propriétés viscoélastiques des hydrogels de NCLs	50
2.3. Effet du rapport molaire maléimide/thiol sur les propriétés viscoélastiques des hydrogels de NCLs...	52
3. Propriétés de diffusion dans les hydrogels de NCLs	53
4. Taux de gonflement des hydrogels de NCLs et propriétés de libération.....	57
CONCLUSION	59
BIBLIOGRAPHIE	60

Introduction

Les hydrogels sont généralement présentés comme des architectures tridimensionnelles construites par réticulations covalentes ou non de polymères hydrophiles naturels ou synthétiques [1,2]. Sur la base de la nature des polymères, leur conformation et la nature de la formation du réseau : physique (réticulations non-covalentes) ou chimique (réticulations covalentes), les hydrogels peuvent acquérir des propriétés telles que la bioadhérence, la biocompatibilité et la biodégradabilité, devenant ainsi des biomatériaux attrayants à des fins médicales [3,4]. Leur utilisation s'est retrouvée généralisée dans de nombreuses applications, allant de l'ingénierie tissulaire pour la médecine régénérative à l'administration de médicaments [5,6].

En tant que technologie de santé, l'utilisation de systèmes à base d'hydrogel dans la conception de formulations à libération prolongée constitue l'une des premières approches pour augmenter la fenêtre thérapeutique des actifs pharmaceutiques [1,5]. Leur participation à l'arsenal pharmaceutique en tant que plateforme de distribution de médicaments a permis l'exploration et l'exploitation de voies d'administration de médicaments non traditionnelles (oculaire [7], nasale [8], vaginale [9], intestinale [10], intra-articulaire [11], intracérébrale [12] et cutanée [13]). De plus, grâce à la mise au point de thérapies indolores et moins contraignantes, les hydrogels sont devenus essentiels pour améliorer le confort et l'observance des patients [5].

Bien que les technologies basées sur les hydrogels puissent être exploitées dans un grand nombre de domaines de la santé, leur utilisation dans le développement de traitements combinant des nanomédicaments a gagné beaucoup d'intérêt [5,12]. Les nanomédicaments, généralement administrés sous forme de suspensions par voie intraveineuse, sont impératifs pour l'amélioration de l'indice thérapeutique de certains actifs en modulant positivement leurs pharmacocinétiques et leurs biodistributions (furtivité, ciblage passif/actif, réduction de la toxicité, entre autres) [3,4,14,15]. Toutefois, leur pertinence pharmacologique diminue lorsque le scénario médical exige une administration localisée de médicaments [5]. Dans le cas des hydrogels, un inconvénient réside dans la difficulté d'être chargé en actifs thérapeutiques hydrophobes en raison de leur nature hydrophile [5,12]. Ainsi, l'association des technologies nano et hydrogel est apparue comme une solution prometteuse pour surmonter ces limites. D'une part, les systèmes hybrides formés par la dispersion de nanomédicaments non viraux (par exemples les liposomes [16], les micelles [17], les nanocapsules [18,19], les nanoparticules polymère [20], les dendrimères [21], etc.) dans les hydrogels peut permettre l'administration locale de médicaments hydrophiles et/ou lipophiles avec une libération prolongée au site d'intérêt [5,19]. D'autre part, la capacité de ces systèmes à imiter les propriétés viscoélastiques et la rigidité des tissus pourrait ouvrir la voie au développement de systèmes d'administration de médicaments compatibles avec l'administration locale intratissulaire [22]. Cette stratégie pharmacologique est pertinente et prometteuse en recherche clinique, notamment dans la thérapie contre les cancers et le traitement des maladies infectieuses/inflammatoires [1,5]. Actuellement, 18 études cliniques associent gel et nanoparticules dans le monde entier, pour des applications odontologiques principalement : analgésie, périodontite, greffage osseux, etc., mais également pour des pathologies oculaires : kératite périphérique ulcéreuse, ou gastrique : pancréatite (<https://clinicaltrials.gov>, consulté le 23 septembre 2023).

Même si une grande variété de conformations sont envisageables pour les systèmes hydrogels chargés de nanoparticules, leur conception s'est largement limitée à l'utilisation d'architecture de type hydrogel classique, soit un hydrogel de polymère avec des nanoparticules dispersées à l'intérieur [12]. Bien que de nouvelles conceptions d'hydrogels chargés de nanoparticules pourraient permettre des améliorations en matière de pharmacocinétique et de biodistribution, cette approche a été rapportée dans très peu d'études [5,12,19]. C'est dans ce contexte que des formulations d'hydrogels sans polymère, uniquement à base de nanocapsules lipidiques (NCLs), ont été récemment développées pour le traitement local et la libération prolongée dirigée contre le glioblastome et les métastases de cancer du poumon [12,18,19,22]. Dans ces travaux, un hydrogel basé sur l'assemblage en réseau de NCLs en suspension a été développé [12,18,19,22]. En ajoutant à la surface des NCLs des agents amphiphiles : une gemcitabine ou une cytidine modifiées en position 4-*N* par des chaînes aliphatiques en C12 ou C16, respectivement, des interactions inter-nanoparticulaires par des liaisons hydrogène peuvent être obtenues, conduisant à la conception d'hydrogels originaux [18,19,22]. Tel que décrit, le principal avantage de ces nouveaux systèmes d'administration de médicaments est l'absence de composant formant le réseau entraînant l'état hydrogel, tels que des polymères ou des agents gélifiants [5,12]. Les toxicités éventuelles liées au réseau polymérique des hydrogels ou à leurs produits de dégradation sont alors évitées. La dégradation de ces hydrogels est exclusivement influencée par la libération de NCLs chargées de médicaments, contrairement aux formulations d'hydrogels classiques [5,12,23].

Partant de ce concept d'hydrogels à base de NCLs par association non covalente, nous avons décidé d'explorer la formulation de réseaux tridimensionnels formés par l'association covalente des NCLs. Nous avons émis l'hypothèse que l'organisation covalente des nanoparticules pourrait former des architectures avec des caractéristiques intéressantes en matière de résistance mécanique [24,25]. De plus, étant donné que la stabilité structurale des hydrogels formés de façon non-covalente dépend des conditions environnementales : pH, force ionique, température, etc. [24], nous pouvons nous attendre à ce que la liaison covalente entre les NCLs entraîne des structures tridimensionnelles plus stables. Ainsi, nous avons mis au point des hydrogels à base de NCLs réticulées de façon covalente par la réaction d'addition de Michael entre des NCLs modifiées en surface par des fonctions maléimide et des agents de réticulation : des polyéthylènes glycol (PEG) modifiés par des fonctions thiol. Les hydrogels ont été conçus en utilisant des agents de réticulation de différentes masses molaires, et avec différents rapports molaires maléimide/thiol. Les propriétés viscoélastiques de ces hydrogels ont été caractérisées par rhéologie. De plus, la diffusion de systèmes d'intérêt à l'intérieur et en dehors des hydrogels : actifs modèles libres ou NCLs réticulées ou non à l'intérieur des hydrogels, ont été évaluées par microscopie confocale et des expériences de libération, afin de confirmer la présence d'interactions covalentes. Finalement, le taux de gonflement des hydrogels a été mesuré pour sélectionner des hydrogels présentant un taux de gonflement limité, c'est-à-dire potentiellement utilisables *in vivo* dans des tissus sensibles tels que le parenchyme cérébral.

Matériels et méthodes

1. Matériels

Le Labrafac® WL1349 (triglycérides d'acides caprique et caprylique) (Lab) a été acheté chez Gattefosse S.A. (Saint-Priest, France). Le Kolliphor® HS15 (un mélange de PEG 660 12-hydroxystéarate et de PEG 660) (Kol) a été acheté chez BASF (Ludwigshafen, Allemagne). Le Span® 80 (Span80), le PEG dithiol (2arm-PEG-SH) (Mn = 1,5, 3,4 et 8 kDa), le PEG thiol 4 branches (4arm-PEG-SH) (Mn = 5, 10 et 20 kDa) et le chlorure de sodium (NaCl) ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). L'eau déionisée a été obtenue à partir d'un système Milli-Q plus system (Millipore, Paris, France). Le 1,2-distéaroyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine-N-[maléimide(PEG)-2000] (DSPE-PEG-Mal) a été acheté chez Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, Etats-Unis). Le 4-chlorobenzènesulfonate de 1,1'-dioctadécyl-3,3',3'-tétraméthylindodicarbocyanine (DiD), le perchlorate de 3,3'-dioctadécyloxcarbocyanine (DiO), et l'ester N-succinimidyle de diacétate de 5-carboxyfluorescéine (5-FAM) ont été achetés chez Invitrogen (Cergy-Pontoise, France).

2. Formulation des NCLs

La formulation des NCLs est basée sur une méthode d'inversion de phases en température bien décrite et maîtrisée au laboratoire MINT - INSERM U1066 / CNRS 6021 [19,26,27]. Brièvement, la préparation des NCLs a été réalisée par la création d'une émulsion huile-dans-eau, composée de Lab (1,117 g) (phase huile), de Kol (0,917 g) et de Span80 (0,450 g) (tensioactifs), de NaCl (0,054 g) et d'eau (1,517 g) (phase aqueuse). Trois cycles de chauffage et de refroidissement entre 50 °C et 90 °C ont été réalisés sous agitation constante (barreau aimanté à environ 900 tr/min) permettant le passage d'une émulsion huile-dans-eau à basse température à une émulsion eau-dans-huile à haute température. Lors de la dernière étape de refroidissement, au moment de la zone d'inversion de phases (environ 80 °C), le système a subi un choc thermique irréversible par l'addition de 2 mL d'eau froide (4 °C), ce qui a entraîné la formation spontanée d'une suspension de NCLs. La suspension de NCLs a été maintenue en agitation constante jusqu'à ce que sa température revienne à la température ambiante puis a été stockée à 4 °C.

Pour la formulation de NCLs modifiées en surface par des fonctions maléimide (NCLs-Mal), le DSPE-PEG-Mal a été incorporé dans les NCLs de deux manières différentes : i) soit ajouté au départ dans la formulation des NCLs [29], ii) soit ajouté à la fin du processus de formulation [30]. Pour la première stratégie, le DSPE-PEG-Mal (5 mg) a été ajouté avec tous les autres composants avant les cycles de température. Pour la seconde stratégie, différentes quantités de DSPE-PEG-Mal (5, 10 et 15 mg) ont été solubilisées dans 0,5 mL d'eau afin d'obtenir des concentrations allant de 0,2% à 0,67% (m/m_{NCLs}) dans la formulation finale. Cette solution de DSPE-PEG-Mal a

été ajoutée à la formulation lors de la dernière étape de refroidissement, au moment de la zone d'inversion de phases, rapidement complété par 1,5 mL d'eau froide (4 °C) de manière à conserver une concentration des NCLs identique à la formulation conventionnelle. La concentration finale en NCLs est environ 375 mg/mL (voir [28] pour le calcul des concentrations).

Pour la préparation des NCLs marquées par des molécules fluorescentes (DiO ou DiD), le DiO ou le DiD ont été dissous dans un mélange de Lab et d'acétone à une concentration de 0,1% (m/m_{Lab}). L'acétone a été éliminé du mélange par évaporation complète dans un bain-marie (60 °C), sous agitation. Ensuite, cette phase huile a été incorporée, avec les autres ingrédients, dans l'émulsion huile-dans-eau avant de lancer le processus de formulation des NCLs par inversion de phases à l'abri de la lumière. Les suspensions de NCLs, NCLs marquées au DiO (NCLs-DiO), NCL-Mal et les NCL-Mal marquées au DiD (NCLs-Mal-DiD) ont été stockées à 4 °C.

3. Formulation des hydrogels à base de NCLs

Les hydrogels à base de NCLs ont été formulés par réaction de Michael de type maléimide-thiol [24], entre les fonctions maléimide à la surface des NCLs et des fonctions thiol présentes sur des chaînes PEGylées, que l'on considèrera comme agents de réticulation. Des 2arm-PEG-SH de masses molaires moyennes en nombre M_n de 1,5, 3,4 et 8 kDa, et des 4arm-PEG-SH de M_n de 5, 10 et 20 kDa ont été utilisés. Les hydrogels à base de NCLs ont été préparés en mélangeant une solution de l'un des agents de réticulation (dissous dans de l'eau pure) et la suspension NCLs-Mal à un rapport volumique constant 1/4, avec divers rapports molaires maléimide/thiol : de 0,125 à 4, et différentes concentrations finales en NCLs : de 100 à 300 mg/mL (suspensions de NCLs diluées dans l'eau pure). Le mélange a été agité (agitateur orbital à environ 650 tr/min) pendant au moins 3h à température ambiante. Les hydrogels à base de NCLs obtenus ont été stockés à 4 °C.

Pour la formulation d'hydrogels de NCLs-DiD contenant des NCLs-DiO (non réticulées) ou contenant du 5-FAM, les agents de réticulation ont d'abord été dissous dans la suspension de NCLs-DiO ou dans une solution aqueuse de 5-FAM (0,16 mg/mL). Ensuite, les solutions d'agents de réticulation ont été mélangées avec la suspension NCLs-Mal-DiD (DSPE-PEG-Mal à 0,67% (m/m_{NCLs})) à un rapport volumique constant 1/4, avec un rapport équimolaire maléimide/thiol correspondant à une concentration finale en NCLs de 300 mg/mL. Les hydrogels de NCLs-DiD, les hydrogels de NCLs-DiD contenant des NCLs-DiO (non réticulées) et les hydrogels de NCLs-DiD contenant du 5-FAM ont été stockés à 4 °C.

4. Caractérisation de la distribution de tailles et du potentiel zêta des NCLs

Le Z-average (Z-ave), le diamètre hydrodynamique (distribution en intensité), l'indice de polydispersité (PdI) et le potentiel zêta (PZ) des suspensions de NCLs et de NCLs-Mal ont été caractérisés à 25 °C à l'aide d'un Malvern Zetasizer® Nano ZS (Malvern Panalytical, Worcestershire, Royaume-Uni). L'instrument de diffusion de la lumière quasi-élastique est équipé d'un laser hélium-néon de 4 mW avec une longueur d'onde de 633 nm et un angle de diffusion fixé à 173°. L'ajustement des fonctions d'autocorrélation a été réalisé par ajustement exponentiel (approche des cumulants) pour la détermination du Z-ave et du PdI. L'ajustement par l'analyse CONTIN a été réalisée pour déterminer la distribution en intensité des diamètres hydrodynamiques. L'approximation de Smoluchowski a été utilisée pour déterminer la mobilité électrophorétique, requise pour la détermination du PZ. Pour les mesures, les suspensions de NCLs ont été diluées dans l'eau pure à une concentration en NCLs d'environ 6 mg/mL. Toutes les caractérisations ont été réalisées avec des valeurs de conductivité similaires.

5. Propriétés rhéologiques des hydrogels de NCLs

Les propriétés mécaniques des hydrogels de NCLs ont été mesurées avec un rhéomètre Kinexus® (Malvern Panalytical, Worcestershire, Royaume-Uni), équipé d'une géométrie cône-plan (diamètre de 40 mm et angle de 2°). Dans un premier temps, un balayage en amplitude d'oscillation de déformation de cisaillement (de 0,01% à 100%) a été réalisé à fréquence d'oscillation constante (1Hz), à 20 °C, de façon à déterminer le régime linéaire des propriétés viscoélastiques. Dans ce régime (amplitude d'oscillation de déformation de cisaillement constante de 0,1%), les modules élastiques (G') et visqueux (G'') caractérisant les propriétés viscoélastiques des matériaux ont été mesurés en fonction de la fréquence d'oscillation (de 0,1 à 10 Hz).

6. Caractérisation de la diffusion dans les hydrogels de NCLs en utilisant la technique de *Fluorescence Recovery After Photobleaching* (FRAP)

Des expériences de FRAP ont été menées sur un microscope confocal Leica TCS SP8 AOBS (Leica Microsystems, Wetzlar, Allemagne) équipé d'un objectif HC PL Fluotar 10x/NA 0,30. Les hydrogels de NCLs-DiD, hydrogels de NCLs-DiD contenant des NCLs-DiO (non réticulées) et les hydrogels de NCLs-DiD contenant du 5-FAM, ainsi que leurs suspensions correspondantes : NCLs-Mal-DiD, NCLs-Mal-DiD contenant des NCLs-DiO et NCLs-Mal-DiD contenant du 5-FAM, ont été déposés sur des lames de verre (75 x 26 mm) et analysés à température ambiante. Les images FRAP ont été acquises avec un zoom 3,5x. Le sténopé a été réglé pour générer une résolution XY de 0,65 µm et une résolution Z de 4,8 µm. La région d'intérêt pour l'impulsion de

photoblanchiment a été définie dans un cercle de 40 μm de diamètre, placé au centre de chaque image. Le blanchiment a été réalisé en une seule étape avec l'*acousto-Optical Beam Splitter* réglé à 100 % de transmission pour cinq lignes du laser à ions argon (458 nm (5 mW), 476 nm (4 mW), 488 nm (40 mW), 496 nm (6 mW) et 514 nm (10 mW)). L'efficacité de photoblanchiment a été augmentée en minimisant le champ d'acquisition et en concentrant la lumière de sortie du laser dans la région de photoblanchiment par la fonction Leica Zoom-In et en concentrant l'intensité lumineuse dans le point focal par l'amplificateur Leica FRAP. Le DiO et le 5-FAM ont été excités avec le laser à ions argon à 488 nm (40 mW) tandis que DiD a été excité avec le laser hélium-néon à 633 nm (10 mW). Les émissions de fluorescence ont été détectées de 492 à 550 nm pour le DiO et le 5-FAM et de 637 à 750 nm pour le DiD. Les images post-photoblanchiment ont été capturées toutes les 2 sec pendant 3 min, 0,65 sec après la séquence de photoblanchiment. La fréquence de balayage pour l'acquisition des images pré et post-photoblanchiment était de 400 Hz.

7. Dissolution des hydrogels et libération des NCLs

La dissolution des hydrogels de NCLs-DiD et la libération des NCLs-DiO (non réticulées) ou du 5-FAM ont été évaluées en utilisant des hydrogels de NCLs-DiD et contenant des NCLs marquées au DiO ou du 5-FAM. Des hydrogels de NCLs (1 mL) ont été préparés comme précédemment décrits dans des tubes à hémolyse (bord droit, fond rond, 6 mL) (NAFVSM, Andeville, France). Les pré-formulations d'hydrogels ont été mélangées par vortex pendant 3 sec pour garantir une dispersion homogène des NCLs-Mal et des agents de réticulation. Une fois les hydrogels de NCLs obtenus, 4 mL de PBS 1X (pH de 7,4, 37 °C) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) ont été soigneusement ajoutés dans les tubes à hémolyse sans modifier la forme de l'hydrogel. Par la suite, les tubes ont été fermés et incubés dans l'obscurité à 37 °C, sous agitation constante pendant 6 jours (agitateur orbital à 125 rpm). Après divers temps d'incubation, 500 μL de surnageant ont été prélevés et remplacés par 500 μL de milieu (à 37 °C). Les concentrations en NCLs-DiD, de NCLs-DiO ou en 5-FAM ont été déterminées en mesurant l'intensité de fluorescence associée à chaque fluorophore (DiD, DiO et 5-FAM) dans les échantillons prélevés à l'aide d'un FluoroMax[®]-4 (Horiba Scientific, NJ, États-Unis). Les longueurs d'onde d'excitation ont été réglées à 648 nm pour le DiD et 440 nm pour le DiO et le 5-FAM. Des spectres d'émission de fluorescence allant de 653 à 800 nm ont été collectés pour le DiD et allant de 480 à 550 nm pour le DiO et le 5-FAM. Les profils de libération cumulés ont été obtenus à partir des courbes étalon d'intensité de fluorescence à la longueur d'onde maximale d'émission de fluorescence, λ_{max} , en fonction des concentrations en NCL-Mal-DiD ($\lambda_{\text{max}} = 670 \text{ nm}$, $R^2 = 0,9999$), en NCLs-DiO ($\lambda_{\text{max}} = 505 \text{ nm}$, $R^2 = 0,9965$) et en 5-FAM ($\lambda_{\text{max}} = 518 \text{ nm}$, $R^2 = 0,9992$).

8. Étude du taux de gonflement des hydrogels de NCLs

La capacité de gonflement des hydrogels de NCLs a été étudiée avec les hydrogels de NCLs formulés avec l'agent de réticulation 4-arm-PEG20kDa-SH, à une concentration en NCLs de 300 mg/mL, une composition de maléimide de 0,67% (m/m_{NCLs}) et un rapport équimolaire maléimide/thiol. Trois cents mg d'hydrogels de NCLs

ont été placés dans des tubes de 2 mL et centrifugés à 2000 tr/min pour assurer un dépôt optimal des hydrogels au fond du tube. Après centrifugation, 1 mL de PBS 1X (pH de 7,4, 37 °C) a été précautionneusement ajouté aux tubes sans modifier la forme de l'hydrogel. Les tubes ont ensuite été fermés et incubés à température ambiante, sans agitation, pendant 48 h. À la fin de l'incubation, le PBS 1X non absorbé par l'hydrogel a été retiré et la masse des hydrogels gonflés a été pesée. Le taux de gonflement des hydrogels de NCLs, défini par l'augmentation de la masse d'hydrogel due à l'absorption du milieu aqueux [30], a été déterminé par l'équation suivante :

$$\text{taux de gonflement} = \frac{m_G - m_{NG}}{m_{NG}}$$

où m_{NG} et m_G représentent les masses des hydrogels de NCLs avant (non gonflés) et après l'incubation dans le PBS 1X (gonflés), respectivement.

9. Statistiques

Tous les résultats sont exprimés par les paramètres statistiques moyenne et écart-type d'au moins 3 répétitions indépendantes. Les données ont été analysées avec un test statistique non-paramétrique de Kruskal-Wallis, suivi d'un test *post-hoc* *Dunn* de comparaison de paires. Une différence avec un seuil de significativité $p < 0,05$ a été considérée comme significative.

Résultats et discussion

1. Formulation des NCLs fonctionnalisées par des fonctions maléimide

La formulation des NCLs fonctionnalisées de groupements maléimide (NCLs-Mal) est basée sur le protocole de formulation des NCLs conventionnelles de 50 nm précédemment établi [27]. Conformément aux données rapportées par Gazaille *et al.*, des suspensions de NCLs avec des valeurs de Z-ave d'environ 50 nm et de $PdI < 0,1$ ont été obtenues en l'absence de DSPE-PEG-Mal, avec une valeur de PZ proche de -10 mV (tableau 2-1).

L'incorporation de fonctions maléimide à la surface des NCLs a ensuite été effectuée par l'ajout de DSPE-PEG-Mal en début (concentration finale = 0,2% (m/m_{NCLs})) ou en fin (concentration finale = 0,2%, 0,45% et 0,67% (m/m_{NCLs})) du procédé de formulation des NCLs. Comme présenté dans le tableau 2-1, les distributions de tailles des NCLs sont significativement différentes suivant que l'on ait ajouté ou non le DSPE-PEG-Mal. L'ajout de DSPE-PEG-Mal a provoqué une augmentation des valeurs de Z-ave comprises entre 23 et 34% et des valeurs de PdI comprises entre 83 et 150%. Au contraire, les valeurs de PZ n'ont pas été modifiées de manière significative par l'ajout de DSPE-PEG-Mal. De plus, le procédé d'addition des fonctions maléimide n'a pas influencé la distribution de tailles ou les caractéristiques de surface des NCLs-Mal puisque des résultats similaires ont été obtenus pour les NCLs formulées selon les deux protocoles et avec une proportion de maléimide équivalente : DSPE-PEG-Mal 0,2% (m/m_{NCLs}).

Lainé *et al.* avaient obtenu des distributions de tailles similaires à celles que nous avons obtenu, ainsi qu'une augmentation de la taille des NCLs par l'ajout de DSPE-PEG-méthoxylé en début du procédé de formulation, sur des NCLs légèrement différentes en composition de tensio-actifs [29]. Il semble que l'ajout de DSPE-PEG-Mal en début ou en fin de procédé de formulation ne modifie pas les caractéristiques des nano-objets. En outre, Perrier *et al.* ont utilisé un procédé de post-insertion, différent de celui que nous avons mis en œuvre. Ils ont modifié les NCLs (même composition en tensio-actifs que celle de Lainé *et al.*), une fois formulées par le procédé classique, en incubant du DSPE-PEG-méthoxy ou -amino à différents temps et différentes températures [29,31]. Des augmentations de tailles des NCLs similaires à celles que nous avons obtenues avaient été observées, avec des variations de PZ négligeables dans le cas du DSPE-PEG-méthoxy. L'ajout de DSPE-PEG-amino à la surface des NCLs avait entraîné quant à lui un changement de signe du PZ, permettant de confirmer la modification de surface par des fonction amine.

Tableau 2-1. L'ajout de DSPE-PEG-Mal modifie légèrement la distribution de tailles de NCLs.

Distributions de tailles : Z-average (Z-ave) et indice de polydispersité (PdI), et caractéristiques de surface : potentiel zêta (PZ) des NCLs en fonction de la composition en maléimide : DSPE-PEG-Mal à 0, 0,2, 0,45 et 0,67% (m/m_{NCLs}). L'addition de DSPE-PEG-Mal a été effectuée en début ou fin du procédé de formulation des NCLs (n=3-13 ; moyenne \pm écart-type ; * $p < 0,05$).

Ajout du DSPE-PEG-Mal	DSPE-PEG-Mal (% , m/m_{NCLs})	Z-ave (nm)	PdI	PZ (mV)
n.a.	n.a.	53 \pm 2	0,06 \pm 0,02	-9 \pm 2
Début de formulation	0,2	71 \pm 1 *	0,14 \pm 0,01 *	-8 \pm 2
Fin de formulation	0,2	71 \pm 1	0,15 \pm 0,01	-8 \pm 1
	0,45	65 \pm 3	0,11 \pm 0,02	-11 \pm 2
	0,67	71 \pm 6	0,14 \pm 0,03	-9 \pm 1

n.a. : non applicable

2. Formulation des hydrogels de NCLs

La formation d'hydrogels de polymère avec des réticulations obtenues par la réaction d'addition de Michael de type maléimide-thiol est bien décrite dans la littérature [24,25,32]. Cette même stratégie a été utilisée après incubation à température ambiante de NCLs-Mal avec différents agents de réticulation PEGylés : 2arm-PEG-SH et 4arm-PEG-SH, de manière à déclencher une liaison covalente entre les NCLs et obtenir des hydrogels de NCLs.

Dans un premier temps, les NCLs-Mal formulées par l'ajout du DSPE-PEG-Mal à 0,2% (m/m_{NCLs}) en début ou fin de formulation, ont été incubées avec le 4arm-PEG10kDa-SH, avec un rapport équimolaire maléimide/thiol et une concentration en NCLs de 300 mg/mL. Seule la formulation de NCLs-Mal pour laquelle le DSPE-PEG-Mal a été ajouté en fin de formation a conduit à une forme hydrogel après incubation. Lorsque le DSPE-PEG-Mal a été ajouté en début de formulation des NCLs-Mal, aucun changement significatif n'a été observé pour la suspension, qui est restée sensiblement la même post-incubation. Ces résultats sont confirmés par les mesures de rhéologie. En effet, après que le régime de linéarité des propriétés viscoélastiques de l'hydrogel de NCLs a été déterminé jusqu'à une valeur d'amplitude d'oscillation de déformation de cisaillement d'environ 10% (figure 2-1A), l'hydrogel de NCLs est bien caractérisé par des propriétés de type solide viscoélastique (figure 2-1B). Les valeurs de G' sont bien supérieures à celles de G'' et ne varient pas avec la fréquence d'oscillation de déformation de cisaillement. En comparant avec la forme en suspension, les valeurs de G' et G'' sont de 100 à 1000 fois plus faibles et ne restent pas constantes avec la fréquence d'oscillation de déformation de cisaillement, caractéristique ici d'un liquide viscoélastique.

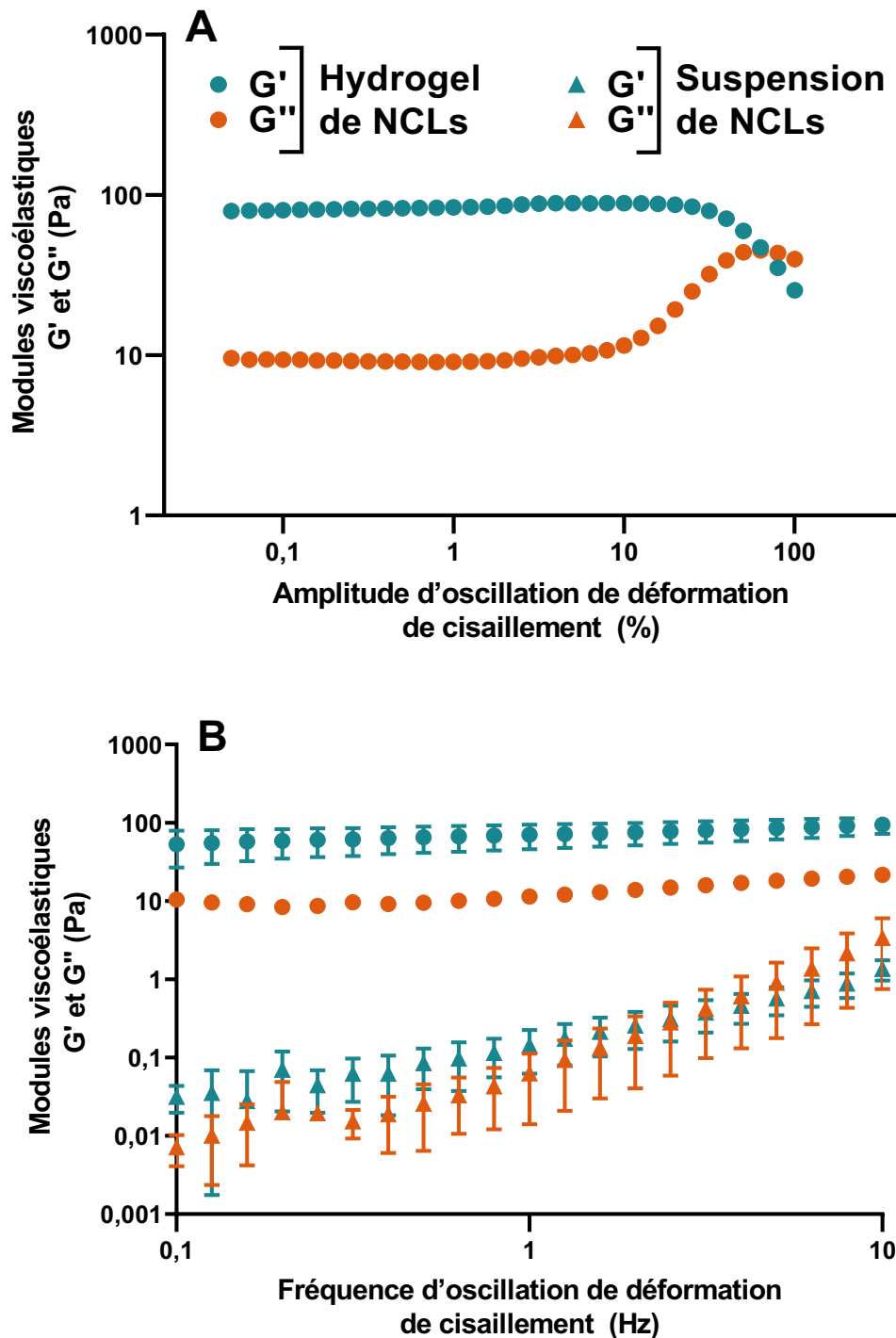


Figure 2-1. Le procédé de modification des NCLs par les fonctions maléimide influence l'obtention de l'hydrogel de NCLs. A) Régime de linéarité : modules élastique G' et visqueux G'' en fonction de l'amplitude d'oscillation de déformation de cisaillement pour un hydrogel de NCLs (fréquence d'oscillation de déformation de cisaillement à 1Hz). B) Propriétés viscoélastiques : modules élastique G' et visqueux G'' en fonction de la fréquence d'oscillation de déformation de cisaillement pour un hydrogel et une suspension de NCLs (amplitude d'oscillation de déformation de cisaillement à 0,1%) ($n = 4$; moyenne \pm écart-type). L'hydrogel et la suspension de NCLs ont été obtenu avec l'ajout du DSPE-PEG-Mal en fin ou en début du procédé de formulation des NCLs, respectivement. $C_{NCLs-Mal} = 300$ mg/mL, DSPE-PEG-Mal 0,2% (m/m_{NCLs}), 4arm-PEG10kDa-SH et rapport équimolaire maléimide/thiol.

La perte de la forme hydrogel de NCLs lorsque le DSPE-PEG-Mal est ajouté en début de formulation peut être expliquée par le stress thermique associé au procédé d'inversion de phases effectué pour formuler les NCLs. Les cycles de température entraîneraient une déstabilisation de la structure chimique du groupement maléimide, réduisant ainsi son activité et limitant sa capacité à former des interactions covalentes avec les groupements thiol des agents de réticulation, comme déjà observé dans la littérature [25]. Pour la suite, toutes les formulations d'hydrogels de NCLs ont été réalisées avec des NCLs-Mal pour lesquelles le DSPE-PEG-Mal a été ajouté en fin du protocole de formulation des NCLs, lors de la dernière phase de refroidissement, pour lesquelles la réactivité des groupements maléimide a été conservée.

2.1. Effet de la composition et de la concentration des NCLs-Mal sur les propriétés viscoélastiques des hydrogels de NCLs

Les hydrogels de NCLs ont été formulés par le mélange de l'agent de réticulation 4arm-PEG10kDa-SH avec les suspensions de NCLs-Mal à différentes compositions en DSPE-PEG-Mal : 0,2, 0,45 et 0,67% (m/m_{NCLs}) et à différentes concentrations en NCLs : 100, 200 et 300 mg/mL, toujours avec un rapport équimolaire maléimide/thiol.

Toutes les conditions testées n'ont pas entraîné la formation d'un hydrogel de NCLs. Comme le montre la figure 2-2, les propriétés viscoélastiques des hydrogels à base de NCLs dépendent de la composition en maléimide à la surface des NCLs pour toutes les concentrations en NCLs étudiées. A une concentration en NCLs-Mal de 100 mg/mL et quelle que soit la composition en DSPE-PEG-Mal entre 0,2 et 0,67% (m/m_{NCLs}), les mélanges sont restés à l'état de suspension de NCLs. Les valeurs de G' et G'' sont inférieures à 1 Pa expliquant leur faible rigidité. Les coefficients d'élasticité que nous avons définis comme étant le rapport G'/G'' sont aussi relativement faibles : $2,4 \pm 1,3$, $0,7 \pm 0,1$ et $1,1 \pm 0,1$ pour les compositions en DSPE-PEG-Mal de 0,2, 0,45 et 0,67% (m/m_{NCLs}), respectivement.

A une concentration en NCLs-Mal de 200 mg/mL, la composition en DSPE-PEG-Mal de 0,2% (m/m_{NCLs}) n'a toujours pas entraîné la formation d'un hydrogel de NCLs. Les valeurs de G' et G'' restent aussi relativement faibles ($< 1\text{Pa}$) avec un faible coefficient d'élasticité : $0,4 \pm 0,2$. En revanche, un changement d'état des mélanges a été observé aux plus fortes compositions en DSPE-PEG-Mal. A 0,45% (m/m_{NCLs}), le mélange est capable de partiellement s'écouler et ne forme pas un hydrogel sur tout le volume du mélange. Les valeurs de G' et G'' sont augmentées : environ 15 et 3 Pa, respectivement ainsi que le coefficient d'élasticité : $6,3 \pm 2,1$. Ce même état est retrouvé pour la composition en DSPE-PEG-Mal de 0,2% (m/m_{NCLs}) mais avec une concentration en NCLs-Mal de 300 mg/mL, avec des valeurs de G' et G'' proches : environ 7 et 3 Pa, respectivement, soit un faible coefficient d'élasticité : $2,2 \pm 0,2$.

Avec une composition en DSPE-PEG-Mal de 0,67% (m/m_{NCLs}) et une concentration en NCLs-Mal de 200 mg/mL, le mélange forme un hydrogel sur tout son volume et ne s'écoule pas. Les valeurs de G' et G'' sont

significativement augmentées : environ 39 et 4 Pa, respectivement, avec un fort coefficient d'élasticité : $13,2 \pm 7,1$. Cet état hydrogel est aussi retrouvé à une composition en DSPE-PEG-Mal plus faible : 0,45% (m/m_{NCLs}) mais une concentration en NCLs-Mal plus importante : 300 mg/mL. Les valeurs de G' et G'' sont élevées avec environ 70 et 11 Pa, respectivement, et avec un coefficient d'élasticité à $6,1 \pm 1,9$. Finalement, le mélange à base de NCLs-Mal les plus concentrées : 300 mg/mL et la composition en DSPE-PEG-Mal la plus forte : 0,67% (m/m_{NCLs}) a permis la préparation d'un hydrogel avec la rigidité la plus élevée : valeurs de G' et G'' à environ 280 et 10 Pa, respectivement, et avec le plus fort coefficient d'élasticité à $22,4 \pm 6,9$.

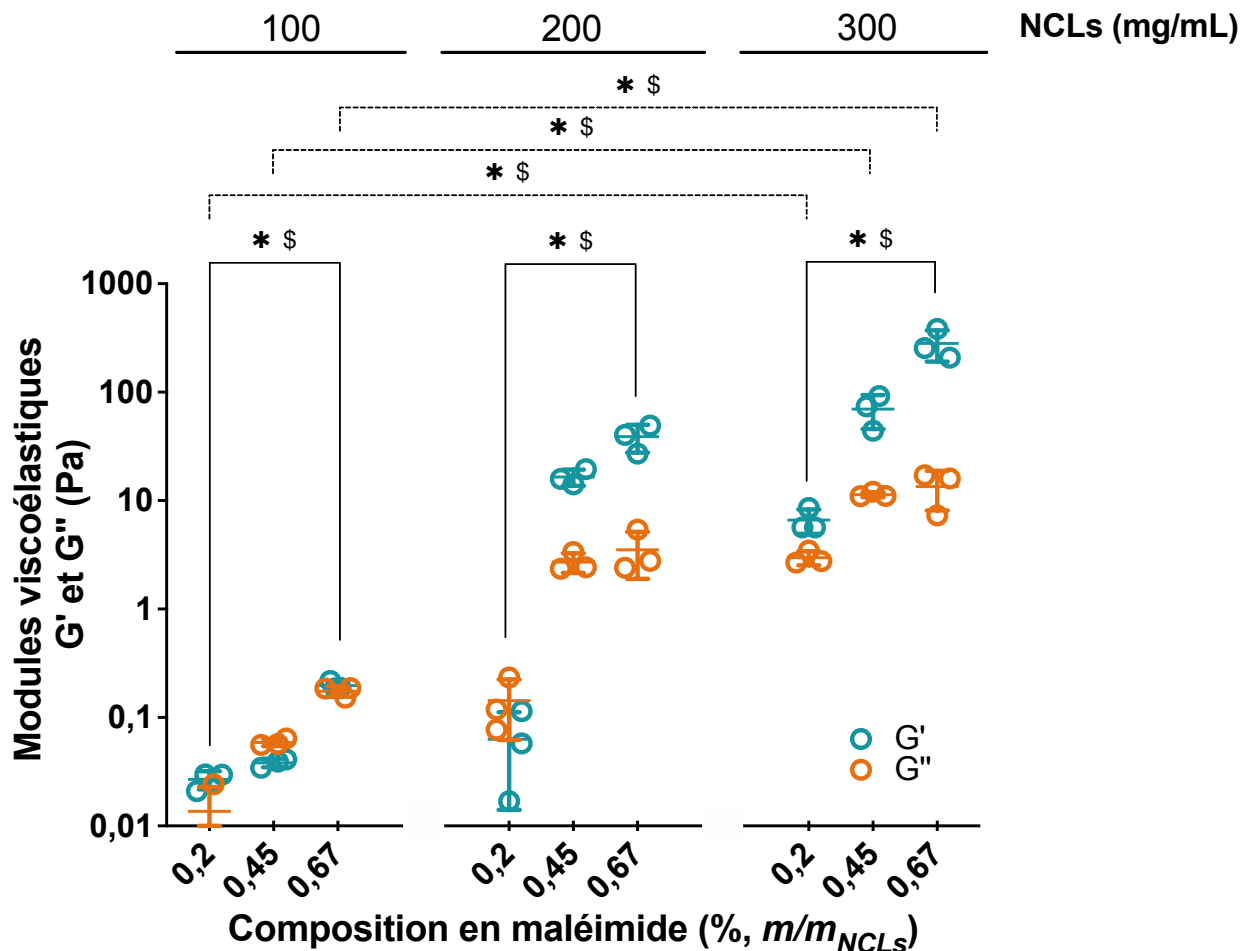


Figure 2-2. La composition en maléimide influence les propriétés viscoélastiques des hydrogels de NCLs. Modules élastiques (G') et visqueux (G'') en fonction de la composition en maléimide (de 0,2 à 0,67% (m/m_{NCLs}) et à différentes concentrations en NCLs (de 100 à 300 mg/mL), obtenus dans le régime linéaire (amplitude et fréquence d'oscillation de déformation de cisaillement constantes à 0,1% et 1Hz, respectivement). 4arm-PEG10kDa-SH et rapport équimolaire maléimide/thiol ($n = 3$; moyenne \pm écart-type ; comparaison des valeurs $G' * p < 0.05$; comparaison des valeurs $G'' \$ p < 0.05$).

Afin de vérifier si l'absence de formation d'hydrogel de NCLs, notamment aux faibles compositions en DSPE-PEG-Mal, est due à un défaut de la réaction d'addition de Michael, nous avons mesuré les distributions de tailles des nano-objets sur les mélanges pour lesquels les NCLs-Mal ont été formulées avec les DSPE-PEG-Mal

0,2% (m/m_{NCLs}). Les distributions de tailles des nano-objets post-incubation sont différentes et semblent être conditionnées par la concentration en NCLs (figure 2-3). Avec $C_{NCLs-Mal} = 200$ mg/mL, les nano-objets ont la taille la plus importante avec en parallèle une augmentation de leur dispersion : $Z\text{-ave} = 109 \pm 5$ nm et $PdI = 0,27 \pm 0,01$. Ce changement de distribution de tailles est certainement obtenu grâce à la réaction de Michael qui permet de former des dimères ou des trimères de NCLs par réaction covalente. L'absence d'hydrogel de NCLs serait finalement due à une réaction incomplète entre les groupements maléimide et thiol ne formant qu'un réseau partiel dans tout le volume du mélange à cause de l'éloignement des NCLs. Cette hypothèse est confirmée par une taille des nano-objets plus faible avec moins de dispersion : $Z\text{-ave} = 90 \pm 1$ nm et $PdI = 0,19 \pm 0,01$ lorsque $C_{NCLs-Mal} = 100$ mg/mL. Cette dernière distribution de tailles des nano-objets reste quand même bien différente de celle des NCLs-Mal préincubation : $Z\text{-ave} = 71 \pm 1$ nm et $PdI = 0,15 \pm 0,01$. Il est à noter que la réaction de Michael ne modifie pas de manière significative les valeurs de PZ : -11 ± 3 et -10 ± 2 mV pour $C_{NCLs-Mal} = 200$ et 100 mg/mL, respectivement, à comparer à -8 ± 1 mV pour les NCLs-Mal préincubation.

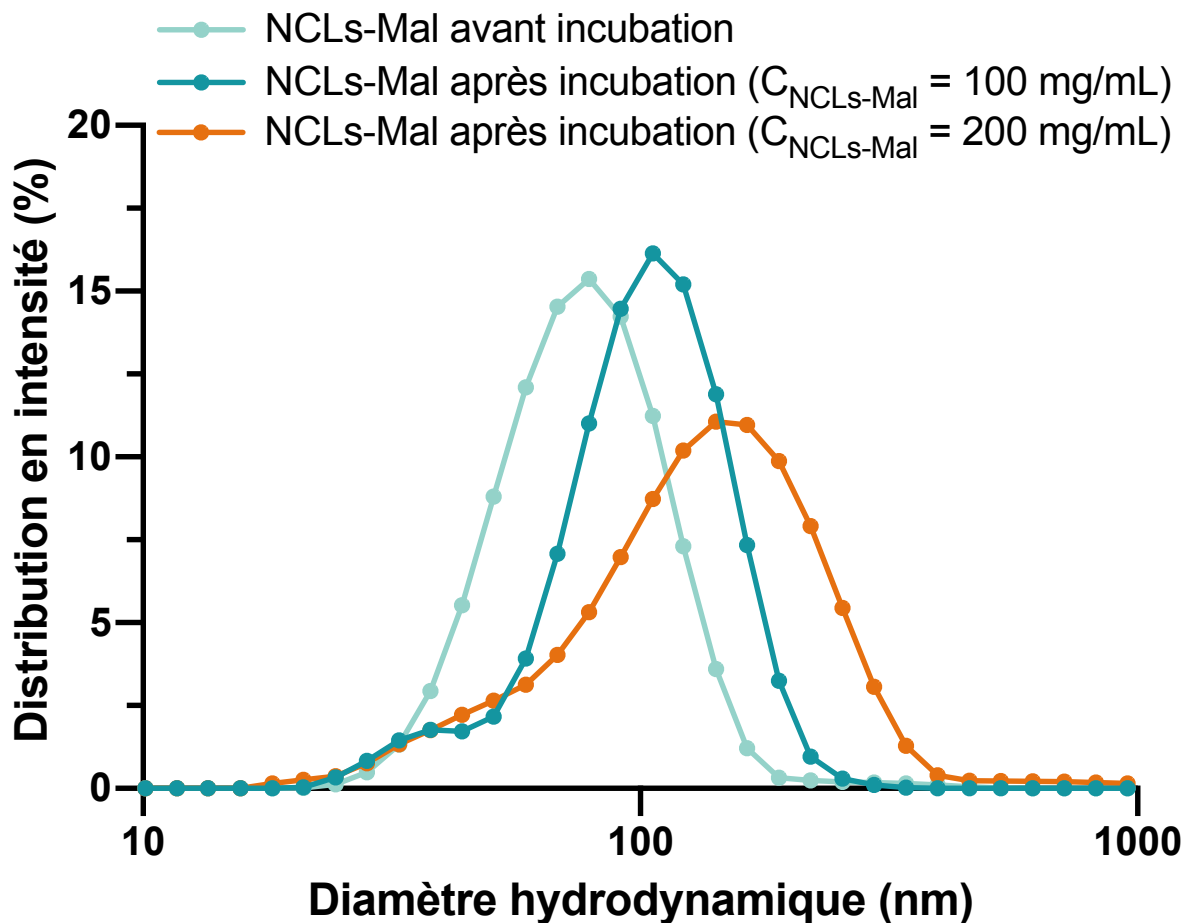


Figure 2-3. L'addition de Michael de type maléimide-thiol permet l'association covalente entre les NCLs. Diamètre hydrodynamique (distribution en intensité) des NCLs-Mal avant incubation ou des nano-objets présents dans la suspension après incubation avec le 4arm-PEG10kDa-SH à différentes concentrations en NCLs-Mal : 100 ou 200 mg/mL. DSPE-PEG-Mal 0,2% (m/m_{NCLs}), rapport équimolaire maléimide/thiol.

Une perte de manière similaire de rigidité des hydrogels due à la diminution de la concentration de NCLs avait été observée dans les hydrogels formulés par auto-association de NCLs médiée par des interactions de type liaison hydrogène [19]. Une concentration en NCLs de 100 mg/mL avait été décrite comme étant une limite inférieure en dessous de laquelle les formulations sont capables de s'écouler. Le manque d'association est dû à la dilution des NCLs et donc leur éloignement les unes des autres.

D'une manière générale, l'augmentation des deux facteurs de formulation que sont la concentration en NCLs-Mal et la composition en maléimide à la surface des NCLs a entraîné l'augmentation de la capacité à obtenir des hydrogels de NCLs, avec une plus forte rigidité et une plus grande élasticité. La concentration en NCLs de 300 mg/mL et la composition en DSPE-PEG-Mal de 0,67% (m/m_{NCLs}) se sont avérées être les paramètres de formulation qui ont permis la préparation des hydrogels ayant la plus grande rigidité, et ils ont été maintenus pour la suite de la formulation des hydrogels de NCLs.

2.2. Effet de la nature des agents de réticulation sur les propriétés viscoélastiques des hydrogels de NCLs

Les propriétés viscoélastiques des hydrogels de NCLs ont ensuite été analysées en fonction de la nature des agents de réticulation thiolés pour la réticulation covalente avec les NCLs-Mal. Pour ces expériences, les hydrogels ont été formulés avec un ratio équimolaire maléimide/thiol et deux types d'agents de réticulation : le 2arm-PEG-SH ($M_n = 1,5, 3,4$ et 8 kDa) et le 4arm-PEG-SH ($M_n = 5, 10$ et 20 kDa).

Quel que soit l'agent de réticulation utilisé, des hydrogels de NCLs ont été obtenus, avec une augmentation graduelle de leur rigidité observée avec l'augmentation de la masse molaire des agents de réticulation (figure 2-4). Les valeurs de G' et G'' passent d'environ 9 et 2 Pa à environ 72 et 7 Pa, respectivement, avec des valeurs de coefficient d'élasticité qui augmentent de $4,8 \pm 0,8$ à $11,6 \pm 3,1$, lorsque la masse molaire du 2arm-PEG-SH utilisé est augmentée de $M_n = 1,5$ à 8 kDa. Lorsque la masse molaire du 4arm-PEG-SH utilisé est augmentée de $M_n = 5$ à 20 kDa, les valeurs de G' et G'' passent d'environ 180 et 9 Pa à environ 530 et 20 Pa, respectivement, avec des valeurs de coefficient d'élasticité qui restent relativement stables : $20,6 \pm 7,9$ et $24,1 \pm 2,7$, respectivement.

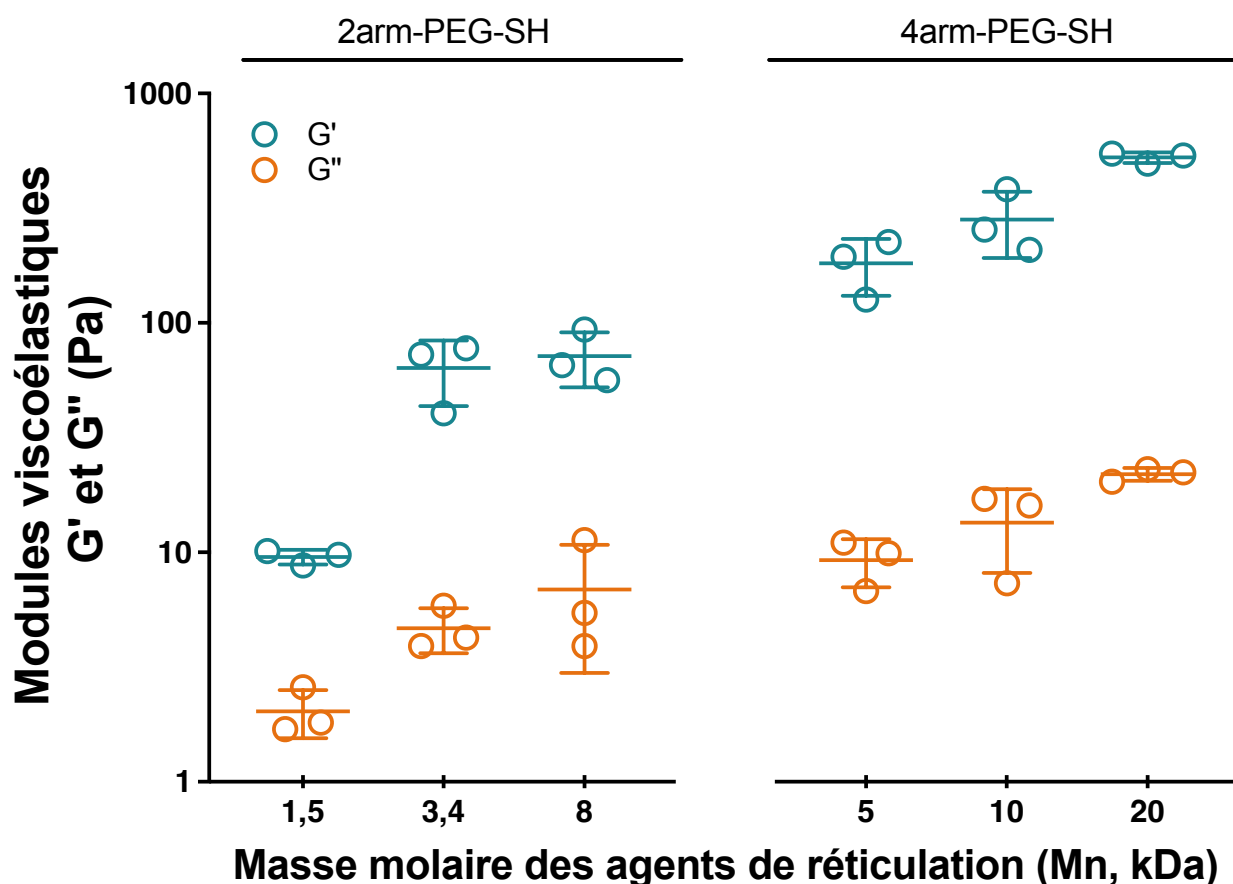


Figure 2-4. La nature des agents de réticulation utilisés influence les propriétés viscoélastiques des hydrogels de NCLs. Modules élastiques (G') et visqueux (G'') en fonction de la nature des PEG-SH (2arm-PEG-SH ($M_n = 1,5, 3,4$ et 8 kDa) et 4arm-PEG-SH ($M_n = 5, 10$ et 20 kDa)), obtenus dans le régime linéaire (amplitude et fréquence d'oscillation de déformation de cisaillement constantes à $0,1\%$ et 1Hz , respectivement). $C_{NCLs-Mal} = 300$ mg/mL, DSPE-PEG-Mal $0,67\%$ (m/m_{NCLs}) et rapport équimolaire maléimide/thiol ($n = 3$; moyenne \pm écart-type).

Comme expliqué par Summonte *et al.*, ces résultats pourraient être liés à l'influence des caractéristiques structurelles des PEG comme la longueur de chaîne [24]. La longueur et donc la flexibilité de la chaîne de PEG de l'agent de réticulation permettrait une plus grande probabilité de réaction entre les groupements maléimide et thiol, et jouerait donc un rôle clé dans la mise en place des réticulations covalentes [33]. De plus, il semble que la rigidité des hydrogels de NCLs est plus importante avec l'utilisation du 4arm-PEG-SH, pour des valeurs de masses molaires équivalentes. Cet agent de réticulation est une molécule en étoile à 4 branches, donc possède déjà un nœud de réticulation interne, et donc ajoute de la réticulation covalente à la réticulation générée par la réaction de Michael. Cet apport supplémentaire de réticulation covalente explique ainsi la plus forte rigidité de ces hydrogels. Dans notre scénario, la rigidité des hydrogels est augmentée par des agents de réticulation thiolés plus longs et plus flexibles. Ainsi, il a été décidé de continuer à utiliser 2arm-PEG8kDa-SH et avec le 4arm-PEG20kDa-SH comme agents de réticulation pour la formulation des hydrogels de NCLs.

2.3. Effet du rapport molaire maléimide/thiol sur les propriétés viscoélastiques des hydrogels de NCLs

L'évaluation des paramètres influençant la formulation s'est achevée par l'étude de la relation entre le rapport molaire maléimide/thiol et les propriétés viscoélastiques des hydrogels de NCLs. Les hydrogels de NCLs ont été formulés avec le 2arm-PEG8kDa-SH et le 4arm-PEG20kDa-SH, à une concentration en NCLs-Mal à 300 mg/mL et des rapports molaires maléimide/thiol variant de 0,125 à 4.

Comme observé dans la figure 2-5, les valeurs de G' et G'' varient en fonction du rapport des fonctions réactives. Le rapport molaire maléimide/thiol qui a permis la préparation des hydrogels de NCLs les plus rigides se situe entre 0,5 et 1 ; les valeurs de G' et G'' sont comprises entre 5 et 150 Pa pour le 2arm-PEG8kDa-SH et entre 15 et 900 Pa pour le 4arm-PEG20kDa-SH. Les coefficients d'élasticité sont également très grands à ces rapports molaires maléimide/thiol, avec des valeurs à $15,0 \pm 4,1$ pour le 2arm-PEG8kDa-SH et $48,2 \pm 6,1$ pour le 4arm-PEG20kDa-SH pour le rapport molaire maléimide/thiol à 0,5.

Particulièrement pour le 2arm-PEG8kDa-SH, une réduction de la rigidité des hydrogels de NCLs est observée pour des rapports molaires maléimide/thiol inférieurs à 0,5 ou supérieurs à 1, conduisant à des assemblages partiellement capables de s'écouler et ne formant pas un hydrogel sur tout le volume du mélange pour les rapports molaires maléimide/thiol de 0,125, 0,25 et 2. Les valeurs de G' et G'' sont comprises entre 1 et 30 Pa, avec des coefficients d'élasticité plus faibles que précédemment : de $1,0 \pm 0,2$ à $5,9 \pm 2,5$. La réduction de la rigidité du système provoquée par une diminution de la concentration en agent de réticulation, soit des rapports molaires maléimide/thiol important dans notre cas, a aussi été observée dans les hydrogels de polymère. Wong *et al.* ont expliqué que la densité des agents de réticulation est un facteur de formulation clé qui gouverne la structure interne des hydrogels et donc leurs propriétés mécaniques [33]. Si ce facteur augmente, les interactions puis les réticulations entre les agents de réticulation adjacents sont facilitées et donc l'architecture de l'hydrogel formé est plus dense. Néanmoins, sur la base de nos résultats, l'effet opposé, à savoir la diminution de la rigidité des hydrogels de NCLs, est observé quand les fonctions thiols sursature les groupements maléimide à la surface des NCLs, c'est-à-dire des rapports molaires maléimide/thiol très inférieurs à 1. Il est probable qu'à un rapport molaire maléimide/thiol de 0,25 et 0,125, la présence massive d'agents de réticulation thiolés interfère avec l'association inter-nanoparticulaire des NCLs, réduisant ainsi les propriétés mécaniques de l'hydrogel formé. Néanmoins, l'utilisation du 4arm-PEG20kDa-SH pour un rapport molaire maléimide/thiol de 0,125 permet toujours l'obtention d'un hydrogel de NCLs avec une rigidité correcte, des valeurs G' et G'' relativement élevées (comprises entre 30 et 400 Pa) et un coefficient d'élasticité de $10,8 \pm 0,8$.

Indépendamment de la nature de l'agent de réticulation, l'utilisation d'un rapport molaire maléimide/thiol de 4, soit des agents de réticulation en important défaut, a empêché la formation des hydrogels de NCLs, avec l'obtention d'un mélange visqueux sans présence partielle d'hydrogel. Les valeurs de G' et G'' sont comprises entre 0,05 et 0,5 Pa avec l'utilisation du 2arm-PEG8kDa-SH (coefficient d'élasticité à $0,2 \pm 0,1$) et entre 1 et 5 Pa avec l'utilisation du 4arm-PEG20kDa-SH (coefficient d'élasticité à $3,1 \pm 0,3$).

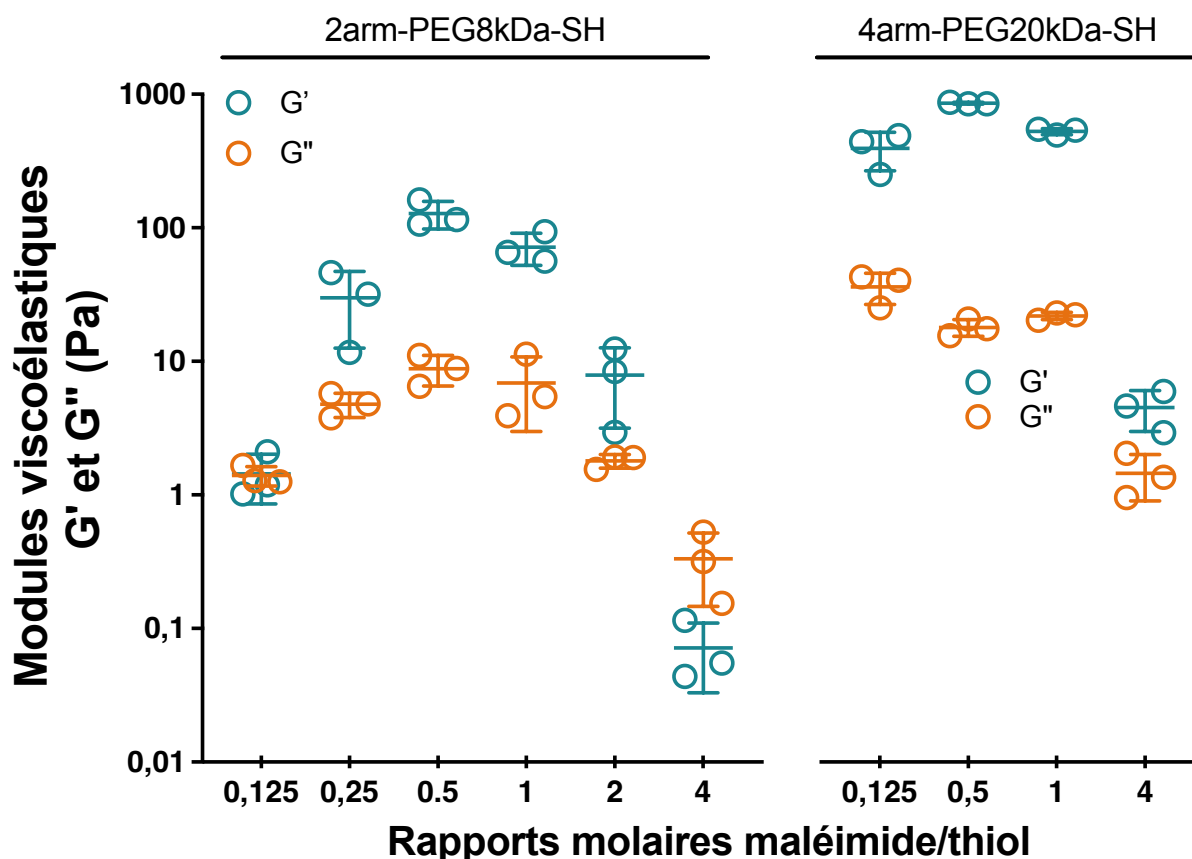


Figure 2-5. Il existe un rapport maléimide/thiol optimal pour former des hydrogels de NCLs. Modules élastiques (G') et visqueux (G'') en fonction du rapport molaire maléimide/thiol (de 0,125 à 4 (n/n)) pour le 2arm-PEG8kDa-SH et le 4arm-PEG-20K-SH), obtenus dans le régime linéaire (amplitude et fréquence d'oscillation de déformation de cisaillement constantes à 0,1% et 1Hz, respectivement). $C_{NCLs-Mal} = 300$ mg/mL et DSPE-PEG-Mal 0,67% (m/m_{NCLs}) ($n = 3$; moyenne \pm écart-type).

Pour conclure, la variation de la rigidité et du coefficient d'élasticité des hydrogels de NCLs est multifactorielle. Elle dépend de la concentration en NCLs, de la densité des fonctions maléimide à la surface des NCLs, de la taille des agents de réticulation et du rapport des groupements fonctionnels (maléimide et thiol) permettant la réticulation covalente entre les NCLs.

3. Propriétés de diffusion dans les hydrogels de NCLs

Les hydrogels de NCLs-DiD ont été soumis à une analyse de *Fluorescence Recovery After Photobleaching* (FRAP) de manière à confirmer leur architecture structurée par un réseau stable de liaisons covalentes entre les NCLs-Mal. Comme présenté dans les images de FRAP (figure 2-6), l'échantillon contrôle correspondant à des NCLs-Mal-DiD non réticulées en suspension a montré un recouvrement rapide de la fluorescence après photoblanchiment, ce qui indique un mouvement brownien des NCLs non réticulées, libres de diffuser dans la

suspension aqueuse. En revanche, le recouvrement de fluorescence de la zone de FRAP est resté quasi nul sur 180 sec après photoblanchiment quel que soit l'agent de réticulation : 2arm-PEG8kDa-SH ou 4arm-PEG20kDa-SH rajouté dans les formulations pour former les hydrogels de NCLs (figure 2-6). Avec ce changement de diffusion évident, on peut donc supposer que la matrice des hydrogels est constituée d'associations covalentes entre les NCLs-Mal, empêchant ainsi leur mouvement brownien [34].

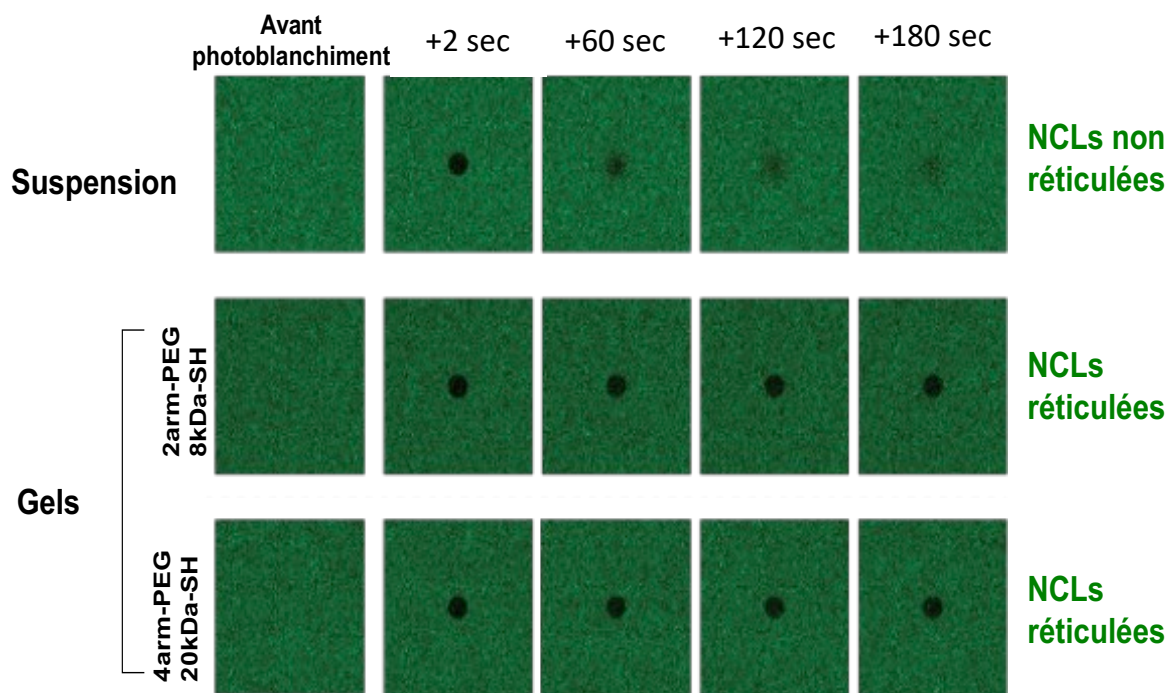


Figure 2-6. Les hydrogels de NCLs sont constitués d'associations covalentes entre les NCLs-Mal. Images de FRAP montrant la diffusion des NCLs dans les hydrogels ou suspensions de NCLs ($C_{\text{NCLs-Mal}} = 300 \text{ mg/mL}$, DSPE-PEG-Mal 0,67% (m/m_{NCLs}), avec ou sans 2arm-PEG8kDa-SH ou 4arm-PEG-20K-SH et rapport équimolaire maléimide/thiol). Hydrogels ou suspension de NCLs marquées au DiD.

Tel que nous pensons la structure de l'hydrogel de NCLs, le milieu aqueux supportant le réseau doit présenter une phase totalement continue comme dans le cas d'un hydrogel de polymère plus classique. Néanmoins, une structure complètement différente, de type phase éponge, pourrait aussi être imaginée avec notre système puisque qu'il est composé de 2 phases : huile et eau, non miscibles, et des tensioactifs à l'interface de ces 2 phases. De tels systèmes ont déjà été proposés, appelés organogels, mais ayant des propriétés viscoélastiques similaires aux hydrogels [35]. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons cherché à vérifier la perméabilité de notre structure en réseau en utilisant deux systèmes modèles de masses molaires différentes : du 5-FAM considéré comme ayant une faible masse molaire et des NCLs-DiO considérées comme ayant une forte masse molaire, soient des NCLs qui ne sont pas réticulées avec le réseau de NCLs formant l'hydrogel. Les diffusions de ces systèmes modèles ont été vérifiées par FRAP et ont été comparées avec des contrôles consistant en les mêmes formulations d'hydrogels de NCLs mais en absence de l'agent de réticulation, soient les suspensions. Les échantillons contrôles montrent les mêmes résultats que précédemment, soit un recouvrement rapide de la fluorescence après photoblanchiment, ce qui indique un mouvement brownien des NCLs-Mal-DiD non réticulées,

des NCLs-DiO et du 5-FAM (figures 2-7 et 2-8). De plus, nous pouvons noter que le recouvrement de fluorescence pour le 5-FAM est plus rapide que pour les NCLs puisque sa masse molaire est plus petite et donc son coefficient de diffusion plus grand. Dans le cas des NCLs-Mal-DiD et NCLs-DiO, la vitesse de recouvrement est sensiblement la même comme les deux NCLs ont environ la même taille et donc environ le même coefficient de diffusion. Avec les formes hydrogels de NCLs et quels que soient les agents de réticulation utilisés : 2arm-PEG8kDa-SH ou 4arm-PEG20kDa-SH, la diffusion de notre système modèle de faible masse molaire reste inchangée si on la compare avec notre système contrôle de suspension de NCLs. Le recouvrement de la zone de FRAP après photoblanchiment pour le 5-FAM confirme donc que celui-ci est capable de diffuser dans tout le réseau (figure 2-7), et donc que la phase aqueuse ne présenterait pas de discontinuité dans notre hydrogel.

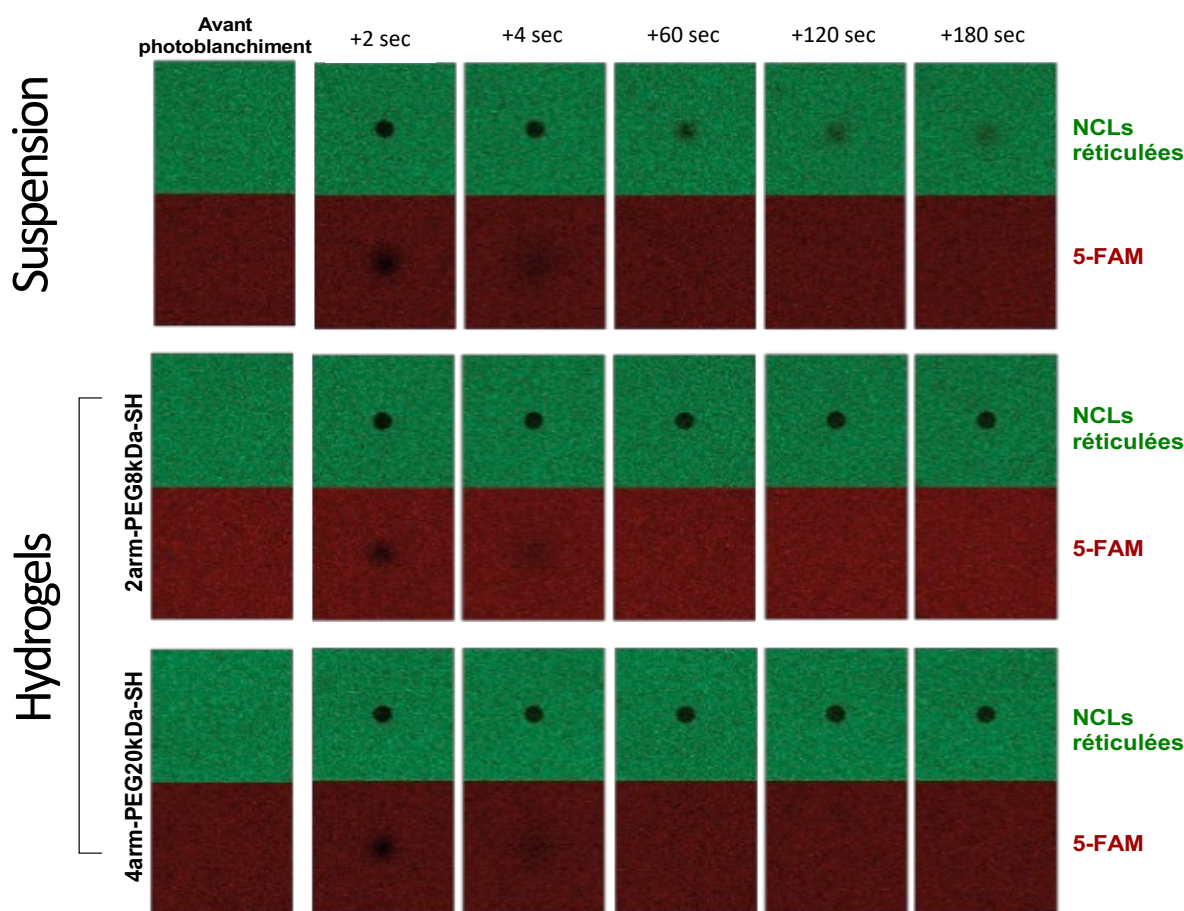


Figure 2-7. Les hydrogels de NCLs sont perméables aux molécules de faible masse molaire. Images de FRAP montrant la diffusion d'une molécule modèle de faible masse molaire (5-FAM) dans les hydrogels ou suspensions de NCLs ($C_{NCLs-Mal} = 300 \text{ mg/mL}$, DSPE-PEG-Mal 0,67% (m/m_{NCLs}), avec ou sans 2arm-PEG8kDa-SH ou 4arm-PEG-20K-SH et rapport équimolaire maléimide/thiol). Hydrogels ou suspension de NCLs marquées au DiD, contenant du 5-FAM dans la phase aqueuse.

En revanche, toujours avec les formes hydrogels de NCLs, la diffusion de notre système modèle de forte masse molaire est inexistante. Le recouvrement de la zone de FRAP pour les NCLs-DiO est quasi nul après photoblanchiment, et comparable à celui observé pour les NCLs-Mal-DiD réticulées formant l'hydrogel (figure 2-

8). Même si les NCLs-DiO étaient capables de diffuser car non réticulées au réseau formant l'hydrogel, leur taille est trop grande comparativement à la dimension des agents de réticulation de faible masse molaire. Ainsi, ces nano-objets restent piégés dans le réseau, et la nature de l'agent de réticulation : 2arm-PEG8kDa-SH ou 4arm-PEG20kDa-SH, n'a pas d'influence sur leur mouvement brownien.

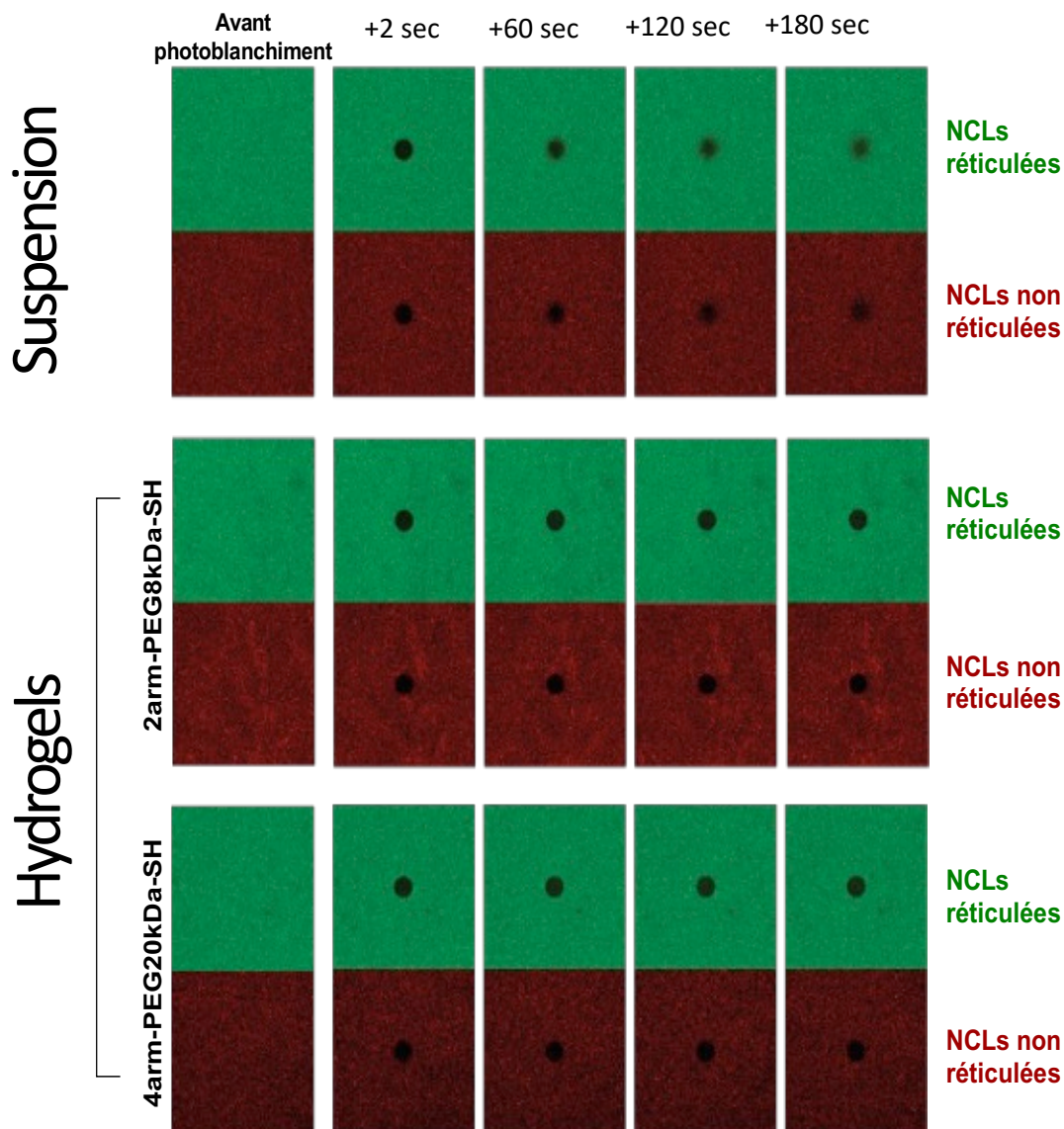


Figure 2-8. Les hydrogels de NCLs ne sont pas perméables aux molécules de forte masse molaire. Images de FRAP montrant la diffusion de molécules modèles (NCLs) dans les hydrogels ou suspensions de NCLs ($C_{NCLs-Mal} = 300 \text{ mg/mL}$, DSPE-PEG-Mal 0,67% (m/m_{NCLs}), avec ou sans 2arm-PEG8kDa-SH ou 4arm-PEG-20K-SH et rapport équimolaire maléimide/thiol). Hydrogels ou suspension de NCLs marquées au DiD, contenant des NCLs marquées au DiO dans la phase aqueuse.

4. Taux de gonflement des hydrogels de NCLs et propriétés de libération

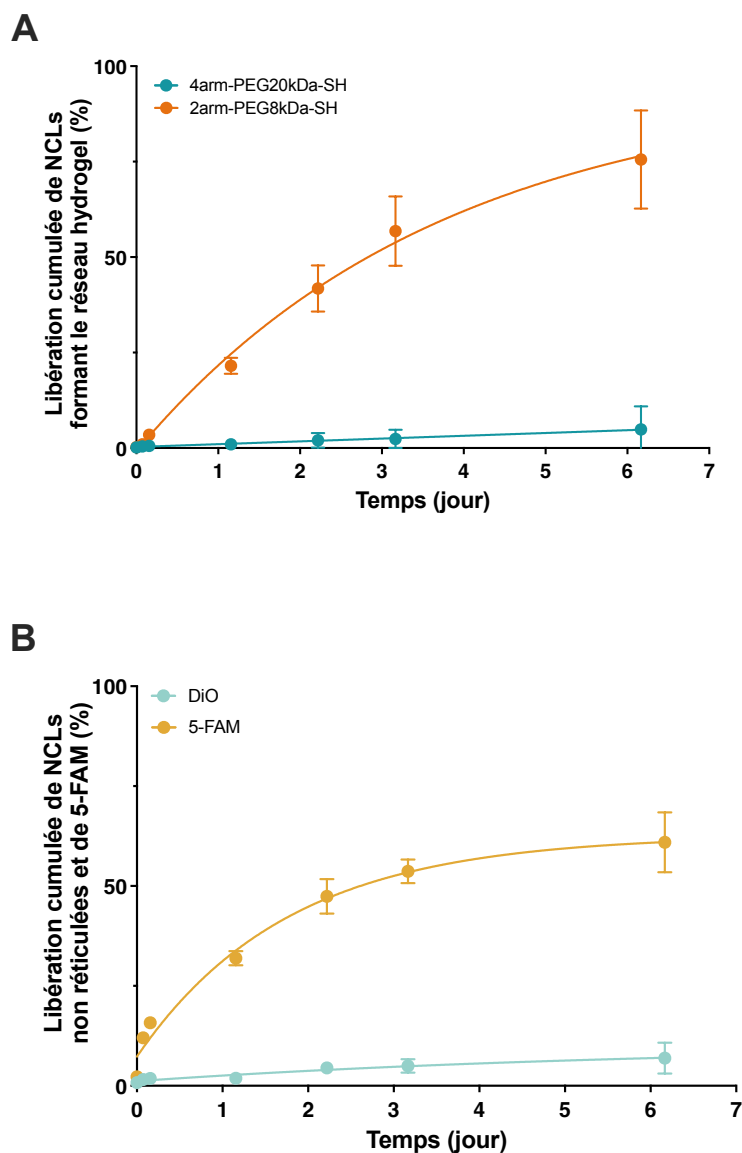


Figure 2-9. La nature des agents de réticulation influence la stabilité de l'hydrogel de NCLs et la masse molaire des molécules libres dans l'hydrogel est un facteur limitant leur libération. A) Libération cumulée des NCLs formant les hydrogels de NCLs réticulées avec le 2-arm-PEG8kDa-SH ou le 4-arm-PEG20kDa-SH et B) libération cumulée des NCLs dispersées ou du 5-FAM solubilisé dans les hydrogels de NCLs réticulées avec le 4-arm-PEG20kDa-SH. $C_{NCLs-Mal} = 300$ mg/mL, DSPE-PEG-Mal 0,67% (m/m_{NCLs}) et rapport équimolaire maléimide/thiol. Les expériences de libération ont été réalisées dans du PBS 1X (pH=7,4) à 37 °C sous constante agitation ($n = 3-6$; moyenne \pm écart-type).

Les hydrogels de NCLs-DiD réticulés en utilisant le 2arm-PEG8kDa-SH ou le 4arm-PEG20kDa-SH ont été incubés avec du PBS 1X à température ambiante et sous constante agitation afin de vérifier leur stabilité (figure 2-9A). Il a été observé une dissolution progressive des hydrogels de NCLs à base de 2arm-PEG8kDa-SH avec une libération de NCLs-Mal-DiD d'environ $75 \pm 13\%$ dans le milieu extérieur après 6 jours d'incubation. Dans le cas de l'hydrogel obtenu à partir du 4arm-PEG20kDa-SH, la structure de l'hydrogel formulé est plus résistante et a montré une libération limitée de NCLs-Mal-DiD, soit $5 \pm 6\%$ sur la même période. Une explication sur les différences de stabilités observées dans les hydrogels formulés avec les deux types d'agents de réticulation pourrait porter sur la structure moléculaire particulière de chacun d'eux. Tandis que le 2arm-PEG8kDa-SH est formé d'une chaîne linéaire de PEG et d'un groupement fonctionnel thiol à chaque extrémité, le 4arm-PEG20kDa-SH est dans une configuration en étoile et possède 4 groupements fonctionnels thiol par molécule. Fondamentalement, le 4arm-PEG20kDa-SH est capable de lier plus de deux NCLs adjacentes en même temps, ce qui conférerait un degré de réticulation plus élevé et formerait un hydrogel plus dense qu'avec le 2arm-PEG8kDa-SH [33], et donc avec des propriétés viscoélastiques plus élevées comme observé précédemment. Pour ce dernier, la libération des NCLs indique une réticulation incomplète des NCLs dans tout le volume de l'hydrogel, mais non observable par la technique de FRAP.

Pour aller plus loin, nous avons évalué les propriétés de gonflement pour l'hydrogel formé à partir de 4arm-PEG20kDa-SH, c'est-à-dire l'hydrogel ne présentant pas une dégradation lors des expériences de libération. Après 6 jours d'incubation avec du PBS 1X, le taux de gonflement de l'hydrogel est de $9 \pm 5\%$ ($n=3$). La capacité de l'hydrogel à absorber en milieu aqueux extérieur est limitée si on le compare avec d'autres hydrogels de polymère pour lesquels les taux de gonflement peuvent aller jusqu'à 2 500 ou 3 000% [36,37]. Ce faible gonflement est tout à fait explicable par la faible masse molaire des agents de réticulation qui empêche l'hydrogel de NCLs de s'expanser. Cependant, cette propriété est tout à fait compatible et un réel avantage si on souhaite utiliser ces hydrogels comme implant thérapeutique. En effet, une expansion trop prononcée d'un hydrogel pourrait entraîner des lésions irréversibles suivant la nature du tissu dans lequel ils sont déposés. De manière générale, l'expansion des hydrogels peut provoquer une compression des tissus adjacents et par extension des compressions vasculaires et neurales [38]. C'est par exemple le cas de l'hydrogel DuraSeal[®], utilisé comme colle chirurgicale dans la réparation de la dure-mère, qui a causé à plusieurs reprises de par son expansion des syndromes de la queue de cheval par compression de la moelle épinière ou d'éléments neuraux [39,40].

Des études de libération des systèmes modèles utilisés précédemment pour les expériences de FRAP ont été réalisés à partir de cet hydrogel de NCLs préparé avec 4-arm-PEG20kDa-SH. En accord avec les données obtenues précédemment, deux profils de libération distincts ont été observés en fonction de la masse molaire des systèmes modèles utilisés (figure 2-9B). A nouveau, le 5-FAM capable de diffuser à travers les mailles de l'hydrogel a montré une plus grande capacité à se libérer de l'hydrogel que les NCLs-DiO qui y restent piégées, atteignant des libérations cumulées sur 6 jours de $61 \pm 7\%$ et $7 \pm 4\%$, respectivement. Une rapide libération de molécules de faible masse molaire à partir d'hydrogels de NCLs formés par liaisons hydrogène avait déjà été observée par Pitorre *et al.* [19]. Néanmoins, il avait été décrit que la libération totale de la fluorescéine (molécule modèle) avait eu lieu en quelques heures, démontrant que les hydrogels de NCLs formés par liaisons covalentes pourraient avoir une capacité accrue à retarder la libération de molécules même de faible masse molaire.

Conclusion

A travers ce travail, le développement de nouvelles structures d'hydrogel basées uniquement sur la réticulation covalente de NCLs a été présenté. Les NCLs ont été modifiées en surface avec des groupements maléimide avec succès, leur réticulation par addition de Michael a été rendue possible par l'ajout d'agents de réticulation thiolés. Plusieurs facteurs influençant la formulation ont été identifiés, tels que la concentration en NCLs, la composition en maléimide, la nature des agents de réticulation et le rapport molaire maléimide/thiol. Tous ces facteurs sont déterminants pour les propriétés viscoélastiques des hydrogels formulés. En somme, les hydrogels les plus rigides ont été observés pour des formulations avec des concentrations en NCLs et des compositions en maléimide plus élevées. De même, la rigidité des hydrogels a été augmentée de manière proportionnelle à la taille des agents de réticulation pour des rapports molaires maléimide/thiol équivalents. De plus, les expériences de diffusion ont révélé que la dissolution des hydrogels est dépendante de l'agent de réticulation utilisé. Sur une période de 6 jours de libération *in vitro*, les hydrogels formulés avec le 2arm-PEG-SH a montré une dégradation quasiment intégrale alors que les hydrogels formés avec le 4arm-PEG-SH sont restés quasi intacts. Les expériences de FRAP complètent les profils de libération de molécules qui pourraient être chargées dans des hydrogels, montrant une diffusion faible pour les systèmes modèles de grande masse molaire et une diffusion beaucoup plus importante dans le cas des systèmes modèles de faible masse molaire. De plus, ces hydrogels sont dotés d'une faible capacité de gonflement, ce qui pourrait s'avérer être un avantage dans le cas d'une application intracérébrale par exemple. Bien que des études *in vitro* et *in vivo* (pharmacocinétiques, stress oxydatif, test de bio-persistence, tests de génotoxicité et de carcinogénicité) soient impératives pour prouver la compatibilité de ces hydrogels de NCLs dans des systèmes biologiques, ces tests préliminaires montrent que ces hydrogels sont des plateformes prometteuses à des fins biomédicales.

Bibliographie

- 1 Karvinen J, Ihalainen TO, Calejo MT, *et al.* Characterization of the microstructure of hydrazone crosslinked polysaccharide-based hydrogels through rheological and diffusion studies. *Materials Science and Engineering: C* 2019;94:1056–66. doi:10.1016/j.msec.2018.10.048
- 2 Vaishya R, Khurana V, Patel S, *et al.* Long-term delivery of protein therapeutics. *Expert Opinion on Drug Delivery* 2015;12:415–40. doi:10.1517/17425247.2015.961420
- 3 Petros RA, DeSimone JM. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nat Rev Drug Discov* 2010;9:615–27. doi:10.1038/nrd2591
- 4 Blanco E, Shen H, Ferrari M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nat Biotechnol* 2015;33:941–51. doi:10.1038/nbt.3330
- 5 Pitorre M, Gondé H, Haury C, *et al.* Recent advances in nanocarrier-loaded gels: Which drug delivery technologies against which diseases? *J Control Release* 2017;266:140–55. doi:10.1016/j.jconrel.2017.09.031
- 6 Shi J, Votruba AR, Farokhzad OC, *et al.* Nanotechnology in Drug Delivery and Tissue Engineering: From Discovery to Applications. *Nano Lett* 2010;10:3223–30. doi:10.1021/nl102184c
- 7 Kang-Mieler JJ, Mieler WF. Thermo-Responsive Hydrogels for Ocular Drug Delivery. In: Nguyen QD, Rodrigues EB, Farah ME, *et al.*, eds. *Developments in Ophthalmology*. S. Karger AG 2016. 104–11. doi:10.1159/000434694
- 8 Karavasili C, Fatouros DG. Smart materials: in situ gel-forming systems for nasal delivery. *Drug Discovery Today* 2016;21:157–66. doi:10.1016/j.drudis.2015.10.016
- 9 Caramella CM, Rossi S, Ferrari F, *et al.* Mucoadhesive and thermogelling systems for vaginal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2015;92:39–52. doi:10.1016/j.addr.2015.02.001
- 10 Cully M. Hydrogel drug delivery for inflammatory bowel disease. *Nat Rev Drug Discov* 2015;14:678–9. doi:10.1038/nrd4744
- 11 Gerwin N, Hops C, Lucke A. Intraarticular drug delivery in osteoarthritis. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2006;58:226–42. doi:10.1016/j.addr.2006.01.018
- 12 Gazaille C, Sicot M, Saulnier P, *et al.* Local Delivery and Glioblastoma: Why Not Combining Sustained Release and Targeting? *Front Med Technol* 2021;3:791596. doi:10.3389/fmedt.2021.791596
- 13 Francesko A, Petkova P, Tzanov T. Hydrogel Dressings for Advanced Wound Management. *CMC* 2019;25:5782–97. doi:10.2174/0929867324666170920161246
- 14 Shi J, Xiao Z, Kamaly N, *et al.* Self-Assembled Targeted Nanoparticles: Evolution of Technologies and Bench to Bedside Translation. *Acc Chem Res* 2011;44:1123–34. doi:10.1021/ar200054n
- 15 Shi J, Kantoff PW, Wooster R, *et al.* Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. *Nat Rev Cancer* 2017;17:20–37. doi:10.1038/nrc.2016.108
- 16 Ding W, Li Y, Hou X, *et al.* Bleomycin A6-loaded anionic liposomes with *in situ* gel as a new antitumoral drug delivery system. *Drug Delivery* 2016;23:88–94. doi:10.3109/10717544.2014.905651

- 17 Wu Z, Zou X, Yang L, *et al.* Thermosensitive hydrogel used in dual drug delivery system with paclitaxel-loaded micelles for in situ treatment of lung cancer. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2014;122:90–8. doi:10.1016/j.colsurfb.2014.06.052
- 18 Bastiancich C, Bianco J, Vanvarenberg K, *et al.* Injectable nanomedicine hydrogel for local chemotherapy of glioblastoma after surgical resection. *J Control Release* 2017;264:45–54. doi:10.1016/j.jconrel.2017.08.019
- 19 Pitorre M, Gazaille C, Pham LTT, *et al.* Polymer-free hydrogel made of lipid nanocapsules, as a local drug delivery platform. *Materials Science and Engineering: C* 2021;126:112188. doi:10.1016/j.msec.2021.112188
- 20 Shen M, Xu Y-Y, Sun Y, *et al.* Preparation of a Thermosensitive Gel Composed of a mPEG-PLGA-PLL-cRGD Nanodrug Delivery System for Pancreatic Tumor Therapy. *ACS Appl Mater Interfaces* 2015;7:20530–7. doi:10.1021/acsami.5b06043
- 21 Rupp R, Rosenthal SL, Stanberry LR. VivaGel (SPL7013 Gel): a candidate dendrimer--microbicide for the prevention of HIV and HSV infection. *Int J Nanomedicine* 2007;2:561–6.
- 22 Bastiancich C, Vanvarenberg K, Ucakar B, *et al.* Lauroyl-gemcitabine-loaded lipid nanocapsule hydrogel for the treatment of glioblastoma. *Journal of Controlled Release* 2016;225:283–93. doi:10.1016/j.jconrel.2016.01.054
- 23 Wauthoz N, Bastiat G, Moysan E, *et al.* Safe lipid nanocapsule-based gel technology to target lymph nodes and combat mediastinal metastases from an orthotopic non-small-cell lung cancer model in SCID-CB17 mice. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 2015;11:1237–45. doi:10.1016/j.nano.2015.02.010
- 24 Summonte S, Racaniello GF, Lopodota A, *et al.* Thiolated polymeric hydrogels for biomedical application: Cross-linking mechanisms. *Journal of Controlled Release* 2021;330:470–82. doi:10.1016/j.jconrel.2020.12.037
- 25 Martínez-Jothar L, Doukeridou S, Schiffelers RM, *et al.* Insights into maleimide-thiol conjugation chemistry: Conditions for efficient surface functionalization of nanoparticles for receptor targeting. *Journal of Controlled Release* 2018;282:101–9. doi:10.1016/j.jconrel.2018.03.002
- 26 Heurtault B, Saulnier P, Pech B, *et al.* A Novel Phase Inversion-Based Process for the Preparation of Lipid Nanocarriers. *Pharmaceutical Research* 2002;19:875–80. doi:10.1023/A:1016121319668
- 27 Gazaille C, Sicot M, Akiki M, *et al.* Characterization of Biological Material Adsorption to the Surface of Nanoparticles without a Prior Separation Step: a Case Study of Glioblastoma-Targeting Peptide and Lipid Nanocapsules. *Pharm Res* 2021;38:681–91. doi:10.1007/s11095-021-03034-8
- 28 Lainé A-L, Gravier J, Henry M, *et al.* Conventional versus stealth lipid nanoparticles: Formulation and in vivo fate prediction through FRET monitoring. *Journal of Controlled Release* 2014;188:1–8. doi:10.1016/j.jconrel.2014.05.042
- 29 Perrier T, Saulnier P, Fouchet F, *et al.* Post-insertion into Lipid NanoCapsules (LNCs): From experimental aspects to mechanisms. *International Journal of Pharmaceutics* 2010;396:204–9. doi:10.1016/j.ijpharm.2010.06.019

- 30 Park H, Guo X, Temenoff JS, *et al.* Effect of Swelling Ratio of Injectable Hydrogel Composites on Chondrogenic Differentiation of Encapsulated Rabbit Marrow Mesenchymal Stem Cells In Vitro. *Biomacromolecules* 2009;10:541–6. doi:10.1021/bm801197m
- 31 Perrier T, Fouchet F, Bastiat G, *et al.* OPA quantification of amino groups at the surface of Lipidic NanoCapsules (LNCs) for ligand coupling improvement. *International Journal of Pharmaceutics* 2011;419:266–70. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.07.028
- 32 Fu Y, Kao WJ. In situ forming poly(ethylene glycol)-based hydrogels via thiol-maleimide Michael-type addition. *J Biomed Mater Res* 2011;98A:201–11. doi:10.1002/jbm.a.33106
- 33 Wong R, Ashton M, Dodou K. Effect of Crosslinking Agent Concentration on the Properties of Unmedicated Hydrogels. *Pharmaceutics* 2015;7:305–19. doi:10.3390/pharmaceutics7030305
- 34 Lorén N, Hagman J, Jonasson JK, *et al.* Fluorescence recovery after photobleaching in material and life sciences: putting theory into practice. *Quart Rev Biophys* 2015;48:323–87. doi:10.1017/S0033583515000013
- 35 Vintiloiu A, Leroux J-C. Organogels and their use in drug delivery — A review. *Journal of Controlled Release* 2008;125:179–92. doi:10.1016/j.jconrel.2007.09.014
- 36 Ahn JI, Kim GA, Kwon HS, *et al.* Culture of preantral follicles in poly(ethylene) glycol-based, three-dimensional hydrogel: a relationship between swelling ratio and follicular developments. *J Tissue Eng Regen Med* 2015;9:319–23. doi:10.1002/term.1824
- 37 Lam J, Kim K, Lu S, *et al.* A factorial analysis of the combined effects of hydrogel fabrication parameters on the in vitro swelling and degradation of oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) hydrogels: Combined Effects of Hydrogel Fabrication Parameters. *J Biomed Mater Res* 2014;102:3477–87. doi:10.1002/jbm.a.35015
- 38 Zhan Y, Fu W, Xing Y, *et al.* Advances in versatile anti-swelling polymer hydrogels. *Materials Science and Engineering: C* 2021;127:112208. doi:10.1016/j.msec.2021.112208
- 39 Mulder M, Crosier J, Dunn R. Cauda Equina Compression by Hydrogel Dural Sealant After a Laminotomy and Discectomy: Case Report. *Spine* 2009;34:E144–8. doi:10.1097/BRS.0b013e31818d5427
- 40 Neuman BJ, Radcliff K, Rihn J. Cauda Equina Syndrome After a TLIF Resulting From Postoperative Expansion of a Hydrogel Dural Sealant. *Clinical Orthopaedics & Related Research* 2012;470:1640–5. doi:10.1007/s11999-011-2071-z

Chapitre 3

6-O-méthylguanine-ADN-méthyltransférase : son rôle essentiel mais ambivalent, et son inhibition

Table des matières

INTRODUCTION	65
LA 6-O-METHYLGUANINE-ADN-METHYLTRANSFERASE : UNE PROTEINE ESSENTIELLE A LA SURVIE CELLULAIRE	67
LA 6-O-METHYLGUANINE-ADN-METHYLTRANSFERASE : UNE BARRIERE A LA PRISE EN CHARGE ACTUELLE DU GBM	70
INHIBITION DE LA 6-O-METHYLGUANINE-ADN-METHYLTRANSFERASE : UNE SOLUTION A L'AMELIORATION DU PROTOCOLE DE STUPP	73
1. Remodelage de la chromatine	75
2. Blocage de la transcription et de la traduction	76
2.1. Voie de NFκB	76
2.2. Voie de Wnt/β-caténine	78
2.3. Voie de p53	79
2.4. Voie de STAT3	79
2.5. Voie de PI3K/Akt/mTOR	81
2.6. ARNs	81
3. Modification de la protéine	82
CONCLUSION	84
BIBLIOGRAPHIE	85

Introduction

Le cancer est la deuxième cause de décès dans le monde, avec 10,0 millions de décès en 2019. Son incidence est en continuelle augmentation, soit environ 25% depuis 2010 pour atteindre en 2019 23,6 millions de cas. Plus dramatique, il est estimé que le cancer est à l'origine d'environ 242 millions d'année de vie perdu en 2019 [1]. Bien que les facteurs associés à un risque élevé de cancer soient connus : tabagisme, manque d'activité physique, consommation d'alcool, alimentation peu équilibrée (faible consommation de légumes et de fruits), on estime qu'ils sont responsables d'environ un tiers des décès par cancer. L'éducation de la population reste encore aujourd'hui un problème de santé publique majeur. Il existe plusieurs méthodes de traitement du cancer : radiothérapie, chirurgie, immunothérapie, thérapie endocrinienne et thérapie génique. Néanmoins, la chimiothérapie reste la méthode la plus courante pour traiter le cancer. On peut citer par exemple diverses classes d'actifs chimiothérapeutiques dépendamment de leurs mécanismes d'actions : les antimétabolites, les agents alkylants, les inhibiteurs du fuseau mitotique, les inhibiteurs de topoisomérase I et II, d'origine synthétique ou naturelles (extraits de plantes) (figure 3-1) [2]. Les données statistiques montrent que plus de 90 % de la mortalité des patients atteints de cancer est attribuée à la résistance aux médicaments.

C'est un phénomène de plus en plus étudié connu sous le nom de *multidrug resistance* ou MDR. Après l'administration d'une chimiothérapie de première ligne, les patients peuvent présenter une réponse complète ou partielle due à une résistance intrinsèque. De plus, le traitement peut souvent devenir inefficace après des cycles répétés, en raison de l'émergence d'une résistance acquise. Divers mécanismes sont associés à la résistance des cellules cancéreuses à la chimiothérapie tels qu'un efflux accru des médicaments (par la surexpression des pompes d'efflux à la surface des cellules cancéreuses), des facteurs génétiques (mutations génétiques, amplifications et altérations épigénétiques), des facteurs de croissance surexprimés, une capacité accrue de réparation de l'ADN, et un métabolisme des agents chimiothérapeutiques élevé les rendant inactifs (figure 3-1) [3]. Chacun de ces mécanismes entraîne une réduction de l'efficacité thérapeutique des médicaments administrés, rendant plus difficile le traitement des tumeurs et il est opportun de trouver de nouvelles stratégies pour éviter ou contrer ces phénomènes de résistance [4-6].

Dans ce chapitre, nous allons nous intéresser à une protéine : la 6-O-méthylguanine-ADN-méthyltransférase (MGMT). Il s'agit d'une protéine ubiquitaire indispensable à l'arsenal de réparation de l'ADN dans les cellules, mais qui est impliquée dans la résistance au traitement par TMZ en particulier dans le GBM. De plus, nous allons explorer les pistes qui peuvent être envisagées pour contrer cette résistance.

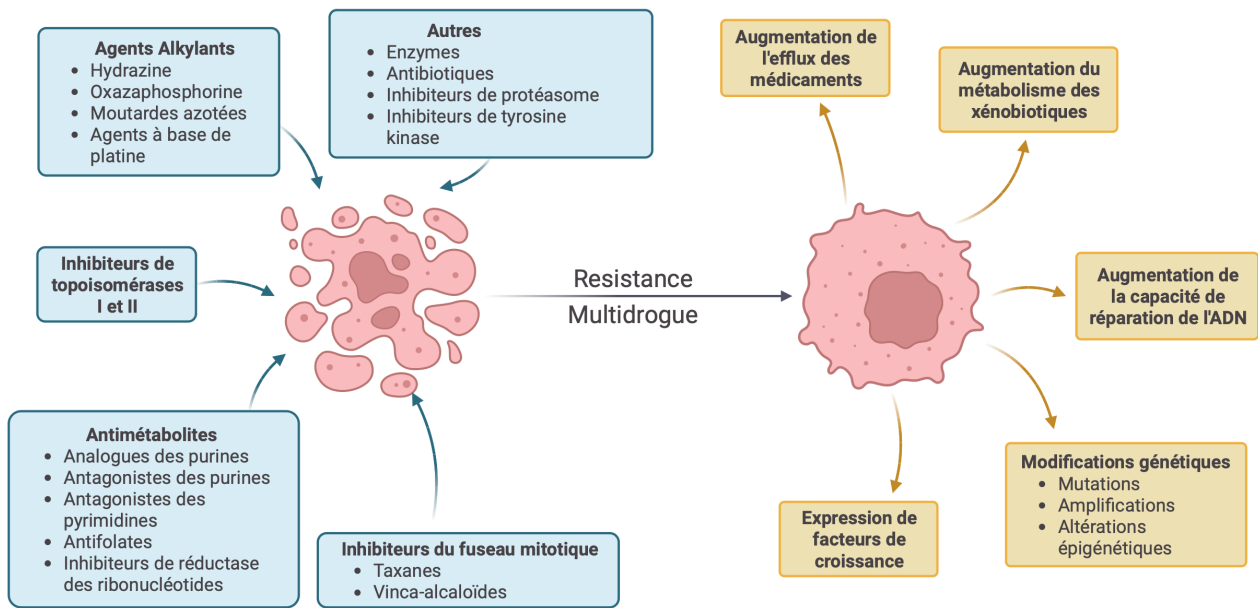


Figure 3-1. Classification des actifs chimiothérapeutiques communément utilisés dépendamment de leur mode d'action et mécanismes de résistance dans les cellules cancéreuses (figure adaptée de Bukowski *et al.*, 2020 [3] et réalisée avec BioRender.com).

La 6-O-méthylguanine-ADN-méthyltransférase : une protéine essentielle à la survie cellulaire

Le génome de tous les organismes est continuellement modifié par des molécules réactives produites de manière endogène ou par des agents environnementaux exogènes qu'ils soient physiques, chimiques ou biologiques [7]. Chaque jour, il est estimé qu'environ 100 000 lésions de l'ADN sont produites dans le génome d'un mammifère à la suite d'erreurs de réplication, d'une désintégration spontanée, et du métabolisme cellulaire [8]. Les lésions persistantes de l'ADN peuvent induire une mutagenèse : des substitutions de bases, des insertions/délétions et des réarrangements chromosomiques. Cette instabilité du génome contribue probablement au vieillissement et aux maladies liées à l'âge mais est aussi une étape essentielle dans le développement du cancer. La viabilité et la longévité d'un organisme nécessite un entretien constant du génome. Les cellules ont ainsi développé de multiples voies de réparation de l'ADN afin de préserver l'intégrité du génome en cas de dommages (figure 3-2).

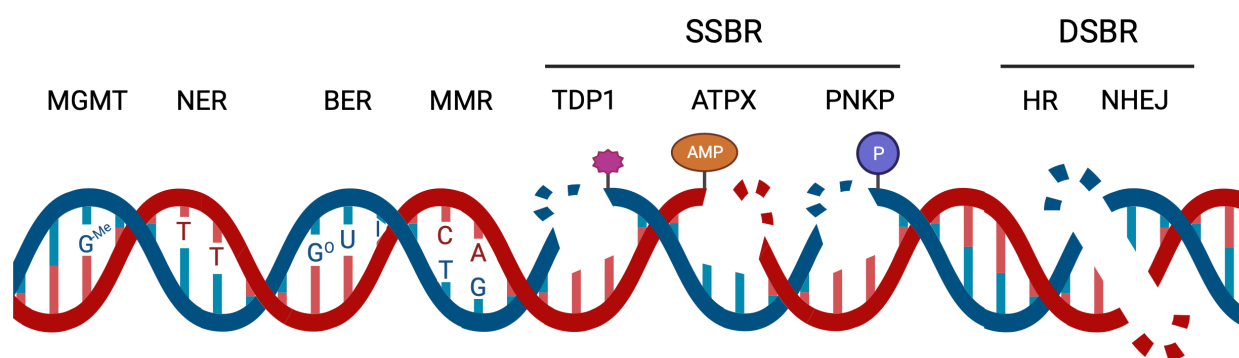


Figure 3-2. Voies de réparation de l'ADN (en haut) et exemples de lésions de l'ADN correspondantes (en bas) : 6-O-méthylguanine-ADN-méthyltransférase (MGMT) et 6-O-méthylguanine (G^{Me}) ; réparation par excision de nucléotides (NER) et dimère de thymine (T-T) ; réparation par excision de bases (BER) et inosine (I) ou uracile (U) ou 8-oxoguanine (G^o) ; la réparation des mésappariements (MMR) ; réparations des cassures simple brin de l'ADN (SSBR) : polynucléotide kinase 3'-phosphatase (PNKP), aprataxine (APTX) et tyrosyl-ADN phosphodiesterase 1 (TDP1) et réparations des cassures double brin de l'ADN (DSBR) : recombinaison homologue (HR) ou jonction des extrémités non homologues (NHEJ) (figure adaptée de Iyama *et al.*, 2013 [9] et réalisée avec BioRender.com).

On retrouve 6 grandes voies de réparation de l'ADN : les réparations des cassures double brin de l'ADN (recombinaison homologue ou jonction des extrémités non homologues), la réparation des mésappariements (MMR), les réparations par excision de bases (BER), les réparations des cassures simple brin de l'ADN (polynucléotide kinase 3-phosphatase, aprataxine, tyrosyl-ADN phosphodiesterase 1), la réparation par excision de nucléotides et la MGMT [9].

La MGMT est une protéine conservée et ubiquitaire impliquée dans la réparation des dommages à l'ADN. Le gène de la MGMT est localisé en position 10q26 du génome, est composé de 5 exons et 4 introns et est

caractérisé par différentes régions telles que les îlots cytosine-phosphate-guanine (CpG) sur l'exon 1 ou le site d'alkylation et d'activité protéase sur l'exon 4 [10]. La méthylation de l'îlot cytosine-phosphate-guanine (CpG) du promoteur et de certaines parties du corps du gène jouent un rôle essentiel dans la régulation transcriptionnelle de la MGMT en inhibant l'expression du gène [11,12]. La modification des histones joue également un rôle important puisque la méthylation sur H3K9 est associée à une inhibition du gène alors que l'acétylation de l'H3K9 et H4K20 ainsi que la méthylation de l'H3K4 sont associées à une activation du gène [12]. D'autres facteurs peuvent aussi influencer l'expression de la MGMT tels que les glucocorticoïdes, adénosine 5' monophosphate cyclique (cAMP), la protéine kinase C (PKC), certains facteurs de transcription, et son statut de phosphorylation par exemple [13-16].

La MGMT permet de prévenir les effets délétères d'une lésion mutagène et cytotoxique majeure de l'ADN : la 6-O-méthylguanine, produite par divers agents alkylants endogènes et exogènes [17,18]. Elle provoque des erreurs de lecture de l'ADN polymérase. Lors de la première réplication, l'ADN polymérase n'est pas capable de reconnaître la guanine et la confond avec une adénine ce qui entraîne un mésappariement avec une thymine [19]. Le système de MMR peut reconnaître ce type d'erreur lors de la seconde réplication en utilisant les complexes MutSa et MutLa [20]. La thymine est alors retirée et remplacée par des intermédiaires de réparation. Cette dernière étape se produit indéfiniment à cause de la persistance de la 6-O-méthylguanine, ce qui produit des cycles futiles de réparation. Ces cycles futiles de réparation vont à terme et après de multiples cycles cellulaires amener à de l'instabilité génomique, à des cassures double brin de l'ADN et enfin à la mort cellulaire. Environ deux tiers des cellules empruntent cette voie [21]. Pour le tiers restant, la mort cellulaire arrive plus tôt pendant le deuxième cycle de réplication. MutSa active la *Checkpoint kinase 1* (Chk1) et ATR/ATRIP quand elle est associée à une 6-O-méthylguanine, ce qui mène à l'activation de la réponse aux dommages à l'ADN, à l'activation des caspases puis à l'apoptose [21-23]. La MGMT élimine directement les adduits d'alkylation 6-O dans une réaction en une étape qui transfère le groupe alkyle de la position 6-O de la guanine à un résidu de cystéine dans la poche de son site actif (position 145), rétablissant ainsi la guanosine dans son état intact et inactivant à son tour la protéine MGMT [31]. La MGMT alkylée inactivée est ensuite ubiquitinée et dégradée par le protéasome [24,25], laissant un brin d'ADN sain et réparé (figure 3-3).

L'expression et l'activité de la MGMT sont très variables d'un tissu à un autre ainsi que d'un type de tumeur à un autre [26]. Par exemple, la MGMT humaine est fortement exprimée dans le foie et le côlon, comparativement au cerveau dans lequel elle est exprimée à des niveaux plus faibles [26]. Après administration de N-méthyl-N-nitrosourée ou N-éthyl-N-nitrosourée, les adduits alkylés 6-O ont été éliminés plus lentement de l'ADN génomique du cerveau de rat que du génome du foie ou du rein [26-28]. L'expression de MGMT semble être dictée principalement par l'état de méthylation du promoteur et également par différents facteurs de transcription qui peuvent activer l'expression lors de l'exposition à des agents alkylants, aux rayons X ou à un traitement hormonal glucocorticoïde [27].

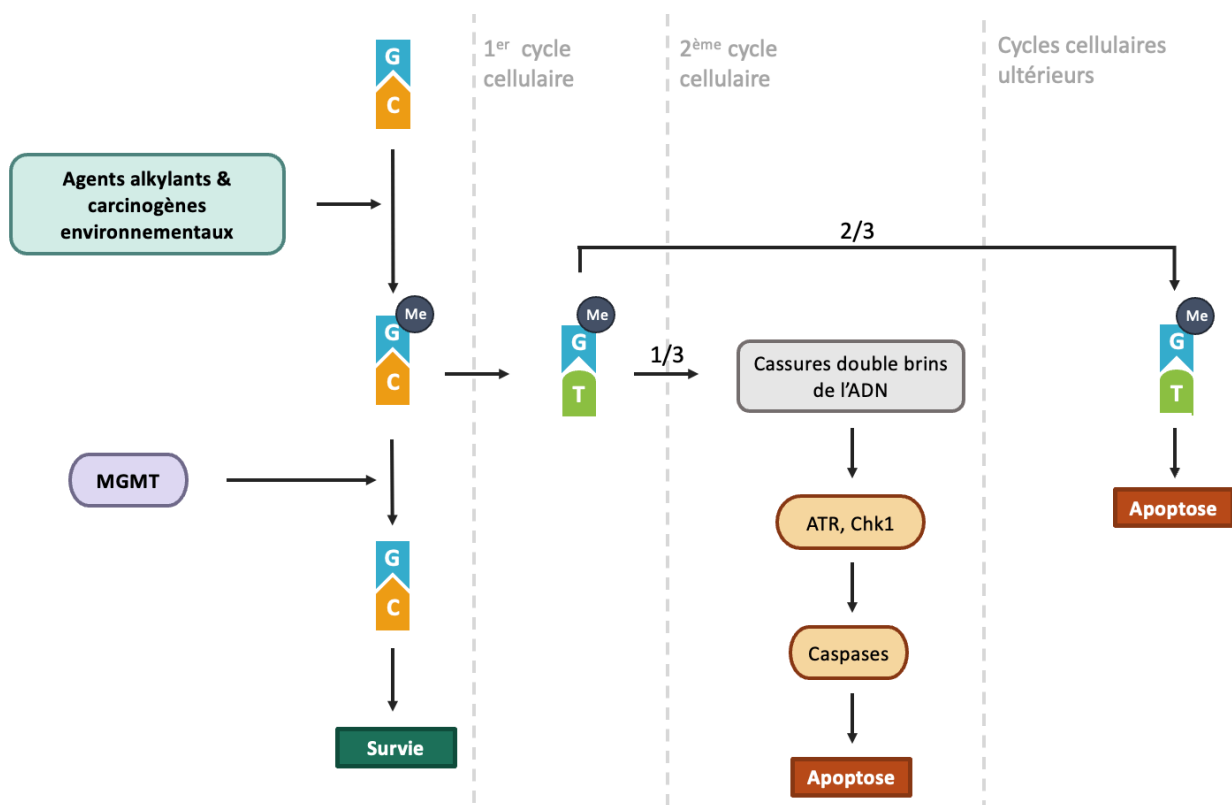


Figure 3-3. Rôle de la MGMT dans la réparation de la méthylation des guanines et dans l'échappement à l'instabilité génomique et au déclenchement du processus apoptotique. Les agents alkylants ou les carcinogènes environnementaux entraînent la méthylation des guanines. Cette méthylation peut être retirée par la MGMT ce qui permet à la cellule d'évoluer vers une voie de survie. Si la méthylation n'est pas retirée par la MGMT, la cellule évolue vers une voie apoptotique (figure adaptée de Quiros *et al.*, 2010 [21])

Un certain niveau de MGMT dans les cellules profère donc une protection contre les mutations et son défaut peut entraîner une carcinogenèse. Une étude réalisée sur des souris MGMT *Knock-Out* (KO) a montré des niveaux accrus de mort cellulaire dans les tissus à prolifération rapide : moelle osseuse, intestin, thymus et rate, bien qu'elles restent viables, fertiles, d'apparence normale et avec une durée de vie normale [29]. De plus, après un traitement à forte dose avec l'agent alkylant N-méthyl-N-nitrosourée, de fortes pertes en leucocytes et plaquettes dans le compartiment des cellules souches hématopoïétiques ont été observées. Quand les mêmes souris ont été exposées à des doses de N-méthyl-N-nitrosourée plus faibles, un grand nombre de lymphomes thymiques et d'adénomes pulmonaires ont été observés, certainement dus aux adduits 6-O-méthylguanine non réparés entraînant les problèmes de réplication de l'ADN [30]. La mort cellulaire due aux adduits 6-O-méthylguanine a aussi été montrée dans les cellules qui ne se divisent pas [31]. Le traitement par des agents alkylants affecte le développement neuronal et les fonctions motrices des souris MGMT KO, ce qui n'a pas été observé chez des souris de type sauvage. De plus, les neurones des souris MGMT KO sont plus sensibles *in vitro* aux agents alkylants que les neurones de type sauvage (cultures primaires). La survie de ces cellules non-divisibles semblent donc être corrélée à la réparation des adduits 6-O-méthylguanine [32].

La 6-O-méthylguanine-ADN-méthyltransférase : une barrière à la prise en charge actuelle du GBM

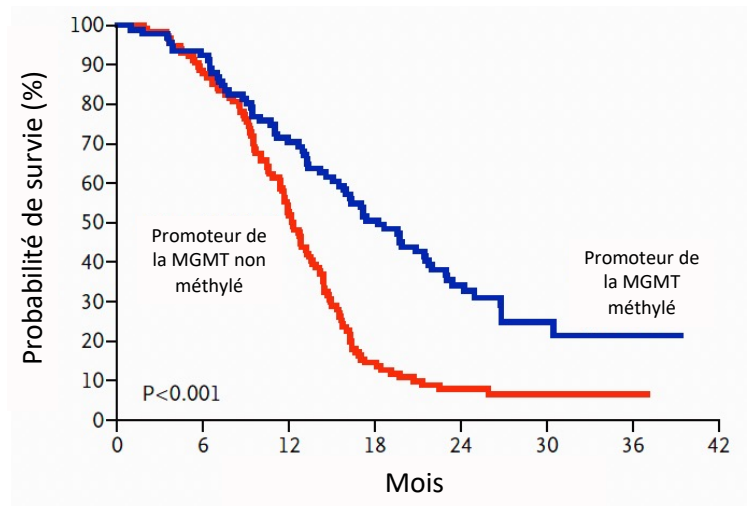


Figure 3-4. La méthylation du promoteur de la MGMT entraîne une survie globale améliorée des patients atteints de GBM après le protocole de Stupp. La différence significative ($p < 0,001$ par le test log-rank) de survie entre les patients avec un promoteur de la MGMT hyperméthylé (92 patients, dont 65 sont décédés) et ceux avec un promoteur de la MGMT non méthylé (114 patients, dont 105 sont décédés) indique que le statut de méthylation du promoteur de la MGMT a une valeur pronostique (figure adaptée de Hegi *et al.*, 2005 [33])

Comme dit précédemment, un certain niveau de MGMT dans les cellules profère donc une protection contre les mutations et est un des principaux mécanismes de défense contre les dommages induits par les carcinogènes mais aussi par les agents alkylants [16,34–36]. La MGMT joue un double rôle où son expression entraîne une diminution de la carcinogenèse mais aussi une diminution de l'efficacité des agents alkylants thérapeutiques. Ainsi, la réponse au protocole de Stupp décrit dans le chapitre 1, impliquant l'agent alkylant TMZ, est directement corrélé au statut hyperméthylé ou non méthylé du promoteur de la MGMT dans les tumeurs des patients atteints de GBM.

Hegi *et al.* ont étudié le *silencing* du gène MGMT par hyperméthylation dans le GBM en 2005. A partir d'une analyse multicentrique, ils ont déterminé l'état de méthylation du promoteur de la MGMT de 206 patients. Sur ces 206 patients atteints de GBM, environ 45 % avaient un promoteur de la MGMT hyperméthylé. La médiane de survie globale était plus élevée chez les patients ayant un promoteur hyperméthylé (18,2 mois) que chez les patients ayant un promoteur non méthylé (12,2 mois) (figure 3-4). Chez les patients traités par TMZ et radiothérapie, la médiane de survie globale était de 21,7 mois pour les patients avec un promoteur hyperméthylé et de 12,7 mois pour les patients sans méthylation sur le promoteur. La survie sans progression était également plus élevée (10,3 mois) chez les patients ayant un promoteur de la MGMT hyperméthylé traités par TMZ et radiothérapie que chez les patients ayant un promoteur de la MGMT non méthylé également traités par TMZ et

radiothérapie (5,3 mois). La méthylation du promoteur de la MGMT joue un rôle clé dans une réponse positive au témozolomide [33].

L'expression de la MGMT peut également prédire la réponse au TMZ des tumeurs neuroendocrines pancréatiques. Dans une étude de 2016, les patients qui réagissaient à la chimiothérapie avaient des scores d'expression de la MGMT plus faibles. Les patients avec de faibles scores (faible expression de la MGMT) avaient une survie plus longue sans progression et les patients avec des scores plus élevés (forte expression de la MGMT) avaient une survie plus courte sans progression. Des scores d'expression de la MGMT plus faibles ont également été associés à une réponse radiologique objective. Avec des scores d'expression de la MGMT plus élevés, la proportion de patients sans progression au cours des 24 mois suivant le début du traitement a diminué (65% pour les patients avec des scores faibles et 0% pour les patients avec des scores élevés). Les scores d'expression de la MGMT et la réponse objective ont été associés à la méthylation du promoteur, où une hyperméthylation a été observée dans les tumeurs à faible score et chez les patients ayant une réponse objective. Il est donc indiqué qu'une faible expression de la MGMT due à l'hyperméthylation dans les tumeurs neuroendocrines pancréatiques est associée à une meilleure réponse au traitement et à une survie plus longue sans progression [37]. L'effet du *silencing* du gène de la MGMT a également été démontré dans le lymphome diffus à larges cellules B. Ce lymphome est couramment traité avec le cyclophosphamide qui est un agent alkylant. Les lymphomes avec des promoteurs de la MGMT hyperméthylés n'ont montré aucune expression de la protéine MGMT alors que les lymphomes avec un promoteur de la MGMT non méthylé ont tous exprimé la protéine MGMT. La survie globale et la survie sans progression étaient plus élevées chez les patients avec un promoteur de la MGMT hyperméthylé. Le rapport de risque de décès des patients était de 2,8 et de 2,6 pour les promoteurs de la MGMT non méthylés par rapport aux promoteurs hyperméthylés, respectivement. Également dans ce cas, l'état d'hyperméthylation de la MGMT pourrait avoir des valeurs pronostiques pour les patients atteints de lymphome diffus à larges cellules B, traités avec le cyclophosphamide [38].

Ce marqueur pronostique est de plus en plus considéré au niveau diagnostique notamment dans le GBM. La nouvelle classification des tumeurs du système nerveux central établi en 2021 par l'Organisation mondiale de la Santé préconise de vérifier le statut de méthylation de l'ADN de manière générale [39], une nouveauté par rapport à la précédente classification établie en 2016 [40]. L'Association européenne de neuro-oncologie a récemment reconnu la nécessité de fournir des lignes directrices actualisées pour le diagnostic des patients atteints de gliome diffus, en raison des changements majeurs dans les algorithmes de diagnostic [41]. Même si l'hyperméthylation du promoteur de la MGMT a une valeur diagnostique limitée, établir son statut peut guider les décisions thérapeutiques concernant l'utilisation de la chimiothérapie avec des agents alkylants pour les patients atteints de GBM ou d'autres gliomes de type IDH sauvage [42]. Une de leur recommandation est que le statut de méthylation du promoteur de la MGMT devrait être déterminé dans le GBM, notamment chez les patients âgés ou fragiles, afin de faciliter la prise de décision concernant l'utilisation du TMZ. Ils alertent cependant sur les défis à relever concernant la standardisation d'un test fiable en accord et utilisable par tous les laboratoires mais donnent plusieurs pistes de réflexion sur les techniques à utiliser : PCR spécifique à la méthylation par exemple, et à ne pas utiliser : immunohistochimie.

Ce statut de méthylation du promoteur MGMT intéresse aussi les chercheurs fondamentaux puisqu'elle peut être liée à d'autres marqueurs diagnostiques du GBM, notamment l'isocitrate déshydrogénase (IDH) [33,43-46]. Les mutations IDH sont des mutations ponctuelles [47]. L'allèle sauvage produit de l' α -cétoglutarate (α -CG) qui aide à la formation de glutathion qui, lui-même, est responsable de la protection contre le stress-oxydatif [48]. Lorsque l'allèle est muté, la production de glutathion diminue et celle du 2-hydroxyglutarate (2-HG), un oncométabolite, augmente. La production d'espèces réactives de l'oxygène est alors elle aussi augmentée [49,50]. Cet oncométabolite peut entraîner l'hyperméthylation de l'ADN, ce qui est caractéristique de la tumorigenèse. Ainsi, la production de 2-HG suite à la mutation de l'IDH pourrait aussi être associée à l'hyperméthylation du promoteur de la MGMT [51]. Les mutations d'IDH, notamment de l'isoforme IDH1, ont été montrées comme associées à une meilleure réponse au traitement par TMZ [52]. Le *silencing* du gène de la MGMT pourrait aussi être responsable de mutations chez certains proto-oncogènes tels que Ras et p53 et a été montré dans d'autres types tumoraux. Il a été rapporté par Esteller *et al.* en 2000 que 55% de 88 tumeurs colorectales mutantes pour K-ras ont un promoteur de la MGMT hyperméthylé [53]. La majorité des tumeurs ayant une transition G vers A dans le gène de K-ras ont un promoteur de la MGMT hyperméthylé. Les auteurs ont remarqué que les tumeurs les plus vieilles et qui sont hyperméthylées sur le promoteur de la MGMT ont cette transition de G vers A dans le gène de K-ras mais que les tumeurs les plus jeunes n'ont pas cette transition. Il est alors supposé que, parce que le *silencing* de la MGMT peut entraîner ce type de mutation et parce que cette mutation apparaît après l'hyperméthylation du gène de la MGMT, le *silencing* de la MGMT pourrait être responsable des mutations de K-ras dans la carcinogenèse colorectale [53]. La même chose a été observée concernant les mutations de p53. Quarante-cinq % de 153 tumeurs colorectales avec un p53 muté avaient aussi un promoteur de la MGMT hyperméthylé. Cette hyperméthylation a été associée à des transitions G vers A dans le gène de p53 et particulièrement dans la portion non-CpG du gène. Les deux gènes étant des proto-oncogènes, le *silencing* de la MGMT pourrait conduire à de la tumorigenèse [54].

Inhibition de la 6-O-méthylguanine-ADN-méthyltransférase : une solution à l'amélioration du protocole de Stupp

Comme indiqué ci-dessus, l'expression de la MGMT et l'état de méthylation de son promoteur peuvent être prédictifs de la réponse d'un patient à la chimiothérapie alkylante. Les patients qui ont un promoteur de la MGMT non méthylé ne réagissent généralement pas aux agents alkylants parce que la MGMT inverse leur effet. Ces patients ne peuvent donc pas bénéficier de ces thérapies. Une idée pour surmonter la résistance aux agents alkylants chez les patients avec des promoteurs de MGMT non méthylés serait d'associer la chimiothérapie avec des inhibiteurs de la MGMT pour rétablir l'action et l'efficacité de l'alkylation.

Cette stratégie a été testée sur plusieurs modèles tumoraux différents du GBM ces 20 dernières années. Quelques études sont rapportées dans le tableau 3-1 et nous détaillerons ci-après les stratégies d'inhibition qui ont été utilisées pour réduire l'expression de la MGMT, principalement dans le cas du GBM. Certains inhibiteurs agissent par remodelage de la chromatine, certains agissent via des voies de signalisation telle que la transcription et la traduction de la MGMT et d'autres par inactivation de la protéine une fois exprimées (figure 3-5).

Tableau 3-1. Inhibiteurs de la MGMT et effets obtenus sur des modèles *in vitro* et *in vivo* dans le cas de tumeurs autres que le GBM.

Organe	Inhibiteur	Modèle <i>in vitro</i>	Modèle <i>in vivo</i>	Résultat principal	Réf.
Sein	6-O-(4-bromothényl)guanine	MCF-7	Xénogreffe murine MCF-7	Inhibition de l'expression MGMT + meilleure efficacité TMZ	[55]
	Fulvestrant (antagoniste des récepteurs α aux œstrogènes)	MCF-7 et T47D		Inhibition de l'expression MGMT + meilleure efficacité TMZ	[56]
	Oligonucléotide synthétique à double brin d'ADN	MCF10A		Inhibition de l'expression MGMT + meilleure efficacité du mitozolomide	[57]
Prostate	Acide gallique	PC-3		Inhibition de l'expression de la MGMT	[58]
	Prodrogue de 6-O-benzylguanine (combiné avec l'agent alkylant CENU)	DU145		Meilleure efficacité de la prodrogue CENU (combinée à la 6-O-benzylguanine)	[59]
Poumon	Cantharidine	NCI-H460		Inhibition de l'expression de la MGMT	[60]
	Prodrogue de 6-O-benzylguanine (combiné avec de la quinazoline pour bloquer la phosphorylation de l'EGFR)	A549 et H1650		Inhibition de l'expression MGMT + meilleure efficacité TMZ	[61]

Foie	S-adenosylhomocystéine	HepG2		Inhibition de l'expression de la MGMT	[62]
	n-butylidèphthalide	HepG2 et J5	Xénogreffes murines HepG2 et J5	Inhibition de l'expression MGMT + meilleure efficacité BCNU	[63]
	miR-221-3p	SMMC-7721 et BEL-7404		Inhibition de l'expression de la MGMT	[64]
Pancréas	6-O-benzylguanine ou 6-O-benzyl-2'-désoxyguanosine		MIA PaCa-2, CFPAC-1, PANC-1, CAPAN-2, et xénogreffes murines BxPC-3	Meilleure efficacité du BCNU et du TMZ	[65]
	Privation de méthionine	CAPAN1, CAPAN2, CFPAC1, MiaPaCa 2, BxPc3, et Panc1		Inhibition de l'expression de la MGMT + meilleure efficacité du TMZ	[66]
Colon	p53 sauvage	HCT116		Inhibition de l'expression de la MGMT	[67]
	6-O-carboxyméthylguanine	HCEC		Inhibition de l'activité de la MGMT	[68]
Leucémie	6-O-(4-bromophenyl)guanine	Blastes de leucémie primaire		Meilleure efficacité du TMZ	[69]
	Kaempférol	HL60		Inhibition de l'expression de la MGMT	[70]

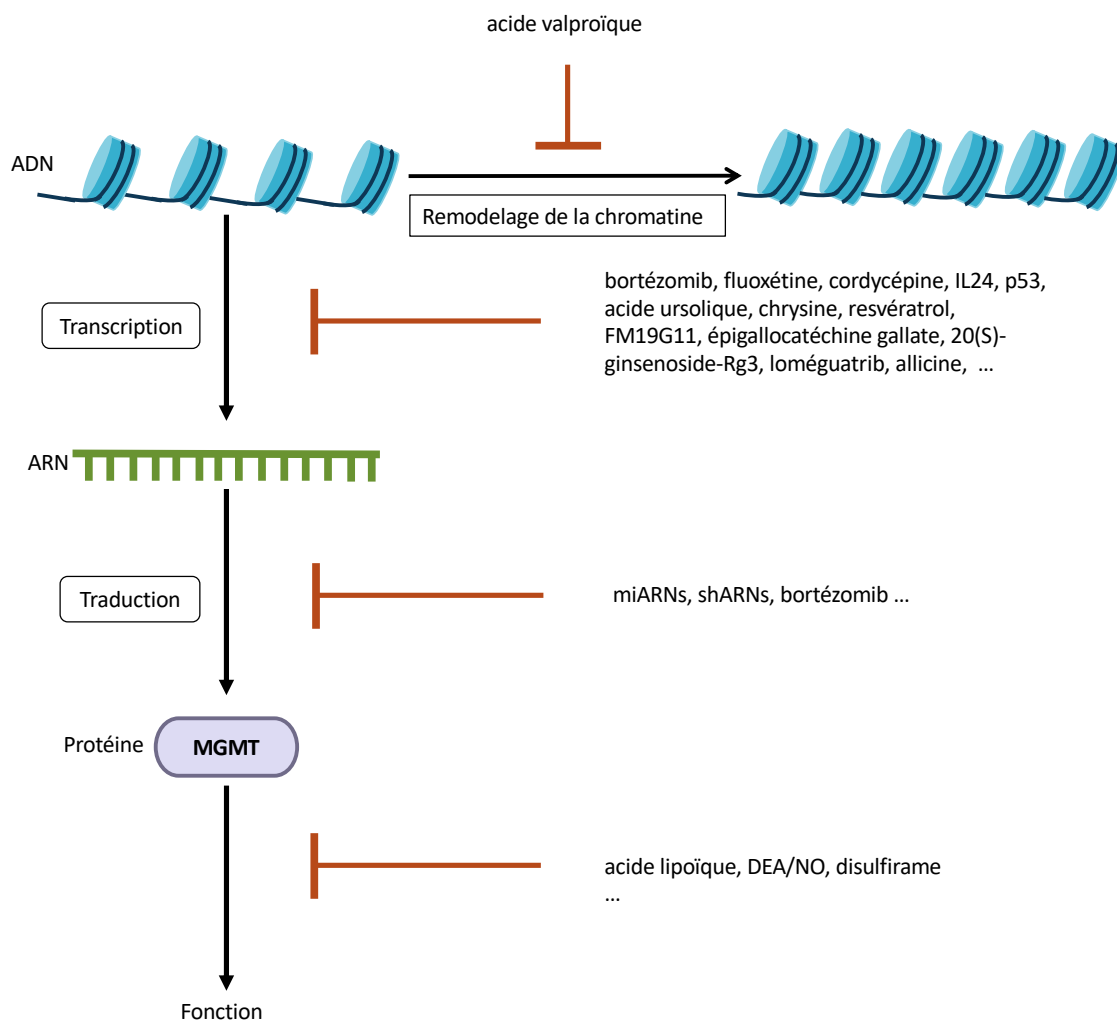


Figure 3-5. Divers inhibiteurs sont capables de diminuer l'expression de la MGMT, soit par remodelage de la chromatine, soit par blocage de la transcription ou de la traduction, ou modifient l'activité de la MGMT une fois exprimée.

1. Remodelage de la chromatine

L'acide valproïque (AV) est habituellement utilisé pour le traitement des crises épileptiques, des troubles bipolaires, des migraines et agit comme inhibiteur de la transamination des acides gamma-aminobutyriques et les histones désacétylases (HDACs) [71–73]. Les HDACs interviennent dans le remodelage de la chromatine et dans l'expression génique par des modifications post-transcriptionnelles de la chromatine. De manière générale, l'inhibition des HDACs entraîne la différenciation de cellules tumorales, l'apoptose et un arrêt du cycle cellulaire [74,75]. Dans cette étude, les auteurs ont étudié la capacité du AV à augmenter la sensibilité des cellules de GBM aux effets cytotoxiques du TMZ par inhibition de l'expression de la MGMT. Dans un premier temps, la combinaison AV / TMZ a augmenté l'effet antitumoral sur les cellules de GBM (lignée cellulaire T98G) avec une mortalité de 40% contre environ 10% le TMZ seul (50 μ M) ou le VPA seul (4mM). L'expression de MGMT sur des lignées cellulaires T98 et U138 a été diminuée par le VPA d'une manière dose-dépendante. L'association de AV / TMZ a augmenté l'expression de protéines pro-apoptotiques (Bak) et diminué l'expression de protéines anti-

apoptotiques (Bcl-2). Cette combinaison a également réduit la croissance tumorale de moitié par rapport aux groupes non traité ou traités avec de l'AV ou du TMZ seul, chez des souris portant des greffes de GBM sous-cutané (lignée cellulaire T98) (figure 3-6) [76].

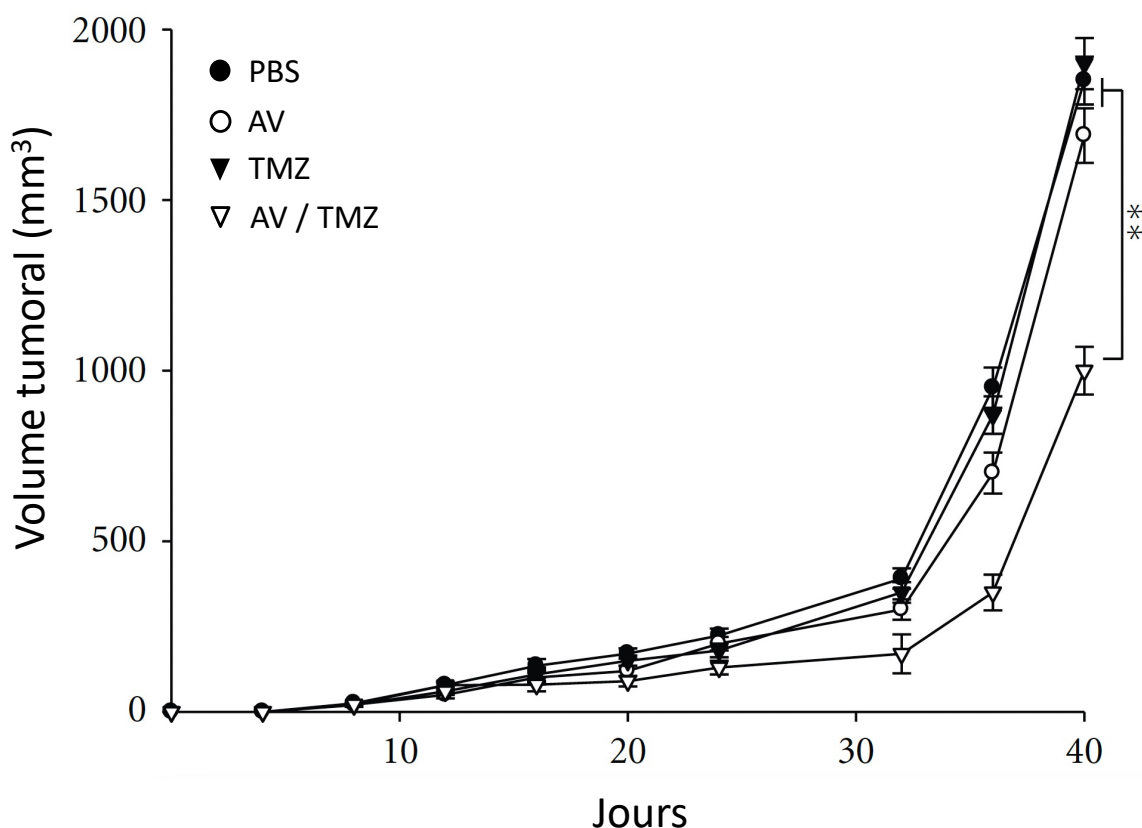


Figure 3-6. La combinaison AV / TMZ ralentit la croissance des xénogreffes sous-cutanée de GBM (lignée cellulaire T98G) chez un modèle murin. Les souris athymiques portant des xénogreffes sous-cutanées de GMB (lignée cellulaire T98G) ont été réparties en quatre groupes de traitement : PBS, AV (300 mg/kg), TMZ (50 mg/kg) et AV (300 mg/kg) / TMZ (50 mg/kg) (moyenne ± erreur-type ; **p < 0,01 (figure adaptée de Ryu *et al.* 2012, [76])).

2. Blocage de la transcription et de la traduction

2.1. Voie de NFκB

Le bortézomib est le seul inhibiteur de protéase actuellement utilisé cliniquement et agit par augmentation de l'arrêt du cycle cellulaire et des protéines pro-apoptotiques. Dans une étude de 2013, il a été démontré que le bortézomib induit la fragmentation de l'ADN et, à terme, l'apoptose dans les cellules de GBM (lignée cellulaire T98G). Il a également réduit l'expression de la MGMT (protéine et ARN messager) par rapport

aux cellules non traitées. Cette diminution de l'expression était plutôt inattendue puisque que le bortézomib est un inhibiteur du protéasome et qu'il devrait plutôt avoir tendance à stabiliser les niveaux de protéine et notamment de la MGMT. Il a donc été supposé que le bortézomib pourrait avoir un effet sur les facteurs de transcription responsables de l'expression de la MGMT comme NFκB, par une diminution de son expression et de son accumulation dans le noyau. En effet, les auteurs ont montré que le bortézomib entraîne une diminution de l'accumulation de NFκB dans le noyau par une augmentation des niveaux cellulaires de IκBα après l'induction de l'inhibition quasi complète de l'activité du protéasome 20S. Il a aussi été démontré que le bortézomib en tant qu'inhibiteur du protéasome peut causer une diminution de la synthèse des protéines par phosphorylation de eIF2α. Ainsi le bortézomib inhiberait l'expression de la MGMT par deux mécanismes distincts : le blocage de la transcription de la MGMT par inhibition de NFκB et le blocage de sa traduction par phosphorylation de eIF2α [77].

Dans une étude de 2012, Huang *et al.* se sont intéressés au resvératrol comme inhibiteur de la MGMT. Dans une étude préliminaire, les auteurs avaient pu démontrer que le resvératrol pouvait être utilisé contre la résistance au TMZ en raison de sa régulation de la voie NFκB et ont cherché ici à savoir s'il était capable de réduire l'expression de la MGMT. La lignée cellulaire T98G est résistante au TMZ mais lorsque que le resvératrol est ajouté (100 μM), la viabilité cellulaire des cellules T98G est diminuée (87 ± 2% pour le TMZ seul contre 48 ± 2% pour la combinaison resvératrol / TMZ). Le TMZ seul entraîne une surexpression de la MGMT (150 ± 8%) alors que la combinaison resvératrol / TMZ permet de réduire l'expression de la MGMT (moins de 20%). Les auteurs ont ensuite exploré la voie de signalisation de NFκB dans l'expression de la MGMT et découvert que le resvératrol réduit l'expression de la sous-unité p65 de NFκB de 25% s'il est combiné avec le TMZ, inhibant la voie entière. La combinaison de resvératrol / TMZ a également induit l'apoptose par la co-inhibition des protéines anti-apoptotiques XIAP et survivine [78].

Dans une étude de 2015, Guo *et al.* ont montré que la fluoxétine réduisait l'expression de la MGMT dans les lignées cellulaires de GBM T98G et U138 [79]. Elle a réduit la phosphorylation de NFκB/p65 et augmenté les taux de IκBα : un inhibiteur de NFκB, mais a également diminué l'activité du promoteur de la MGMT induit par NFκB. Les cellules de GBM qui surexpriment la MGMT sensibilisées à la fluoxétine, puis traitées par la combinaison fluoxétine / TMZ ont réduit la croissance tumorale. La concentration inhibitrice médiane (CI50) du TMZ seul est d'environ 550μM contre environ 200μM pour la combinaison fluoxétine / TMZ. La formation *in vitro* de colonies a également été affectée : 75% pour le TMZ seul contre 30% avec la combinaison fluoxétine / TMZ. Les auteurs ont aussi montré que cette sensibilisation agissait par la voie de signalisation NFκB puisque la cytotoxicité accrue n'a pas été observée dans les cellules avec une déplétion de IKKβ, un autre inhibiteur de NFκB. Cette stratégie d'inhibition de l'expression de la MGMT a ensuite été testée *in vivo* sur des souris portant une xénogreffe de GBM sous-cutané (lignée cellulaire U138) et a montré que la combinaison fluoxétine / TMZ était plus efficace pour réduire le volume tumoral (100mm³ pour la combinaison contre 200mm³ pour le TMZ seul) et la masse de la tumeur (100mg pour la combinaison contre 250mg pour le TMZ seul) que la TMZ seul, en inhibant NFκB, l'expression de la MGMT et Ki67 [79].

Le FM19G11 est un inhibiteur du HIF-1α qui est impliqué dans la régulation de l'expression de la MGMT et est sans danger à de faibles concentrations (<30 μmol/L) contrairement à d'autres inhibiteurs de HIF-1α tel

que le 2-méthoxyestradiol qui est très cytotoxique. Le FM19G11 est efficace à des doses nanomolaires et module, en plus de HIF-1 α , d'autres voies de signalisation telles que mTOR et PI3K/Akt en conditions normoxiques. You *et al.* ont montré en 2018 que dans des conditions hypoxiques, le FM19G11 inhibait l'expression de la MGMT de moitié par rapport au contrôle non traité par la voie HIF-1 α . Dans des conditions normoxiques, la FM19G11 a inhibé l'expression de la MGMT par inhibition directe de NF κ B. Le FM19G11 n'est pas cytotoxique en soi, mais augmente la cytotoxicité du TMZ (46% des cellules en apoptose pour le TMZ seul contre 64% pour la combinaison FM19G11 / TMZ) [80].

2.2. Voie de Wnt/ β -caténine

La cordycépine est isolée de *Cordyceps militaris* et a divers effets cliniques comme la régulation de l'immunité, de l'inflammation, de la synthèse protéique, etc. *In vitro*, sur des cellules de GBM (lignées cellulaires LN18 et T98G), la cordycépine a inhibé la production de β -caténine. Puisque la β -caténine inhibe la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), la cordycépine a levé cette inhibition dans les cellules de GBM de manières dose et temps dépendantes. Les ROS ont réduit la transcription et l'expression de la MGMT de 80% par rapport à la condition non traitée. *In vivo*, la combinaison cordycépine / TMZ a augmenté la médiane de survie (41j contre 31j pour le TMZ seul) et diminué les expressions de la β -caténine et de la MGMT, ainsi que la croissance tumorale (200mm³ contre 900mm³ pour le TMZ seul). La cordycépine a donc amélioré l'effet du TMZ [81].

L'épigallocatechine gallate (EGCG) est une molécule naturelle connue pour inhiber la tumorigenèse et est connue pour avoir des effets chimiosensibilisants sur de nombreuses tumeurs. Dans une étude de 2008, les auteurs ont montré que l'EGCG a diminué l'expression de l'ARN messenger de la MGMT par un facteur 4 sur la lignée cellulaire T98G réduisant son expression protéique, ainsi que l'expression des gènes cibles de Wnt/ β -caténine et des facteurs de transcription. L'EGCG a empêché la translocation de β -caténine dans le noyau, avec des effets différents sur les cellules tumorales ou saines, soit augmentant l'expression de la MGMT dans cette dernière. La combinaison EGCG / TMZ a été plus cytotoxique sur la lignée cellulaire T98G après 72h (30% de viabilité) que le TMZ seul (60% de viabilité) [82].

Le 20(S)-ginsenoside-Rg3 (20(S)-rg3) est un stéréoisomère du ginsenoside-Rg3 : triterpénoïde saponine monomère tétracyclique extrait du ginseng. Le 20(S)-Rg3 est non toxique et bien toléré chez les mammifères (souris, rats, chiens, humains). Dans une étude de 2018, le 20(S)-Rg-3 a diminué l'expression de l'ARN messenger de la MGMT de moitié et son expression protéique de 75%, par rapport au contrôle. Les expressions des facteurs de transcription de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine (LEF1 et TCF1/TCF7) et de leurs gènes cibles (CD44, C-Jun, C-Myc, cycline D1, survivine et MMP7) ont également été inhibées en présence de 20(S)-Rg3. Dans 3 lignées cellulaires de GBM (T98G, U118 et GBM-XX), le 20(S)-Rg3 seul (100 μ M) et le TMZ seul (100 μ M) n'ont pas eu d'effet cytotoxique mais la combinaison 20(S)-Rg3 / TMZ a entraîné une diminution de la viabilité cellulaire de plus de 50% quelle que soit la lignée cellulaire. *In vivo*, la combinaison 20(S)-Rg3 / TMZ a permis de réduire

la croissance tumorale de 80% par rapport au TMZ seul et l'expression de la MGMT au sein de la tumeur a été diminuée de moitié par rapport au TMZ seul [83].

2.3. Voie de p53

Harris *et al.* ont utilisé la lignée cellulaire Saos-2, n'exprimant pas p53, et les ont transfectées avec du p53 de type sauvage [84]. L'activité du promoteur de la MGMT des cellules transfectées avec le p53 de type sauvage a été réduite à seulement 4% par rapport aux cellules non transfectées. Les auteurs ont identifié une région de 271 pb du promoteur de la MGMT comme élément régulateur négatif de p53. Les cellules transfectées avec le p53 de type sauvage présentent des niveaux de protéines MGMT bas, non quantifiable après 120h, ce qui suggère que p53 peut inhiber l'activité du promoteur de la MGMT et son expression protéique [84].

Les IFN de type I tels que l'IFN- α ou l'IFN- β sont une famille de cytokines ayant des effets biologiques pléiotropiques et sont largement utilisés dans les thérapies antitumorales comme agents de sensibilisation aux chimiothérapies, particulièrement aux nitrosourées. L'IFN- β peut induire l'expression de p53, qui réduit l'activité du promoteur de la MGMT. Lorsque p53 est inhibé avant le traitement par IFN- β , la combinaison IFN- β / TMZ a le même effet que le TMZ seul, ce qui suggère que l'IFN- β resensibilise les cellules au TMZ en induisant l'expression de p53 et donc en réduisant l'expression de la MGMT [85].

Taspinar *et al.* se sont intéressés au loméguastrib comme inhibiteur de la MGMT. Lorsque le loméguastrib est combiné au TMZ, la CI50 de différentes cellules de GBM (lignées cellulaires U118-MG, U-138MG, U-87 MG et T98G, ou cellules primaires) est considérablement réduite par rapport au TMZ seul. Pour les T98G par exemple, la CI50 est de 250 μ M pour le TMZ seul et de 60 μ M pour la combinaison loméguastrib / TMZ (50 μ M). La combinaison n'a montré aucun effet sur la méthylation du promoteur de la MGMT, mais a été associée à une diminution de 90% de l'expression de la MGMT et à une augmentation d'un facteur 5 de l'expression de p53 sur la lignée cellulaire U118-MG, par exemple [86].

2.4. Voie de STAT3

L'acide ursolique (AU) est un acide triterpène pentacyclique retrouvé dans la nourriture et dans de nombreuses plantes médicinales. Il est très largement utilisé pour ses actions pharmacologiques notamment en tant qu'antioxydant, antiinflammatoire, antiviral, etc. Récemment l'AU a surtout été étudié pour ses actions antitumorales. Il permettrait d'augmenter la sensibilité de certaines cellules tumorales aux agents de chimiothérapie. C'est dans ce contexte que Zhu *et al.* ont étudié l'AU en tant qu'inhibiteur de la MGMT. Il a été démontré sur les cellules de GBM surexprimant MGMT que l'AU diminue l'expression protéique de la MGMT de 90% environ, probablement par interaction avec la voie de signalisation STAT3, nécessaire pour la régulation transcriptionnelle de la MGMT. La combinaison AU / TMZ a montré *in vitro* une diminution de la viabilité des cellules surexprimant la MGMT : 40% de viabilité cellulaire, contre 70% pour les cellules traitées avec le TMZ

seul. *In vivo*, la combinaison AU / TMZ a montré une diminution de l'expression de la MGMT intratumorale et une diminution de plus de la moitié du volume tumoral par rapport à l'AU ou au TMZ seul sur une xénogreffe de GBM sous-cutané (lignée cellulaire LN18) chez des souris athymiques (Figure 3-7). L'AU potentialise donc l'effet du TMZ tant *in vitro* qu'*in vivo* [87].

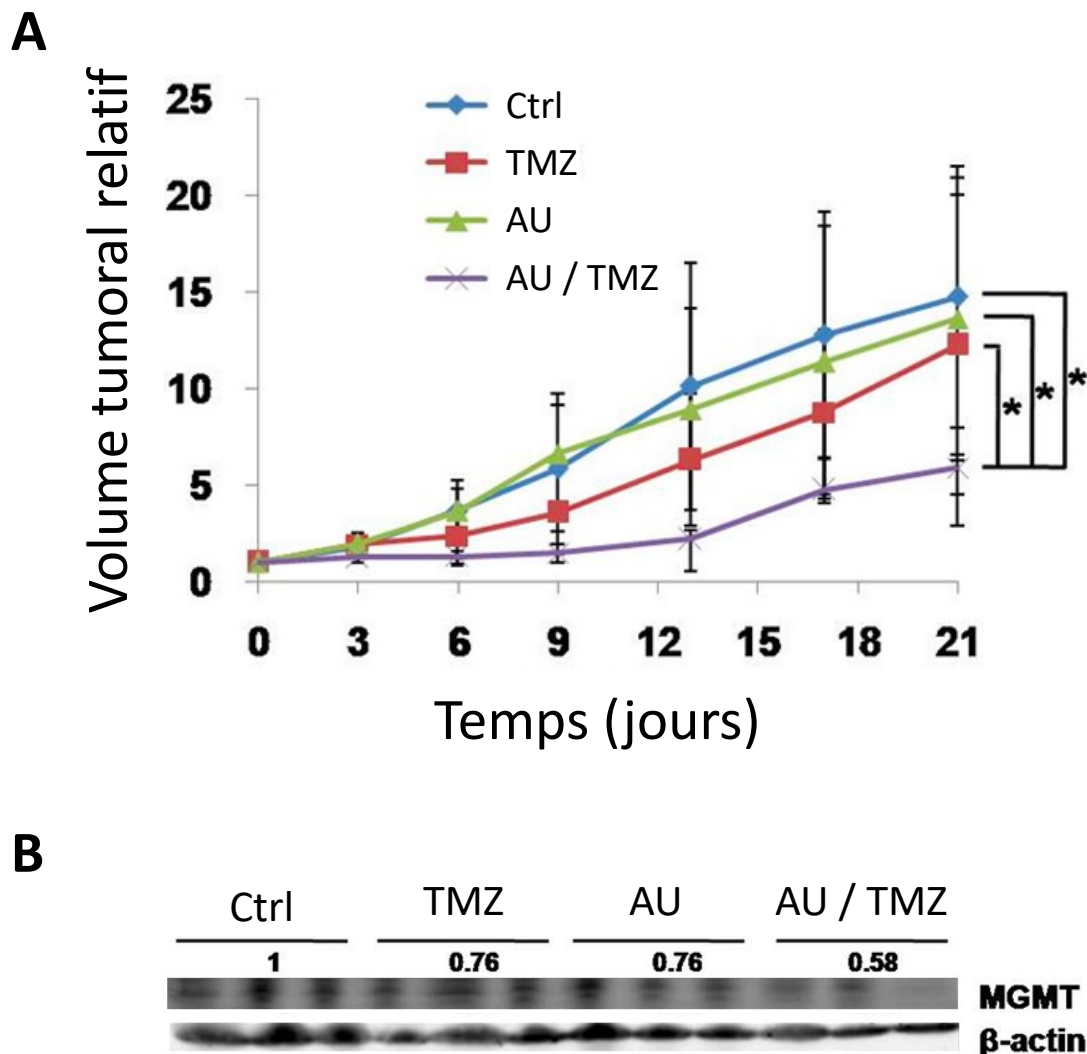


Figure 3-7. L'AU potentialise l'efficacité du TMZ dans un modèle murin de xénogreffe de GBM. (A) Des souris avec une xénogreffe de GBM (lignée cellulaire LN18) ont été traitées par voie intrapéritonéale avec du PBS (Ctrl), du TMZ (50 mg/kg), de l'AU (50 mg/kg) ou la combinaison AU (50mg/kg) / TMZ (50 mg/kg) pendant 21 jours. Le volume tumoral a été mesuré et comparé à celui du début du traitement (moyenne \pm écart-type ; * $p < 0,05$). (B) Les lysats extraits des tissus tumoraux ont été examinés par immunoblot avec des anticorps anti-MGMT et anti-phospho-H2A.X. La β -actine a été utilisée comme contrôle interne (figure adaptée de Zhu *et al.*, 2016 [87]).

2.5. Voie de PI3K/Akt/mTOR

L'extrait d'aiguilles de pin est très répandu à Taiwan en raison de ses propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, antibactériennes, et anticancéreuses. Liao *et al.* ont étudié cet extrait riche en flavonoïdes dans le but d'identifier des composés qui pourraient avoir des effets antitumoraux. Les auteurs ont alors isolé la chryisine qui est reconnue pour avoir des propriétés de suppresseur de tumeur, d'inducteur de l'apoptose et d'inhibiteur de la migration et de l'invasion tumorale. Dans cette étude, la chryisine (100M) a inhibé de 50% la prolifération des cellules de GBM (lignée cellulaire GBM8901), mais pas celle des lignées cellulaires normales. Elle a également induit une apoptose dans des lignées cellulaires de GBM (observée par clivage de caspase-3 et de PARP). Lorsque les cellules ont été traitées avec la chryisine, l'invasion cellulaire et la migration ont été réduites de 35 et 25%, respectivement. La chryisine a un effet synergique avec la TMZ et la combinaison chryisine / TMZ a réduit de 50% la viabilité des cellules de glioblastome, contre 10% pour le TMZ seul. L'expression de la MGMT a été réduite en présence de chryisine. Son action pourrait avoir lieu par la voie PI3K/Akt/mTOR puisque l'application de rapamycine (inhibiteur de mTOR) inhibe la synergie de la combinaison chryisine / TMZ [88].

2.6. ARNs

L'allicine est un composé présent dans l'ail et est largement utilisé dans les compléments alimentaires. Wu *et al.* ont montré sur des lignées cellulaires de GBM (lignée cellulaire U251) que l'allicine (30µg/mL) permet de doubler l'expression du miARN-486-3p [89]. Le miARN-486-3p se lie à la région 3'UTR de la MGMT et inhibe la traduction de l'ARNm sans affecter son taux. La combinaison allicine / TMZ a permis de diminuer de 60% la viabilité des cellules de GBM par rapport au TMZ seul : 40%. La surexpression du miARN-486-3p a donc considérablement inhibé la survie des cellules du GBM en présence de TMZ (lignée cellulaire U251 transfectée pour surexprimer le miARN-486-3p) et a augmenté la médiane de survie de souris portant une tumeur sous-cutanée : 35 jours pour le modèle avec le miRNA-486-3p surexprimé contre 24 jours pour les modèles n'exprimant pas le miARN-486-3p ou exprimant un miARN *scramble* [89].

De petits ARNs en épingle à cheveux (shARNs) pourraient être utilisés pour inhiber l'expression de la MGMT. Viel *et al.* ont utilisé une stratégie de shARN spécifiques de la MGMT, par transfection lentivirale, et ont observé une diminution de l'expression de la MGMT dans des lignées cellulaires de GBM de 20% par rapport au contrôle pour la lignée cellulaire T98G [90]. Cette inhibition de la MGMT a été associée à une sensibilisation *in vitro* au TMZ : les cellules T98G portant le shARN sont deux fois plus sensibles au TMZ que les cellules sauvages. Les auteurs ont ensuite injecté des lignées cellulaires de GBM (LN18) exprimant ou non le shARN chez des souris et les tumeurs sous-cutanées portant le shARN étaient plus sensibles au TMZ que les tumeurs n'exprimant pas le shARN. Le volume tumoral pour les tumeurs transfectées a diminué de moitié alors qu'il a augmenté d'un facteur 2 pour le contrôle. Ils ont ensuite testé la traduction *in vivo* directe du shARN et ont remarqué une sensibilité accrue au TMZ due à une diminution de l'expression de la MGMT. Le volume tumoral après 14 jours est augmenté d'un facteur 1,5 pour le TMZ seul et est diminué de moitié pour la combinaison shARN / TMZ [90].

3. Modification de la protéine

Göder *et al.* ont montré en 2015 que le site catalytique de la MGMT (Cystéine 145) peut être modifié par l'acide lipoïque (AL) [91]. La 6-O-benzylguanine biotinylée : un pseudosubstrat de la MGMT, est capable de marquer la protéine MGMT lorsque son site actif est intact. Avec l'AL, le marquage sur la protéine MGMT est perdu signifiant que le site actif a été modifié (figure 3-8). La combinaison AL / TMZ a permis d'augmenter de 50% la méthylation des positions 6-O des guanines, et a également réduit la viabilité cellulaire de 60% par rapport au TMZ seul. De plus, la combinaison AL / TMZ a réduit le volume de la tumeur de manière plus importante (volume tumoral relatif de 5) que le TMZ seul (volume tumoral relatif de 7 sur un modèle de GBM sous-cutané (lignée cellulaire HCT116) [91].

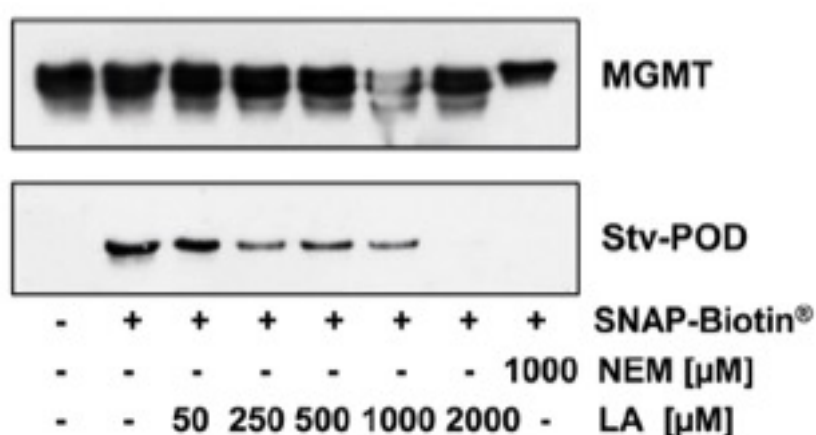


Figure 3-8. L'AL réduit l'activité de la MGMT. Évaluation de la modification de la Cys-145 dans la fente catalytique de la MGMT à l'aide du pseudosubstrat 6-O-benzylguanine (SNAP-Biotin®) conjugué à la biotine. La MGMT a été préincubée avec l'AL ou avec du N-éthylméimide (NEM) (témoin positif) suivi de la réaction enzymatique. La MGMT biotinylée a été détectée par SDS-PAGE et par immunotransfert avec de la streptavidine-peroxydase (Stv-POD) (figure adaptée de Göder *et al.*, 2015 [91]).

Dans une étude de 1994, Laval et Wink se sont intéressés au monoxyde d'azote (NO) [92]. Le NO est ubiquitaire chez tous les mammifères et régule la pression sanguine, la neurotransmission ou encore le système immunitaire. En condition aérobie, le NO peut entraîner des altérations des protéines et de l'ADN. En présence de NO, les protéines forment des adduits S-nitrosothiol ce qui entraîne la perte de leur activité. Ainsi, les auteurs ont suggéré que le NO pourrait inactiver la fonction de la MGMT. Le DEA/NO ($\text{Et}_2\text{NN}(\text{O})\text{NO}^-\text{Na}^+$) est un complexe qui libère du NO de manière contrôlée et a donc été utilisé dans cette étude. Lorsque le DEA/NO et la MGMT ont été mis en contact, l'activité de la MGMT a été diminuée d'un facteur 9. Il a été supposé que le NO réagisse avec la cystéine du site actif de la MGMT en créant des adduits S-nitrosothiol. La lignée cellulaire H4 traitée par DEA/NO a vu l'activité de la MGMT diminuée de 30% par rapport aux cellules non traitées. De plus, la sensibilité à un agent alkylant tel que le BCNU a été plus importante ($\text{CI}_{50} = 17$ et $24 \mu\text{g/mL}$, pour la combinaison DEA/NO / BCNU et le BCNU seul, respectivement) [92].

En présence de disulfirame, l'activité de la MGMT peut être aussi régulée. Les auteurs ont utilisé la 6-O-benzylguanine biotinylée pour évaluer si le disulfirame modifiait ou non le site actif de la protéine MGMT. Il a été démontré que lorsque les cellules étaient traitées au disulfirame, le marquage et donc l'activité était réduit de 75%, ce qui suggère que le disulfirame a modifié la cystéine 145. Après avoir été modifiée par le disulfirame, la protéine MGMT est dégradée par la voie du protéasome. En inhibant l'action de la MGMT, le disulfirame potentialise la cytotoxicité *in vitro* des agents alkylants tels que le BCNU et le TMZ puisque les CI50 passe de 1 mM et 150µM pour le TMZ seul et le BCNU seul, respectivement, à 0,2 mM et 50 µM pour les combinaisons disulfirame / TMZ et disulfirame / BCNU, respectivement. *In vivo*, le disulfirame a permis de diminuer de 50% l'activité de la MGMT au sein de la tumeur dans un modèle de GBM sous-cutanée (lignée cellulaire T98G) [93]. Liu *et al.* ont signalé en 2012 que le disulfirame pouvait réduire la liaison et la transcription de la MGMT par la voie NFκB, augmentant ainsi la production de ROS et potentialisant l'effet de la gemcitabine [93,94]. Le disulfirame pourrait aussi inhiber l'expression de la MGMT et non uniquement son activité. Karamanakos *et al.* ont évalué en 2017 le cas d'un homme de 37 ans qui a reçu un diagnostic de GBM et qui a subi une résection partielle [95]. Le patient avait un promoteur MGMT non méthylé et a commencé le traitement standard (TMZ + radiothérapie). Il a également été traité avec du disulfirame (250 mg, une dose *per os*) et Cu gluconate (3mg, 2 doses *per os*). Les premiers signes de récurrence sont apparus 15 mois après l'opération et le patient est décédé 26 mois après la première intervention soit une survie de 1 an supérieure à la médiane de survie classiquement observée [95].

Conclusion

Le GBM est l'une des formes les plus agressives et mortelles de cancer du cerveau, et malheureusement, sa prise en charge thérapeutique actuelle est loin d'être optimale. Pour améliorer la gestion de cette maladie dévastatrice, il est impératif de considérer plusieurs solutions, car il est de plus en plus évident que les approches actuelles ont leurs limites.

Tout d'abord, l'une des options envisageables pour améliorer la prise en charge du GBM consiste à repenser complètement les stratégies thérapeutiques existantes. Cependant, cette voie est parsemée d'obstacles majeurs. Changer radicalement les protocoles de traitement actuels nécessite une recherche approfondie, des essais cliniques coûteux et de nombreuses années de développement. De plus, il est difficile de garantir que de nouvelles stratégies seront plus efficaces que celles déjà en place, ce qui rend cette approche risquée.

Une alternative plus réaliste consiste à améliorer les stratégies thérapeutiques existantes. Le GBM est connu pour sa résistance aux traitements, et l'une des raisons de cette résistance est la protéine MGMT, qui joue un rôle crucial dans la réparation de l'ADN endommagé par les thérapies anticancéreuses. Inhiber l'activité de la MGMT pourrait rendre les cellules tumorales plus sensibles aux traitements conventionnels, tels que la radiothérapie et la chimiothérapie. Des recherches prometteuses ont montré que l'utilisation d'inhibiteurs de la MGMT, pourrait améliorer la réponse des patients au traitement conventionnel par TMZ.

Toutefois, malgré les perspectives encourageantes de l'inhibition de la MGMT, elle présente des défis non négligeables. Il est impératif de développer des inhibiteurs de la MGMT plus performants et spécifiques, tout en minimisant les effets secondaires indésirables. C'est dans ce contexte que cette étude se poursuivra. Son objectif principal sera de choisir des inhibiteurs de la MGMT susceptibles d'accroître la sensibilité des cellules résistantes au TMZ. Ces inhibiteurs seront ensuite formulés sous forme de nanoparticules pour augmenter leur efficacité et simplifier leur administration. Une approche novatrice sera envisagée pour l'administration de ces inhibiteurs : une injection locale d'un hydrogel contenant les inhibiteurs de la MGMT, permettant leur libération continue. Cette méthode d'administration n'ajoutera pas de complexité au protocole existant puis que l'hydrogel pourra être injecté directement dans la cavité de résection par le neurochirurgien et offrira une possibilité de sensibilisation des patients résistants à la chimiothérapie conventionnelle qui suivra.

Bibliographie

- 1 Global Burden of Disease 2019 Cancer Collaboration, Kocarnik JM, Compton K, *et al.* Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life Years for 29 Cancer Groups From 2010 to 2019: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *JAMA Oncol* 2022;**8**:420. doi:10.1001/jamaoncol.2021.6987
- 2 Nussbaumer S, Bonnabry P, Veuthey J-L, *et al.* Analysis of anticancer drugs: a review. *Talanta* 2011;**85**:2265–89. doi:10.1016/j.talanta.2011.08.034
- 3 Bukowski K, Kciuk M, Kontek R. Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. *Int J Mol Sci* 2020;**21**:3233. doi:10.3390/ijms21093233
- 4 Wang J, Seebacher N, Shi H, *et al.* Novel strategies to prevent the development of multidrug resistance (MDR) in cancer. *Oncotarget* 2017;**8**:84559–71. doi:10.18632/oncotarget.19187
- 5 Wang X, Zhang H, Chen X. Drug resistance and combating drug resistance in cancer. *Cancer Drug Resist Alhambra Calif* 2019;**2**:141–60. doi:10.20517/cdr.2019.10
- 6 Dallavalle S, Dobričić V, Lazzarato L, *et al.* Improvement of conventional anti-cancer drugs as new tools against multidrug resistant tumors. *Drug Resist Updat Rev Comment Antimicrob Anticancer Chemother* 2020;**50**:100682. doi:10.1016/j.drup.2020.100682
- 7 Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 1993;**362**:709–15. doi:10.1038/362709a0
- 8 Hoeijmakers JHJ. DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med* 2009;**361**:1475–85. doi:10.1056/NEJMra0804615
- 9 Iyama T, Wilson DM. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair* 2013;**12**:620–36. doi:10.1016/j.dnarep.2013.04.015
- 10 Pegg AE, Fang Q, Laktionova NA. Human variants of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *DNA Repair* 2007;**6**:1071–8. doi:10.1016/j.dnarep.2007.03.012
- 11 Everhard S, Tost J, El Abdalaoui H, *et al.* Identification of regions correlating MGMT promoter methylation and gene expression in glioblastomas. *Neuro-Oncol* 2009;**11**:348–56. doi:10.1215/15228517-2009-001
- 12 Nakagawachi T, Soejima H, Urano T, *et al.* Silencing effect of CpG island hypermethylation and histone modifications on O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) gene expression in human cancer. *Oncogene* 2003;**22**:8835–44. doi:10.1038/sj.onc.1207183
- 13 Harris LC, Potter PM, Tano K, *et al.* Characterization of the promoter region of the human O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase gene. *Nucleic Acids Res* 1991;**19**:6163–7. doi:10.1093/nar/19.22.6163
- 14 Biswas T, Ramana CV, Srinivasan G, *et al.* Activation of human O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene by glucocorticoid hormone. *Oncogene* 1999;**18**:525–32. doi:10.1038/sj.onc.1202320
- 15 Srivenugopal KS, Mullapudi SR, Shou J, *et al.* Protein phosphorylation is a regulatory mechanism for O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase in human brain tumor cells. *Cancer Res* 2000;**60**:282–7.

- 16 Gerson SL. MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* 2004;**4**:296–307. doi:10.1038/nrc1319
- 17 Loveless A. Possible relevance of O-6 alkylation of deoxyguanosine to the mutagenicity and carcinogenicity of nitrosamines and nitrosamides. *Nature* 1969;**223**:206–7. doi:10.1038/223206a0
- 18 Xiao W, Samson L. In vivo evidence for endogenous DNA alkylation damage as a source of spontaneous mutation in eukaryotic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;**90**:2117–21. doi:10.1073/pnas.90.6.2117
- 19 Horsfall MJ, Gordon AJ, Burns PA, *et al.* Mutational specificity of alkylating agents and the influence of DNA repair. *Environ Mol Mutagen* 1990;**15**:107–22. doi:10.1002/em.2850150208
- 20 Karran P, Bignami M. Self-destruction and tolerance in resistance of mammalian cells to alkylation damage. *Nucleic Acids Res* 1992;**20**:2933–40. doi:10.1093/nar/20.12.2933
- 21 Quiros S, Roos WP, Kaina B. Processing of O⁶-methylguanine into DNA double-strand breaks requires two rounds of replication whereas apoptosis is also induced in subsequent cell cycles. *Cell Cycle* 2010;**9**:168–78. doi:10.4161/cc.9.1.10363
- 22 Trivedi RN, Almeida KH, Fornsglio JL, *et al.* The Role of Base Excision Repair in the Sensitivity and Resistance to Temozolomide-Mediated Cell Death. *Cancer Res* 2005;**65**:6394–400. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0715
- 23 Yoshioka K, Yoshioka Y, Hsieh P. ATR kinase activation mediated by MutSalpha and MutLalpha in response to cytotoxic O6-methylguanine adducts. *Mol Cell* 2006;**22**:501–10. doi:10.1016/j.molcel.2006.04.023
- 24 Srivenugopal KS, Yuan X-H, Friedman HS, *et al.* Ubiquitination-Dependent Proteolysis of O⁶-Methylguanine-DNA Methyltransferase in Human and Murine Tumor Cells following Inactivation with O⁶-Benzylguanine or 1,3-Bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea[†]. *Biochemistry* 1996;**35**:1328–34. doi:10.1021/bi9518205
- 25 Xu-Welliver M, Pegg AE. Degradation of the alkylated form of the DNA repair protein, O(6)-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Carcinogenesis* 2002;**23**:823–30. doi:10.1093/carcin/23.5.823
- 26 Ali RB, Teo AK, Oh HK, *et al.* Implication of localization of human DNA repair enzyme O6-methylguanine-DNA methyltransferase at active transcription sites in transcription-repair coupling of the mutagenic O6-methylguanine lesion. *Mol Cell Biol* 1998;**18**:1660–9. doi:10.1128/MCB.18.3.1660
- 27 Christmann M, Verbeek B, Roos WP, *et al.* O(6)-Methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) in normal tissues and tumors: enzyme activity, promoter methylation and immunohistochemistry. *Biochim Biophys Acta* 2011;**1816**:179–90. doi:10.1016/j.bbcan.2011.06.002
- 28 Goth R, Rajewsky MF. Persistence of O6-ethylguanine in rat-brain DNA: correlation with nervous system-specific carcinogenesis by ethylnitrosourea. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974;**71**:639–43. doi:10.1073/pnas.71.3.639
- 29 Tsuzuki T, Sakumi K, Shiraishi A, *et al.* Targeted disruption of the DNA repair methyltransferase gene renders mice hypersensitive to alkylating agent. *Carcinogenesis* 1996;**17**:1215–20. doi:10.1093/carcin/17.6.1215
- 30 Sakumi K, Shiraishi A, Shimizu S, *et al.* Methylnitrosourea-induced tumorigenesis in MGMT gene knockout mice. *Cancer Res* 1997;**57**:2415–8.

- 31 Roos WP, Kaina B. DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer Lett* 2013;**332**:237–48. doi:10.1016/j.canlet.2012.01.007
- 32 Kisby GE, Olivas A, Park T, et al. DNA repair modulates the vulnerability of the developing brain to alkylating agents. *DNA Repair* 2009;**8**:400–12. doi:10.1016/j.dnarep.2008.12.002
- 33 Hegi ME, Diserens A-C, Gorlia T, et al. MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *N Engl J Med* 2005;**352**:997–1003. doi:10.1056/NEJMoa043331
- 34 Belanich M, Pastor M, Randall T, et al. Retrospective study of the correlation between the DNA repair protein alkyltransferase and survival of brain tumor patients treated with carmustine. *Cancer Res* 1996;**56**:783–8.
- 35 Friedman HS, McLendon RE, Kerby T, et al. DNA mismatch repair and O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase analysis and response to Temodal in newly diagnosed malignant glioma. *J Clin Oncol* 1998;**16**:3851–7. doi:10.1200/JCO.1998.16.12.3851
- 36 Jaeckle KA, Eyre HJ, Townsend JJ, et al. Correlation of tumor O6 methylguanine-DNA methyltransferase levels with survival of malignant astrocytoma patients treated with bis-chloroethylnitrosourea: a Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol* 1998;**16**:3310–5. doi:10.1200/JCO.1998.16.10.3310
- 37 Cros J, Hentic O, Rebours V, et al. MGMT expression predicts response to temozolomide in pancreatic neuroendocrine tumors. *Endocr Relat Cancer* 2016;**23**:625–33. doi:10.1530/ERC-16-0117
- 38 Esteller M. Hypermethylation of the DNA Repair Gene O6-Methylguanine DNA Methyltransferase and Survival of Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *CancerSpectrum Knowl Environ* 2002;**94**:26–32. doi:10.1093/jnci/94.1.26
- 39 Louis DN, Perry A, Wesseling P, et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro-Oncol* 2021;**23**:1231–51. doi:10.1093/neuonc/noab106
- 40 Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol (Berl)* 2016;**131**:803–20. doi:10.1007/s00401-016-1545-1
- 41 Weller M, van den Bent M, Preusser M, et al. EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood. *Nat Rev Clin Oncol* 2021;**18**:170–86. doi:10.1038/s41571-020-00447-z
- 42 Wick W, Meisner C, Hentschel B, et al. Prognostic or predictive value of MGMT promoter methylation in gliomas depends on IDH1 mutation. *Neurology* 2013;**81**:1515–22. doi:10.1212/WNL.0b013e3182a95680
- 43 Malmström A, Grønberg BH, Marosi C, et al. Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012;**13**:916–26. doi:10.1016/S1470-2045(12)70265-6
- 44 Parsons DW, Jones S, Zhang X, et al. An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme. *Science* 2008;**321**:1807–12. doi:10.1126/science.1164382
- 45 Weller M, Wick W, Aldape K, et al. Glioma. *Nat Rev Dis Primer* 2015;**1**:15017. doi:10.1038/nrdp.2015.17
- 46 Wick W, Platten M, Meisner C, et al. Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012;**13**:707–15. doi:10.1016/S1470-2045(12)70164-X

- 47 Watanabe T, Nobusawa S, Kleihues P, *et al.* IDH1 Mutations Are Early Events in the Development of Astrocytomas and Oligodendrogliomas. *Am J Pathol* 2009;**174**:1149–53. doi:10.2353/ajpath.2009.080958
- 48 Circu ML, Aw TY. Glutathione and modulation of cell apoptosis. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res* 2012;**1823**:1767–77. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.06.019
- 49 Shi J, Zuo H, Ni L, *et al.* An IDH1 mutation inhibits growth of glioma cells via GSH depletion and ROS generation. *Neurol Sci* 2014;**35**:839–45. doi:10.1007/s10072-013-1607-2
- 50 Shi J, Sun B, Shi W, *et al.* Decreasing GSH and increasing ROS in chemosensitivity gliomas with IDH1 mutation. *Tumor Biol* 2015;**36**:655–62. doi:10.1007/s13277-014-2644-z
- 51 Molenaar RJ, Verbaan D, Lamba S, *et al.* The combination of IDH1 mutations and MGMT methylation status predicts survival in glioblastoma better than either IDH1 or MGMT alone. *Neuro-Oncol* 2014;**16**:1263–73. doi:10.1093/neuonc/nou005
- 52 Houillier C, Wang X, Kaloshi G, *et al.* IDH1 or IDH2 mutations predict longer survival and response to temozolomide in low-grade gliomas. *Neurology* 2010;**75**:1560–6. doi:10.1212/WNL.0b013e3181f96282
- 53 Esteller M, Toyota M, Sanchez-Cespedes M, *et al.* Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is associated with G to A mutations in K-ras in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 2000;**60**:2368–71.
- 54 Esteller M, Risques RA, Toyota M, *et al.* Promoter hypermethylation of the DNA repair gene O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase is associated with the presence of G:C to A:T transition mutations in p53 in human colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 2001;**61**:4689–92.
- 55 Clemons M, Kelly J, Watson AJ, *et al.* O6-(4-bromothienyl)guanine reverses temozolomide resistance in human breast tumour MCF-7 cells and xenografts. *Br J Cancer* 2005;**93**:1152–6. doi:10.1038/sj.bjc.6602833
- 56 Ameya P, Nathan I, Santhi K, *et al.* New insights into estrogenic regulation of O6-methylguanine DNA-methyltransferase (MGMT) in human breast cancer cells: Co-degradation of ER- α and MGMT proteins by fulvestrant or O6-benzylguanine indicates fresh avenues for therapy. *J Biomed Res* 2016;**30**:393. doi:10.7555/JBR.30.20160040
- 57 Mariani L, Piccirilli A, Citti L, *et al.* The Sensitivity of MCF10A Breast Epithelial Cells to Alkylating Drugs is Enhanced by the Inhibition of O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase Transcription with a Synthetic Double Strand DNA Oligonucleotide. *Breast Cancer Res Treat* 2002;**73**:207–13. doi:10.1023/A:1015808205169
- 58 Liu K-C, Ho H-C, Huang A-C, *et al.* Gallic acid provokes DNA damage and suppresses DNA repair gene expression in human prostate cancer PC-3 cells: GA Affects DNA Damage and Repair Gene in PC-3 Cells. *Environ Toxicol* 2013;**28**:579–87. doi:10.1002/tox.20752
- 59 Liu Q, Wang X, Li J, *et al.* Development and biological evaluation of AzoBGNU: A novel hypoxia-activated DNA crosslinking prodrug with AGT-inhibitory activity. *Biomed Pharmacother* 2021;**144**:112338. doi:10.1016/j.biopha.2021.112338
- 60 Hsia T-C, Lin J-H, Hsu S-C, *et al.* Cantharidin induces DNA damage and inhibits DNA repair-associated protein levels in NCI-H460 human lung cancer cells: Cantharidin Affects DNA Damage and DNA Repair Protein Expressions in NCI-H460 Cells. *Environ Toxicol* 2015;**30**:1135–43. doi:10.1002/tox.21986

- 61 Rupp M, Mouhri ZS, Williams C, *et al.* Molecular analysis of the dual targeting of the epidermal growth factor receptor and the O6-methylguanine-DNA methyltransferase with a double arm hybrid molecule. *Oncotarget* 2018;**9**:35041–55. doi:10.18632/oncotarget.25120
- 62 Hermes M, Geisler H, Osswald H, *et al.* Alterations in S-adenosylhomocysteine metabolism decrease O6-methylguanine DNA methyltransferase gene expression without affecting promoter methylation. *Biochem Pharmacol* 2008;**75**:2100–11. doi:10.1016/j.bcp.2008.02.031
- 63 Yu Y-L, Yu S-L, Su K-J, *et al.* Extended O⁶-Methylguanine Methyltransferase Promoter Hypermethylation Following *n*-Butylidenephthalide Combined with 1,3-Bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU) on Inhibition of Human Hepatocellular Carcinoma Cell Growth. *J Agric Food Chem* 2010;**58**:1630–8. doi:10.1021/jf903043r
- 64 Chen Z, Xiang B, Qi L, *et al.* miR-221-3p promotes hepatocellular carcinogenesis by downregulating O6-methylguanine-DNA methyltransferase. *Cancer Biol Ther* 2020;**21**:915–26. doi:10.1080/15384047.2020.1806642
- 65 Kokkinakis DM, Ahmed MM, Chendil D, *et al.* Sensitization of pancreatic tumor xenografts to carmustine and temozolomide by inactivation of their O6-Methylguanine-DNA methyltransferase with O6-benzylguanine or O6-benzyl-2'-deoxyguanosine. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2003;**9**:3801–7.
- 66 Kokkinakis DM, Liu X, Neuner RD. Modulation of cell cycle and gene expression in pancreatic tumor cell lines by methionine deprivation (methionine stress): implications to the therapy of pancreatic adenocarcinoma. *Mol Cancer Ther* 2005;**4**:1338–48. doi:10.1158/1535-7163.MCT-05-0141
- 67 Bocangel D, Sengupta S, Mitra S, *et al.* p53-Mediated down-regulation of the human DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) via interaction with Sp1 transcription factor. *Anticancer Res* 2009;**29**:3741–50.
- 68 Kostka T, Empl MT, Seiwert N, *et al.* Repair of O⁶-carboxymethylguanine adducts by O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in human colon epithelial cells. *Carcinogenesis* 2021;**42**:1110–8. doi:10.1093/carcin/bgab049
- 69 Turriziani M, Caporaso P, Bonmassar L, *et al.* O6-(4-Bromothienyl)guanine (PaTrin-2), a novel inhibitor of O6-alkylguanine DNA alkyl-transferase, increases the inhibitory activity of temozolomide against human acute leukaemia cells in vitro. *Pharmacol Res* 2006;**53**:317–23. doi:10.1016/j.phrs.2005.12.001
- 70 Wu L-Y, Lu H-F, Chou Y-C, *et al.* Kaempferol Induces DNA Damage and Inhibits DNA Repair Associated Protein Expressions in Human Promyelocytic Leukemia HL-60 Cells. *Am J Chin Med* 2015;**43**:365–82. doi:10.1142/S0192415X1550024X
- 71 Göttlicher M, Minucci S, Zhu P, *et al.* Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J* 2001;**20**:6969–78. doi:10.1093/emboj/20.24.6969
- 72 Boffa LC, Vidali G, Mann RS, *et al.* Suppression of histone deacetylation in vivo and in vitro by sodium butyrate. *J Biol Chem* 1978;**253**:3364–6.
- 73 Candido EP, Reeves R, Davie JR. Sodium butyrate inhibits histone deacetylation in cultured cells. *Cell* 1978;**14**:105–13. doi:10.1016/0092-8674(78)90305-7
- 74 Knüpfer MM, Pulzer F, Schindler I, *et al.* Different effects of valproic acid on proliferation and migration of malignant glioma cells in vitro. *Anticancer Res* 2001;**21**:347–51.

- 75 Shao Y, Gao Z, Marks PA, *et al.* Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;**101**:18030–5. doi:10.1073/pnas.0408345102
- 76 Ryu CH, Yoon WS, Park KY, *et al.* Valproic Acid Downregulates the Expression of MGMT and Sensitizes Temozolomide-Resistant Glioma Cells. *J Biomed Biotechnol* 2012;**2012**:1–9. doi:10.1155/2012/987495
- 77 Vlachostergios PJ, Hatzidaki E, Stathakis NE, *et al.* Bortezomib Downregulates MGMT Expression in T98G Glioblastoma Cells. *Cell Mol Neurobiol* 2013;**33**:313–8. doi:10.1007/s10571-013-9910-2
- 78 Zhang X. Resveratrol reverses temozolomide resistance by downregulation of MGMT in T98G glioblastoma cells by the NF-κB-dependent pathway. *Oncol Rep* 2012;**27**:2050–6. doi:10.3892/or.2012.1715
- 79 Guo Y, Song T, Liu J, *et al.* Disruption of NF-κB signaling by fluoxetine attenuates MGMT expression in glioma cells. *OncoTargets Ther* 2015;:2199. doi:10.2147/OTT.S85948
- 80 You C, Sheng H, Xie C, *et al.* FM19G11 inhibits O⁶-methylguanine DNA-methyltransferase expression under both hypoxic and normoxic conditions. *Cancer Med* 2018;**7**:3292–300. doi:10.1002/cam4.1551
- 81 Bi Y, Li H, Yi D, *et al.* Corrigendum to “β-catenin contributes to cordycepin-induced MGMT inhibition and reduction of temozolomide resistance in glioma cells by increasing intracellular reactive oxygen species”. [Cancer Lett. 435 (2018) 66–79]. *Cancer Lett* 2019;**461**:157–8. doi:10.1016/j.canlet.2019.06.006
- 82 Xie C-R, You C-G, Zhang N, *et al.* Epigallocatechin Gallate Preferentially Inhibits O⁶-Methylguanine DNA-Methyltransferase Expression in Glioblastoma Cells Rather than in Nontumor Glial Cells. *Nutr Cancer* 2018;**70**:1339–47. doi:10.1080/01635581.2018.1539189
- 83 Chen Z, Wei X, Shen L, *et al.* 20(S)-ginsenoside-Rg3 reverses temozolomide resistance and restrains epithelial-mesenchymal transition progression in glioblastoma. *Cancer Sci* 2019;**110**:389–400. doi:10.1111/cas.13881
- 84 Harris LC, Remack JS, Houghton PJ, *et al.* Wild-type p53 suppresses transcription of the human O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase gene. *Cancer Res* 1996;**56**:2029–32.
- 85 Natsume A, Ishii D, Wakabayashi T, *et al.* IFN-β Down-Regulates the Expression of DNA Repair Gene MGMT and Sensitizes Resistant Glioma Cells to Temozolomide. *Cancer Res* 2005;**65**:7573–9. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0036
- 86 Taspinar M, Ilgaz S, Ozdemir M, *et al.* Effect of lomeguatrib–temozolomide combination on MGMT promoter methylation and expression in primary glioblastoma tumor cells. *Tumor Biol* 2013;**34**:1935–47. doi:10.1007/s13277-013-0738-7
- 87 Zhu Z, Du S, Ding F, *et al.* Ursolic acid attenuates temozolomide resistance in glioblastoma cells by downregulating O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) expression. *Am J Transl Res* 2016;**8**:3299–308.
- 88 Liao C-L, Chen C-M, Chang Y-Z, *et al.* Pine (*Pinus morrissonicola* Hayata) Needle Extracts Sensitize GBM8901 Human Glioblastoma Cells to Temozolomide by Downregulating Autophagy and O⁶-Methylguanine-DNA Methyltransferase Expression. *J Agric Food Chem* 2014;**62**:10458–67. doi:10.1021/jf501234b
- 89 Wu H, Li X, Zhang T, *et al.* Overexpression miR-486-3p Promoted by Allicin Enhances Temozolomide Sensitivity in Glioblastoma Via Targeting MGMT. *NeuroMolecular Med* 2020;**22**:359–69. doi:10.1007/s12017-020-08592-5

- 90 Viel T, Monfared P, Schelhaas S, *et al.* Optimizing Glioblastoma Temozolomide Chemotherapy Employing Lentiviral-based Anti-MGMT shRNA Technology. *Mol Ther* 2013;**21**:570–9. doi:10.1038/mt.2012.278
- 91 Göder A, Nagel G, Kraus A, *et al.* Lipoic acid inhibits the DNA repair protein O6 -methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) and triggers its depletion in colorectal cancer cells with concomitant autophagy induction. *Carcinogenesis* 2015;**36**:817–31. doi:10.1093/carcin/bgv070
- 92 Laval F, Wink DA. Inhibition by nitric oxide of the repair protein, O6 -DNA-methyltransferase. *Carcinogenesis* 1994;**15**:443–7. doi:10.1093/carcin/15.3.443
- 93 Paranjpe A, Zhang R, Ali-Osman F, *et al.* Disulfiram is a direct and potent inhibitor of human O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) in brain tumor cells and mouse brain and markedly increases the alkylating DNA damage. *Carcinogenesis* 2014;**35**:692–702. doi:10.1093/carcin/bgt366
- 94 Liu P, Brown S, Goktug T, *et al.* Cytotoxic effect of disulfiram/copper on human glioblastoma cell lines and ALDH-positive cancer-stem-like cells. *Br J Cancer* 2012;**107**:1488–97. doi:10.1038/bjc.2012.442
- 95 Karamanakos PN, Trafalis DT, Papachristou DJ, *et al.* Evidence for the efficacy of disulfiram and copper combination in glioblastoma multiforme - A propos of a case. *J BUON Off J Balk Union Oncol* 2017;**22**:1227–32.

Chapitre 4

Hydrogel de nanoparticules inhibant la 6-O-méthylguanine-ADN-méthyltransférase comme implant post-opératoire dans la prise en charge du glioblastome – les premiers essais

Table des matières

INTRODUCTION	95
MATERIELS ET METHODES	100
1. Matériels	100
2. Essais de solubilité.....	100
3. Formulations des NCLs en suspension.....	101
4. Formulations des hydrogels de NCLs.....	101
5. Mesure de la distribution de tailles des NCLs	102
6. Dosage de l'AU par chromatographie	102
7. Microscopie électronique en transmission.....	103
8. Propriétés viscoélastiques des hydrogels de NCLs par rhéologie.....	103
9. Libération de l'AU à partir des hydrogels de NCLs	103
10. Cultures cellulaires	104
11. Viabilité cellulaire	104
12. Western Blot	105
13. Statistiques.....	105
RESULTATS ET DISCUSSION	106
1. Effet de trois inhibiteurs de la MGMT sur la sensibilisation au TMZ	106
2. Formulation des suspensions de NCLs pour l'encapsulation de l'AU	109
3. Essais de solubilité de l'AU dans différentes huiles	110
4. Formulation des hydrogels de NCLs piégeant l'AU.....	111
5. Libération <i>in vitro</i> de l'AU à partir de l'hydrogel de NCLs	114
6. Cytotoxicité des suspensions de NCLs formulées ou non en présence d'AU.....	115
7. Expression de la MGMT après traitement avec les hydrogels de NCLs contenant ou non de l'AU	117
CONCLUSION	119
BIBLIOGRAPHIE	120

Introduction

Le glioblastome (GBM) est la tumeur primaire la plus fréquente du système nerveux central chez les adultes et est considérée comme le gliome de plus haut grade selon l'Organisation Mondiale de la Santé [1]. Il est souvent diagnostiqué chez des patients âgés : l'âge moyen au moment du diagnostic est de 65 ans, avec une incidence de 3,23 cas pour 100 000 personnes. Des données récentes indiquent que la survie médiane de tous les patients atteints de GBM est de 8 mois, quel que soit le traitement, avec un taux de survie à cinq ans de 7,2 % [2,3]. La prise en charge standard : le protocole de Stupp [4], conduit à la meilleure efficacité thérapeutique clinique avec une survie médiane de 14,6 mois et un taux de survie à 5 ans de 10 %, ce qui a été confirmé par une récente méta-analyse [5]. Malgré cette survie prolongée, ce traitement de référence n'est pas curatif : des récurrences tumorales fatales se produisent chez la plupart des patients [6]. Ce protocole n'a pas évolué depuis 2005, et il est aujourd'hui crucial d'améliorer la prise en charge des patients atteints de GBM avec de nouvelles alternatives thérapeutiques.

Parmi toutes les études précliniques portant sur cette pathologie, deux stratégies se distinguent. La première consiste à améliorer le passage des agents thérapeutiques à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE) en utilisant des nanomédicaments spécifiques, seules [7,8] ou en combinaison avec des méthodes physiques qui augmentent de manière transitoire la perméabilité de la barrière [9,10]. La deuxième approche est l'administration locale de médicaments directement dans la tumeur ou dans la cavité de résection du GBM [11–13]. Le traitement local est particulièrement intéressant puisque la résection de la tumeur primaire fait partie de la procédure clinique standard et en 1998, la *Food and Drug Administration* a approuvé le Gliadel® comme le premier implant postopératoire contre le GBM nouvellement diagnostiqué ou récurrent. Aucune autre forme implantable n'a été acceptée à ce jour. Pourtant, dans les modèles précliniques de cancer du cerveau, de récentes méta-analyses ont mis en évidence l'efficacité accrue de l'administration locale par rapport au traitement systémique, quels que soient le médicament, le système d'administration ou le modèle préclinique *in vivo* [13,14].

Bien que l'efficacité du Gliadel® combiné au protocole de Stupp ait été prouvée sur des patients atteints de GBM nouvellement diagnostiqué [15], le rapport risque-bénéfice et les coûts élevés limitent encore son utilisation clinique [16]. Plusieurs limites ont été mises en évidence telles que i) la rigidité des implants qui contribue à plusieurs effets secondaires graves après l'implantation : mauvaise cicatrisation des plaies, œdème cérébral, hypertension intracrânienne, crises d'épilepsie et méningite [17] ; ii) une libération rapide de l'agent chimiothérapeutique : la carmustine [18] ; sa diffusion limitée dans les tissus entourant la cavité de résection et une non-spécificité du médicament vis-à-vis des cellules résiduelles du GBM [17,19,20] ; et iii) une trop lente dégradation des implants, toujours observés jusqu'à 232 jours après l'implantation lors d'autopsies et de réopérations (*Food and Drug Administration*. Référence ID 3358686. Disponible à l'adresse suivante : <https://www.fda.gov/>. Consulté le 25 septembre 2023).

Pour surmonter ces limites : rigidité, dégradabilité et spécificité des actifs, le laboratoire MINT – INSERM U1066 / CNRS 6021 a récemment développé des hydrogels sans polymère, composés uniquement de nanocapsules lipidiques (NCLs), à la manière d'un collier de perles à 3 dimensions. Dans ce système, la structure hydrogel résulte de l'association de suspensions concentrées de NCLs grâce à des agents de réticulation amphiphiles, notamment la 4-N-gemcitabine lauramide (GemC12) (cytotoxique) ou la 4-N-cytidine palmitamide (CytC16) (non cytotoxique), localisés à l'interface huile/eau des NCLs. Des interactions de type liaison hydrogène entre les motifs pyrimidine conduisent à la réticulation entre les nanoparticules [21,22]. Les propriétés rhéologiques de ces hydrogels sont compatibles avec une administration par seringue et cette organisation présente l'avantage de proposer une libération continue et locale des NCLs et donc des principes actifs nano-encapsulés, tout en ne laissant aucun résidu à l'issue de la dégradation (ou dissolution) des hydrogels, c'est-à-dire après la libération totale des NCLs. Ce système implantable a été testé avec succès sur des modèles murins tumoraux pour retarder la récurrence du GBM, en remplissant la cavité de résection après la chirurgie. Dans un modèle murin orthotopique validé de GBM réséqué chirurgicalement (lignée cellulaire U-87 MG), l'administration dans la cavité de résection d'hydrogels préparés avec des NCLs chargées de GemC12 a significativement retardé l'apparition de récurrences par rapport à l'administration locale de doses équivalentes de solution de gemcitabine : médianes de survie de 62 et 36 jours, respectivement [23]. Contrairement à un liquide, la forme hydrogel dans la cavité de résection maintient l'exposition des cellules résiduelles du GBM au médicament. De plus, la spécificité des NCLs une fois libérées pour les cellules résiduelles de GBM a été montrée en associant un peptide de ciblage : le NFL-TBS.40–63 à la surface des NCLs. Cette association n'a pas empêché les NCLs de se combiner pour former l'hydrogel et a même amélioré ses propriétés mécaniques, permettant une libération encore plus soutenue des NCLs. L'association peptide et NCLs étant maintenue lors de la libération, la médiane de survie a été davantage retardée : 73 jours, par rapport à l'hydrogel sans capacité de ciblage [24]. Cet implant offre ainsi des perspectives prometteuses pour la combinaison avec le protocole de Stupp et ainsi assurer la continuité du traitement pour les patients atteints de GBM.

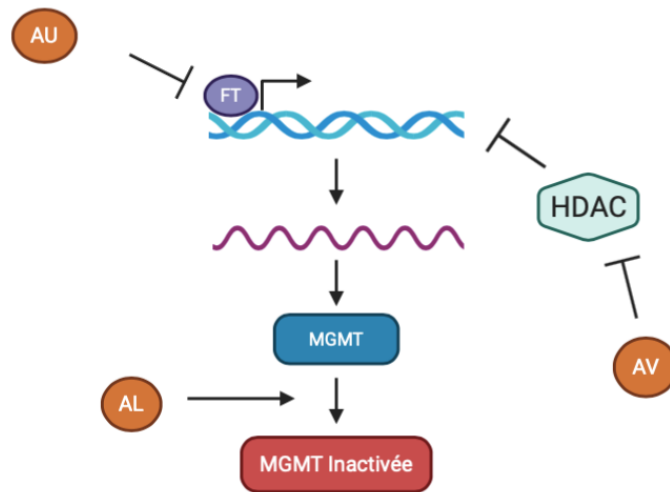


Figure 4-1. Mode d'action de l'AU (acide ursolique), de l'AV (acide valproïque) et de l'AL (acide lipoïque). L'AU inhibe l'expression protéique de la 6-O-méthylguanine-ADN-méthyltransférase (MGMT) en inhibant la signalisation menant à la transcription et à la traduction du gène et de l'ARN messager. L'AU joue probablement son rôle en intervenant sur le facteur de transcription (FT) STAT3 nécessaire à la régulation transcriptionnelle de la MGMT. L'AV inhibe également l'expression de la MGMT. L'AV étant un inhibiteur des histones désacétylases (HDACs), il est supposé jouer son rôle d'inhibiteur de la MGMT par remodelage de la chromatine. Enfin, l'AL joue son rôle d'inhibiteur de la MGMT en diminuant l'activité de la protéine en inactivant directement la MGMT par modification de son site actif (Cystéine 145).

Le protocole de Stupp intervient après la résection maximale de la tumeur et consiste en une chimiothérapie par témozolomide (TMZ) associée à une radiothérapie. Cependant, comme précisé dans le chapitre précédent, environ la moitié des patients ne répondent pas ou peu à la chimiothérapie en raison d'une trop forte expression de la 6-O-méthylguanine-ADN-méthyltransférase (MGMT) qui inhibe l'action du TMZ [25]. Afin de renforcer l'effet du TMZ, cette résistance des cellules surexprimant la MGMT (promoteur non méthylé) peut être contrée par des inhibiteurs de la MGMT, et il serait intéressant de pouvoir les associer dans les NCLs des hydrogels discutés précédemment. Cette possibilité est pertinente puisque les hydrogels de NCLs ont pu être utilisés pour combiner des actifs ayant des mécanismes d'action différents : GemC12 et paclitaxel, et améliorer l'efficacité antitumorale *in vitro* dans les lignées cellulaires de GBM (GL261 et 9L) de manière synergique [26]. La seule contrainte pour l'actif est qu'il doit être lipophile si on veut l'encapsuler et parmi la liste des inhibiteurs de la MGMT cités dans le chapitre 3, on peut mettre en avant l'acide ursolique (AU), l'acide lipoïque (AL) et l'acide valproïque (AV). Ces inhibiteurs de la MGMT sont d'autant plus intéressants qu'ils présentent des mécanismes d'inhibition différents, allant de la modification de l'expression protéique à la modification du site actif de la MGMT (figure 4-1).

Plus particulièrement, l'AU est un acide triterpène pentacyclique qui est actuellement étudié dans des stratégies thérapeutiques notamment antitumorales bien que son mécanisme d'action soit encore très peu connu à ce jour. L'AU permet entre autres d'inhiber la prolifération des cellules de GBM surexprimant la MGMT. Il a été en effet montré sur des lignées cellulaires LN18 et T98G (surexprimant la MGMT) que l'AU réduit de manière dose-dépendante la viabilité cellulaire et la formation de nouvelles colonies. L'AU diminue aussi dans ces cellules

l'expression protéique de la MGMT, et ce probablement en intervenant sur la voie STAT3, nécessaire pour la régulation transcriptionnelle de la MGMT et peut alors potentialiser l'effet du TMZ [27]. En effet, la combinaison d'un traitement AU / TMZ a montré *in vitro* une diminution de la viabilité cellulaire sur les mêmes lignées. De plus, une diminution significative du volume tumoral sur un modèle de GBM sous-cutané (lignée cellulaire LN18) chez des souris athymiques a été observée avec la combinaison AU / TMZ, injectée par voie intrapéritonéale, par rapport aux monothérapies (AU ou TMZ). L'AU possède également un certain nombre d'autres applications potentielles étant donné ses nombreuses autres propriétés. En effet, l'AU aurait des propriétés antiépileptiques [28], antitumorales [29] et antibactériennes [30]. Il permettrait aussi de protéger contre les pathologies métaboliques [31], contre des substances toxiques comme l'éthanol au niveau hépatique, contre les modifications de la pression artérielle, contre les pathologies musculaires (sarcopénie, amyotrophie, sclérose latérale amyotrophique, etc.) ou alors contre l'ostéolyse en inhibant la formation d'ostéoclastes [32].

Il en va de même pour un autre inhibiteur, l'AV, un acide carboxylique. L'AV étant un inhibiteur des histones désacétylases (HDACs) et son mode d'action serait une diminution de l'expression de la MGMT par remodelage de la chromatine. L'AV a permis de diminuer l'expression protéique de la MGMT de manière dose dépendante sur des lignées cellulaires surexprimant la MGMT (T98G et U138). Quand cet inhibiteur de la MGMT est associé au TMZ, la viabilité cellulaire de ces cellules se trouve fortement diminuée comparativement à celle de cellule n'exprimant pas la MGMT (lignées cellulaires U-87 MG et U251). De plus, la combinaison AV / TMZ a induit un ralentissement significatif de la croissance tumorale par administrations intrapéritonéales séquencées chez des souris athymiques porteuses de xénogreffes sous-cutanées (lignée cellulaire T98G), comparativement aux monothérapies (AU ou TMZ) [33].

L'AL, un composé organosulfuré dérivant de l'acide octanoïque, est au même titre que l'AU et l'AV un inhibiteur de la MGMT mais utilise une voie d'action différente. Göder *et al.* ont montré en 2015 que le traitement avec l'AL de la lignée cellulaire HCT116 surexprimant la MGMT (un carcinome colorectal) entraînait la perte de l'activité de la MGMT. Cette perte d'activité provient de la modification du site catalytique de la MGMT (Cystéine 145) par le traitement avec l'AL, confirmé en utilisant la 6-O-benzylguanine biotinylée : un pseudosubstrat de la MGMT permettant de marquer la MGMT lorsque son site actif est intact [34]. Ce traitement ne réduit en rien l'expression de la MGMT puisqu'ils ont montré des niveaux d'ARN messager et protéiques identiques, avec ou sans traitement à l'AL. L'AL potentialise alors la capacité du TMZ à méthyler les positions 6-O des guanines. Toujours sur la même lignée cellulaire, les quantités de 6-O-méthylguanine dans l'ADN ont augmenté significativement d'environ 50% lors d'un traitement combinant AL / TMZ, par rapport au TMZ seul. La viabilité cellulaire à quant à elle était diminuée d'environ 45% avec la même comparaison de traitement.

Sur la base des hydrogels de NCLs décrits précédemment, il a été envisagé d'améliorer les gels non pas par des liaisons covalentes comme présenté dans le chapitre 2 mais en ajoutant un actif thérapeutique qui permettrait de sensibiliser les patients résistants au TMZ. L'objectif de cette étude a alors été de formuler des implants qui pourraient être déposés dans la cavité de résection à la suite de l'intervention chirurgicale, et qui auraient la capacité d'inhiber la MGMT. Ainsi, cela restaurerait l'efficacité du TMZ de façon plus pérenne, ce qui permettrait d'augmenter l'efficacité du protocole de Stupp chez les patients résistants aux agents alkylants. Plus

particulièrement, après avoir confirmé que les inhibiteurs de la MGMT sont capables de renforcer l'effet du TMZ sur la lignée cellulaire T98G (surexprimant la MGMT) mais n'ont aucun effet sur la lignée U-87 MG (n'exprimant pas la MGMT), des essais d'encapsulation dans les NCLs ont été menés, ainsi que sous la forme hydrogel de NCLs. La libération prolongée des inhibiteurs de la MGMT à partir des hydrogels a été montrée *in vitro*. Finalement, après avoir établi les concentrations non toxiques pour les NCLs en présence d'AU sur les 2 lignées cellulaires, à la suite de la totale dissolution de l'hydrogel de NCLs, l'inhibition de la MGMT a été mise en évidence.

Matériels et Méthodes

1. Matériels

Le Labrafac® WL 1349 (triglycérides d'acides caprique et caprylique) (Lab) a été obtenu auprès de Gattefossé S.A. (Saint-Priest, France). Le Kolliphor® HS15 (un mélange de polyéthylène glycol (PEG) 660 et de PEG 660 12-hydroxystéarate) (Kol) a été commandé chez BASF (Ludwigshafen, Allemagne). Le Span® 80 (Span 80), l'AU, l'AV, l'AL, le chlorure de calcium (KCl), chlorure de sodium (NaCl), l'hydrogénophosphate de sodium (Na_2HPO_4), le dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4), l'huile de colza, le dodécylsulfate de sodium (SDS), le déoxycholate de sodium, le Triton X-100, l'albumine de sérum bovin (BSA), l'anticorps monoclonal anti- β -actine murin (A5316-2ML), le β -mercaptoéthanol et les comprimés d'inhibiteurs de protéases cOmplete™ Mini ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Le Captex 8000 et le Captex 200 ont été commandés auprès de ABITEC Corporation (Janesville, WI, États-Unis). Le miglyol 812N (Miglyol) a été obtenu auprès de Cremer Oleo GmbH & Co. KG (Hambourg, Allemagne). L'huile de sésame a été fournie par CRODA Chemicals Ctd (Snaith, Royaume-Uni). Le chlorure de Tris(hydroxyméthyl)méthylammonium (Tris HCl) a été fourni par EUROMEDEX (Souffelweyersheim, France). L'anticorps murin anti-MGMT clone MT3.1 (MAB16200) et l'anticorps caprin anti-immunoglobuline murine conjugué à la peroxydase (AP124P) ont été fournis par Merck Millipore (Darmstadt, Allemagne). Le kit de révélation SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate a été acheté chez Thermo Scientific (Rockford, IL, États-Unis). Le marqueur de poids moléculaire Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards, le tampon de transfert Trans-Blot Turbo 5x, le tampon de migration 10x Tris/Glycine/SDS ont été commandés chez BIO-RAD (Marnes-la-Coquette, France). Le Tween® 20 a été obtenu auprès de PROLABO (Paris, France). Le tampon Laemmli a été fourni par Alfa Aesar (Kandel, Allemagne). L'eau déionisée a été obtenue à partir d'un système Milli-Q plus (Millipore, Paris, France). Le méthanol a été fourni par Fisher Scientific (Loughborough, Royaume-Uni). La CytC16 a été synthétisée par AtlanChim Pharma (Saint-Herblain, France).

2. Essais de solubilité

La solubilité de l'AU a été testée dans 6 huiles différentes : Lab, Captex 8000, Miglyol, Captex 200, huile de sésame et huile de colza. Les échantillons contenant l'AU ont été préparés de la manière suivante : 500 mg d'huile et 5 mg d'AU ont été pesés, et 450 μL de méthanol ont été ajoutés. L'AU a été solubilisé à 60 °C sous agitation puis le méthanol a été évaporé à 70 °C. Les échantillons ont subi 3 cycles de température allant de 45 à 75 °C chacun pour simuler le procédé par inversion de phases utilisé pour la formulation des NCLs (voir ci-après). Enfin, les échantillons ont été centrifugés à 14 000 g pendant 30 min et les surnageants ont été récupérés. Ils ont ensuite été dilués d'un facteur 50 dans du méthanol. La proportion d'AU dans les différents échantillons a ensuite été quantifiée par UPLC (voir ci-après).

3. Formulations des NCLs en suspension

Les NCLs en suspension ont été préparées suivant le processus d'inversion de phases qui a été largement décrit [35,36]. Brièvement, 616,3 mg de Kol et 173,3 mg de Span 80 (tensioactifs), 645,2 mg de Lab (phase huile), 37,5 mg de NaCl et 555 mg d'eau désionisée (phase aqueuse) ont été pesés. Trois cycles de chauffage-refroidissement entre 45 °C et 75 °C ont ensuite été réalisés sous agitation constante (barreau aimanté à environ 900 tr/min). On passe ainsi d'une phase huile-dans-eau à basse température à une phase eau-dans-huile à haute température. Lors du dernier refroidissement et au moment de la zone d'inversion de phases (à environ 55 °C), 2,167 mL d'eau déionisée (4 °C) ont été rajoutés au mélange, ce qui a entraîné la formation des NCLs en suspensions. Les suspensions de NCLs (concentration finale de 300 mg/mL) ont été maintenues sous agitation jusqu'au retour à la température ambiante puis ont été stockées à 4 °C jusqu'à utilisation. Cinq formulations indépendantes ont été réalisées.

Pour formuler la suspension de NCLs en présence d'AU, la phase huile a tout d'abord été préparée : 23,8 mg d'AU, 645,2 mg de Lab et 2,1 mL de méthanol ont été mis sous agitation (barreau aimanté à environ 400 tr/min) dans un bain-marie à 60 °C jusqu'à totale dissolution de l'AU. Le méthanol a ensuite été évaporé dans un bain marie à 70 °C. Puis, les composés de la phase aqueuse et les tensioactifs ont été pesées (voir précédemment) et ajoutés. Les trois cycles de chauffage-refroidissement et l'ajout final d'eau désionisée ont été reproduits. Les suspensions de NCLs (concentration finale de 300 mg/mL) en présence d'AU (concentration finale de 5,96 mg/mL) ont été stockées à 4 °C, et ont été filtrées ou non (filtre de 0,45 µm) avant utilisation. Six formulations indépendantes ont été réalisées.

4. Formulations des hydrogels de NCLs

Les hydrogels de NCLs ont été préparés suivant le même processus d'inversion de phases décrit précédemment et retrouvé dans la littérature [22]. Brièvement, la phase huile a tout d'abord été préparée : 309,7 mg de Lab, 83,2 mg de Span 80, 15,5 mg de CytC16 et 1,4 mL d'acétone ont été pesés et mis sous agitation (barreau aimanté à environ 400 tr/min) dans un bain-marie à 60 °C jusqu'à dissolution complète. L'acétone a ensuite été évaporée à la même température et sous agitation. Puis 295,8 mg de Kol (tensioactif), 18 mg de NaCl, et 266,4 mg d'eau déionisée (phase aqueuse) ont été ajoutés à la préparation. Les trois cycles de chauffage-refroidissement ont été réalisés comme décrit pour les suspensions de NCLs et 1mL d'eau déionisée à 4 °C a été ajouté à environ 55 °C lors du dernier refroidissement, ce qui a entraîné la formation des NCLs en suspensions avant leur association pour former l'hydrogel de NCLs. Des seringues ont été remplies avec les suspensions de NCLs (concentration finale de 300 mg/mL) puis stockées à 4 °C jusqu'à utilisation. La forme hydrogel de NCLs (concentration finale de 300 mg/mL) a été considérée comme achevée après un stockage d'une nuit à 4 °C. Six formulations indépendantes ont été réalisées.

Pour formuler les hydrogels de NCLs en présence d'AU, la phase huile a également été préparée en amont : 10,7 mg d'AU, 309,7 mg de Lab, 83,2 mg de Span 80 et 1,2 mL de méthanol ont été pesés et mis sous agitation (barreau aimanté à environ 400 tr/min) dans un bain-marie à 60 °C jusqu'à totale dissolution de l'AU. Le méthanol a ensuite été évaporé dans un bain-marie à 70 °C. Puis, 15,5 mg de CytC16 ont été ajoutés et entièrement solubilisés avec 1,4 mL d'acétone dans un bain-marie à 60 °C toujours sous agitation. L'acétone a ensuite été totalement évaporée à la même température et sous agitation. Puis, les composés de la phase aqueuse et les tensioactifs ont été pesés (voir précédemment) et ajoutés. Les trois cycles de chauffage-refroidissement et l'ajout d'eau déionisée ont été reproduit. Les hydrogels de NCLs (concentration finale de 300 mg/mL) en présence d'AU (concentration finale de 5,7 mg/mL) dans les seringues ont été stockés à 4 °C jusqu'à utilisation. Une nuit a été quand même attendue pour considérer l'état hydrogel de NCLs atteint. Quatre formulations indépendantes ont été réalisées.

5. Mesure de la distribution de tailles des NCLs

La distribution de tailles, *i.e.* le diamètre Z-average (Z-ave) et l'indice de polydispersité (PdI), des NCLs en suspensions, ou des NCLs après dissolution des hydrogels de NCLs, en présence ou non d'AU, a été mesurée à l'aide d'un Malvern Zetasizer® Nano ZS (Malvern Panalytical, Worcestershire, Royaume-Uni). Cet instrument de diffusion de la lumière quasi-élastique est équipé d'un laser hélium-néon de 4-mW, avec une longueur d'onde de 633 nm et un angle de diffusion fixé à 173°. L'ajustement des fonctions d'autocorrélation a été réalisée par ajustement exponentiel (approche des cumulants). Toutes les mesures ont été réalisées à 25 °C sur les suspensions de NCLs à la concentration de 5 mg/mL (dilution d'un facteur 60 avec de l'eau déionisée).

6. Dosage de l'AU par chromatographie

La présence ou non d'AU dans les huiles, dans les suspensions des NCLs ou après dissolution des hydrogels de NCLs a été quantifiée à l'aide d'un appareil Acquity® H-Class Bio UPLC (Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Un volume de 75 µL des diverses formulations a été mélangé avec 1,425 mL de méthanol afin de détruire la structure des NCLs et/ou solubiliser l'AU, puis ces solutions ont été filtrées sur filtre 0,22 µm. La séparation des constituants a été réalisée à l'aide d'une colonne Acquity UPLC® BEH C18 1,7 µm (2,5 x 50 mm) à 35 °C, avec une phase mobile sous condition isocratique : méthanol / eau déionisée 85 / 15 (v/v). Le débit a été maintenu à 0,4 mL/min, le volume d'injection à 10 µL, et la détection a été faite par spectroscopie UV (longueur d'onde : 210 nm). Une courbe de calibration a été obtenue avec de l'AU dissout dans du méthanol (concentrations allant de 100 à 1000 µg/mL) et en quantifiant l'aire sous le pic (coefficient de détermination $R^2 > 0,9900$).

7. Microscopie électronique en transmission

Les hydrogels de NCLs en présence ou non d'AU ont été observés par microscopie électronique en transmission (TEM). Deux μL de chaque formulation ont été déposés sur des grilles en cuivre (maille de 150) et marqués avec 2% d'acétate d'uranyle pendant 1 min, puis les échantillons ont été laissés à sécher à température ambiante avant observation. L'observation a été faite par un microscope électronique 120 kV Jeol JEM-1400 (Jeol, Japan) équipé d'une caméra Gatan SC1000 ORIUS[®] CCD (11 Mégapixels).

8. Propriétés viscoélastiques des hydrogels de NCLs par rhéologie

Les propriétés mécaniques des hydrogels de NCLs, avec ou sans AU, ont été mesurées avec un rhéomètre Kinexus[®] (Malvern Panalytical, Worcestershire, Royaume-Uni), équipé d'une géométrie cône-plan (diamètre de 40 mm et angle de 2°). Dans un premier temps, un balayage en amplitude d'oscillation de déformation de cisaillement (de 0,01% à 100%) a été réalisé à une fréquence d'oscillation constante (1Hz), à 25 °C, de façon à déterminer le régime linéaire des propriétés viscoélastiques. Dans ce régime (amplitude d'oscillation de déformation de cisaillement constante de 0,1%), les modules élastiques (G') et visqueux (G'') caractérisant les propriétés viscoélastiques des matériaux ont été mesurés en fonction de la fréquence d'oscillation (de 0,1 à 10 Hz) à 25 °C.

9. Libération de l'AU à partir des hydrogels de NCLs

La libération de l'AU à partir des hydrogels de NCLs a été évaluée en déposant les hydrogels dans des tubes PCR (VWR, Radnor, PA, États-Unis). Ces tubes PCR contenant le gel sont ensuite retournés dans des microtubes (STARLAB GmbH, Hambourg, Allemagne) contenant du tampon phosphate (NaCl 137 mM ; KCl 2,7 mM ; Na_2HPO_4 10 mM ; KH_2PO_4 1,8 mM ; pH = 7,4) (PBS) filtré (filtre de 0,22 μm). Le volume de PBS a été adapté de manière à avoir le même rapport masse/volume entre l'AU dans l'hydrogel de NCLs et le PBS pour tous les essais indépendants, représentant 1 mg d'AU pour 1,5 mL de PBS. L'assemblage des tubes a été incubé à 37 °C sous agitation (barreau aimanté dans le microtube, à environ 100 tr/min). Les tubes PCR contenant le restant des hydrogels ont ensuite été récupérés après 8h, 1, 2, 3, 4 et 9 jours et ont été conservés à 4 °C jusqu'à l'analyse par UPLC. Les quantités restantes d'AU dans les hydrogels de NCLs dans les tubes PCR ont été analysées par chromatographie suivant la méthode décrite précédemment.

10. Cultures cellulaires

Les lignées cellulaires U-87 MG et T98G (ATCC, Manassas, VA, Etats-Unis) ont été cultivées dans du milieu *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France), supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal (Biowest, Nuaille, France) et de 1% d'antibiotiques (10 unités de pénicilline et 10 mg de streptomycine) (Biowest, Nuaille, France). Les cellules ont été cultivées dans des flacons de 75 cm³ et incubées à 37 °C sous atmosphère humide avec 5% de CO₂.

11. Viabilité cellulaire

La viabilité des lignées cellulaires U-87 MG et T98G a été mesurée par un test à la résazurine (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) qui permet de quantifier l'activité métabolique des cellules vivantes. Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 96 puits à une densité de 4 000 et 5 000 cellules par puit pour les T98G et les U-87 MG, respectivement, et incubées à 37 °C et 5% de CO₂ pendant 24h.

Pour l'étude de la toxicité du TMZ en présence des trois potentiels inhibiteurs, les cellules ont ensuite été traitées pendant 72h avec des concentrations croissantes de TMZ solubilisé dans le milieu de culture (de 0,1 à 3 000 µg/mL) et des concentrations fixes d'inhibiteurs (500 µg/mL pour l'AV solubilisé dans le milieu de culture, 40 µg/mL pour l'AL solubilisé dans le milieu de culture et 6 µg/mL pour l'AU solubilisé dans du méthanol puis dans du milieu de culture (la concentration finale de méthanol a été testée comme non cytotoxique)).

Pour l'étude de la toxicité des NCLs d'AU, les cellules ont ensuite été traitées pendant 48h avec i) des suspensions de NCLs, ii) des suspensions non filtrées de NCLs contenant de l'AU, iii) des suspensions filtrées de NCLs contenant de l'AU, iv) des solutions d'AU non encapsulé (dans un mélange méthanol/milieu de culture, contrôlé comme non cytotoxique), et v) du simple milieu de culture adéquat servant de contrôle négatif. Les divers traitements ont été dilués dans le milieu de culture adéquat pour avoir des concentrations en suspensions de NCLs (seules ou contenant de l'AU) allant de 0,1 mg/mL à 10 mg/mL, correspondant à des concentrations en AU encapsulé allant de 3 µM à 300 µM. Les mêmes concentrations ont été testées pour l'AU non encapsulé.

Après 48h ou 72h, les traitements ont été remplacés par 100 µL de milieu de culture et 20 µL de solution de résazurine (0,15 mg/mL dans de l'eau déionisée) et les cellules ont été incubées à 37 °C sous atmosphère humide avec 5% de CO₂ pendant 3,5h. La fluorescence de chaque puit a été mesurée en utilisant un lecteur de plaque CLARIOstar Plus (BMG Labtech SARL, Chassigny-sur-Marne, France) à des longueurs d'onde d'excitation et d'émission fixées à 560 et 590 nm, respectivement. La viabilité cellulaire (exprimée en pourcentage) a été calculée grâce à l'équation suivante :

$$\text{Viabilité cellulaire (\%)} = \frac{I_{F \text{ cellules traitées}} - I_{F \text{ puit vide}}}{I_{F \text{ cellules non-traitées}} - I_{F \text{ puit vide}}} \times 100$$

avec $I_{F \text{ cellules traitées}}$, $I_{F \text{ cellules non-traitées}}$ et $I_{F \text{ puit vide}}$ les intensités de fluorescence des puits comprenant les cellules ayant subi un traitement (NCLs et/ou AU), des puits comprenant des cellules n'ayant pas subi de traitement (milieu de culture, contrôle négatif), et des puits vides, respectivement.

12. Western Blot

Les lignées cellulaires U-87 MG et T98G ont étéensemencées dans des plaques 6 puits à une densité de 100 000 et 130 000 cellules par puit pour les T98G et les U-87 MG, respectivement, et incubées à 37 °C et 5% de CO₂ pendant 48h. Les cellules ont ensuite été traitées avec des suspensions de NCLs (à une concentration de 0,3 mg/mL) issues de la dissolution des hydrogels de NCLs contenant ou non de l'AU (12,5 µM), ainsi que des solutions d'AU non encapsulé à des concentrations allant de 5 à 15 µM. Les cellules ont été lavées avec du PBS froid et lysées dans un tampon de lyse RIPA + antiprotéases (8,7 mg/mL NaCl, 1% Triton X-100 (v/v), 1 mg/mL SDS 20% (m/v), 5 mg/mL déoxycholate de sodium, 6 mg/mL Tris HCl, anti-protéases). Les lysats ont été centrifugés 10 min à 300 g et à 4 °C, puis la fraction protéique a été récupérée. La concentration protéique a été quantifiée par un test BCA (*BiCinchoninic acid Assay*) (kit Pierce® BCA Protein Assay, Thermo Scientific, Rockford, IL, États-Unis). Les échantillons ont ensuite été préparés de façon à avoir 20 µg de protéines dans tous les échantillons avec du tampon Laemmli et 10% de β-mercaptoéthanol ainsi que du tampon RIPA. Ils ont ensuite été placés dans un bain-marie sec à 95 °C pendant 5 min. Les protéines ont été séparées par électrophorèse sur des gels de polyacrylamide (4-20 %) (Mini-PROTEAN TGX Stain-Free (4-20%), BIO-RAD, Marnes-la-Coquette, France) puis transférées sur des membranes PVDF (TransBlot® Turbo™ Mini-size LF PVDF, BIO-RAD, Marnes-la-Coquette, France). Les membranes ont été saturées 1h à température ambiante avec 5% de BSA dans du TBS/Tween (20 mM de Tris HCl, 150 mM de NaCl, 0,1% de Tween 20 (v/v)). Les membranes ont été incubées une nuit à 4 °C avec les anticorps primaires anti-MGMT dilués dans de la BSA 5% + TBS/Tween (facteur 500), ou anti-β-actine dilués dans de la BSA 5% + TBS/Tween (facteur 5000). Les membranes ont ensuite été lavées puis incubées 1 heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire anti-immunoglobuline-murine dilué dans de la BSA 5% + TBS/Tween (facteur 5000). Après lavage, la détection s'est faite grâce au kit de révélation et à l'imageur ImageQuant™ LAS 4000 (GE Healthcare, Chicago, IL, États-Unis). Puis, la proportion d'expression de la MGMT par rapport à l'expression de la β-actine a été estimée grâce au logiciel ImageJ.

13. Statistiques

Tous les résultats sont exprimés par les paramètres statistiques moyenne et écart-type. Les analyses statistiques de tous les résultats ont été effectuée avec des tests non-paramétriques, tels que Kruskal-Wallis suivi du test Nemenyi-Dunn's post hoc pour les comparaisons de paires, ou Mann-Whitney. La différence entre deux groupes a été définie comme significative lorsque la valeur de p était inférieure à 0,05.

Résultats et discussion

1. Effet de trois inhibiteurs de la MGMT sur la sensibilisation au TMZ

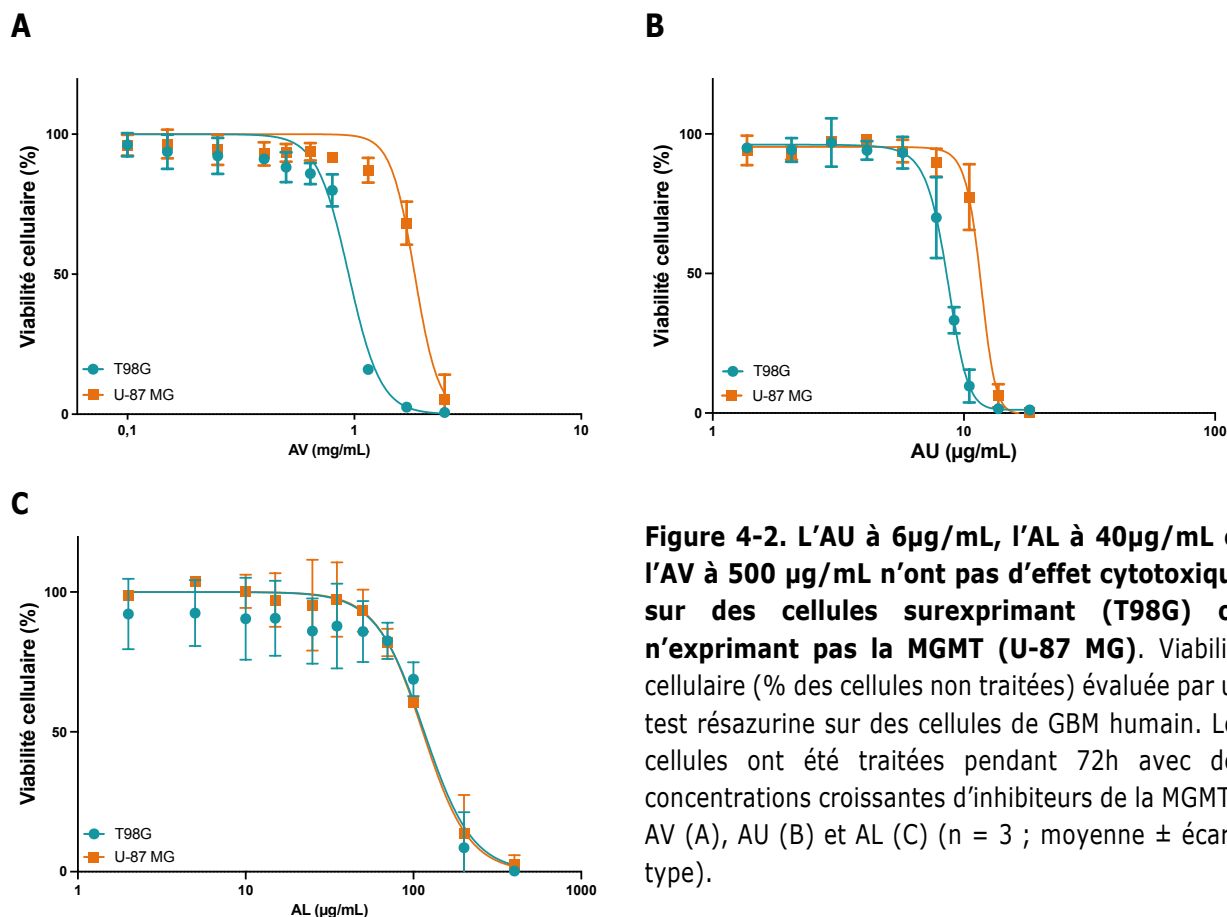


Figure 4-2. L'AU à 6µg/mL, l'AL à 40µg/mL et l'AV à 500 µg/mL n'ont pas d'effet cytotoxique sur des cellules surexprimant (T98G) ou n'exprimant pas la MGMT (U-87 MG). Viabilité cellulaire (% des cellules non traitées) évaluée par un test résazurine sur des cellules de GBM humain. Les cellules ont été traitées pendant 72h avec des concentrations croissantes d'inhibiteurs de la MGMT : AV (A), AU (B) et AL (C) (n = 3 ; moyenne ± écart-type).

La capacité de trois inhibiteurs de la MGMT : l'AU, l'AV et l'AL, à potentialiser les effets du TMZ sur des lignées cellulaires de GBM surexprimant ou non la MGMT a été étudiée par un test de viabilité à la résazurine. Dans un premier temps, l'effet non cytotoxique des 3 inhibiteurs aux concentrations sélectionnées : 6µg/mL pour l'AU, 40µg/mL pour l'AL et 500 µg/mL pour l'AV a été confirmé sur les lignées cellulaires U-87 MG (n'exprimant pas la MGMT) et T98G (surexprimant la MGMT) (figure 4-2). L'AV a été plus cytotoxique sur les cellules de GBM surexprimant la MGMT (T98G) que sur celle ne l'exprimant pas (U-87 MG) avec des concentrations inhibitrices médianes (CI50) de 944 ± 34 µg/mL et 1844 ± 48 µg/mL, respectivement, mais n'était pas cytotoxique à 500µg/mL sur les deux lignées cellulaires (figure 4-2 A). De même, l'AU a été plus cytotoxique sur les cellules T98G que sur les cellules U-87 MG avec des CI50 de $8,6 \pm 0,1$ et $11,7 \pm 0,3$ µg/mL, respectivement, mais n'était pas cytotoxique à 6µg/mL (figure 4-2 B). En revanche, l'AL a eu une cytotoxicité très similaire sur les deux lignées

cellulaires avec des CI50 de $116 \pm 10 \mu\text{g/mL}$ et $114 \pm 6 \mu\text{g/mL}$ pour les T98G et les U87-MG, respectivement. Une concentration de $40\mu\text{g/mL}$ n'était pas toxique sur les deux types cellulaires (figure 4-2 C).

Le TMZ, sans surprise, s'est révélé significativement plus cytotoxique sur les cellules n'exprimant pas la MGMT (U-87 MG) par rapport aux cellules surexprimant la MGMT (T98G) : les CI50 étaient de $421 \pm 44 \mu\text{g/mL}$ et $715 \pm 43 \mu\text{g/mL}$, respectivement ($p=0,009$). Pour des cellules n'exprimant la MGMT, comme attendu, la combinaison de l'AU ou l'AV avec le TMZ n'a pas amélioré la toxicité du TMZ. En effet, les valeurs de CI50 sont comparables entre le TMZ : CI50 = $421 \pm 44 \mu\text{g/mL}$ et les combinaisons AU / TMZ : CI50 = $379 \pm 39 \mu\text{g/mL}$ ou AV / TMZ : CI50 = $443 \pm 31 \mu\text{g/mL}$. En revanche, l'association AL / TMZ fait diminuer la toxicité du TMZ avec une valeur de CI50 à $874 \pm 48 \mu\text{g/mL}$ (figure 4-3A). L'AL semble inhiber l'effet du TMZ sur ces cellules qui n'expriment pas la MGMT. Nous ne souhaitons pas avancer d'hypothèses hasardeuses sur ce phénomène qui n'a jamais été rapporté à notre connaissance.

Pour des cellules de GBM surexprimant la MGMT, seule la combinaison AU / TMZ a augmenté de manière significative la cytotoxicité du TMZ en faisant passer la CI50 de 715 ± 43 à $159 \pm 30 \mu\text{g/mL}$ ($p = 0,002$) (figure 4-3B). Cela confirme les résultats de Zhu *et al.* montrés sur les T98G et une autre lignée cellulaire de GBM surexprimant la MGMT (LN18), mais avec une autre concentration en AU [27]. De manière surprenante, les autres inhibiteurs n'ont pas montré d'amélioration de la toxicité au TMZ sur ces cellules (figure 4-3B). En effet, les valeurs de CI50 des combinaisons AL / TMZ et AV / TMZ sont de 623 ± 47 et $713 \pm 49 \mu\text{g/mL}$, respectivement, comparables à celle du TMZ pour les cellules T98G. Nos résultats sont en contradiction avec ceux de Ryu *et al.* observés sur la même lignée cellulaire (et avec une autre lignée cellulaire de GBM surexprimant la MGMT : U138), avec une concentration en AV similaire [33] et ceux de Göder *et al.* obtenus sur la lignée cellulaire HCT116 : un carcinome colorectal, avec une concentration en AL identique [34]. Cela pourrait être expliqué par des conditions de culture différentes. Tout d'abord, dépendamment des publications, les solutions de TMZ et d'inhibiteurs de la MGMT sont préparées de manières variées [37]. D'autres articles n'indiquent pas non plus comment ces solutions sont préparées [38–41]. Les temps et les séquences d'incubations des inhibiteurs de la MGMT et du TMZ peuvent aussi impacter les résultats obtenus. Tandis que nous avons utilisé une séquence similaire à celle réalisée par Ryu *et al.* avec l'AV [33], celle de Göder *et al.* est plus compliquée à mettre en place : un prétraitement à l'AL de 48 h, puis un traitement au TMZ de 2h, suivi de l'ajout d'AL pendant 96h [34]. On peut s'interroger sur la pertinence d'un tel schéma thérapeutique et sa difficulté à le transposer en préclinique et clinique.

L'objectif global de cette première partie étant de renforcer la sensibilité au TMZ des cellules surexprimant la MGMT, l'AU a été choisi comme inhibiteur de la MGMT pour le reste des expériences.

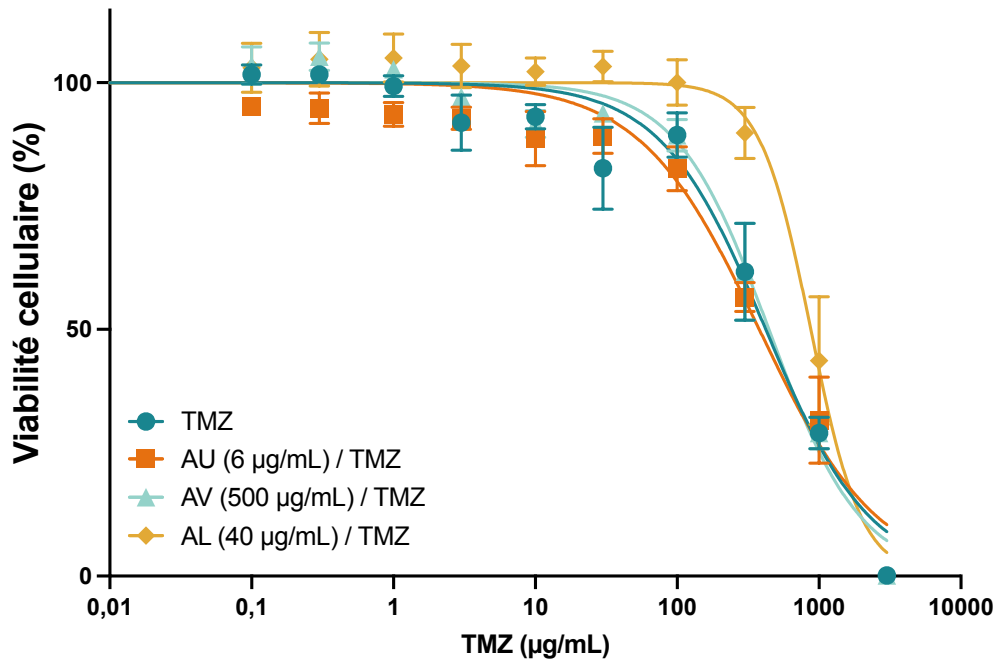
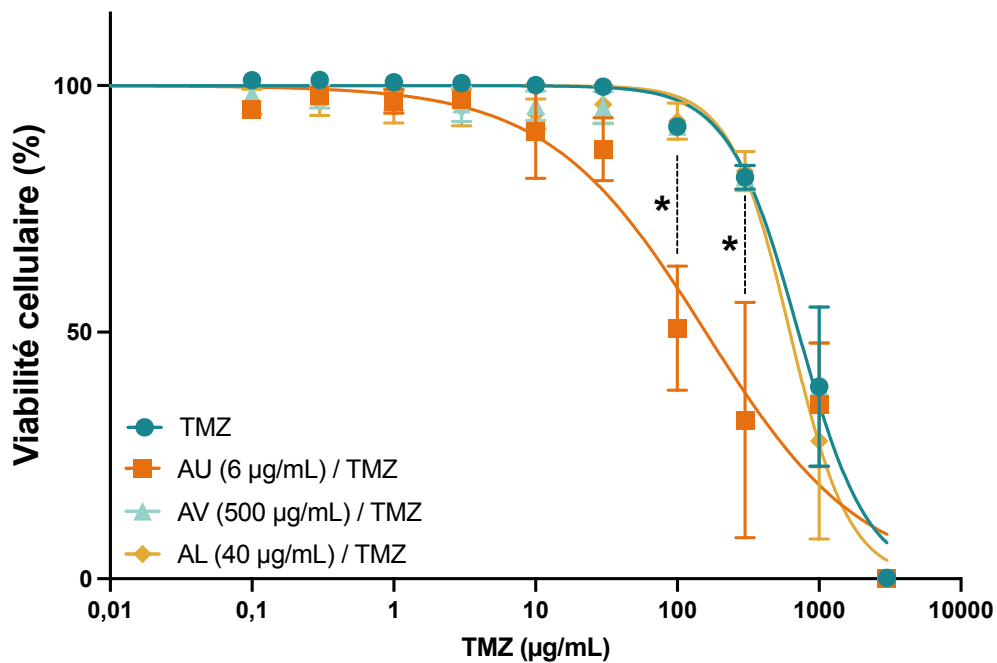
A**B**

Figure 4-3. L'AU augmente la toxicité du TMZ sur des cellules surexprimant la MGMT. Viabilité cellulaire (% des cellules non traitées) évaluée par un test à la résazurine sur des cellules de GBM humain n'exprimant pas (U-87 MG) (A) ou surexprimant la MGMT (T98G) (B). Les cellules ont été traitées pendant 72h avec des concentrations croissantes de TMZ (de 0,1 à 3 000 µg/mL) et avec des concentrations fixes d'inhibiteurs de la MGMT (6µg/mL pour l'AU, 40µg/mL pour l'AL et 500µg/mL pour l'AV (n = 4 ; moyenne ± écart-type ; * p < 0,05).

2. Formulation des suspensions de NCLs pour l'encapsulation de l'AU

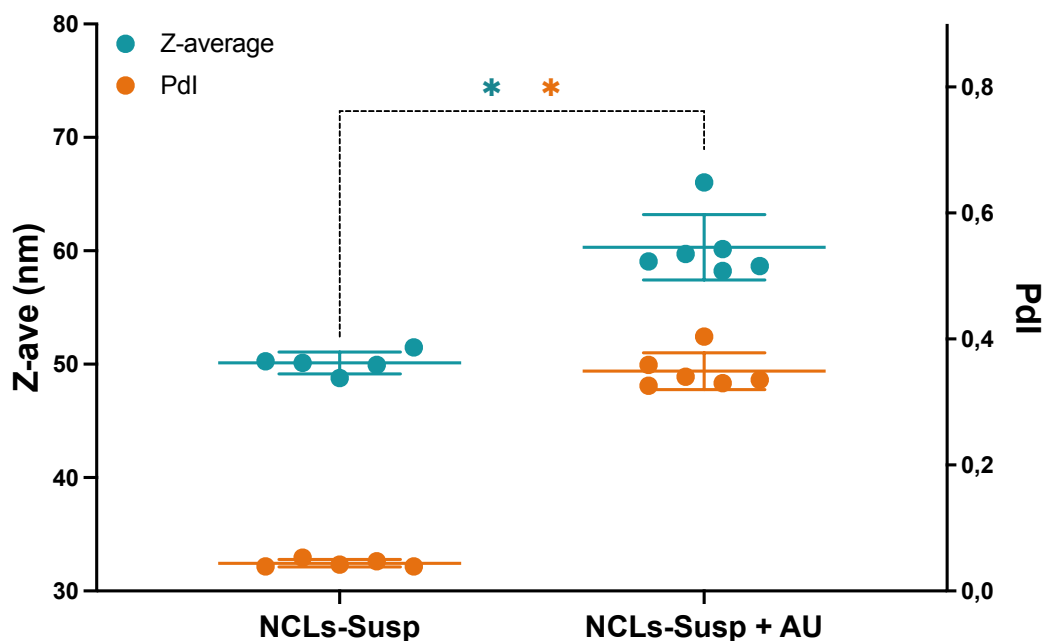


Figure 4-4. L'AU modifie la distribution de taille des NCLs en suspension. Diamètre Z-average (Z-ave) et indice de polydispersité (PdI), des NCLs en suspension, sans (NCLs-Susp) ou en présence d'AU (NCLs-Susp + AU) (n = 5-6 ; moyenne \pm écart-type ; * p < 0,05).

Les NCLs en suspension ont été formulées en utilisant un procédé d'inversion de phases, utilisé en routine au laboratoire MINT - INSERM U1066 / CNRS 6021 [35,36]. Ces nano-objets lipidiques en suspension aqueuse peuvent permettre d'encapsuler des molécules lipophiles afin de pouvoir les administrer *in vivo* [42,43]. C'est cette stratégie de formulation que nous avons employée afin de pouvoir encapsuler l'AU, un inhibiteur de la MGMT. La première étape de ce protocole de formulation consiste à créer une zone d'inversion de phases par des cycles de température, en passant d'une émulsion huile-dans-eau (à basse température) à une eau-dans-huile (à haute température). L'inversion de phases est due à la modification de la balance hydrophile/lipophile du surfactant Kol. La seconde étape consiste en une dilution brutale de cette zone d'inversion de phases avec de l'eau déionisée froide. Le rôle de cet ajout d'eau n'est pas encore totalement clarifié mais cette dilution permet de figer le système et d'obtenir des NCLs en suspension [35,36]. La taille des NCLs obtenues dépend essentiellement des proportions des différents composants. Lorsque la proportion de la phase huile augmente, la taille des NCLs augmente et inversement. Quand la proportion des tensioactifs augmente, la taille des NCLs diminue, et inversement [36,44]. Ce processus de formulation est relativement simple, plutôt sans danger, n'utilise pas de solvant organique et pourrait être appliqué à une production à grande échelle. En effet, Thomas *et al.* ont montré en 2013 que le diamètre moyen, le PdI, le potentiel zêta (définissant l'état de surface) et l'efficacité d'encapsulation de l'ibuprofène dans les NCLs en suspension, formulées en laboratoire ou à une échelle 50 fois plus importante, étaient comparables [45]. Il a également été montré que les NCLs de ces deux lots conservaient une même distribution de tailles et une efficacité d'encapsulation constante sur une période d'un

an. Aucune optimisation n'a été nécessaire pour le développement à grande échelle et le temps de formulation n'a pas été proportionnel à la quantité formulée. Ce processus de formulation par inversion de phases semble alors facilement transposable à une production industrielle.

Dans le cas de nos NCLs en suspension, le diamètre Z-ave moyen observé est d'environ 50 nm avec une valeur moyenne de PdI de 0,04 (figure 4-4). Cette dernière est inférieure à 0,1, ce qui indique que la distribution de tailles des NCLs est monomodale et monodisperse. Il y a une bonne répétabilité de ces paramètres sur des échantillons indépendants (écart-types de 0,96 nm pour le Z-ave et de 0,006 pour le PdI). Ces paramètres de distribution de tailles sont totalement en accord avec ceux obtenues par Gazaille *et al.* sur les mêmes formations [36] En revanche, pour les suspensions de NCLs formulées en présence d'AU, le Z-ave moyen mesuré est significativement plus important : environ 60 nm ($p = 0,004$), avec une valeur moyenne de PdI significativement plus élevée : 0,35 ($p = 0,004$) (figure 4-4). Cette valeur de PdI supérieure à 0,1 indique que les échantillons analysés présentent très certainement plusieurs distributions de tailles ou une plus forte polydispersité. La distribution multimodale n'a pas été observée lors de la mesure mais seul un pic plus large, qui pourrait être dû à la superposition de plusieurs pics, a été obtenu. De tels changements, surtout l'augmentation concernant le PdI, n'ont pas été observés lorsque le paclitaxel ou des ferrocifènes ont été encapsulés dans les NCLs avec des taux d'encapsulation $> 95\%$ [26,43]. Ces résultats pourraient ainsi indiquer une mauvaise encapsulation de l'AU dans les NCLs et les autres objets mesurés pourraient alors être des agrégats d'AU présents dans la suspension autour des NCLs.

Afin de vérifier cette hypothèse, une analyse par chromatographie a été réalisée sur 3 préparations différentes, la suspension de NCLs, la suspension non filtrée de NCLs formulées en présence d'AU et la même suspension filtrée (0,45 μm) de NCLs formulées en présence d'AU. Les résultats montrent qu'aucune quantité d'AU n'est retrouvée après filtration de la suspension de NCLs en présence d'AU : le chromatogramme est quasiment identique à celui correspondant à la suspension de NCLs, c'est-à-dire sans AU (données non-montrées). L'AU n'est plus présent dans la suspension après filtration. Sous forme d'agrégats à l'extérieur des NCLs, il est probablement retenu sur le filtre. L'AU n'est donc pas encapsulé dans les NCLs bien que sa solubilisation dans le Lab semblât correcte avec notre protocole.

3. Essais de solubilité de l'AU dans différentes huiles

Après solubilisation à chaud de l'AU dans le Lab en présence de méthanol, l'évaporation de ce dernier et le refroidissement de la phase huile a entraîné la recristallisation de l'AU, visible à l'œil nu par la solution qui se trouble. Ceci peut expliquer le problème de non-encapsulation dans les NCLs que nous avons obtenu. La solubilisation de l'AU dans le Lab n'étant pas optimale afin de formuler des NCLs encapsulant l'AU, des essais de solubilisation de l'AU dans d'autres huiles ont été menés. Afin d'améliorer la solubilité de l'AU dans une phase lipophile, diverses huiles ont été testées : le Captex 8000, le Miglyol, le Captex 200, l'huile de sésame et l'huile de colza. L'AU a été solubilisé dans ces différentes huiles dans un premier temps avec du méthanol. De la même

manière que pour le Lab, l'évaporation du méthanol a entraîné un trouble de la phase huile et donc probablement une recristallisation de l'AU. Les différents échantillons ont ensuite subi les 3 cycles de températures réalisés lors de la formulation de NCLs afin de mimer ces conditions. Les échantillons ont ensuite été centrifugés et le surnageant a été récupéré de façon à pouvoir quantifier la proportion d'AU solubilisé dans les huiles. En concordance avec les précédentes observations concernant la recristallisation de l'AU, les culots obtenus à la suite de la centrifugation (correspondant à la fraction d'AU non solubilisée) étaient relativement importants et visibles à l'œil nu. Une infime quantité d'AU (< 0,1%) a été retrouvée solubilisée dans les surnageants des échantillons centrifugés et nous pouvons considérer que l'AU n'est soluble dans aucune des huiles testées (données non présentées).

4. Formulation des hydrogels de NCLs piégeant l'AU

Bien que l'AU ne puisse pas être encapsulé dans les NCLs, une forme hydrogel pourrait tout de même permettre sa libération prolongée. Les hydrogels de NCLs sont formulés par la même méthode que décrite précédemment pour les suspensions de NCLs et a déjà été rapportée dans la littérature [22]. Le réseau formé entre les NCLs et permettant cette structure de type hydrogel est dû à des agents de réticulation, qui interagissent par des interactions faibles entre les NCLs [21]. Cette forme totalement nouvelle permet notamment une libération prolongée et locale des principes actifs, encapsulés et transportés lors de la libération des NCLs. Plusieurs agents de réticulation peuvent être utilisés pour formuler ces hydrogels. C'est le cas de la GemC12 cytotoxique qui a été utilisée précédemment dans une stratégie thérapeutique contre le GBM [23,46,47] et plus récemment de la CytC16 non cytotoxique qui pourrait permettre d'explorer d'autres applications en santé nécessitant une application localisée mais sans l'utilisation d'actifs anticancéreux [48,49]. C'est ce dernier agent de réticulation qui a été utilisé pour cette étude, afin d'observer uniquement l'effet de l'AU et non un effet synergique qui pourrait exister entre notre inhibiteur de la MGMT et la GemC12 : un antimétabolite.

Après dissolution des hydrogels de NCLs, formulés en présence ou non d'AU, les distributions de tailles des NCLs ont été évaluées. Dans le cas des hydrogels de NCLs sans AU, le Z-ave moyen observé est d'environ 50 nm avec une valeur moyenne de PdI de 0,17. En ce qui concerne les hydrogels de NCLs formulés en présence d'AU, le Z-ave moyen observé est d'environ 68 nm, avec une valeur moyenne de PdI d'environ 0,28 (figure 4-5). Ces résultats de distributions de tailles en présence ou non d'AU sont concordants avec ceux obtenus pour les suspensions de NCLs, à savoir que la taille moyenne des échantillons est significativement supérieure ($p = 0,009$) quand l'AU est ajouté à la formulation, accompagné d'une augmentation significative ($p = 0,009$) de la valeur de PdI. Cette valeur plus élevée du PdI supporte à nouveau l'idée d'agrégats d'AU au cœur du réseau de NCLs formant l'hydrogel. La valeur de PdI est en revanche plus élevée pour les NCLs en suspension après dissolution de l'hydrogel, comparativement à la suspension de NCLs classique : 0,17 vs 0,04. Ces résultats sont néanmoins identiques à ceux obtenus par Pitorre *et al.*, et expliqués par le fait que la dissolution de l'hydrogel ne permet pas une complète séparation des NCLs [48,49].

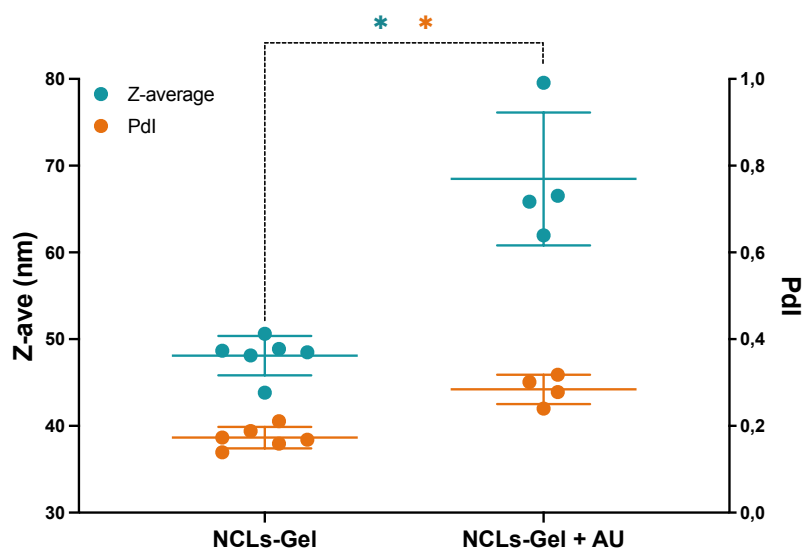


Figure 4-5. L'AU modifie la distribution de taille des NCLs lors de la formulation des hydrogels de NCLs. Diamètre Z-average (Z-ave) et indice de polydispersité (PDI) des NCLs en suspension (5 mg/mL), après dissolution des hydrogels de NCLs sans (NCLs-Gel) ou en présence d'AU (NCLs-Gel+AU) (n = 4-6 ; moyenne \pm écart-type ; * p < 0,05).

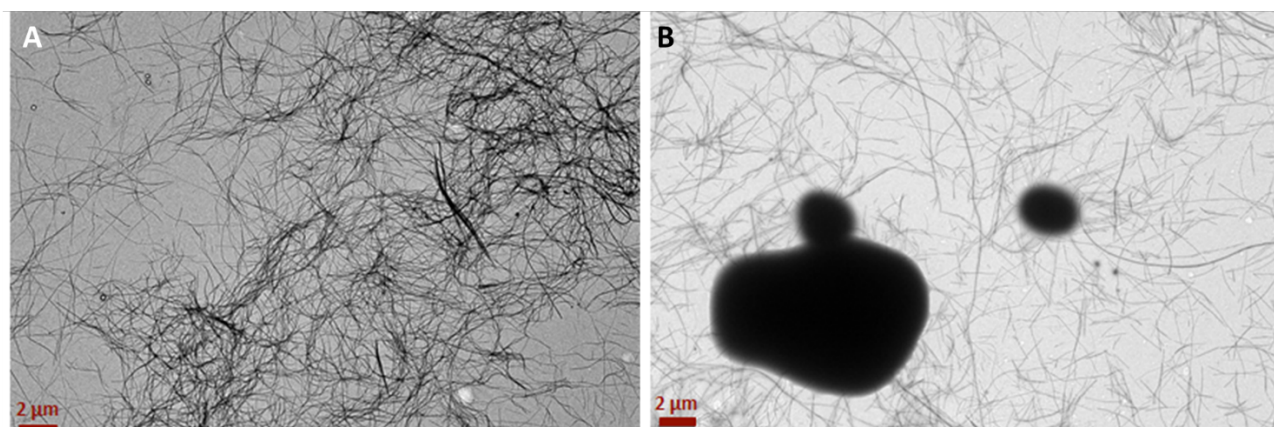


Figure 4-6. L'AU est sous forme d'agrégat au sein des hydrogels de NCLs. Images d'hydrogels de NCLs formulés sans (A) ou en présence d'AU (B), par microscopie électronique en transmission. Les hydrogels de NCLs ont été dilués à une concentration de 50 mg/mL en NCLs, correspondant à une concentration en AU de 1 mg/mL.

Les hydrogels de NCLs ont été observés par microscopie électronique en transmission de manière à confirmer la présence des agrégats d'AU au sein du réseau de NCLs réticulées. Les images des hydrogels de NCLs sans AU montrent la présence du réseau de réticulation entre les NCLs (figure 4-6A). Cependant, pour les hydrogels de NCLs formulés en présence d'AU, en plus du réseau de réticulation sont observés des agrégats de taille micrométrique (figure 4-6 B). Ces observations semblent confirmer que l'AU serait en réalité plutôt localisé à l'extérieur de NCLs. Ces résultats confirment également ceux obtenus par chromatographie. Cette précipitation de l'AU pourrait être liée à la forte valeur de logP : 7,3 [50] et à sa difficulté à se solubiliser dans l'huile au cœur des NCLs.

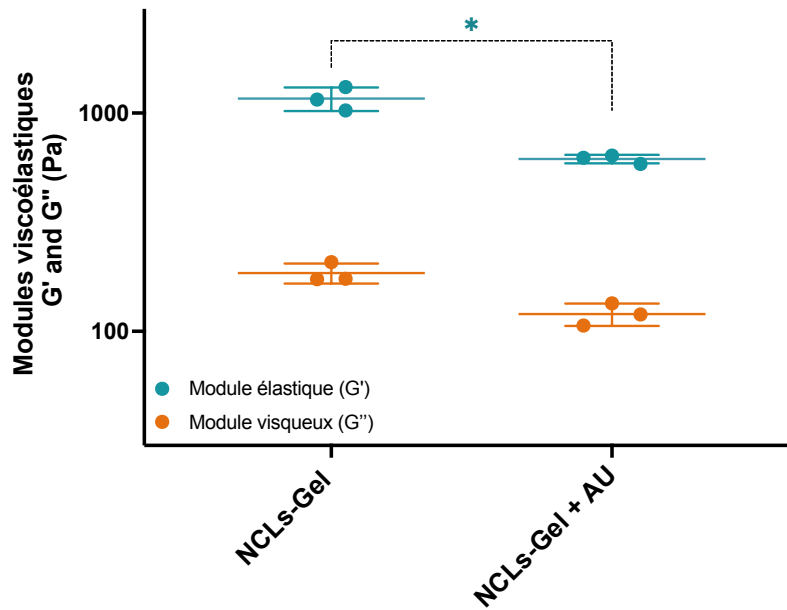


Figure 4-7. L'AU fait diminuer les propriétés mécaniques des hydrogels de NCLs. Modules élastique G' et visqueux G'' des hydrogels de NCLs sans (NCLs-Gel) ou formulés en présence d'AU (NCLs-Gel+AU). Amplitude d'oscillation de déformation de cisaillement de 0,1% et fréquence d'oscillation de 1Hz (n = 3 ; moyenne \pm écart-type ; * p < 0,05).

Afin d'observer si les propriétés structurales des hydrogels de NCLs sont perturbées par la présence des agrégats d'AU, leurs propriétés viscoélastiques ont été mesurées par rhéologie. Dans un premier temps, les échantillons sont analysés par un balayage en amplitude de déformation de cisaillement en oscillation à une fréquence d'oscillation constante afin de déterminer le régime linéaire. Dans le cas des hydrogels de NCLs, il est compris entre 0,01% et 1%, et ne varie pas suivant la présence ou non d'AU (données non montrées). Les propriétés viscoélastiques des hydrogels ont alors été étudiées dans le régime linéaire (amplitude d'oscillation de déformation de cisaillement constante à 0,1%) avec un balayage en fréquence d'oscillation. Des profils de propriétés viscoélastiques typiques des hydrogels ont été retrouvés. Des valeurs constantes pour les modules élastique G' et visqueux G'' ont été obtenues, avec la composante élastique supérieure à la composante visqueuse, indépendamment de la fréquence. Concernant les hydrogels de NCLs sans AU, les valeurs de G' et G'' sont d'environ 1200 ± 140 et 190 ± 20 Pa, respectivement. Les valeurs de ces modules sont légèrement inférieures (significativement ($p < 0,001$) pour les valeurs de G') dans le cas des hydrogels de NCLs en présence d'AU, soient 620 ± 30 et 120 ± 14 Pa, respectivement (figure 4-7). L'hydrogel formulé en présence d'AU présente une valeur de G' ainsi qu'un rapport G'/G'' plus faibles, ce qui indique une texture moins rigide de l'hydrogel. Cette texture moins rigide de l'hydrogel concorderait avec la possibilité que l'AU ne soit en réalité pas encapsulé dans les NCLs mais plutôt sous forme d'agrégats en dehors de ces nanocapsules. Contrairement à ce qui est obtenu pour les matériaux composites de type hydrogel [51], les agrégats pourraient alors empêcher une formation optimale des réticulations entre les NCLs, comme celles obtenues pour l'hydrogel de NCLs sans AU, rendant ainsi l'hydrogel moins rigide.

5. Libération *in vitro* de l'AU à partir de l'hydrogel de NCLs

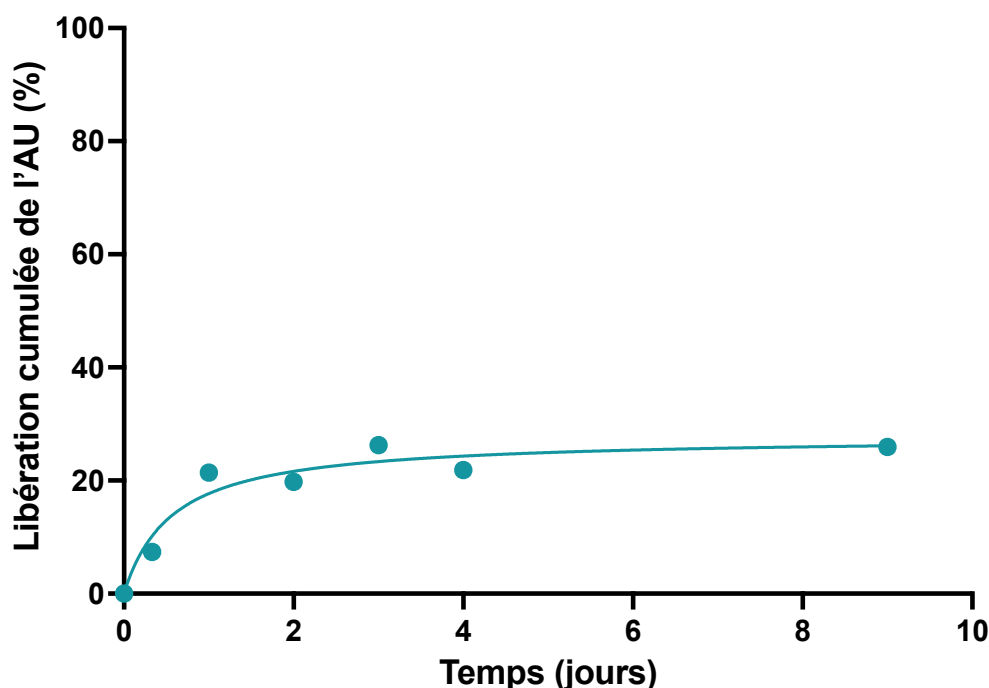


Figure 4-8. La libération de l'UA à partir de l'hydrogel de NCLs est progressive. La libération de l'AU a été mesurée sur une période de 9 jours pendant lesquels les hydrogels étaient placés dans du PBS à 37 °C sous agitation (n=1).

La finalité des hydrogels de NCLs que nous avons formulés ici est qu'ils puissent libérer l'AU au cours du temps lorsqu'ils seront injectés dans la cavité de résection du GBM. Ainsi, la capacité des hydrogels de NCLs à libérer l'AU de manière prolongée a été évaluée. Les hydrogels de NCLs ont été incubés à 37 °C dans du PBS sous agitation puis ils ont été récupérés après différents temps d'incubation. La solubilisation de l'hydrogel dans le PBS (due à la libération des NCLs) a été observée avec une diminution de son volume initial. La quantité d'AU dans les hydrogels non encore dissous a été mesurée par chromatographie et la quantité d'AU libérée en a été déduite. Une libération brutale (*burst effect*) de l'AU est observée dans les premières 24h avec environ 20% d'AU libéré (figure 4-8). Cette première phase de libération pourrait permettre une sensibilisation efficace des cellules résiduelles au TMZ qui surexprimeraient la MGMT. Puis la libération de l'AU est progressive dans les jours suivants avec une libération qui atteint environ 25% au terme du neuvième jour d'incubation. La seconde phase de libération plus progressive pourrait maintenir l'effet de sensibilisation, de manière à permettre l'élimination des cellules résiduelles de GBM lors du protocole de Stupp. Les hydrogels de NCLs sont alors capables de libérer l'AU de manière prolongée au moins sur 9 jours et semblent être compatibles avec une administration dans la cavité de résection. Cette expérience préliminaire sera à répéter afin de s'assurer de l'effet observé. La libération et l'efficacité de l'AU *in vivo* sera très certainement dépendante des flux du liquide interstitiel et du liquide cérébrospinal au sein du système glymphatique [52,53]. De plus, si on compare le profil de libération de l'AU que nous avons obtenu avec celui des NCLs dans les travaux de Pitorre *et al.*, pour un hydrogel de NCLs avec les mêmes propriétés mécaniques, une grande différence est observée. Pitorre *et al.* avait montré qu'au moins 50%

des NCLs étaient libérées après 9 jours, soit une dissolution de l'hydrogel de moitié, alors que seuls 25% d'AU sont libérés. Il est alors possible que les agrégats d'AU affecte aussi la dissolution de l'hydrogel de NCLs. Il sera donc important de montrer la corrélation entre libération de l'AU et la dissolution de l'hydrogel (ou libération des NCLs). Une séquence de libération pourrait s'avérer intéressante en considérant l'encapsulation de plusieurs actifs comme expliqué précédemment.

6. Cytotoxicité des suspensions de NCLs formulées ou non en présence d'AU

La cytotoxicité de l'AU, évaluée à partir de l'activité mitochondriale, a été observée sur les deux lignées cellulaires de GBM n'exprimant pas (U-87 MG) ou surexprimant la MGMT (T98G). Il semble que les cellules T98G soient plus sensibles à l'AU que les cellules U-87 MG, avec des valeurs de CI50 de $18,8 \pm 0,3$ et $25,5 \pm 0,6 \mu\text{M}$ ($p = 0,03$), respectivement (figure 4-9). La valeur de CI50 que nous avons obtenue pour les cellules T98G est proche de celle obtenue par Zhu *et al.* ($15 \mu\text{M}$) [27].

En parallèle, la cytotoxicité de l'AU en présence des NCLs a aussi été évaluée. Concernant les cellules U-87 MG, toutes les courbes de cytotoxicité se superposent quelles que soient les conditions de traitement : solution d'AU non encapsulé et suspensions filtrées ou non-filtrées de NCLs formulées en présence d'AU (figure 4-9A). La viabilité cellulaire reste à 100% du contrôle jusqu'à une concentration de $12,5 \mu\text{M}$ d'AU, correspondant à une concentration en NCLs de $0,3 \text{ mg/mL}$. Les valeurs de CI50 sur cette lignée se situent à $0,78 \pm 0,01 \text{ mg/mL}$ de NCLs soit $32,7 \pm 0,6 \mu\text{M}$ d'AU pour la suspension filtrée de NCLs formulée en présence d'AU, et à $0,81 \pm 0,01 \text{ mg/mL}$ de NCLs soit $33,9 \pm 0,5 \mu\text{M}$ d'AU pour la suspension non-filtrée de NCLs formulée en présence d'AU. La cytotoxicité de la suspension de NCLs sans présence d'AU a aussi été évaluée et le profil de viabilité cellulaire se superpose également aux autres profils ($\text{CI50} = 0,64 \pm 0,02 \text{ mg/mL}$) (figure 4-9A). Ceci explique pourquoi aucune différence de cytotoxicité n'est observée entre les suspensions filtrées ou non-filtrées de NCLs formulées en présence d'AU, soient des formulations sans et avec AU, respectivement. Il semblerait donc que pour cette lignée, avec les suspensions que nous avons formulées (concentrations en NCLs de 300 mg/mL et concentrations en AU de $5,7 \text{ mg/mL}$), la cytotoxicité ne dépende uniquement que des NCLs.

Pour ce qui est des cellules T98G, la viabilité cellulaire est à 100% du contrôle jusqu'à 1 mg/mL de NCLs en suspension sans présence d'AU et la valeur de CI50 se situe à $1,10 \pm 0,01 \text{ mg/mL}$ de NCLs en suspension. Le même profil de cytotoxicité est observé avec la suspension filtrée de NCLs en présence d'AU ($\text{CI50} = 1,23 \pm 0,01 \text{ mg/mL}$), ce qui est cohérent puisque la filtration élimine la totalité de l'AU (figure 4-9B). En revanche, le profil de cytotoxicité de la suspension non-filtrée de NCLs en présence d'AU est aussi superposable, avec une valeur de CI50 qui correspond à une concentration en NCLs de $1,20 \pm 0,01 \text{ mg/mL}$, soit une concentration en AU de $49 \pm 1 \mu\text{M}$. Cette valeur est significativement éloignée de la valeur de CI50 obtenue avec l'AU non-encapsulée ($18,8 \pm 0,3 \mu\text{M}$) ($p < 0,001$) et peut laisser supposer que la forme agrégée de l'AU obtenue après formulation des NCLs par le procédé d'inversion de phases est moins cytotoxique que la forme moléculaire.

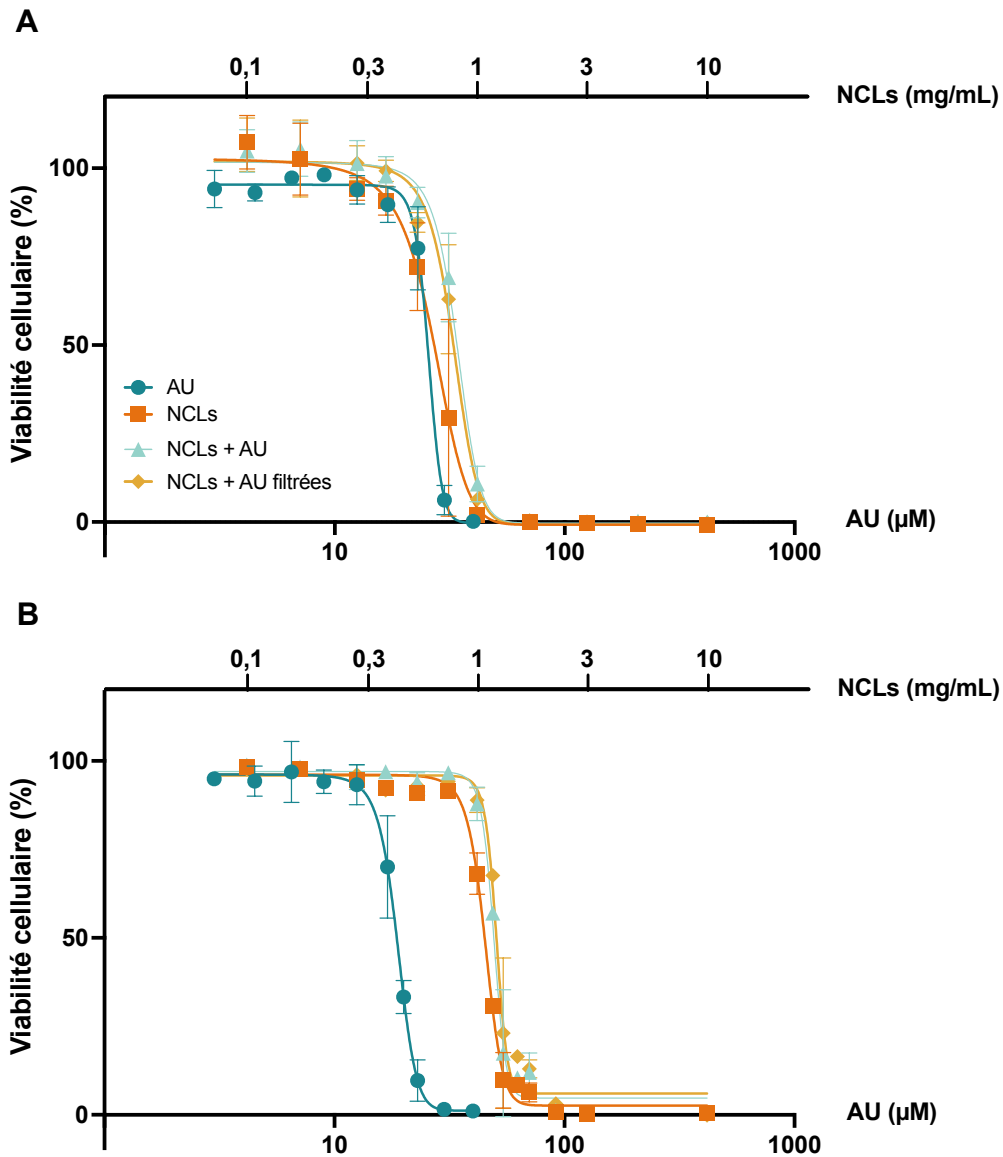


Figure 4-9. La présence des NCLs diminue la cytotoxicité de l'AU pour les cellules de GBM surexprimant la MGMT. Viabilité cellulaire (% des cellules non traitées) évaluée par un test à la résazurine sur des cellules de GBM humain n'exprimant pas (U-87 MG) (A) ou surexprimant la MGMT (T98G) (B). Les cellules ont été traitées pendant 48h avec une suspension de NCLs, une suspension non-filtrée de NCLs en présence d'AU, une suspension filtrée de NCLs en présence d'AU, ou d'AU non-encapsulé, à différentes concentrations (n = 4 ; moyenne ± écart-type).

7. Expression de la MGMT après traitement avec les hydrogels de NCLs contenant ou non de l'AU

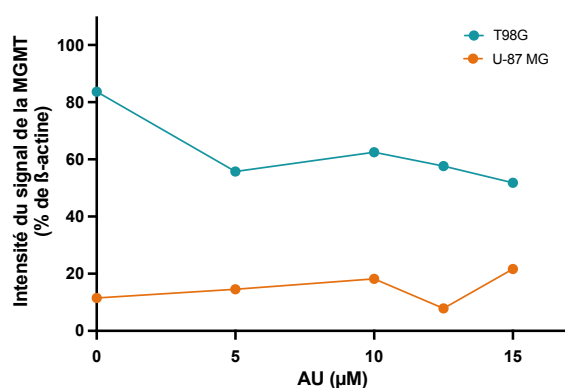
A



B



C



D

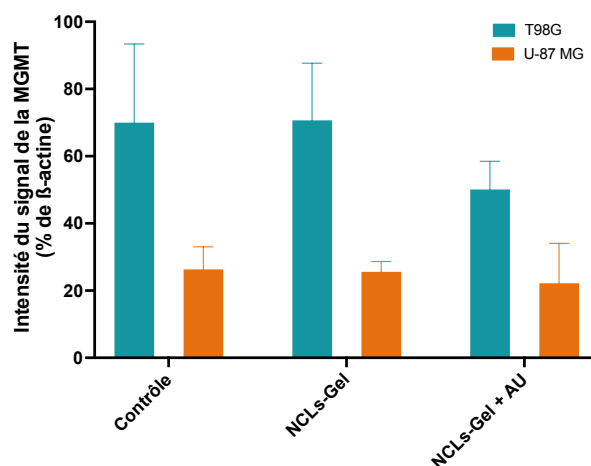


Figure 4-10. L'AU dans les hydrogels de NCLs fait diminuer l'expression de la MGMT pour les cellules de GBM surexprimant la MGMT. Expression de la MGMT évaluée par Western Blot sur les lignées cellulaires (A) U-87 MG ou (B) T98G traitées 48h avec des concentrations en AU de 5 à 15 μM (gauche) ou avec des hydrogels dissous (0,3 mg/mL de NCLs) contenant (NCLs-Gel + AU) ou non de l'AU (12,5 μM) (NCLs-Gel) (droite). Intensité du signal de la MGMT par rapport au signal de la β-actine (en pourcentage) sur les lignées cellulaires U-87 MG et T98G traitées 48h avec (C) des concentrations en AU ou (D) après traitement avec des hydrogels dissous (0,3 mg/mL de NCLs) contenant (NCLs-Gel + AU, 4 puits) ou non de l'AU (12,5 μM) (NCLs-Gel, 4 puits), ou sans traitement (Contrôle, 8 puits) (n = 4-8 ; N = 1 ; moyenne ± écart-type).

L'expression de la MGMT a été évaluée par Western Blot sur les deux lignées cellulaires U-87 MG et T98G, après 48h de traitement avec les hydrogels dissous de NCLs formulés ou non en présence d'AU. La lignée cellulaire U-87 MG est considérée comme n'exprimant pas la MGMT et cette propriété a été confirmée par les résultats observés en figure 4-10A. Quelles que soient les conditions, l'expression de la MGMT est très faible. Des concentrations croissantes d'AU (de 5 à 15 μM) ne semblent pas modifier l'expression de la MGMT étant donné que l'intensité du signal est maintenue entre 10 et 20% (par rapport à la β-actine) (figure 4-10C). De la même

manière, après dissolution, les hydrogels de NCLs contenant ou non de l'AU ne semblent pas modifier l'expression de la MGMT, l'intensité du signal étant constante entre les 3 conditions (environ 20% par rapport à la β -actine) (figure 4-10D).

Au contraire, la lignée cellulaire T98G est considérée comme surexprimant la MGMT, ce qui est aussi confirmé par les résultats observés en figure 4-10B. Un signal est détecté pour la MGMT dans les conditions contrôles (aucun traitement). Des concentrations croissantes d'AU (de 5 à 15 μ M) semblent faire diminuer l'expression de la MGMT, passant d'une intensité du signal d'environ 80% (par rapport à la β -actine) pour le contrôle à environ 50% pour 15 μ M d'AU (figure 4-10C). Ces résultats restent à confirmer par des répétitions indépendantes. Ces observations concordent avec celles faites par Zhu *et al.* où l'AU était capable, à partir de 10 μ M, de réduire l'expression de la MGMT sur des cellules T98G traitées pendant 48h [27].

Après dissolution, les hydrogels de NCLs ne contenant pas d'AU n'ont pas d'effet sur l'expression de la MGMT. En effet, l'intensité du signal est comparable entre la condition contrôle et le traitement avec les hydrogels de NCLs sans AU : environ 70% dans les deux cas. En revanche, les hydrogels de NCLs contenant de l'AU semblent faire diminuer l'expression de la MGMT : l'intensité du signal n'étant plus qu'à environ 50% (par rapport à la β -actine) (figure 4-10D). De plus, il semblerait que l'action de l'AU au sein des hydrogels soit comparable à celle de l'AU libre pour les mêmes concentrations (12,5 μ M), l'intensité du signal étant de 50 et 55% (par rapport à la β -actine), respectivement (figures 4-10C et 4-10D). Il semblerait alors que la forme hydrogel de NCLs et la dissolution de ces hydrogels n'altèrent pas la capacité d'inhibition de la MGMT de l'AU. Ces résultats restent aussi à confirmer par des répétitions indépendantes.

Conclusion

La prise en charge actuelle du GBM consiste en une neurochirurgie pour enlever partiellement la tumeur primaire, suivie d'une radio et d'une chimiothérapie à base de TMZ (protocole de Stupp). Cette dernière peut se retrouver limitée par la présence de la MGMT qui répare les altérations de l'ADN provoquées par l'actif chimiothérapeutique. Ainsi, nous avons initié le développement d'un implant de nouvelle génération : un hydrogel de NCLs, i) sans réseau polymérique afin de diminuer les effets secondaires, ii) chargé en un inhibiteur de la MGMT : l'AU capable de sensibiliser de manière continue les cellules surexprimant la MGMT afin d'améliorer le traitement standard, et iii) adapté à une implantation dans la cavité de résection par le neurochirurgien. Les propriétés mécaniques des hydrogels de NCLs formulés en présence d'AU se sont révélés être optimales à une administration dans la cavité de résection. De plus, *in vitro*, ces hydrogels ont permis une libération prolongée de l'AU sur au moins 9 jours bien que l'AU ne soit pas encapsulé au cœur de NCLs. La forme hydrogel n'a pas altéré la fonction de l'AU puisqu'elle a permis, à des concentrations non cytotoxiques, une inhibition de l'expression de la MGMT dans une lignée cellulaire de GBM humain surexprimant la MGMT : les T98G. Par conséquent, une telle formulation pourrait s'avérer prometteuse dans la restauration de la sensibilité au TMZ chez les patients atteints d'un GBM avec un promoteur non méthylé de la MGMT. L'efficacité de cette stratégie thérapeutique reste à être prouvée *in vivo*, aussi bien en matière d'inhibition prolongée de la MGMT qu'en combinaison avec le TMZ.

Bibliographie

- 1 Louis DN, Perry A, Wesseling P, *et al.* The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro-Oncol* 2021;**23**:1231–51. doi:10.1093/neuonc/noab106
- 2 Ostrom QT, Cioffi G, Waite K, *et al.* CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2014–2018. *Neuro-Oncol* 2021;**23**:iii1–105. doi:10.1093/neuonc/noab200
- 3 Miller KD, Ostrom QT, Kruchko C, *et al.* Brain and other central nervous system tumor statistics, 2021. *CA Cancer J Clin* 2021;**71**:381–406. doi:10.3322/caac.21693
- 4 Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, *et al.* Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N Engl J Med* 2005;**352**:987–96. doi:10.1056/NEJMoa043330
- 5 Feng E, Sui C, Wang T, *et al.* Temozolomide with or without Radiotherapy in Patients with Newly Diagnosed Glioblastoma Multiforme: A Meta-Analysis. *Eur Neurol* 2017;**77**:201–10. doi:10.1159/000455842
- 6 Rapp M, Baernreuther J, Turowski B, *et al.* Recurrence Pattern Analysis of Primary Glioblastoma. *World Neurosurg* 2017;**103**:733–40. doi:10.1016/j.wneu.2017.04.053
- 7 Reddy S, Tatiparti K, Sau S, *et al.* Recent advances in nano delivery systems for blood-brain barrier (BBB) penetration and targeting of brain tumors. *Drug Discov Today* 2021;**26**:1944–52. doi:10.1016/j.drudis.2021.04.008
- 8 Gallego L, Ceña V. Nanoparticle-mediated therapeutic compounds delivery to glioblastoma. *Expert Opin Drug Deliv* 2020;**17**:1541–54. doi:10.1080/17425247.2020.1810015
- 9 Picca A, Guyon D, Santonocito OS, *et al.* Innovating Strategies and Tailored Approaches in Neuro-Oncology. *Cancers* 2022;**14**:1124. doi:10.3390/cancers14051124
- 10 Roberts JW, Powlovich L, Sheybani N, *et al.* Focused ultrasound for the treatment of glioblastoma. *J Neurooncol* 2022;**157**:237–47. doi:10.1007/s11060-022-03974-0
- 11 Alghamdi M, Gumbleton M, Newland B. Local delivery to malignant brain tumors: potential biomaterial-based therapeutic/adjuvant strategies. *Biomater Sci* 2021;**9**:6037–51. doi:10.1039/D1BM00896J
- 12 van Solinge TS, Nieland L, Chiocca EA, *et al.* Advances in local therapy for glioblastoma - taking the fight to the tumour. *Nat Rev Neurol* 2022;**18**:221–36. doi:10.1038/s41582-022-00621-0
- 13 Bastiancich C, Bozzato E, Henley I, *et al.* Does local drug delivery still hold therapeutic promise for brain cancer? A systematic review. *J Controlled Release* 2021;**337**:296–305. doi:10.1016/j.jconrel.2021.07.031
- 14 Wang Y, Bastiancich C, Newland B. Injectable local drug delivery systems for glioblastoma: a systematic review and meta-analysis of progress to date. *Biomater Sci* 2023;**11**:1553–66. doi:10.1039/D2BM01534J
- 15 Ashby LS, Smith KA, Stea B. Gliadel wafer implantation combined with standard radiotherapy and concurrent followed by adjuvant temozolomide for treatment of newly diagnosed high-grade glioma: a systematic literature review. *World J Surg Oncol* 2016;**14**:225. doi:10.1186/s12957-016-0975-5

- 16 Xing W, Shao C, Qi Z, *et al.* The role of Gliadel wafers in the treatment of newly diagnosed GBM: a meta-analysis. *Drug Des Devel Ther* 2015;**9**:3341–8. doi:10.2147/DDDT.S85943
- 17 Bota DA, Desjardins A, Quinn JA, *et al.* Interstitial chemotherapy with biodegradable BCNU (Gliadel) wafers in the treatment of malignant gliomas. *Ther Clin Risk Manag* 2007;**3**:707–15.
- 18 Domb AJ. Polymeric carriers for regional drug therapy. *Mol Med Today* 1995;**1**:134–9. doi:10.1016/s1357-4310(95)80091-3
- 19 Grossman SA, Reinhard C, Colvin OM, *et al.* The intracerebral distribution of BCNU delivered by surgically implanted biodegradable polymers. *J Neurosurg* 1992;**76**:640–7. doi:10.3171/jns.1992.76.4.0640
- 20 Fung LK, Ewend MG, Sills A, *et al.* Pharmacokinetics of interstitial delivery of carmustine, 4-hydroperoxycyclophosphamide, and paclitaxel from a biodegradable polymer implant in the monkey brain. *Cancer Res* 1998;**58**:672–84.
- 21 Moysan E, González-Fernández Y, Lautram N, *et al.* An innovative hydrogel of gemcitabine-loaded lipid nanocapsules: when the drug is a key player of the nanomedicine structure. *Soft Matter* 2014;**10**:1767. doi:10.1039/c3sm52781f
- 22 Pitorre M, Gazaille C, Pham LTT, *et al.* Polymer-free hydrogel made of lipid nanocapsules, as a local drug delivery platform. *Mater Sci Eng C* 2021;**126**:112188. doi:10.1016/j.msec.2021.112188
- 23 Bastiancich C, Bianco J, Vanvarenberg K, *et al.* Injectable nanomedicine hydrogel for local chemotherapy of glioblastoma after surgical resection. *J Controlled Release* 2017;**264**:45–54. doi:10.1016/j.jconrel.2017.08.019
- 24 Gazaille C, Bozzato E, Madadian-Bozorg N, *et al.* Glioblastoma-targeted, local and sustained drug delivery system based on an unconventional lipid nanocapsule hydrogel. *Biomater Adv* 2023;**153**:213549. doi:10.1016/j.bioadv.2023.213549
- 25 Hegi ME, Diserens A-C, Gorlia T, *et al.* MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *N Engl J Med* 2005;**352**:997–1003. doi:10.1056/NEJMoa043331
- 26 Bastiancich C, Bozzato E, Luyten U, *et al.* Drug combination using an injectable nanomedicine hydrogel for glioblastoma treatment. *Int J Pharm* 2019;**559**:220–7. doi:10.1016/j.ijpharm.2019.01.042
- 27 Zhu Z, Du S, Ding F, *et al.* Ursolic acid attenuates temozolomide resistance in glioblastoma cells by downregulating O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) expression. *Am J Transl Res* 2016;**8**:3299–308.
- 28 Kazmi I, Afzal M, Gupta G, *et al.* Antiepileptic Potential of Ursolic Acid Stearoyl Glucoside by GABA Receptor Stimulation. *CNS Neurosci Ther* 2012;**18**:799–800. doi:10.1111/j.1755-5949.2012.00369.x
- 29 Wang Q, Zhao T, Liu Y, *et al.* An evaluation of anti-tumor effect and toxicity of PEGylated ursolic acid liposomes. *J Nanoparticle Res* 2016;**18**:34. doi:10.1007/s11051-016-3339-8
- 30 Qian W, Wang W, Zhang J, *et al.* Antimicrobial and antibiofilm activities of ursolic acid against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *J Antibiot (Tokyo)* Published Online First: 12 February 2020. doi:10.1038/s41429-020-0285-6
- 31 Kunkel SD, Elmore CJ, Bongers KS, *et al.* Ursolic Acid Increases Skeletal Muscle and Brown Fat and Decreases Diet-Induced Obesity, Glucose Intolerance and Fatty Liver Disease. *PLoS ONE* 2012;**7**:e39332. doi:10.1371/journal.pone.0039332

- 32 Woźniak Ł, Skąpska S, Marszałek K. Ursolic Acid—A Pentacyclic Triterpenoid with a Wide Spectrum of Pharmacological Activities. *Molecules* 2015;**20**:20614–41. doi:10.3390/molecules201119721
- 33 Ryu CH, Yoon WS, Park KY, *et al.* Valproic Acid Downregulates the Expression of MGMT and Sensitizes Temozolomide-Resistant Glioma Cells. *J Biomed Biotechnol* 2012;**2012**:1–9. doi:10.1155/2012/987495
- 34 Göder A, Nagel G, Kraus A, *et al.* Lipoic acid inhibits the DNA repair protein O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) and triggers its depletion in colorectal cancer cells with concomitant autophagy induction. *Carcinogenesis* 2015;**36**:817–31. doi:10.1093/carcin/bgv070
- 35 Heurtault B, Saulnier P, Pech B, *et al.* A Novel Phase Inversion-Based Process for the Preparation of Lipid Nanocarriers. *Pharm Res* 2002;**19**:875–80. doi:10.1023/A:1016121319668
- 36 Gazaille C, Sicot M, Akiki M, *et al.* Characterization of Biological Material Adsorption to the Surface of Nanoparticles without a Prior Separation Step: a Case Study of Glioblastoma-Targeting Peptide and Lipid Nanocapsules. *Pharm Res* 2021;**38**:681–91. doi:10.1007/s11095-021-03034-8
- 37 Zhang X. Resveratrol reverses temozolomide resistance by downregulation of MGMT in T98G glioblastoma cells by the NF-κB-dependent pathway. *Oncol Rep* 2012;**27**:2050–6. doi:10.3892/or.2012.1715
- 38 Guo Y, Song T, Liu J, *et al.* Disruption of NF-κB signaling by fluoxetine attenuates MGMT expression in glioma cells. *OncoTargets Ther* 2015;**6**:2199. doi:10.2147/OTT.S85948
- 39 Bi Y, Li H, Yi D, *et al.* Corrigendum to “β-catenin contributes to cordycepin-induced MGMT inhibition and reduction of temozolomide resistance in glioma cells by increasing intracellular reactive oxygen species”. [Cancer Lett. 435 (2018) 66–79]. *Cancer Lett* 2019;**461**:157–8. doi:10.1016/j.canlet.2019.06.006
- 40 You C, Sheng H, Xie C, *et al.* FM19G11 inhibits O⁶-methylguanine DNA-methyltransferase expression under both hypoxic and normoxic conditions. *Cancer Med* 2018;**7**:3292–300. doi:10.1002/cam4.1551
- 41 Xie C-R, You C-G, Zhang N, *et al.* Epigallocatechin Gallate Preferentially Inhibits O⁶-Methylguanine DNA-Methyltransferase Expression in Glioblastoma Cells Rather than in Nontumor Glial Cells. *Nutr Cancer* 2018;**70**:1339–47. doi:10.1080/01635581.2018.1539189
- 42 Arrua EC, Hartwig O, Loretz B, *et al.* Formulation of benzimidazole-lipid nanocapsules: Drug release, permeability, biocompatibility, and stability studies. *Int J Pharm* 2023;**642**:123120. doi:10.1016/j.ijpharm.2023.123120
- 43 Idlas P, Ladaycia A, Némati F, *et al.* Ferrocifen stealth LNCs and conventional chemotherapy: A promising combination against multidrug-resistant ovarian adenocarcinoma. *Int J Pharm* 2022;**626**:122164. doi:10.1016/j.ijpharm.2022.122164
- 44 Heurtault B, Saulnier P, Pech B, *et al.* The influence of lipid nanocapsule composition on their size distribution. *Eur J Pharm Sci* 2003;**18**:55–61. doi:10.1016/S0928-0987(02)00241-5
- 45 Thomas O, Lagarce F. Lipid Nanocapsules: A Nanocarrier Suitable for Scale-Up Process. *J Drug Deliv Sci Technol* 2013;**23**:555–9. doi:10.1016/S1773-2247(13)50084-0
- 46 Bastiancich C, Lemaire L, Bianco J, *et al.* Evaluation of lauroyl-gemcitabine-loaded hydrogel efficacy in glioblastoma rat models. *Nanomed* 2018;**13**:1999–2013. doi:10.2217/nnm-2018-0057
- 47 Bastiancich C, Vanvarenberg K, Ucakar B, *et al.* Lauroyl-gemcitabine-loaded lipid nanocapsule hydrogel for the treatment of glioblastoma. *J Controlled Release* 2016;**225**:283–93. doi:10.1016/j.jconrel.2016.01.054

- 48 Pitorre M, Bastiat G, Béjaud J, *et al.* Nanocapsules comprising modified nucleobases and/or nucleosides, hydrogels and oleogels comprising them and thereof. 2019.
- 49 Pitorre M. *Développement de deux plateformes pharmaceutiques gélifiées : un hydrogel de nanocapsules lipidiques et un organogel avec le même agent de réticulation.* 2017.
- 50 PubChem. Ursolic Acid. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/64945> (accessed 12 Sep 2023).
- 51 Karam J-P, Muscari C, Sindji L, *et al.* Pharmacologically active microcarriers associated with thermosensitive hydrogel as a growth factor releasing biomimetic 3D scaffold for cardiac tissue-engineering. *J Control Release Off J Control Release Soc* 2014;**192**:82–94. doi:10.1016/j.jconrel.2014.06.052
- 52 Iliff JJ, Wang M, Liao Y, *et al.* A Paravascular Pathway Facilitates CSF Flow Through the Brain Parenchyma and the Clearance of Interstitial Solutes, Including Amyloid. *Sci Transl Med* 2012;**4**:147ra111-147ra111. doi:10.1126/scitranslmed.3003748
- 53 Benveniste H, Liu X, Koundal S, *et al.* The Glymphatic System and Waste Clearance with Brain Aging: A Review. *Gerontology* 2019;**65**:106–19. doi:10.1159/000490349

Chapitre 5

Nanoprécipités d'acide ursolique pour la sensibilisation des cellules de glioblastome résistantes au témozolomide

Table des matières

INTRODUCTION	127
MATERIELS ET METHODES	131
1. Matériels	131
2. Formulation des nanoprécipités d'AU	131
3. Mesure de la distribution de tailles des AU-NPs	132
4. Chromatographie	132
5. Diffraction des rayons X.....	132
6. Mesure du rapport d'efficacité de FRET	133
7. Cryomicroscopie électronique en transmission	133
8. Culture cellulaire.....	133
9. Internalisation des nanoprécipités dans des cellules T98G	134
10. Cytométrie en flux	134
11. Viabilité cellulaire	134
12. Western Blots	135
13. Statistiques.....	136
RESULTATS ET DISCUSSION	137
1. Formulation et caractérisation des nanoprécipités d'AU.....	137
2. Influence du pH sur les formulations de nanoprécipités d'AU	141
3. Suivi des AU-NPs et de leur intégrité en utilisant un signal FRET	144
148	
4. Toxicité des AU-NPs et potentialisation de l'effet du TMZ.....	149
CONCLUSION	152
BIBLIOGRAPHIE	153

Introduction

Le glioblastome (GBM) est la forme la plus agressive et mortelle des tumeurs cérébrales primaires chez l'adulte. Caractérisé par une croissance rapide et invasive, ainsi qu'une résistance aux traitements conventionnels, le GBM pose un défi majeur pour les professionnels de santé et en fait l'une des affections les plus redoutables en neuro-oncologie [1]. Le GBM est classé dans la catégorie des gliomes de grade IV selon la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) [2]. Il affecte principalement les cellules gliales, qui jouent un rôle essentiel dans le soutien et la protection des neurones du système nerveux central. Les patients atteints de GBM ont un pronostic sombre, avec une médiane de survie d'environ 15 mois, malgré les progrès réalisés dans les traitements tels que la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie [3].

Les recherches sur les origines du GBM et ses mécanismes de développement ont considérablement progressé ces dernières années. Plusieurs facteurs de risque ont été identifiés, notamment l'exposition aux radiations ionisantes et certains facteurs génétiques, tels que les mutations du gène IDH1 [4]. Des études ont également mis en évidence le rôle potentiel de l'inflammation chronique et du stress oxydatif dans l'initiation et la progression du GBM [1].

Dans cette quête de nouvelles approches thérapeutiques, l'acide ursolique (AU) a suscité un intérêt croissant en raison de ses propriétés potentiellement bénéfiques contre le GBM. L'AU est un triterpène pentacyclique naturel présent dans de nombreux fruits et plantes tels que le romarin ou dans la peau des pommes, et il est connu pour ses effets anti-inflammatoires, antioxydants et anticancéreux [5].

D'autres études menées à la fois *in vitro* et *in vivo* ont mis en évidence les capacités de l'AU à combattre les stimuli inflammatoires, qu'ils soient d'origine endogène ou exogène, et à exercer des effets anti-inflammatoires bénéfiques. Ces effets anti-inflammatoires sont principalement le résultat de mécanismes incluant la réduction de la libération d'histamine dans les mastocytes, la suppression des activités de la lipoxigénase, de la cyclooxygénase et de la phospholipase, ainsi que la diminution de la production d'oxyde nitrique et d'espèces réactives de l'oxygène. L'AU bloque également l'activation des voies de signalisation réduisant l'expression de facteurs inflammatoires et inhibe les activités de l'élastase et du complément [6].

Saravanan *et al.* ont étudié l'effet de l'AU comme puissant antioxydant sur le stress oxydatif dans le cœur de rats soumis à une administration chronique d'éthanol [7]. L'administration prolongée d'éthanol a entraîné des lésions tissulaires, se traduisant par une augmentation des taux sériques de lactate déshydrogénase et de créatine phosphokinase. En outre, elle a induit un stress oxydatif dans le cœur, caractérisé par une augmentation du processus de peroxydation lipidique et une diminution de la capacité antioxydante du cœur. L'administration d'AU à une dose de 20 mg/kg/jour a permis de rétablir efficacement l'activité des enzymes. De plus, elle a régulé le stress oxydatif en réduisant les produits de peroxydation lipidique, en augmentant l'activité des enzymes antiradicalaires, ainsi qu'en augmentant les niveaux d'antioxydants non enzymatiques tels que le glutathion réduit, l'acide ascorbique et l'alpha-tocophérol. Ainsi, l'AU peut agir comme un agent protecteur contre les

anomalies cardiaques induites par l'éthanol en réduisant la peroxydation lipidique et en renforçant la capacité antioxydante du cœur.

Par ailleurs, des recherches ont également mis en évidence les propriétés anticancéreuses de l'AU, démontrant son potentiel inhibiteur de la prolifération tumorale, de l'invasion et de la métastase dans divers types de cancer, y compris le GBM [5,8]. Une étude réalisée par Yeh *et al.* a exploré les effets de l'AU sur les métastases dans le cancer du sein [9]. Les résultats ont mis en évidence que l'AU exerce une influence inhibitrice, dépendante de la dose et du temps, sur la migration et l'invasion des cellules de cancer du sein (lignée cellulaire MDAMB231), connues pour leur haut potentiel métastatique. Cette action bénéfique a été observée à des concentrations non-toxiques. L'étude de son mécanisme d'action a montré que l'AU réduisait les activités de certaines enzymes (MMP-2 et u-PA) impliquées dans le processus métastatique. Ceci est associé à une augmentation de l'expression d'inhibiteurs naturels de ces enzymes, qui jouent un rôle essentiel dans la régulation de la propagation des cellules cancéreuses. Au niveau moléculaire, l'AU agit en supprimant la phosphorylation de certaines protéines clés (JNK, Akt et mTOR) sans en affecter d'autres (ERK et p38). De plus, il module la présence de protéines spécifiques (NFκB, p65, c-Jun et c-Fos) dans le noyau des cellules MDAMB231, ce qui influe sur leur potentiel métastatique. L'AU a également permis de réguler négativement plusieurs protéines impliquées dans la signalisation cellulaire et la croissance tumorale (Rho-like GTPases, GRB2, Ras et VEGF). Ces résultats prometteurs suggèrent que l'AU pourrait être un candidat potentiel en tant qu'agent préventif contre les métastases dans le cancer du sein puisque son mécanisme d'action complexe implique la régulation de différentes protéines et enzymes critiques liées à la progression des cellules cancéreuses métastatiques.

En ce qui concerne les maladies métaboliques, l'AU présente également un grand potentiel. Des recherches menées par Ramírez-Rodríguez *et al.* ont montré qu'il améliore la sensibilité à l'insuline, ce qui en fait un candidat prometteur pour le traitement des maladies métaboliques [10]. L'administration d'AU lors d'une étude clinique sur des patients atteints d'un syndrome métabolique a entraîné une amélioration du syndrome métabolique chez 50 % des patients en réduisant le poids corporel, l'Indice de Masse Corporelle, le tour de taille et la glycémie à jeun, tout en augmentant la sensibilité à l'insuline.

Nous allons nous intéresser dans ce chapitre à une autre propriété de l'AU : sa capacité à inhiber la 6-O-méthylguanine-ADN-méthyltransférase (MGMT), une protéine impliquée dans la résistance des cellules cancéreuses aux agents alkylants, comme déjà développé dans le chapitre 3. En effet, Zhu *et al.* ont découvert que l'AU inhibait la prolifération des cellules de GBM surexprimant la MGMT. Les expériences ont été menées sur les lignées cellulaires LN18 et T98G, toutes deux surexprimant la MGMT, montrant que l'AU a réduit la viabilité cellulaire et la formation de colonies de manière dose-dépendante. De plus, l'AU a diminué l'expression protéique de la MGMT dans ces cellules en agissant potentiellement sur la voie STAT3, renforçant ainsi l'effet du témozolomide (TMZ). La combinaison AU / TMZ a réduit la viabilité cellulaire *in vitro* et diminué significativement la taille des tumeurs dans un modèle murin de GBM sous-cutané (lignée cellulaire LN18) par rapport aux monothérapies [11]. Malgré ses nombreux bienfaits potentiels pour la santé vu précédemment, améliorer la biodisponibilité de l'AU reste un défi à surmonter. La faible solubilité de l'AU limite son absorption intestinale et sa distribution tissulaire. Ainsi, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour développer des

formulations améliorées qui optimisent la biodisponibilité de cet agent thérapeutique en clinique [12]. Une stratégie couramment envisagée pour de tels actifs est la vectorisation et notamment la nanovectorisation [13]. Néanmoins, comme vu dans le chapitre 4, il n'est pas toujours évident de concevoir une formulation de type nanoparticule, capable d'encapsuler un actif spécifique. En effet, les nanocapsules lipidiques couramment utilisées au laboratoire MINT – INSERM U1066 / CNRS 6021 sont capables d'encapsuler différents actifs : paclitaxel [14], ferrocifènes [15], sorafénib [16], par exemple, avec des bons taux d'encapsulation, sans modification majeure de la formulation, mais ne permettent pas d'encapsuler l'AU. Ainsi, une autre formulation doit être envisagée.

Les nanoprecipités, qui sont également des nanoparticules, ont attiré un intérêt croissant dans de nombreux domaines tels l'électronique, la catalyse, la chimie, mais également la médecine, en raison de leur potentiel prometteur dans ces diverses applications. En effet, environ 70% des actifs pharmaceutiques sont classifiés comme ayant une faible solubilité et les formes solides telles que les nanoprecipités, et notamment les nanocristaux, présentent dans la plupart des cas des solubilités améliorées et des vitesses de dissolution plus rapides, ce qui améliorerait leur biodisponibilité [17,18]. De plus, ces nanosystèmes, dont la taille est contrôlable, ont d'autres nombreux avantages tels que le fait qu'ils soient formulés avec peu d'excipients ce qui permet de limiter les possibles effets indésirables. Le rendement est en général élevé et peut même atteindre 100% [17,18]. Plusieurs méthodes sont disponibles pour formuler des nano-objets et ces méthodes peuvent être définies par deux grandes catégories : les méthodes *top-down* et les méthodes *bottom-up*. En ce qui concerne les méthodes *top-down*, les particules sont d'abord formulées à des tailles de l'ordre du micromètre puis sont réduites à la taille nanométrique par des méthodes telles que le broyage ou l'homogénéisation à haute pression. Pour les méthodes dites *bottom-up*, les particules sont formées à partir d'une solution [17]. C'est le cas notamment de la méthode de précipitation par effet antisolvant, qui s'avère très efficace et qui est une approche largement utilisée. L'actif thérapeutique est d'abord dissous dans un solvant, puis est ajouté avec un antisolvant de l'actif thérapeutique, provoquant ainsi une forte sursaturation qui entraîne la précipitation [19,20]. Le processus de précipitation comprend la nucléation, la croissance des particules et l'agglomération [20–22]. La sursaturation joue un rôle clé dans chaque étape, et en ajustant les paramètres, on peut obtenir des particules de la taille souhaitée. Un séchage immédiat par pulvérisation, évaporation du solvant ou lyophilisation peut assurer une stabilisation prolongée des nanoparticules formées [20,23]. Le paclitaxel (PTX), l'un des agents antitumoraux les plus couramment utilisés, présente une caractéristique notable : sa faible solubilité en phase aqueuse, inférieure à 0,1 µg/ml, limitant ainsi considérablement son utilisation en clinique. Pour résoudre ce problème, Sharma *et al.* ont mis au point des nanocristaux de paclitaxel (PTX-NCs) en utilisant un homogénéisateur haute pression. Les résultats des tests *in vitro* ont révélé que la valeur de la concentration inhibitrice médiane (CI50) des PTX-NCs était inférieure ($7,41 \pm 0,96$ nM et $4,82 \pm 0,32$ nM) à celle de la solution de PTX ($12,17 \pm 1,36$ nM et $7,02 \pm 1,27$ nM) dans des cellules de cancer du sein : lignées cellulaires MCF7 et MDA-MB, respectivement. Par ailleurs, les études pharmacocinétiques par voie orale ont montré que l'aire sous la courbe des PTX-NCs était environ 9 à 10 fois supérieure à celle des cristaux de PTX de taille supérieure (n'ayant pas subi d'homogénéisation à haute pression) [24]. Martin *et al.* ont également proposé des nanocristaux d'étoposide dans le cadre du traitement du carcinome colorectal. Les nanocristaux d'étoposide ont été formulés par une méthode de précipitation par effet antisolvant. Les résultats *in vivo* ont permis de déterminer que les nanocristaux étaient plus efficaces que Toposar qui est la forme commercialisée de l'étoposide. La concentration plasmatique était plus importante pour les nanocristaux

($58,2 \pm 1,9$ $\mu\text{g/mL}$) par rapport au Toposar ($37,2 \pm 1,1$ $\mu\text{g/mL}$) et la médiane de survie est passée de 22 à 29 jours pour des souris portant des tumeurs sous-cutanées (lignée cellulaire CT26) [25]. Ce processus de formulation a été appliqué à plusieurs médicaments tels que le béclométhasone dipropionate [26], le budésonide [27], la griséofulvine [28], le kétoprofène [29] ou le vemurafénib (Zelboraf[®], F. Hoffmann-La Roche SA), qui est commercialisé depuis 2017 dans le cadre du traitement contre le mélanome [18].

Nous avons décidé d'explorer la possibilité de formuler des nanoprecipités d'AU. Différentes conditions de formulations ont été explorées : l'effet de la masse d'AU dans le solvant, le volume de la phase utilisée pour l'effet antisolvant, ainsi que l'effet du pH de cette phase. Ces nanoprecipités ont été caractérisés pour vérifier leur distribution de tailles, leur état de surface, leur taux de nanoprecipitation en AU et leur cristallinité, afin d'optimiser le procédé de formulation. Par la suite, une méthode basée sur le transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET) a été mise au point afin de suivre l'interaction des nano-objets avec des cellules pour observer leur internalisation et leur intégrité *in cellulo* par microscopie confocale et cytométrie de flux. La capacité d'inhibition de la MGMT par ces nano-objets a ensuite été investiguée, et comparée à celle obtenue avec l'AU non formulé. Finalement, les capacités de sensibilisation des cellules de GBM résistantes au TMZ ont été explorées.

Matériels et méthodes

1. Matériels

L'acide ursolique (AU), le chlorure de potassium (KCl), le chlorure de sodium (NaCl), l'hydrogénophosphate de sodium (Na_2HPO_4), la dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4), le déoxycholate de sodium, le Triton X-100, l'albumine de sérum bovin (BSA), l'anticorps monoclonal anti- β -actine murin (A5316-2ML), le β -mercaptoéthanol et les comprimés d'inhibiteurs de protéases cOmplete™ Mini ont été fournis par Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Le chlorure de Tris(hydroxyméthyl)méthylammonium (Tris HCl) a été fourni par EUROMEDEX (Souffelweyersheim, France). L'anticorps murin anti-MGMT clone MT3.1 (MAB16200) et l'anticorps caprin anti-immunoglobuline-murine conjugué à la peroxydase (AP124P) ont été fournis par Merck Millipore (Darmstadt, Allemagne). Le kit de révélation SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate a été acheté chez Thermo Scientific (Rockford, IL, États-Unis). Le marqueur de poids moléculaire Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards, le tampon de transfert Trans-Blot Turbo 5x, le tampon de migration 10x Tris/Glycine/SDS ont été commandés chez BIO-RAD (Marnes-la-Coquette, France). Le Tween®20 a été obtenu auprès de PROLABO (Paris, France). Le tampon Laemmli a été fourni par Alfa Aesar (Kandel, Allemagne). L'eau déionisée a été obtenue à partir d'un système Milli-Q plus (Millipore, Paris, France). Le méthanol, l'acide trifluoroacétique, le perchlorate de 1,1'-dioctadécyl-3,3,3',3'-tétraméthylindocarboxycyanine (DiI) et le 4-chlorobenzenesulfonate 1,1'-dioctadécyl-3,3,3',3'-tétraméthylindodicarboxycyanine (DiD) ont été fournis par Fisher Scientific (Loughborough, Royaume-Uni).

2. Formulation des nanoprecipités d'AU

L'AU a été formulé sous forme de nanoprecipités par une méthode de précipitation par effet antisolvant. Brièvement, différentes quantités : 2,5, 5, 7,5 ou 10 mg d'AU ont été dissoutes dans 1,5 mL de méthanol. Cette phase organique est ensuite ajoutée goutte à goutte dans un volume d'eau (10 ou 20 mL) sous agitation constante (barreau aimanté à environ 600 tr/min), dont le pH a pu être ajusté avec des solutions concentrées de NaOH ou HCl. Le méthanol est ensuite évaporé en utilisant un évaporateur rotatif pour obtenir la suspension de nanoprecipités d'AU (AU-NPs). Des nanoprecipités marqués par des molécules fluorescentes ont aussi été formulés suivant le même principe, en ajoutant simplement du DiI, du DiD ou les deux à 1% (m/m_{AU}) dans la phase organique de manière à obtenir des nanoprecipités marqués au DiI (AU-NPs-DiI), des nanoprecipités marqués au DiD (AU-NPs-DiD) ou des nanoprecipités capables d'émettre un signal de transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET), c'est-à-dire marqués au DiI et au DiD (AU-NPs-FRET). Les échantillons ont été conservés à 4 °C avant leur utilisation.

3. Mesure de la distribution de tailles des AU-NPs

La distribution de tailles, *i.e.* le diamètre hydrodynamique Z-average (Z-ave) et l'indice de polydispersité (PdI), le *Derived Count Rate* (DCR) et le potentiel zêta (PZ) des AU-NPs en suspension ont été mesurés à l'aide du Zetasizer® Nano ZS (Malvern Panalytical, Worcestershire, Royaume-Uni). Cet instrument de diffusion de la lumière quasi-élastique est équipé d'un laser hélium-néon de 4 mW, avec une longueur d'onde de 633 nm et un angle de diffusion fixé à 173°. L'ajustement des fonctions d'autocorrélation a été réalisée par ajustement exponentiel (approche des cumulants) pour la détermination du Z-ave, du PdI et la mesure du DCR. L'approximation de Smoluchowski a été utilisée pour déterminer la mobilité électrophorétique nécessaire à la détermination du PZ. Toutes les mesures ont été réalisées à 25 °C, sur les suspensions d'AU-NPs non diluées. Concernant les mesures de DCR, elles ont aussi été mesurées sur les suspensions d'AU-NPs mélangées avec du méthanol pour avoir des proportions de méthanol variant entre 0 (pas d'ajout de méthanol) et 80 % (v/v).

4. Chromatographie

La concentration d'AU dans chaque suspension d'AU-NPs a été quantifiée à l'aide d'un appareil Acquity® H-Class Bio UPLC (Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Les suspensions d'AU-NPs ont été diluées dans du méthanol (facteur de dilution 5) pour permettre la solubilisation de l'AU. La séparation des constituants a été réalisée à l'aide d'une colonne Acquity UPLC® BEH C18 1,7 µm (2,5 x 50 mm) à 40 °C, avec une phase mobile sous condition isocratique : méthanol + acide trifluoroacétique 0,1 % (v/v) / eau déionisée + acide trifluoroacétique 0,1 % (v/v) 85 / 15 (v/v). Le débit a été maintenu à 0,3 mL/min, le volume d'injection à 10 µL, et la détection a été faite par spectroscopie UV (longueur d'onde : 210 nm). La colonne a été laissée sous flux continu pendant 1 heure pour sa stabilisation, puis la durée de l'analyse pour chaque échantillon a été fixée à 5 min (avec un cycle de nettoyage après chaque échantillon). La quantification de l'AU a été réalisée à l'aide d'une courbe étalon d'AU dans un mélange eau désionisée / méthanol 20 / 80 (v/v) (concentrations allant de 50 à 500 µg/mL) et en quantifiant l'aire sous le pic (coefficient de détermination $R^2 = 0,9993 \pm 0,0008$, $n = 7$).

5. Diffraction des rayons X

Les données de diffraction de rayons X ont été collectées sur un diffractomètre D8 Bruker (Cu K α , $\lambda = 1,54184 \text{ \AA}$) (Billerica, MA, États-Unis) équipé avec un détecteur linéaire haute-vitesse Vantec. Les poudres ont été insérées dans des supports et pressées avec une lame en verre. Les diffractogrammes ont été obtenus à température ambiante sur une plage de 2θ allant de 5 à 42° avec un pas de 0,0197°.

6. Mesure du rapport d'efficacité de FRET

La déstabilisation des AU-NPs-FRET a été évaluée à l'aide d'un spectrofluoromètre FluoroMax (Horiba, Kyoto, Japon). Les suspensions d'AU-NPs-FRET ont été mélangées avec du méthanol pour avoir des proportions de méthanol variant entre 0 (pas d'ajout de méthanol) à 80 % (v/v). Les spectres d'émission de fluorescence ont été mesurés à température ambiante avec une longueur d'onde d'excitation de 520nm. Le signal FRET induit par la proximité du donneur (DiI) et de l'accepteur (DiD) a été utilisé pour évaluer l'intégrité des AU-NPs-FRET en utilisant le rapport d'efficacité de FRET calculé avec la formule suivante :

$$\text{Rapport d'efficacité de FRET} = \frac{I_{\text{DiD}}}{I_{\text{DiI}} + I_{\text{DiD}}}$$

où I_{DiI} correspond à l'intensité maximale du spectre d'émission du donneur (DiI) (longueur d'onde de 569 nm) et I_{DiD} correspond à l'intensité maximale du spectre d'émission de l'accepteur (DiD) (longueur d'onde de 680 nm).

7. Cryomicroscopie électronique en transmission

La vitrification de l'échantillon d'AU-NPs a été effectuée à l'aide d'un congélateur à piston automatique (EM GP, Leica) sous humidité et température contrôlées [31]. Les échantillons ont été déposés sur des grilles de microscope électronique *glow-discharged*, suivi d'un tamponnage et d'une vitrification par congélation rapide et ont été observés à l'aide d'un microscope électronique de 200 kV (Tecnai G² T20 Sphera, FEI) équipé d'une caméra 4k × 4k CCD (XF416, TVIPS). Les micrographes ont été acquis sous de faibles doses d'électrons en utilisant la caméra en mode *binning* 1 et à un grossissement nominal de 25 000 x.

8. Culture cellulaire

Les lignées cellulaires U-87 MG et T98G (ATCC, Manassas, VA, Etats-Unis) ont été cultivées dans du milieu *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France), supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal (Biowest, Nuaille, France) et de 1% d'antibiotiques (10 unités de pénicilline et 10 mg de streptomycine) (Biowest, Nuaille, France). Les cellules ont été cultivées dans des flacons de 75 cm³ et incubées à 37 °C sous atmosphère humide avec 5% de CO₂.

9. Internalisation des nanoprecipités dans des cellules T98G

Les cellules T98G ont étéensemencées sur des lamelles stérilisées de 13mm de diamètre à l'intérieur des puits d'une plaque 24 puits à une densité de 15 000 cellules par puits. Les cellules ont ensuite été incubées à 37 °C et à 5 % de CO₂ pendant 48 h. Les cellules ont ensuite été traitées avec 3 µg/mL d'AU-NPs contenant du DiI, du DiD ou les deux et incubées pendant 24 h. Les plaques ont ensuite été recueillies, lavées deux fois avec du PBS et incubées avec 4 % de paraformaldéhyde (Electron Microscopy Science, Hatfield, PA, Etats-Unis) pendant 15 min à température ambiante. Les cellules ont été lavées à nouveau avec du PBS et incubées avec 3,33 nM de DAPI pendant 15 min dans l'obscurité à température ambiante. Les lamelles ont ensuite été montées sur des lames à l'aide de ProLong™ Diamond Antifade Mountant (Thermo Scientific, Rockford, Illinois, États-Unis). Les images ont été acquises avec un microscope confocal (Leica TCS SP8 AOBS confocal laser scanning microscope (Leica Microsystems, Allemagne)) équipé d'un objectif HC PL APOCS2 63X/ON 1.4 (immersion dans l'huile). Le signal du DAPI a été détecté entre 430 et 500 nm après une excitation à 360 nm. Le DiI et le FRET ont été excités à 561nm et le DiD à 645 nm. L'émission de fluorescence a été collectée par un détecteur hybride GaAsP (entre 550 et 633nm pour le DiI et entre 660 et 800nm pour le DiD et le FRET). L'acquisition des images a été faite à une fréquence de 400 Hz.

10. Cytométrie en flux

Les cellules T98G ont étéensemencées dans des plaques 6 puits à une densité de 100 000 cellules par puit et incubées à 37 °C et 5% de CO₂ pendant 24h. Les cellules ont ensuite été traitées pendant 3h avec des suspensions d'AU-NPs contenant du DiI, du DiD ou les deux (FRET). Au terme des 3h, les traitements ont été remplacés par du milieu frais et les cellules ont été remises dans l'incubateur pour 0, 48 ou 72h. Les cellules ont ensuite été lavées avec du PBS 1X froid puis ont été trypsinées (trypsin-EDTA 1X (Biowest, France)) pendant 5 min à 37 °C et suspendues à nouveau dans du PBS 1X. Les cellules ont été centrifugées à 150 g pendant 3 min puis à nouveau suspendues dans du PBS 1X froid. Cette étape de lavage a été répétée 3 fois. L'analyse par cytométrie en flux a été effectuée sur un Cytoflex LX (Beckman Coulter, Villepinte, France) avec environ 10 000 cellules analysées par échantillon. Le DiI a été excité à 488nm et collecté avec un filtre 610/20 nm ; le DiD a été excité à 633 nm et collecté avec un filtre 660/10 nm ; et le FRET a été excité à 488 nm et collecté avec un filtre 660/10 nm.

11. Viabilité cellulaire

La viabilité des lignées cellulaires U-87 MG et T98G a été mesurée par un test à la résazurine (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) qui permet de quantifier l'activité métabolique des cellules vivantes. Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 96 puits à une densité de 4 000 et 5 000 cellules par puit pour les T98G et les U-87 MG, respectivement, et incubées à 37 °C et 5% de CO₂ pendant 24h.

Pour l'étude de la toxicité des AU-NPs, les cellules ont ensuite été traitées pendant 72h avec i) des suspensions d'AU-NPs, ii) des solutions d'AU unimoléculaire (dans un mélange méthanol/milieu de culture, contrôlé comme non cytotoxique), et iii) du simple milieu de culture servant de contrôle négatif. Les divers traitements ont été dilués dans le milieu de culture pour avoir des concentrations en AU allant de 1,5 à 20 µg/mL.

Pour l'étude de la toxicité du TMZ en présence d'AU ou d'AU-NPs, les cellules ont ensuite été traitées pendant 72h avec des concentrations croissantes de TMZ solubilisé dans du milieu de culture (de 0,1 à 3 000 µg/mL) et des concentrations fixes (3 µg/mL) i) d'AU-NPs solubilisé dans du milieu de culture ou ii) d'AU solubilisé dans du méthanol et du milieu de culture (la concentration finale de méthanol a été testée comme non cytotoxiques).

Après 72h, les traitements ont été remplacés par 100 µL de milieu de culture et 20 µL de solution de résazurine (0,15 mg/mL dans de l'eau déionisée) et les cellules ont été incubées à 37 °C sous atmosphère humide avec 5% de CO₂ pendant 3,5h. La fluorescence de chaque puit a été mesurée en utilisant un lecteur de plaque CLARIOstar Plus (BMG Labtech SARL, Champigny-sur-Marne, France) à des longueurs d'onde d'excitation et d'émission fixées à 560 et 590 nm, respectivement. La viabilité cellulaire (exprimée en pourcentage) a été calculée grâce à l'équation suivante :

$$\text{Viabilité cellulaire (\%)} = \frac{I_{F \text{ cellules traitées}} - I_{F \text{ puit vide}}}{I_{F \text{ cellules non-traitées}} - I_{F \text{ puit vide}}} \times 100$$

avec $I_{F \text{ cellules traitées}}$, $I_{F \text{ cellules non-traitées}}$ et $I_{F \text{ puit vide}}$ les intensités de fluorescence des puits comprenant les cellules ayant subi un traitement (AU-NPs ou AU et/ou TMZ), des puits comprenant des cellules n'ayant pas subi de traitement (milieu de culture, contrôle négatif), et des puits vides, respectivement.

12. Western Blots

La lignée cellulaire T98G a étéensemencée dans des plaques 6 puits à une densité de 100 000 cellules par puit et incubée à 37 °C et 5% de CO₂ pendant 24h. Les cellules ont ensuite été traitées pendant 72h avec de l'AU ou des suspensions d'AU-NPs (à une concentration de 2 ou 3 µg/mL). Les cellules ont été lavées avec du PBS 1X froid et lysées dans un tampon de lyse RIPA + antiprotéases (8,7 mg/mL NaCl, 1% Triton X-100 (v/v), 1 mg/mL SDS 20% (m/v), 5 mg/mL déoxycholate de sodium, 6 mg/mL Tris HCl, anti-protéase). Les lysats ont été centrifugés 10 min à 300 g à 4 °C et la fraction protéique a été récupérée. La concentration protéique a été quantifiée par un test BCA (*BiCinchoninic acid Assay*) (kit Pierce® BCA Protein Assay, Thermo Scientific, Rockford, IL, États-Unis). Les échantillons ont ensuite été préparés de façon à avoir 20 µg de protéines dans tous les échantillons avec du tampon Laemmli et 10% de β-mercaptoéthanol ainsi que du tampon RIPA. Ils ont ensuite été placés dans un bain-marie sec à 95 °C pendant 5 min. Les protéines ont été séparées par électrophorèse sur

des gels de polyacrylamide (4-20 %) (Mini-PROTEAN TGX Stain-Free (4-20%), BIO-RAD, Marnes-la-Coquette, France) puis transférées sur des membranes PVDF (TransBlot® Turbo™ Mini-size LF PVDF, BIO-RAD, Marnes-la-Coquette, France). Les membranes ont été saturées 1h à température ambiante avec 5% de BSA dans du TBS/Tween (20 mM de Tris HCl, 150 mM de NaCl, 0,1% de Tween 20 (v/v)). Les membranes ont été incubées une nuit à 4 °C avec les anticorps primaires anti-MGMT dilués dans de la BSA 5% + TBS/Tween (facteur 500), ou anti- β -actine dilués (facteur 5000) dans de la BSA 5% + TBS/Tween. Les membranes ont ensuite été lavées puis incubées 1 heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire anti-immunoglobuline-murine dilué (facteur 5000) dans de la BSA 5% + TBS/Tween. Après lavage, la détection s'est faite grâce au kit de révélation et à l'imageur ImageQuant™ LAS 4000 (GE Healthcare, Chicago, IL, États-Unis). Puis, la proportion d'expression de la MGMT par rapport à l'expression de la β -actine a été estimée grâce au logiciel ImageJ.

13. Statistiques

Tous les résultats sont exprimés par les paramètres statistiques moyenne et écart-type. Les analyses statistiques de tous les résultats ont été effectuées avec des tests non-paramétriques, tels que Kruskal-Wallis suivi du test Nemenyi-Dunn's post hoc pour les comparaisons de paires, ou Mann-Whitney. La différence entre deux groupes a été définie comme significative lorsque la valeur de p était inférieure à 0,05.

Résultats et discussion

1. Formulation et caractérisation des nanoprecipités d'AU

La possibilité de formuler l'AU sous la forme de nanoprecipités ou nanocristaux a été investiguée, en utilisant la méthode de cristallisation par effet antisolvant. Brièvement, l'AU : 2,5, 5, 7,5 et 10 mg a été solubilisé dans du méthanol, un solvant de cette molécule, en fixant le volume à 1,5 mL. Le mélange a ensuite été ajouté goutte à goutte dans 10 ou 20 mL d'eau désionisée, servant de phase pour l'effet antisolvant, sous forte agitation. Le choix de ces solvants est évident puisque l'AU est très peu soluble dans l'eau : 0,00059 g/L, d'après *The Human Metabolome Database* (HMDB) (<https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0002395>, consulté le 10 septembre 2023) [32]. De plus, le méthanol est miscible à l'eau. À la suite de l'ajout, un trouble a été observé, caractéristique de nanoparticules en suspension. Puis, le méthanol a été éliminé de la formulation par évaporation, ne modifiant pas l'aspect trouble des formulations. Elles ont été caractérisées par diffusion de la lumière après évaporation du méthanol afin de déterminer la taille des nano-objets en présence. De plus, la quantité finale d'AU dans les formulations a été quantifiée par chromatographie.

Quelle que soit la quantité d'AU utilisée dans les formulations : de 2,5 à 10 mg, les distributions de tailles sont relativement similaires lorsque 10 mL d'eau désionisée ont été utilisés pour l'effet antisolvant (tableau 5-1). En effet, les diamètres hydrodynamiques (Z-ave) sont compris entre 150 et 200 nm, avec un PdI compris entre 0,2 et 0,3. En revanche, lorsque 20 mL d'eau désionisée ont été utilisés pour l'effet antisolvant, le diamètre hydrodynamique des nano-objets est plus important : entre 300 et 550 nm, avec une distribution beaucoup plus hétérogène : valeurs de PdI comprises entre 0,5 et 0,6. Il semble donc que le volume d'eau désionisée utilisée pour l'effet antisolvant influence la taille de nanoprecipités d'AU, tandis que la quantité d'AU utilisée au départ ne semble pas impacter de manière significative les distributions de tailles. Nous avons décidé de continuer uniquement la caractérisation des formulations réalisées avec 10 mL d'eau déionisée, et de vérifier leur comportement *in vitro*.

Tableau 5-1. Formulés dans 10 mL d'eau désionisée utilisée pour l'effet antisolvant, les nanoprecipités d'AU sont les plus homogènes. Distribution de tailles (Z-ave et PdI), PZ et rendement de nanoprecipitation en AU des suspensions de nanoprecipités d'AU formulés avec des masses d'AU variant de 2,5 à 10mg, et 10 ou 20 mL d'eau désionisée utilisée pour l'effet antisolvant (n = 3 ; moyenne ± écart-type).

Masse d'AU (mg)	Volume d'eau désionisée (mL)	Z-ave (nm)	PdI	PZ (mV)	Rendement de nanoprecipitation en AU (%)
2,5	10	175 ± 65	0,30 ± 0,01	-30 ± 2	66 ± 4
5	10	169 ± 10	0,30 ± 0,02	-27 ± 1	72 ± 3
7,5	10	175 ± 5	0,20 ± 0,02	-28 ± 1	71 ± 7
10	10	195 ± 6	0,20 ± 0,01	-45 ± 1	72 ± 7
2,5	20	540 ± 179	0,60 ± 0,08	n.d.	n.d.
5	20	331 ± 33	0,50 ± 0,06	n.d.	n.d.
7,5	20	434 ± 16	0,60 ± 0,04	n.d.	n.d.
10	20	354 ± 47	0,70 ± 0,06	n.d.	n.d.

n.d. : non déterminé

Le PZ est d'environ -28 mV pour les formulations réalisées avec 2,5, 5 ou 7,5 mg d'AU mais est plus négatif pour les formulations contenant 10mg d'AU, soit environ -45 mV (tableau 5-1). De plus, le rendement de nanoprecipitation en AU des formulations, après évaporation du méthanol, a été estimé à 70% environ, quelle que soit la quantité d'AU utilisée dans les formulations (tableau 5-1). L'homogénéité de la distribution de tailles a été confirmée par cryomicroscopie électronique en transmission : la taille de nanoprecipités d'AU a été estimée entre 100 et 200 nm ce qui rejoint les tailles obtenues par diffusion de la lumière (figure 5-1). La stabilité de ces nano-objets a été évaluée sur 30 jours. Alors que les valeurs de Z-ave et PdI ont évolué sur cette période pour les lots formulés avec 2,5 ou 5 mg d'AU, les distributions de tailles de ceux formulés avec 7,5 ou 10 mg d'AU sont restées stables avec des valeurs de Z-ave et de PdI très proches de celles obtenues au premier jour (figure 5-2).

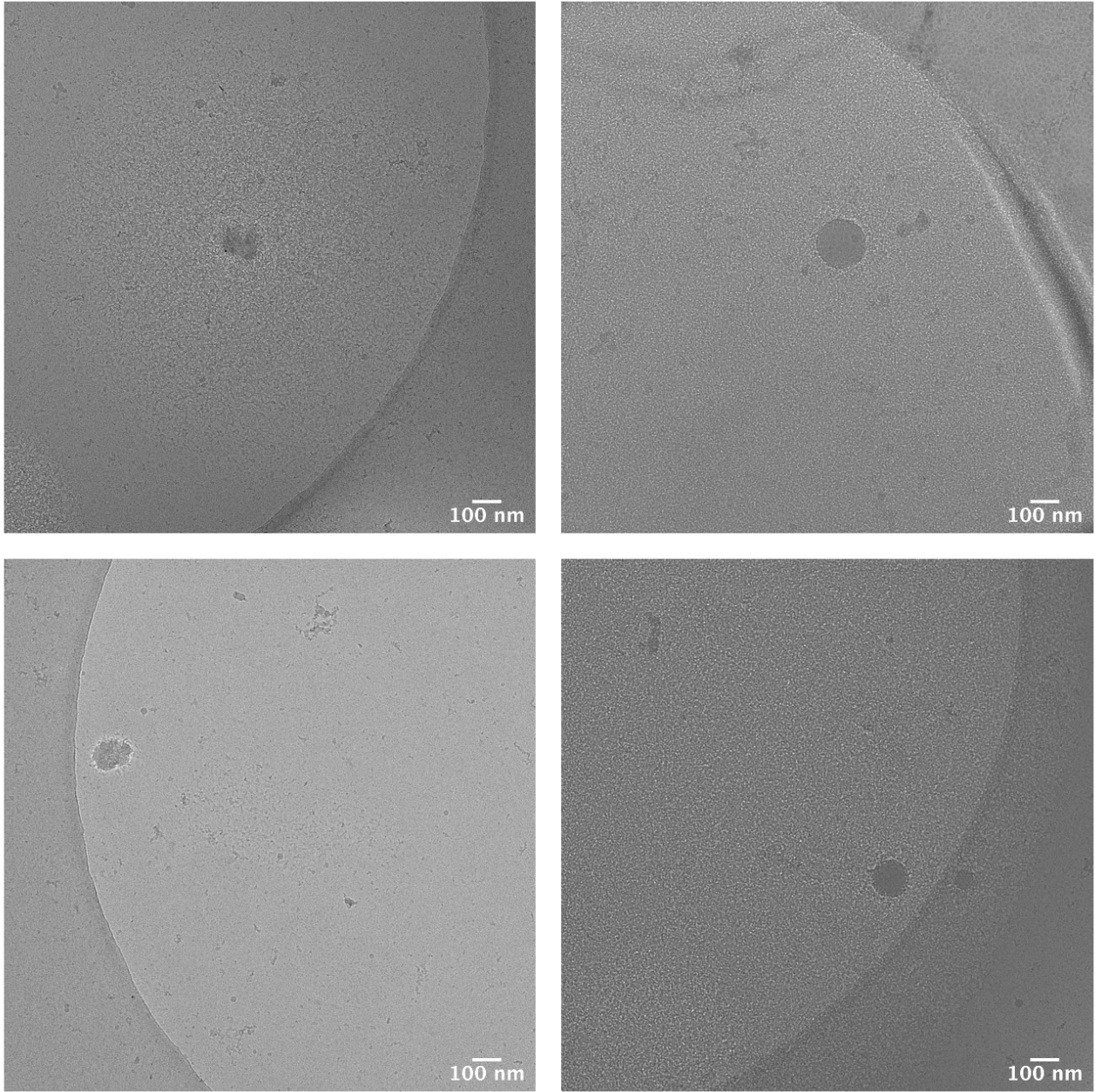


Figure 5-1. Les images de cryomicroscopie électronique en transmission confirment la présence et la distribution de tailles des AU-NPs.

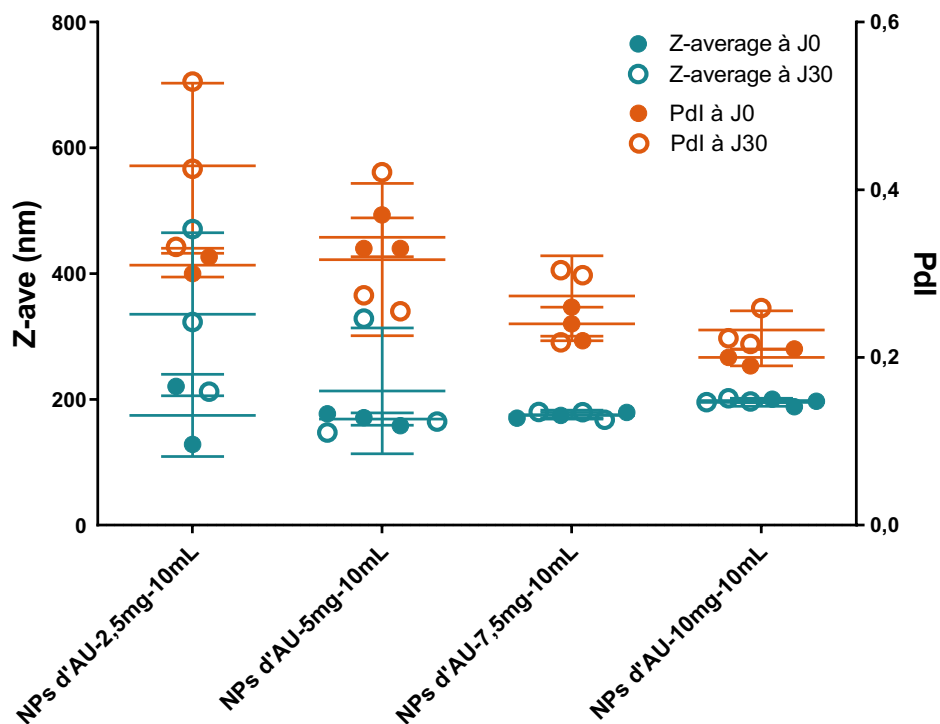


Figure 5-2. Les AU-NPs dans les suspensions les plus concentrées sont stables au moins 1 mois à 4 °C. Comparaison du diamètre hydrodynamique (Z-ave) et de l'indice de polydispersité (PdI) des formulations d'AU-NPs juste après la formulation (J0) et 30 jours plus tard (J30) (n = 2-3 ; moyenne ± écart-type).

Finalement, un spectre de poudre par diffraction des rayons X a été réalisé sur les nanoprecipités d'AU après lyophilisation et comparé à l'AU non formulé. Une perte de cristallinité est observée pour les nano-objets comparativement au produit initial (figure 5-3), et celle-ci n'est pas récupérée post lyophilisation. Ainsi, pour la suite, nous allons préférer appeler ces nano-objets des nanoprecipités d'AU (AU-NPs) plutôt que des nanocristaux.

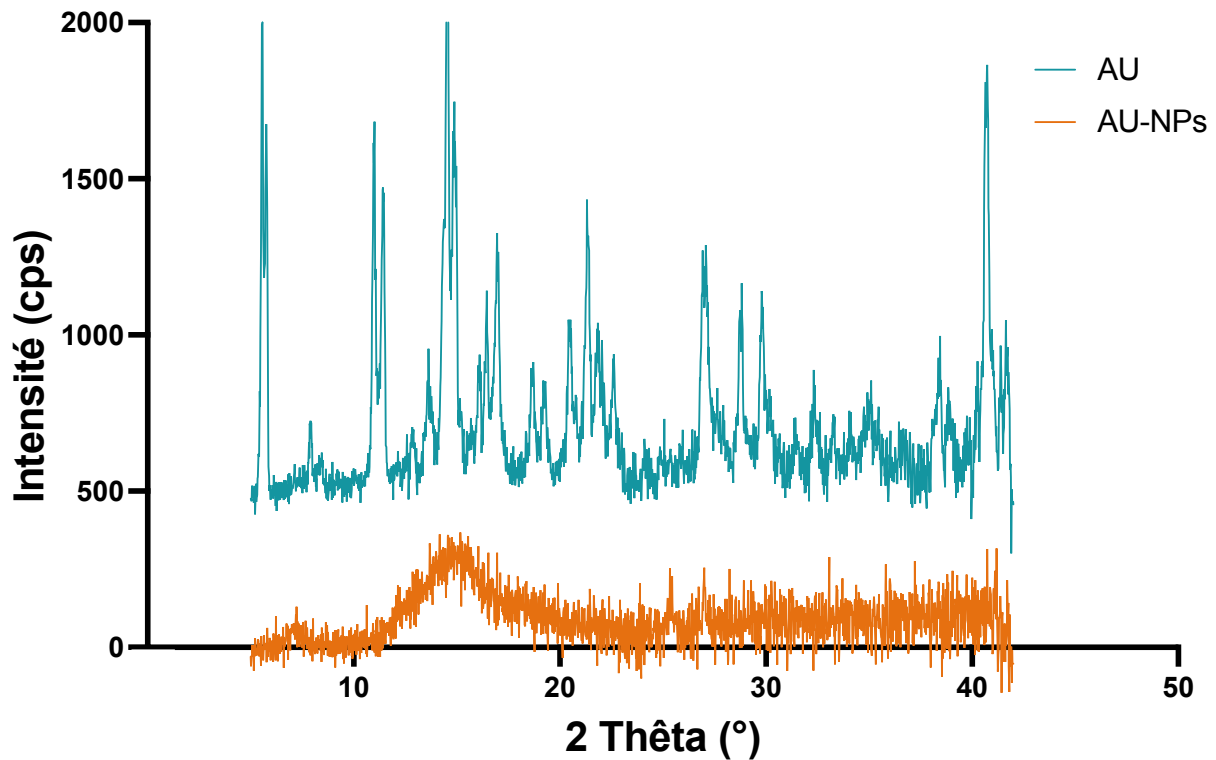


Figure 5-3. L'AU perd sa cristallinité lorsqu'il est à l'état de nanoprecipités formulés par une méthode *bottom-up*. Diffractogrammes à rayon X de poudres : AU (non formulé) et AU-NPs.

2. Influence du pH sur les formulations de nanoprecipités d'AU

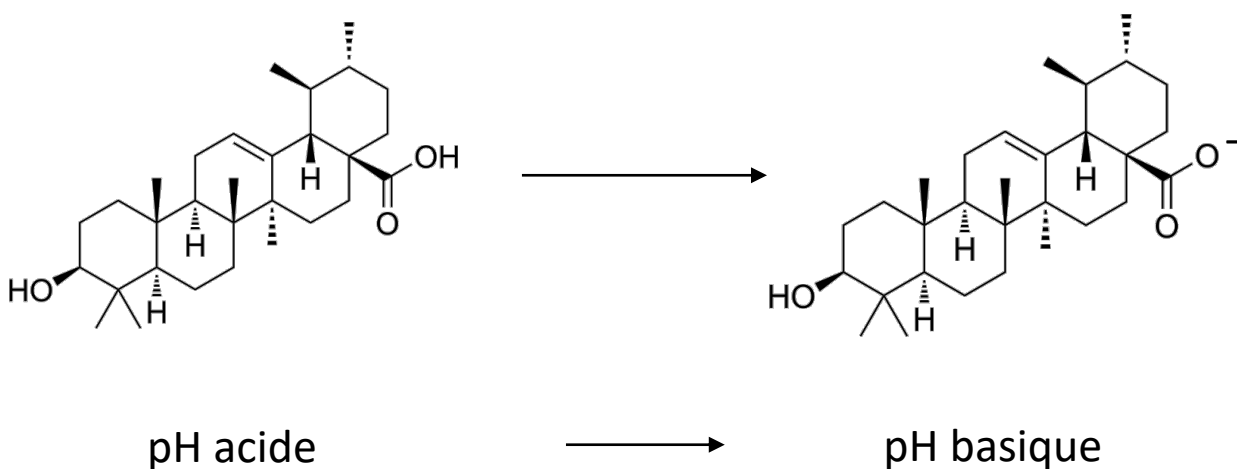


Figure 5-4. Le pH a un effet sur la charge de l'AU. Formules chimiques de l'AU à pH acide ou basique.

Le PZ négatif observé pour les AU-NPs est certainement associé à la forme basique de l'AU qui est un acide carboxylique (figure 5-4). En raison de sa très faible solubilité dans l'eau, il est difficile de déterminer le pKa et une valeur théorique de pKa de 4,74 a été prédite par l'organisme ChemAxon sur le site *The Human Metabolome Database* (HMDB) (<https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0002395>, consulté le 10 septembre 2023) [32]. Il nous a donc semblé important de vérifier l'effet du pH de la phase aqueuse utilisée pour l'effet antisolvant. Le pH de l'eau utilisée dans les expériences était environ à 8.

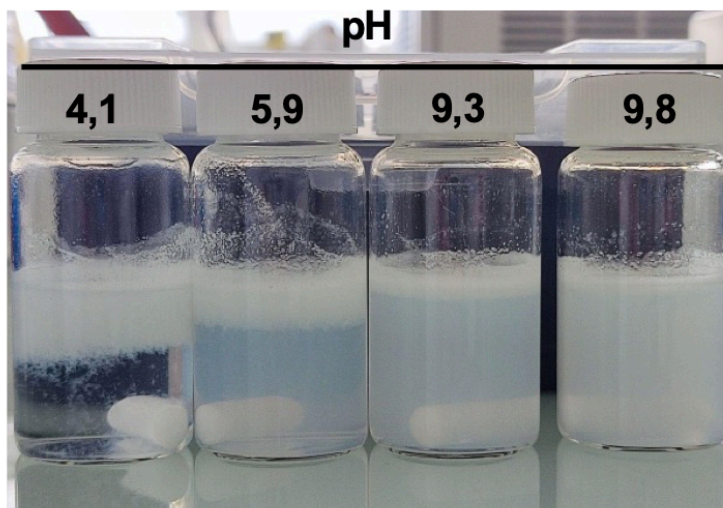


Figure 5-5. Le pH impacte l'aspect de la suspension des AU-NPs. Images de suspensions d'AU-NPs formulés avec de l'eau à différents pH.

Différentes valeurs de pH ont été testées en ajoutant du NaOH ou du HCl jusqu'à atteindre la valeur de pH souhaitée. Après l'ajout de l'AU et avant l'évaporation du méthanol, une séparation de phases a été observée pour les échantillons obtenus dans les phases aqueuses les plus acides, comme illustré dans la figure 5-5. Pendant l'évaporation du méthanol à l'aide de l'évaporateur rotatif, les échantillons ont également réagi différemment lorsque la pression diminuait. À mesure que le pH devient plus basique, les échantillons se dégazent davantage et forment des bulles, pouvant aboutir à la formation d'une mousse épaisse et persistante, ce qui augmente considérablement les temps de formulation. En revanche, les échantillons présentant un pH acide produisent très peu de bulles. Par conséquent, un pH plus élevé pourrait avoir un impact sur une éventuelle production industrielle en prolongeant les temps de dépression.

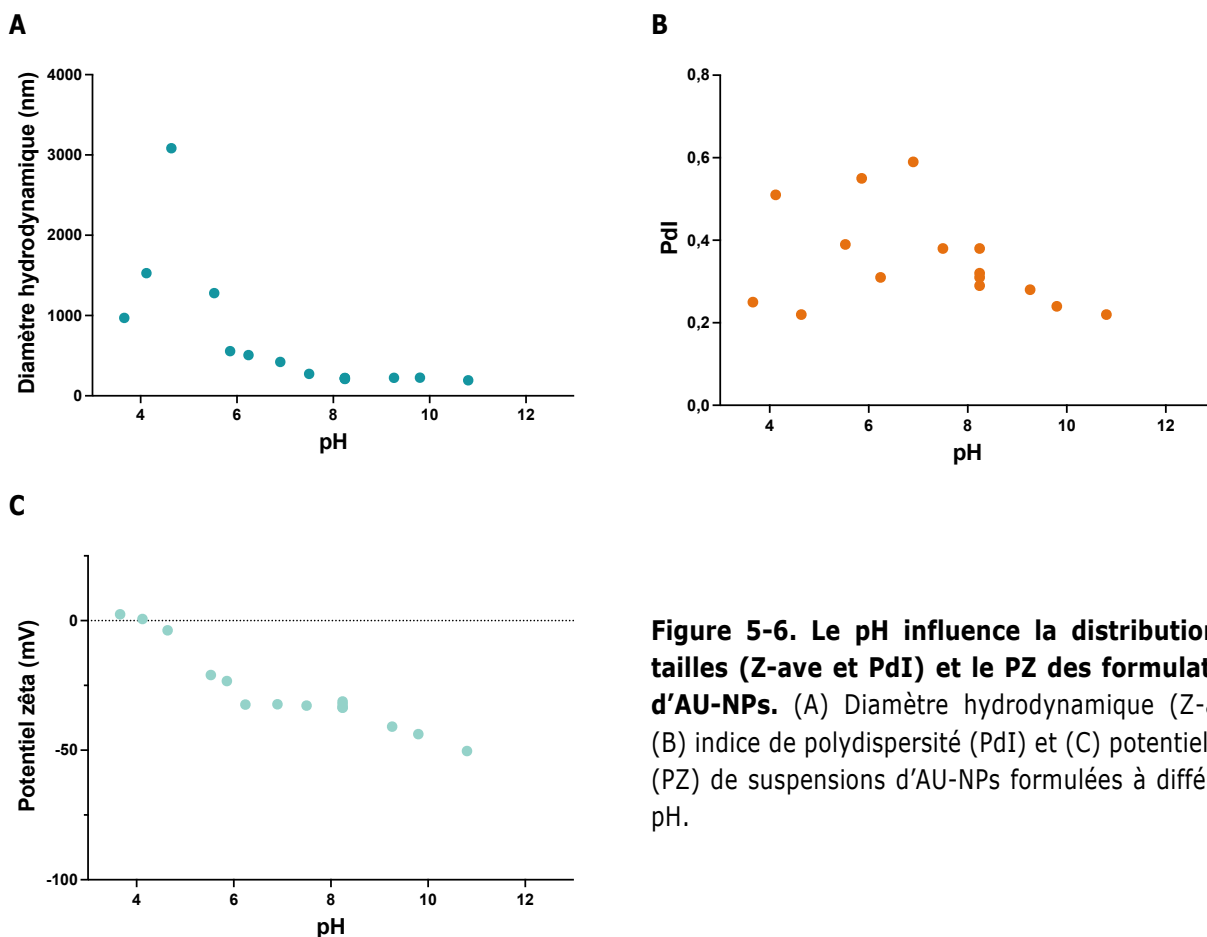


Figure 5-6. Le pH influence la distribution de tailles (Z-ave et PdI) et le PZ des formulations d'AU-NPs. (A) Diamètre hydrodynamique (Z-ave), (B) indice de polydispersité (PdI) et (C) potentiel zéta (PZ) de suspensions d'AU-NPs formulées à différents pH.

Après la formulation, la distribution de tailles et le PZ des échantillons d'AU-NPs ont été caractérisés. Lorsque le pH de la phase aqueuse utilisée pour l'effet antisolvant est compris entre 7,5 et 11, la distribution de tailles des AU-NPs est relativement stable : Z-ave proche de 200 nm et PdI compris entre 0,2 et 0,3. Les valeurs de PZ sont également relativement stables : entre -30 et -50 mV, assurant une stabilité colloïdale. Pour des pH plus acides (< 7,5), une forte augmentation de taille a été observée avec des valeurs de Z-ave qui peuvent atteindre environ 3 μm et des valeurs de PdI d'environ 0,6. De plus, une augmentation continue des valeurs de PZ est observée lorsque le pH diminue (figure 5-6), pouvant expliquer également ce phénomène d'agrégation par la perte de stabilité colloïdale. Ces observations peuvent être attribuées à des changements dans la charge de l'AU. Aux pH > 7,5, l'AU se retrouve majoritairement sous sa forme basique (AU avec la forme carboxylate) si on considère le pKa de l'AU qui ne reste que théorique. Ainsi, les valeurs de PZ négatives des AU-NPs sont compatibles avec cet état moléculaire, ce qui peut aussi expliquer la faible taille des AU-NPs et une faible distribution de tailles, formés à la fois par un équilibre entre une attraction hydrophobe et une répulsion électrostatique. Lorsque le pH diminue, l'augmentation des valeurs de PZ peut être expliquée par l'AU qui retrouve progressivement sa forme protonée non chargée (AU avec la forme acide carboxylique). Ainsi, il y a une déstabilisation de l'équilibre formant les AU-NPs avec une répulsion minimisée laissant uniquement la place à l'attraction hydrophobe. Ce phénomène peut expliquer l'augmentation de taille des AU-NPs qui est observée pour des valeurs de pH < 7,5, et des valeurs de distribution de tailles plus importante par la perte de contrôle de la nanoprecipitation des AU-NPs. Ainsi, le pH sera maintenu entre 7,5 et 8,5 pour la formulation de ces nano-objets.

Dans une récente publication de 2023 par Li *et al.*, des nanoparticules d'AU ont également été formulées [33]. Leur procédé de fabrication se rapproche sensiblement de celui que nous avons mis au point et optimisé. Il s'agit d'une méthode d'émulsification. L'AU est solubilisé dans un mélange acétate d'éthyle / diméthylsulfoxyde et ajouté dans de l'eau contenant de l'alcool polyvinylique. L'émulsification est réalisée par sonication. S'en suit une série de lavage par centrifugation successive pour éliminer l'alcool polyvinylique. Rien n'est dit sur la purification pour enlever l'acétate d'éthyle et le DMSO mais on peut imaginer que l'étape de sonication permet une évaporation partielle de l'acétate d'éthyle. Comme dans notre cas, des nanoparticules d'AU ont été obtenues, avec une distribution de taille caractérisée par microscopie électronique et diffusion de la lumière donnant un diamètre hydrodynamique moyen de 200 nm (le PdI n'a pas été précisé). De plus, ils ont comme nous observé une perte de cristallinité par leur méthode de formulation en comparant avec l'AU non formulé. L'avantage de notre méthode est qu'elle est relativement simple : nous n'utilisons pas de tensioactif ce qui nous permet d'éviter une purification pour l'enlever. Sorti de formulation, nous obtenons des AU-NPs qui ne sont uniquement formés d'AU, sans excipient supplémentaire. Ceci est un des avantages majeurs de notre méthode puisque nous avons une capacité de charge (la masse d'actif dans les nanoparticules par rapport à la masse des nanoparticules) de 100%, bien plus importante que lorsque des actifs sont encapsulés dans des nanovecteurs (environ 1%). Notre seule purification est le retrait du méthanol de la formulation. Le méthanol est un solvant de classe 2 (utilisation limitée) avec une concentration limite tolérée de 3 000 ppm et une dose journalière admissible de 30 mg/jour (*European Medicine Agency - ICH Q3C (R8) Residual solvents - Scientific guideline - <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q3c-r8-residual-solvents-scientific-guideline>*, consulté le 11 septembre 2023). Il faudra bien entendu contrôler sa concentration résiduelle avant de valider la formulation pour un usage clinique. Un effort pourra aussi être mené pour utiliser un solvant de classe supérieure. Li *et al.* ont en effet utilisé des solvants de classe 3 : acétate d'éthyle et diméthylsulfoxyde, des solvants difficiles à enlever, et il faudra quand même contrôler leurs concentrations résiduelles.

3. Suivi des AU-NPs et de leur intégrité en utilisant un signal FRET

Le FRET est issu des travaux de Theodor Förster qui a développé cette théorie en 1949 [34]. Ce mécanisme de transmission d'énergie entre molécules se produit lorsque deux molécules fluorescentes sont en interaction étroite et présentent un chevauchement spectral particulier. Lorsque la première molécule est excitée par une source d'énergie externe, elle peut transmettre une partie de cette énergie à la seconde molécule par un processus non radiatif. Cela résulte en une désexcitation de la première molécule et une excitation de la seconde, permettant ainsi une émission de fluorescence sans émission directe de photon. Ainsi, la gamme d'excitation de la deuxième molécule fluorescente (également appelé fluorophore accepteur et ici le DiD) doit se superposer à la gamme d'émission de la première (également appelé fluorophore donneur et ici le DiI). Ainsi, lorsque le fluorophore donneur est excité, seule l'émission du fluorophore accepteur est collectée. Pour observer cette signature de fluorescence particulière, les deux molécules fluorescentes doivent être à proximité l'une de l'autre, et cet effet diminue lorsque les molécules s'éloignent : lors de l'excitation du fluorophore donneur, l'émission de

ce même fluorophore sera collectée. Cette technique est un phénomène optique largement utilisé dans de nombreuses disciplines scientifiques, telles que la biologie, la physique et la chimie [35], et a permis d'étudier des interactions moléculaires, des distances intermoléculaires et des changements conformationnels dans un large éventail d'applications de recherche [36]. Ainsi l'utilisation de l'effet FRET pourrait permettre de suivre l'intégrité des AU-NPs.

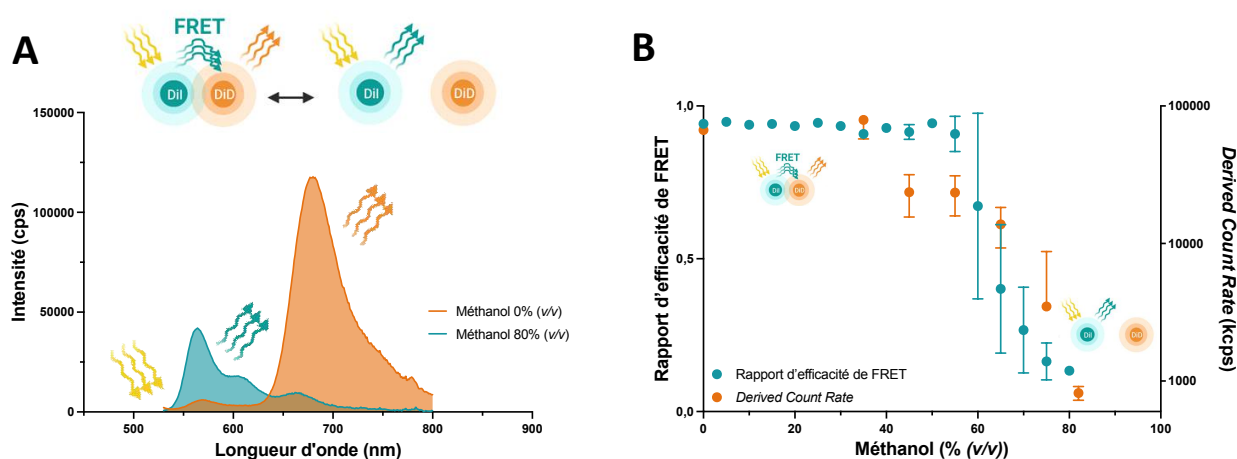


Figure 5-7. Le signal FRET permet de suivre l'intégrité des AU-NPs. A. Spectres d'émission de fluorescence (longueur d'onde d'excitation : 490 nm) des AU-NPs-FRET (obtenus par le mélange DiI / DiD) sortis de formulation (méthanol 0% (v/v)) ou après ajout de méthanol (méthanol 80% (v/v)) dans le milieu extérieur. B. Rapport d'efficacité de FRET pour les AU-NPs-FRET (obtenus par le mélange DiI / DiD) et *Derived Count Rate* (DCR) pour les AU-NPs non marqués (pas de fluorophores), en fonction de la proportion de méthanol dans le milieu extérieur (n=3 ; moyenne ± écart-type).

Le mélange de DiI et DiD dans les AU-NPs a été réalisé pour obtenir un signal FRET. La caractérisation de la distribution de tailles de ces nano-objets (AU-NPs-FRET) ne peut pas être réalisée de la même manière que les AU-NPs (celle-ci sera davantage développée dans le chapitre 6). En effet, la longueur d'onde du laser du Zetasizer® Nano ZS dont nous disposons correspond à la longueur d'onde d'excitation du DiD. Ainsi, les corrélogrammes obtenus permettant la détermination du Z-ave et du PdI ne peuvent pas être exploités. Néanmoins, nous avons mesuré la distribution de tailles des AU-NPs-DiI (servant de contrôle au même titre que les AU-NPs-DiD) et celle-ci reste similaire aux AU-NPs non marqués. Les faibles quantités de fluorophores utilisées : 1% (m/m_{AU}) ne perturbe pas le procédé de nanoprecipitation.

Comme observé sur la figure 5-7A, les AU-NPs-FRET présentent un bon signal FRET avec un rapport d'efficacité de FRET proche de 1 ($0,940 \pm 0,002$). Lorsque du méthanol est ajouté en grande proportion (80% (v/v)) dans la suspension, le signal FRET disparaît et le rapport d'efficacité de FRET se rapproche 0 ($0,130 \pm 0,004$). Une limite de 0,2 pour le rapport d'efficacité de FRET correspond à la même valeur que celle obtenue avec les AU-NPs-DiI, comme si les deux sondes n'étaient finalement plus colocalisées dans les AU-NPs. Ainsi, cette perte de signal FRET serait certainement due à l'éloignement des molécules fluorescentes par la dissolution des AU-NPs-FRET après l'ajout du méthanol. Afin de confirmer que le signal FRET peut en effet être utilisé pour

suivre l'intégrité des AU-NPs, nous avons mesuré le signal FRET (en utilisant le rapport d'efficacité de FRET) pour les AU-NPs-FRET, et nous l'avons corrélé avec aux valeurs de DCR des AU-NPs non fluorescents lors des mesures de diffusion de lumière, avec l'ajout de méthanol (figure 5-7B). En effet, le DCR représente l'intensité diffusée par les nano-objets lors d'une expérience de diffusion de la lumière et est proportionnelle à la concentration en nano-objets en suspension [37]. Le rapport d'efficacité de FRET est resté constant jusqu'à ce que la proportion de méthanol dans le milieu extérieur atteigne environ 55% (v/v). Pour des proportions plus importantes, une diminution claire du rapport d'efficacité de FRET a été observée, avec une perte d'environ 0,8. Le profil du DCR en fonction de l'ajout de méthanol suit celui du rapport d'efficacité de FRET. La diminution des valeurs du DCR indique ici la dissolution des AU-NPs avec l'ajout de méthanol. Les deux profils similaires pour le rapport d'efficacité de FRET et le DCR prouvent que la technique FRET peut être utilisée comme un outil à la fois pour le suivi des AU-NPs et pour évaluer leur intégrité.

Le signal FRET a ensuite été utilisé pour suivre l'internalisation des AU-NPs dans des cellules de GBM (lignée cellulaire T98G). Les AU-NPs ont été utilisées à une concentration de 3 µg/mL, non cytotoxique (voir ci-après pour les expériences de cytotoxicité). Après 24h de traitement avec des AU-NPs-FRET, un signal FRET est détecté dans les cellules de GBM ce qui signifie que les AU-NPs sont internalisés après 24h et sous forme intacte (figure 5-8). Afin d'enlever tout biais expérimental, le mélange physique d'AU-NPs-DiI et AU-NPs-DiD a été utilisé dans les mêmes conditions. Après incubation, les images de microscopie confocale montrent que mélange physique ne produit pas de signal FRET, indiquant que le signal FRET n'est présent que lorsque que les sondes sont incluses dans le même nanoprécipté.

Une méthode de quantification de la dégradation des AU-NPs *in vitro* a été développée à l'aide de la cytométrie en flux. En bref, les cellules de GBM (lignée cellulaire T98G) ont été exposées pendant 3 h, et les intensités de fluorescence pour les marqueurs DiI, DiD ou FRET ont été mesurées par cytométrie en flux. Sans surprise, les cellules traitées avec les AU-NPs non fluorescentes sont doubles négatives pour le FRET et le DiI ou le DiD. Les cellules traitées avec un mélange physique AU-NPs-DiI et AU-NPs-DiD sont négatives pour le FRET mais positives pour le DiI et le DiD. Les cellules traitées avec les AU-NPs-FRET sont doubles positives pour le FRET et le DiI ou le DiD (figure 5-9). Cette technique permet alors de discriminer les AU-NPs intacts contenant un signal FRET des AU-NPs qui seraient déstabilisés et pour lesquels les sondes fluorescentes seraient trop éloignées.

À la suite des 3h d'incubation, le traitement a été retiré et remplacé par du milieu frais. Les cellules ont été laissées en culture pendant 0, 48 et 72h et les intensités de fluorescence ont à nouveau été mesurées par cytométrie en flux. Après 72h de prolifération post 3h d'incubation des AU-NPs-FRET, une diminution non significative d'environ 50 % du nombre de cellules T98G positives à un signal FRET a été observée (figure 5-10A). En parallèle, l'intensité moyenne par cellule du signal FRET a été significativement ($p = 0,04$) et fortement diminuée d'environ 85% après 72h (figure 5-10B). Cette forte perte de signal signifie que les AU-NPs sont internalisés puis dégradés sur une période de 72h *in cellulo*.

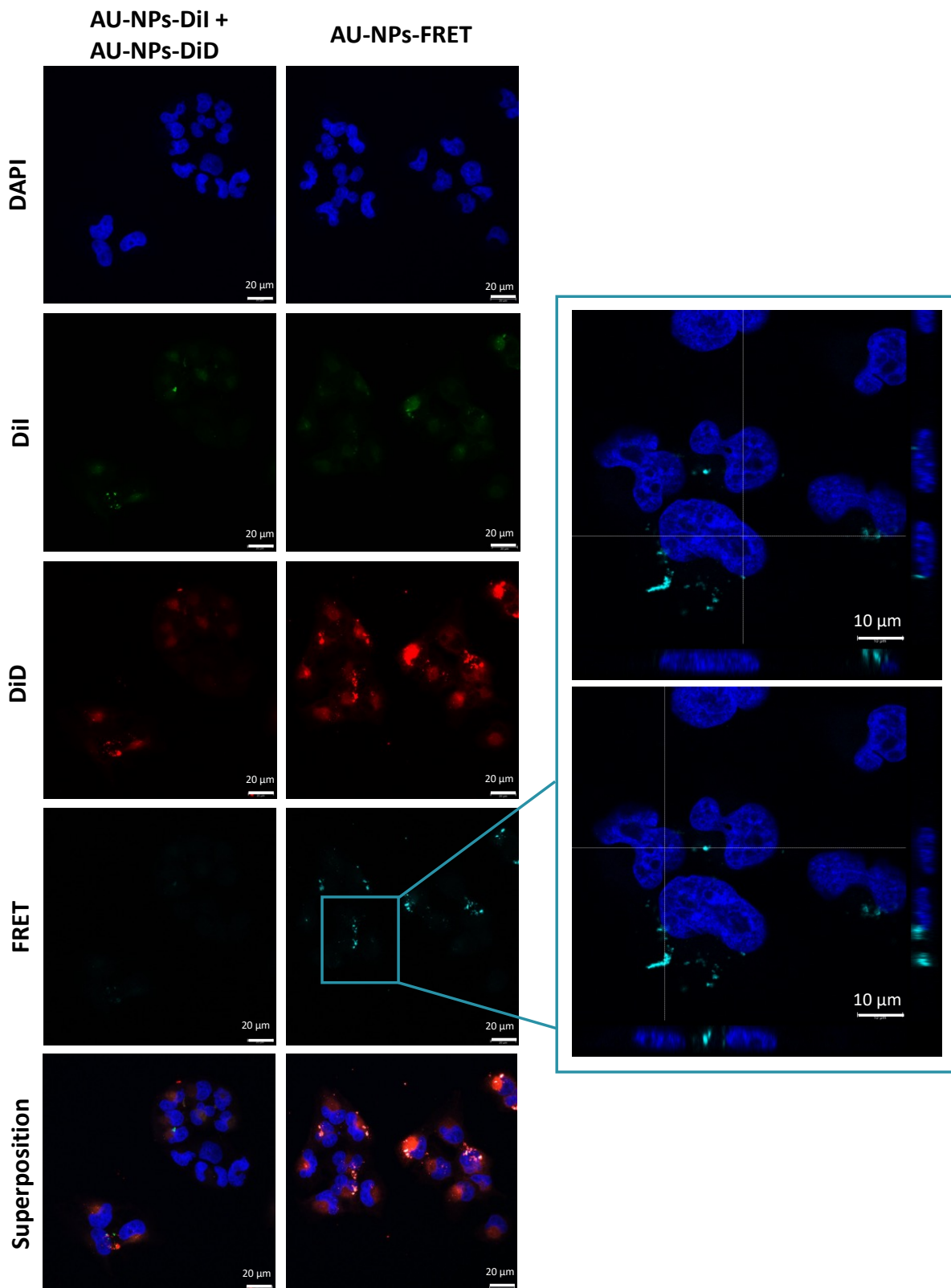


Figure 5-8. Les AU-NPs s'internalisent de manière intégrée dans les cellules de GBM. Images de microscopie confocale (et projection orthogonale) de cellules de GBM (lignée cellulaire T98G) traitées pendant 24h avec soit un mélange physique d'AU-NPs-DiI et AU-NPs-DiD ou soit des AU-NPs-FRET. Le signal du DAPI (bleu foncé) a été détecté entre 430 et 500 nm après une excitation à 360 nm. Le signal du DiI (vert) a été détecté entre 550 et 633nm après une excitation à 561 nm, le signal du DiD (rouge) a été détecté entre 660 et 800nm après une excitation à 645 nm. Le signal FRET (bleu clair) a été détecté entre 660 et 800nm après une excitation à 561 nm.

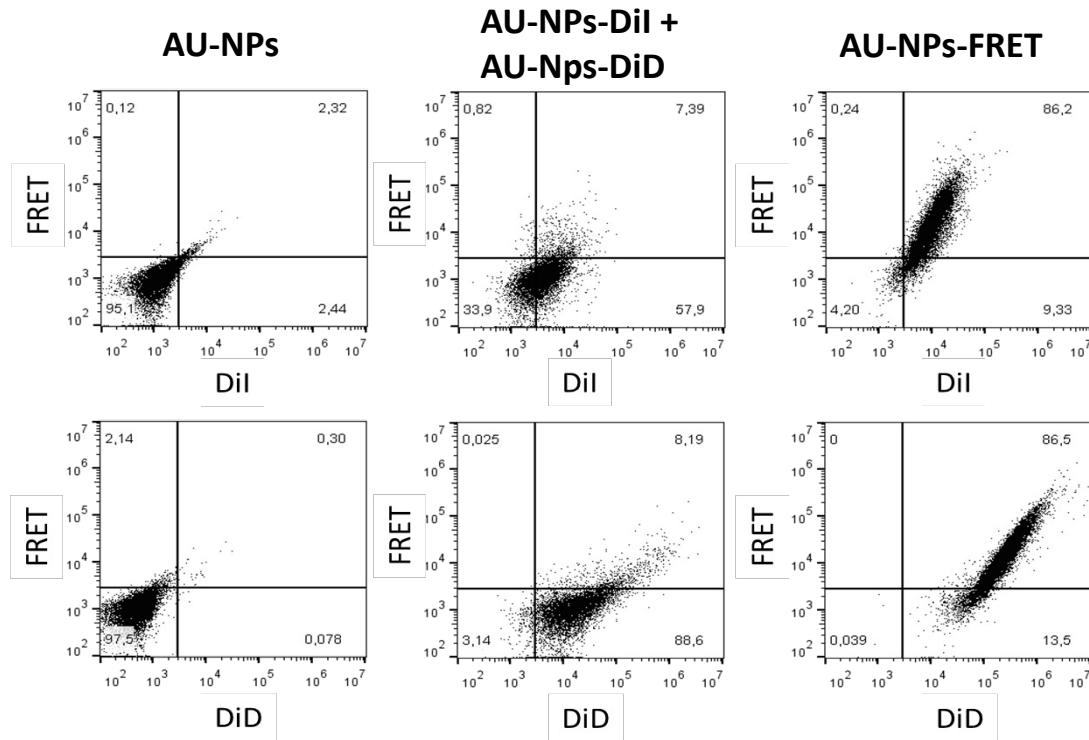


Figure 5-9. La cytométrie en flux permet d'observer un signal FRET. Dot-plots de l'intensité du signal FRET en fonction de l'intensité du DiI ou du DiD pour des cellules de GBM (lignée cellulaire T98G) traitées 3h avec des AU-NPs non fluorescentes, un mélange d'AU-NPs-DiI et d'AU-NPs-DiD, et des AU-NPs-FRET, mesurées par cytométrie en flux.

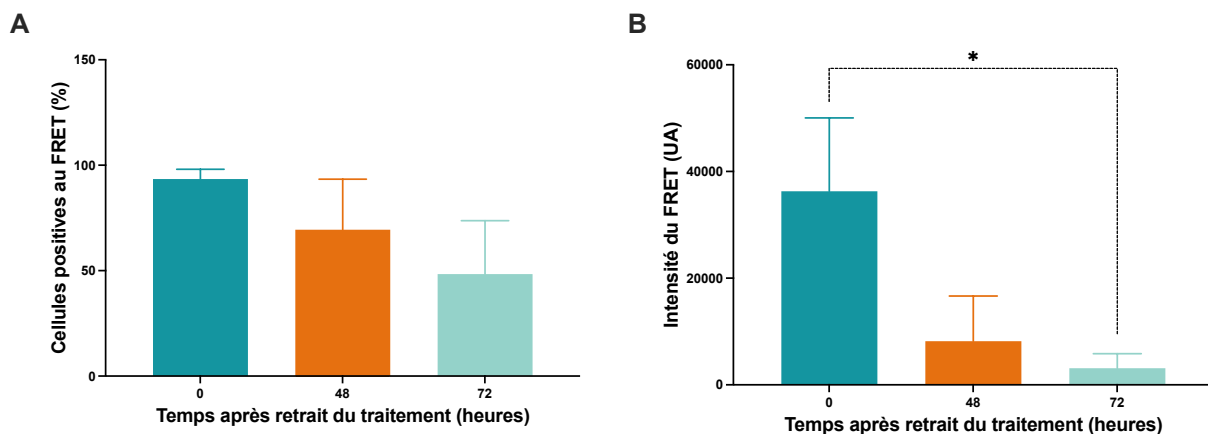


Figure 5-10. La cytométrie en flux permet de vérifier la dégradation des AU-NPs *in cellulo*. La proportion de cellules positives au signal FRET (A) et la médiane d'intensité de fluorescence du signal FRET par cellule, ont été mesurées par cytométrie en flux dans des cellules de GBM (lignée cellulaire T98G) lorsque celles-ci ont été traitées pendant 3h avec des AU-NPs-FRET puis laissées proliférer pendant 0, 48 ou 72h (n = 4 ; moyenne ± écart-type).

4. Toxicité des AU-NPs et potentialisation de l'effet du TMZ

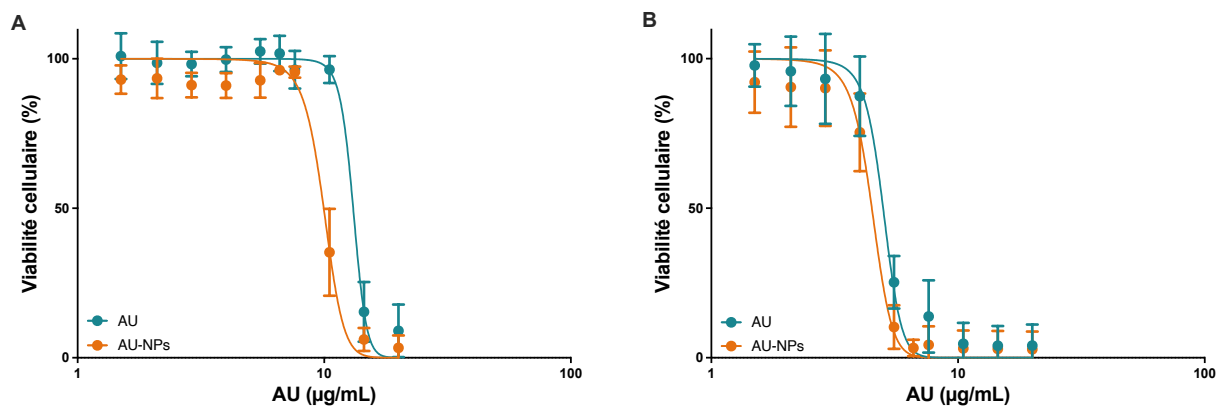


Figure 5-11. La cytotoxicité des AU-NPs dépend du statut MGMT des cellules de GBM. Viabilité cellulaire de l'AU sous forme unimoléculaire et des AU-NPs après 72h de traitement sur des cellules de GBM : lignées cellulaires U-87 MG (A) ou T98G (B) (n = 4 ; moyenne ± écart-type).

Des études de cytotoxicité après 72h d'incubation (temps où une dégradation significative des AU-NPs a été observée précédemment, figure 5-10) ont été menées sur deux lignées cellulaires de GBM différentes : l'une n'exprimant pas (lignée cellulaire U-87 MG) et l'autre surexprimant la MGMT (T98G). Pour la lignée cellulaire U-87 MG, la CI50 de l'AU unimoléculaire était d'environ $13,6 \pm 0,7 \mu\text{g/mL}$. Les AU-NPs semblent plus cytotoxiques ($p = 0,053$) : CI50 = $10,0 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$ (figure 5-11A). Pour la lignée cellulaire T98G, les CI50 de l'AU unimoléculaire et des AU-NPs sont comparables : $5,0 \pm 0,1$ et $4,5 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$, respectivement (figure 5-11B). L'AU est donc de manière générale significativement plus cytotoxique pour les cellules de GBM surexprimant la MGMT que pour les cellules n'exprimant pas la MGMT, pour la forme unimoléculaire ($p = 0,001$), confirmant les résultats que nous avons obtenus au chapitre 4 mais après 48h d'incubation. Il en va de même pour la forme AU-NPs ($p < 0,001$). De plus, la formulation de l'AU sous la forme nanoprecipité semble aussi influencer la cytotoxicité sur les cellules. Les AU-NPs sont plus cytotoxiques que l'AU unimoléculaire pour les cellules n'exprimant pas la MGMT mais aucune différence n'est observée pour celles la surexprimant.

Li *et al.* ont aussi évalué la cytotoxicité de leurs nanoparticules d'AU fabriquées par la méthode d'émulsification sur la lignée cellulaire U-87 MG [33]. Ils ont obtenu une valeur de CI50 de $6,5 \mu\text{g/mL}$, donc des nanoparticules plus cytotoxiques que celles que nous avons fabriquées. Ceci est d'autant plus surprenant que le temps d'incubation était beaucoup plus court que le nôtre : 24h vs 72h. Mis à part que les comportements des deux nanosystèmes puissent être différents, d'autres explications peuvent être avancées. Premièrement, les quantités résiduelles d'alcool polyvinylique et de solvants : acétate d'éthyle et diméthylsulfoxyde, peuvent influencer l'effet cytotoxique des nanoparticules. Deuxièmement, Li *et al.* n'ont pas vérifié le rendement d'encapsulation de l'AU (que nous appelons le taux de nanoprecipitation dans le tableau 5-1). Ainsi, ils ont peut-être une surestimation de la quantité d'AU dans leur suspension, qui se traduit par une valeur de CI50 plus faible que celle qui devrait être réellement obtenue.

La capacité de l'AU sous la forme unimoléculaire et des AU-NPs à inhiber l'expression de la MGMT a ensuite été évaluée par Western Blots sur la lignée cellulaire T98G. Les cellules ont été traitées pendant 72h avec des concentrations croissantes d'AU sous forme unimoléculaire ou d'AU-NPs et nous nous sommes limités à la concentration maximale de 3µg/mL d'après les résultats précédents (figure 5-11B). A cette concentration, les AU-NPs ont réduit de manière significative l'expression de la MGMT par rapport au contrôle ($p = 0,04$) et aussi par rapport à l'AU sous forme unimoléculaire ($p = 0,006$) (figure 5-12). A cette concentration, l'AU sous forme unimoléculaire n'a pas permis de réduire l'expression de la MGMT. Dans le chapitre précédent, nous avons montré que l'AU sous forme unimoléculaire pouvait réduire l'expression de la MGMT. Néanmoins, nous avons travaillé avec des concentrations plus importantes (de 5 à 15 µg/mL) sachant que les traitements étaient effectués pendant 48h donc moins cytotoxiques que ceux à 72 h.

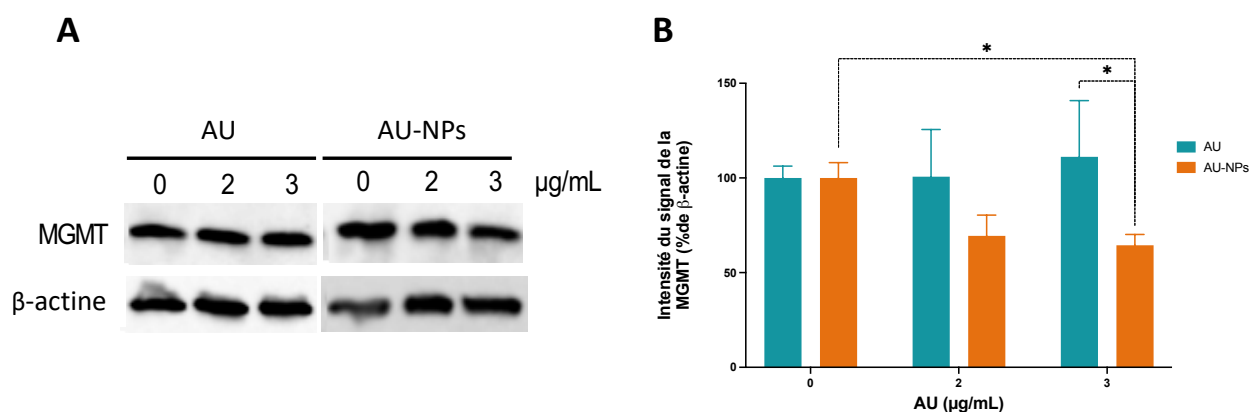


Figure 5-12. Les AU-NPs sont capables d'inhiber la MGMT dans les cellules de GBM de manière plus efficace que l'AU sous la forme unimoléculaire. (A) Expression de la MGMT évaluée par Western-Blots sur des cellules de GBM surexprimant la MGMT (lignée cellulaire T98G) après 72h de traitement avec de l'AU sous forme unimoléculaire ou avec des AU-NPs, à 0, 2 et 3 µg/mL. (B) Intensité du signal de la MGMT par rapport au signal de la β-actine (en pourcentage) des cellules de GBM surexprimant la MGMT (lignée cellulaire T98G) après 72h de traitement avec de l'AU sous forme unimoléculaire ou avec des AU-NPs, à 0, 2 et 3 µg/mL (n = 3 ; moyenne ± écart-type ; * $p < 0,05$).

Les lignées cellulaires surexprimant la MGMT ont montré une résistance significative au TMZ ($p < 0,001$), comme attendu. Les valeurs de CI50 pour le TMZ seul étaient de 660 ± 32 et 386 ± 34 µg/mL pour les lignées cellulaires surexprimant et n'exprimant pas la MGMT, respectivement. Lorsque l'AU unimoléculaire a été combiné avec le TMZ, il n'a pas eu d'effet significatif sur la toxicité du TMZ, comme le montrent les CI50 de 724 ± 33 et 315 ± 35 µg/mL, respectivement, pour les mêmes lignées cellulaires surexprimant la MGMT ou non (figure 5-13). Cependant, la situation a été différente lorsque les AU-NPs ont été utilisés en combinaison avec le TMZ. Pour la lignée cellulaire surexprimant la MGMT, les AU-NPs ont montré une capacité remarquable à potentialiser l'effet du TMZ. Les CI50 pour cette combinaison étaient de 96 ± 13 µg/mL, soit plus efficace que le TMZ seul ($p < 0,001$) et que l'association AU sous forme unimoléculaire / TMZ (figure 5-13A). Dans le cas de la lignée n'exprimant pas la MGMT, la combinaison AU-NPs / TMZ donne une CI50 de 259 ± 39 µg/mL, une valeur similaire à celle obtenue pour le TMZ seul ou la combinaison AU sous forme unimoléculaire / TMZ (figure 5-13B). Les résultats de cette étude suggèrent que les AU-NPs pourraient être efficaces pour la sensibilisation des cellules

résistantes au TMZ grâce à l'inhibition de la MGMT. Ces résultats sont encourageants pour le développement de stratégies thérapeutiques combinées visant à améliorer l'efficacité du TMZ chez les patients atteints de cancers, dont le GBM, possédant des promoteurs de la MGMT non méthylés.

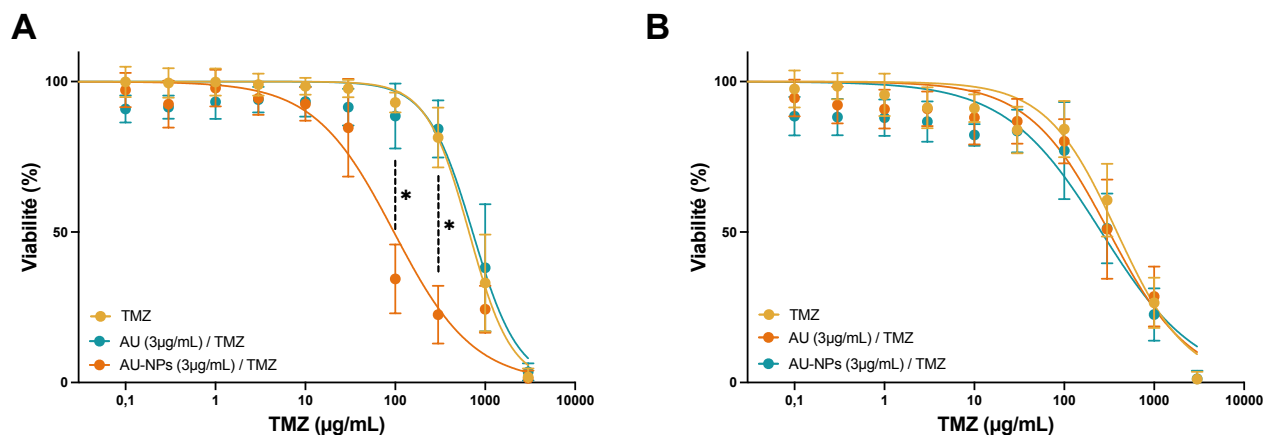


Figure 5-13. Les AU-NPs permettent de sensibiliser au TMZ les cellules de GBM surexprimant la MGMT. Viabilité cellulaire (test à la résazurine) de lignées cellulaires (A) T98G (cellules de GBM surexprimant la MGMT) ou (B) U-87 MG (cellules de GBM n'exprimant pas la MGMT), en fonction de la concentration en TMZ. Les cellules ont été traitées pendant 72h avec des concentrations croissantes de TMZ et des concentrations fixes soit d'AU sous la forme unimoléculaire soit d'AU-NPs, à 3 µg/mL (n = 5-7 ; moyenne ± écart-type ; * p < 0,05).

Conclusion

Près de la moitié des patients atteints de GBM présentent une résistance manifeste envers l'agent chimiothérapeutique intégré au protocole de soins actuellement institué : le TMZ. Cette résistance découle d'une expression trop élevée de la protéine MGMT. Dans l'intention de rétablir la sensibilité de ces patients au TMZ, des nanoprecipités d'AU, un inhibiteur de la MGMT, ont été élaborés. La préparation de ces AU-NPs repose sur un processus de nanoprecipitation utilisant une méthode antisolvant. Le diamètre hydrodynamique des AU-NPs se situe dans une fourchette allant de 150 à 200 nm et leur suspension dans l'eau reste stable pendant une période d'au moins un mois. La formulation des AU-NPs a pu être optimisée en y incorporant des sondes fluorescentes générant un signal FRET. Ce dispositif a ainsi permis de surveiller en temps réel l'intégrité de ces nanoprecipités et leur internalisation au sein des cellules de GBM. Ces AU-NPs parviennent à être internalisés dans un délai de 24h et subissent une dégradation *in cellulo* s'étalant sur 72 h.

La forme AU-NPs s'est avérée plus efficace que sa contrepartie unimoléculaire en ce qui concerne la diminution de l'expression de la protéine MGMT. Ce résultats encourageant ouvre ainsi la voie à une potentialisation de l'efficacité du traitement chimiothérapeutique sur les cellules de GBM exprimant cette protéine. Dès lors, cette formulation spécifique suscite un optimisme justifié quant à son application pour les patients atteints de GBM qui présentent une surexpression de la MGMT, car elle pourrait induire une meilleure réponse à la chimiothérapie. Désormais se pose la question cruciale de l'administration de ces nanoprecipités. Une administration locale pourrait présenter un double avantage : elle permettrait d'accroître la dose d'AU disponible proche du site ciblé tout en évitant le franchissement de la barrière hémato-encéphalique. Cette approche pourrait également permettre d'atténuer l'accès aux cibles secondaires, étant donné l'ubiquité de la protéine MGMT.

Bibliographie

- 1 Wen PY, Kesari S. Malignant Gliomas in Adults. *N Engl J Med* 2008;**359**:492–507. doi:10.1056/NEJMra0708126
- 2 Louis DN, Perry A, Wesseling P, et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro-Oncology* 2021;**23**:1231–51. doi:10.1093/neuonc/noab106
- 3 Ostrom QT, Cioffi G, Waite K, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2014–2018. *Neuro-Oncology* 2021;**23**:iii1–105. doi:10.1093/neuonc/noab200
- 4 Ostrom QT, Gittleman H, Fulop J, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008–2012. *Neuro Oncol* 2015;**17**:iv1–62. doi:10.1093/neuonc/nov189
- 5 Woźniak Ł, Skąpska S, Marszałek K. Ursolic Acid—A Pentacyclic Triterpenoid with a Wide Spectrum of Pharmacological Activities. *Molecules* 2015;**20**:20614–41. doi:10.3390/molecules201119721
- 6 Luan M, Wang H, Wang J, et al. Advances in Anti-inflammatory Activity, Mechanism and Therapeutic Application of Ursolic Acid. *MRMC* 2022;**22**:422–36. doi:10.2174/1389557521666210913113522
- 7 Saravanan R, Pugalendi V. Impact of ursolic acid on chronic ethanol-induced oxidative stress in the rat heart. *Pharmacol Rep* 2006;**58**:41–7.
- 8 Shanmugam MK, Dai X, Kumar AP, et al. Ursolic acid in cancer prevention and treatment: Molecular targets, pharmacokinetics and clinical studies. *Biochemical Pharmacology* 2013;**85**:1579–87. doi:10.1016/j.bcp.2013.03.006
- 9 Yeh C-T, Wu C-H, Yen G-C. Ursolic acid, a naturally occurring triterpenoid, suppresses migration and invasion of human breast cancer cells by modulating c-Jun N-terminal kinase, Akt and mammalian target of rapamycin signaling. *Mol Nutr Food Res* 2010;**54**:1285–95. doi:10.1002/mnfr.200900414
- 10 Ramírez-Rodríguez AM, González-Ortiz M, Martínez-Abundis E, et al. Effect of Ursolic Acid on Metabolic Syndrome, Insulin Sensitivity, and Inflammation. *Journal of Medicinal Food* 2017;**20**:882–6. doi:10.1089/jmf.2017.0003
- 11 Zhu Z, Du S, Ding F, et al. Ursolic acid attenuates temozolomide resistance in glioblastoma cells by downregulating O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) expression. *Am J Transl Res* 2016;**8**:3299–308.
- 12 Jinhua W. Ursolic acid: Pharmacokinetics process *in vitro* and *in vivo* , a mini review. *Arch Pharm Chem Life Sci* 2019;**352**:1800222. doi:10.1002/ardp.201800222
- 13 Vanti G. Recent strategies in nanodelivery systems for natural products: a review. *Environ Chem Lett* 2021;**19**:4311–26. doi:10.1007/s10311-021-01276-x
- 14 Bastiancich C, Bozzato E, Luyten U, et al. Drug combination using an injectable nanomedicine hydrogel for glioblastoma treatment. *International Journal of Pharmaceutics* 2019;**559**:220–7. doi:10.1016/j.ijpharm.2019.01.042

- 15 Idlas P, Ladaycia A, Némati F, *et al.* Ferrocifen stealth LNCs and conventional chemotherapy: A promising combination against multidrug-resistant ovarian adenocarcinoma. *International Journal of Pharmaceutics* 2022;**626**:122164. doi:10.1016/j.ijpharm.2022.122164
- 16 Clavreul A, Roger E, Pourbaghi-Masouleh M, *et al.* Development and characterization of sorafenib-loaded lipid nanocapsules for the treatment of glioblastoma. *Drug Deliv* 2018;**25**:1756–65. doi:10.1080/10717544.2018.1507061
- 17 Fan M, Geng S, Liu Y, *et al.* Nanocrystal Technology as a Strategy to Improve Drug Bioavailability and Antitumor Efficacy for the Cancer Treatment. *CPD* 2018;**24**:2416–24. doi:10.2174/1381612824666180515154109
- 18 Couillaud BM, Espeau P, Mignet N, *et al.* State of the Art of Pharmaceutical Solid Forms: from Crystal Property Issues to Nanocrystals Formulation. *ChemMedChem* 2019;**14**:8–23. doi:10.1002/cmdc.201800612
- 19 Kakran M, Sahoo NG, Tan I-L, *et al.* Preparation of nanoparticles of poorly water-soluble antioxidant curcumin by antisolvent precipitation methods. *J Nanopart Res* 2012;**14**:757. doi:10.1007/s11051-012-0757-0
- 20 Wu CY, Wang W. Application of Antisolvent Precipitation Method for Formulating Excipient-Free Nanoparticles of Psychotropic Drugs. *Pharmaceutics* 2022;**14**:819. doi:10.3390/pharmaceutics14040819
- 21 Sinha B, Müller RH, Möschwitzer JP. Bottom-up approaches for preparing drug nanocrystals: Formulations and factors affecting particle size. *International Journal of Pharmaceutics* 2013;**453**:126–41. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.01.019
- 22 Jungblut S, Dellago C. Pathways to self-organization: Crystallization via nucleation and growth. *Eur Phys J E* 2016;**39**:77. doi:10.1140/epje/i2016-16077-6
- 23 Abdelwahed W, Degobert G, Stainmesse S, *et al.* Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations☆. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2006;**58**:1688–713. doi:10.1016/j.addr.2006.09.017
- 24 Sharma S, Verma A, Teja BV, *et al.* Development of stabilized Paclitaxel nanocrystals: In-vitro and in-vivo efficacy studies. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2015;**69**:51–60. doi:10.1016/j.ejps.2014.11.012
- 25 Martin B, Seguin J, Annereau M, *et al.* Preparation of parenteral nanocrystal suspensions of etoposide from the excipient free dry state of the drug to enhance in vivo antitumoral properties. *Sci Rep* 2020;**10**:18059. doi:10.1038/s41598-020-74809-z
- 26 Wang Z, Chen J-F, Le Y, *et al.* Preparation of Ultrafine Beclomethasone Dipropionate Drug Powder by Antisolvent Precipitation. *Ind Eng Chem Res* 2007;**46**:4839–45. doi:10.1021/ie0615537
- 27 Rasenack N, Steckel H, Müller BW. Micronization of Anti-Inflammatory Drugs for Pulmonary Delivery by a Controlled Crystallization Process. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2003;**92**:35–44. doi:10.1002/jps.10274
- 28 Beck C, Sievens-Figueroa L, Gärtner K, *et al.* Effects of stabilizers on particle redispersion and dissolution from polymer strip films containing liquid antisolvent precipitated griseofulvin particles. *Powder Technology* 2013;**236**:37–51. doi:10.1016/j.powtec.2012.05.047

- 29 Belkacem N, Sheikh Salem MA, AlKhatib HS. Effect of ultrasound on the physico-chemical properties of poorly soluble drugs: Antisolvent sonocrystallization of ketoprofen. *Powder Technology* 2015;**285**:16–24. doi:10.1016/j.powtec.2015.06.058
- 30 Gazaille C, Sicot M, Akiki M, *et al.* Characterization of Biological Material Adsorption to the Surface of Nanoparticles without a Prior Separation Step: a Case Study of Glioblastoma-Targeting Peptide and Lipid Nanocapsules. *Pharm Res* 2021;**38**:681–91. doi:10.1007/s11095-021-03034-8
- 31 Dubochet J, McDowell AW. VITRIFICATION OF PURE WATER FOR ELECTRON MICROSCOPY. *Journal of Microscopy* 1981;**124**:3–4. doi:10.1111/j.1365-2818.1981.tb02483.x
- 32 Wishart DS, Guo A, Oler E, *et al.* HMDB 5.0: the Human Metabolome Database for 2022. *Nucleic Acids Res* 2021;**50**:D622–31. doi:10.1093/nar/gkab1062
- 33 Li Y, Zhao L, Zhao Q, *et al.* Ursolic acid nanoparticles for glioblastoma therapy. *Nanomedicine* 2023;**50**:102684. doi:10.1016/j.nano.2023.102684
- 34 Förster T. Experimentelle und theoretische Untersuchung des zwischenmolekularen Übergangs von Elektronenanregungsenergie. *Zeitschrift für Naturforschung A* 1949;**4**:321–7. doi:10.1515/zna-1949-0501
- 35 Stryer L, Haugland RP. Energy transfer: a spectroscopic ruler. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1967;**58**:719–26. doi:10.1073/pnas.58.2.719
- 36 Okamoto K, Sako Y. Recent advances in FRET for the study of protein interactions and dynamics. *Curr Opin Struct Biol* 2017;**46**:16–23. doi:10.1016/j.sbi.2017.03.010
- 37 Bastiat G, Pritz CO, Roider C, *et al.* A new tool to ensure the fluorescent dye labeling stability of nanocarriers: a real challenge for fluorescence imaging. *J Control Release* 2013;**170**:334–42. doi:10.1016/j.jconrel.2013.06.014

Chapitre 6

Pistes d'amélioration des nanoprecipités d'acide ursolique pour la prise en charge des patients atteints de glioblastome résistant au témozolomide : le ciblage et le dépôt local

Table des matières

INTRODUCTION	159
MATERIELS ET METHODES	161
1. Matériels	161
2. Nanoprecipités d'acide ursolique, associés ou non au peptide NFL	161
3. Hydrogels chargés en nanoprecipités d'AU	162
4. Quantification de l'AU	162
5. Distribution de tailles des nanoprecipités d'AU	163
6. Caractérisation rhéologique des hydrogels chargés de nanoprecipités d'AU	163
7. Cryomicroscopie électronique en transmission	164
8. Diffraction des rayons X.....	164
9. Étude de la libération <i>in vitro</i>	164
10. Caractérisation de la diffusion des nanoprecipités dans les hydrogels en utilisant la technique de <i>Fluorescence Recovery After Photobleaching</i> (FRAP)	164
11. Stabilité des nanoprecipités d'AU dans l'hydrogel et dans l'aCSF à 37 °C, en utilisant le transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET).....	165
12. Culture cellulaire.....	166
13. Internalisation des nanoprecipités dans les cellules T98G	166
14. Viabilité cellulaire	166
15. Analyses statistiques	167
RESULTATS ET DISCUSSION	168
1. Formulation et caractérisation des AU-NPs et leurs dérivés	168
2. Adsorption du peptide NFL sur les AU-NPs et AUS-NPs	173
3. Internalisation	175
4. Propriétés rhéologiques des hydrogels chargés en AU-NPs et AUS-NPs	176
5. Étude de la libération <i>in vitro</i> des nanoprecipités à partir de l'hydrogel, et étude de leur comportement dans l'hydrogel	179
6. Stabilité des nanoprecipités dans l'hydrogel de poloxamères et dans du liquide céphalorachidien simulé.	182
7. Cytotoxicité des nanoprecipités après dissolution des hydrogels de poloxamères.	184
CONCLUSION	187
BIBLIOGRAPHIE	188

Introduction

Le glioblastome (GBM) est le cancer du cerveau le plus fréquent et il représente la moitié des tumeurs malignes du système nerveux central [1]. Il est considéré comme un cancer du cerveau très agressif et est classé comme une tumeur de gliome de grade IV selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) [2]. Même si le GBM a un faible taux d'incidence (environ 3,23 pour 100 000), la médiane de survie des patients atteints de GBM est de 8 mois avec un taux de survie à un an de 42,8 % et un taux de survie à cinq ans de 7,2 % [3]. Le GBM est caractérisé biologiquement par une forte migration, plasticité, infiltration cellulaire et hétérogénéité inter-patient [4]. Les caractéristiques biologiques du GBM ainsi que sa localisation anatomique dans le cerveau limitent considérablement les options de traitement. Le franchissement de la barrière hémato-encéphalique (BHE) est considéré comme un défi majeur pour la plupart des traitements disponibles en clinique [5].

Jusqu'à présent, il n'y a que très peu de traitements approuvés par la *Food and Drug Administration* (FDA) contre le GBM nouvellement diagnostiqué, et ils sont fréquemment associés à de forts effets secondaires [6]. L'approbation la plus récente de la FDA pour un traitement systémique contre le GBM, avec une toxicité systémique modérée, est le témozolomide (TMZ). Le TMZ est un agent alkylant non spécifique et une prodrogue qui fonctionne par la méthylation de la position 6-O de la guanine, provoquant une réparation inadéquate dans l'ADN [7]. En 2005, Stupp *et al.* ont montré que l'application de TMZ parallèlement à la radiothérapie entraîne une augmentation de la médiane de survie à 14,6 mois avec un taux de survie à 5 ans de 10 % [8]. Depuis lors, le protocole Stupp a été considéré comme le protocole standard de soins pour GBM. Il commence par la chirurgie pour la résection tumorale maximale, suivie de 6 semaines de radiothérapie combinée avec TMZ, puis 6 mois de TMZ seul [9]. Malheureusement, ce protocole n'élimine pas complètement le GBM et une récurrence tumorale est observée dans la plupart des cas [10].

La récurrence tumorale du GBM est caractérisée par une résistance élevée aux agents chimiothérapeutiques, en particulier aux agents alkylants tels que le TMZ. Ceci est dû à la forte expression de la protéine 6-O-méthylguanine-ADN-méthyltransférase (MGMT) [11]. La MGMT est une enzyme qui répare l'ADN en enlevant les groupes alkyles de la position 6-O de la guanine ce qui neutralise les dommages causés par le TMZ dont le mécanisme d'action est la création d'adduits méthylés sur l'ADN [12]. Il a été montré que la raison derrière l'expression élevée de MGMT dans la récurrence de tumeur de GBM pourrait être liée à la sélection spontanée des cellules surexprimant la MGMT pendant l'exposition à la chimiothérapie [13]. Ainsi, plusieurs approches ont été suggérées pour contrer la chimiorésistance du GBM causée par la forte expression de MGMT. Ces approches comprennent l'augmentation de la dose ou de la fréquence d'administration de TMZ et l'accent mis sur le développement de pseudo-substrats pour la MGMT. Cependant, les deux approches provoquent une toxicité systémique élevée [14].

Une approche alternative se concentre sur l'utilisation d'agents thérapeutiques pour réguler l'expression de la MGMT, et ainsi améliorer l'efficacité du TMZ [15]. Il a été constaté que l'un des agents prometteurs à utiliser pour cette approche est l'acide ursolique (AU). L'AU est un acide de triterpène pentacyclique d'origine naturelle

que l'on trouve largement dans les herbes et les plantes médicinales [16]. Il a diverses propriétés pharmacologiques, y compris des activités anti-inflammatoires, antioxydantes, antivirales et anticancéreuses. Il a été démontré que l'AU peut être utilisé pour lever la chimiorésistance due à la MGMT dans plusieurs types de cancer [17–19], et notamment dans le GBM en améliorant l'efficacité du TMZ *in vitro* et *in vivo* [20]. Le mécanisme complet d'action de l'AU n'est pas complètement compris, cependant il a été supposé que l'AU peut inhiber la phosphorylation du facteur de transcription STAT3 qui est associé à la régulation de l'expression de la MGMT [21].

L'administration pharmaceutique d'AU est un défi majeur, car il se caractérise par une lipophilie élevée et une faible biodisponibilité. L'utilisation de méthodes de nanotechnologie pour produire des nanomédicaments peut être très bénéfique pour développer une formulation efficace pour l'AU [22]. Néanmoins, comme traité dans le chapitre précédent, nous avons mis au point une méthode simple de nanopréciptation par effet antisolvant pour préparer des nanopréciptés d'AU (AU-NPs). Celle-ci est particulièrement intéressante. Cette méthode permet la production d'une suspension nanométrique d'actif pur (capacité de charge de 100%), sans utilisation d'excipients, et avec une utilisation minimale de solvants organiques. De plus, la forme AU-NPs renforce la capacité de l'AU à inhiber l'expression de la MGMT. Néanmoins, la stratégie d'administration mérite encore d'être explorée.

Pour améliorer l'efficacité de l'AU et réduire sa toxicité systémique, des stratégies de libération locales peuvent être envisagées. Étant donné que le protocole de soins standard pour le GBM implique la chirurgie, c'est l'occasion de pouvoir administrer localement des médicaments et d'éviter les défis rencontrés lors du franchissement de la barrière hémato-encéphalique (BHE). Il est également possible d'améliorer la délivrance de l'AU en y ajoutant une composante de ciblage par l'ajout de ligands à la surface des AU-NPs. L'ajout de ces ligands pourrait permettre de cibler activement le GBM de manière générale, que ce soit par le ciblage des cellules tumorales en elles-mêmes, le ciblage des cellules souches de GBM, des cellules myéloïdes associées aux tumeurs ou bien de la matrice extracellulaire [23]. Ces deux stratégies peuvent tout à fait être combinées en proposant une application locale et ciblée.

Nous avons décidé d'explorer ces deux pistes d'amélioration afin de renforcer le ciblage des AU-NPs et de vérifier la possibilité de formuler un hydrogel capable de libérer de manière prolongée les AU-NPs. Dans un premier temps, nous avons envisagé d'adsorber à la surface des AU-NPs le peptide *NFL-TBS.40-63* (NFL), qui a déjà montré des propriétés intéressantes pour cibler les cellules de GBM [24–28]. Afin d'améliorer l'adsorption, un lipide : le sulfate de cholestérol, a été combiné aux nanopréciptés. Après caractérisation de ces nouveaux nano-systèmes et évaluation de l'adsorption du peptide NFL, nous avons vérifié l'amélioration de l'internalisation dans les cellules de GBM surexprimant la MGMT (lignée cellulaire T98G). Puis nous avons examiné la capacité de ces nanopréciptés à être chargés dans des hydrogels de poloxamères. Après avoir estimé les changements des propriétés mécaniques dans les hydrogels post chargement par les nanopréciptés, la libération prolongée des nanopréciptés à partir de ces hydrogels a été examinée. Leur stabilité a aussi été vérifiée, dans les hydrogels et dans du liquide céphalorachidien simulé, par la technique de transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET). Finalement, une étude préliminaire d'interaction avec des cellules de GBM (cytotoxicité) lorsque les nanopréciptés ont été libérés de l'hydrogels a été menée afin de vérifier l'impact des poloxamères.

Matériels et Méthodes

1. Matériels

L'acide ursolique (AU), le sulfate de cholestérol (SChol), le poloxamère 407 (P407), le poloxamère 188 (P188), la fluorescéine, le chlorure de potassium (KCl), le chlorure de sodium (NaCl), chlorure de magnésium ($MgCl_2$), chlorure de calcium ($CaCl_2$), l'hydrogénophosphate de sodium (Na_2HPO_4), la dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4), le déoxycholate de sodium, le D-glucose, l'acide L-ascorbique et l'albumine de sérum bovin (BSA), ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Le méthanol, l'acide trifluoroacétique, le perchlorate de 1,1'-dioctadécyl-3,3,3',3'-tétraméthylindocarbocyanine (DiI) et le 4-chlorobenzenesulfonate 1,1'-dioctadécyl-3,3,3',3'-tétraméthylindocarbocyanine (DiD) ont été fournis par Fisher Scientific (Loughborough, Royaume-Uni). L'eau a été fournie par le système Milli-Q plus (Millipore, Paris, France). Le peptide NFL a été synthétisé par PolyPeptide (Strasbourg, France).

2. Nanoprécipités d'acide ursolique, associés ou non au peptide NFL

L'AU a été formulé sous forme de nanoprécipités en utilisant une méthode de précipitation par effet antisolvant. Brièvement, 10 mg d'UA ont été dissous dans 1,5 mL de méthanol. Puis cette phase organique a été ajoutée goutte à goutte dans 10 mL d'eau et sous agitation (barreau aimanté à environ 600 tr/min). Le solvant est ensuite évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif pour obtenir une suspension finale de nanoprécipités d'AU (AU-NPs). Le SChol a été ajouté dans la phase organique (de 1 à 5% (m/m_{AU})) pour agir comme un lipide aidant (*helper lipid*). Le même procédé de formulation que précédemment a été utilisé pour obtenir des nanoprécipités contenant du SChol (AUS-NPs). Enfin, des nanoprécipités marqués par fluorescence ont été préparés en ajoutant du DiI, du DiD ou les deux dans la phase organique de la formulation à 1% (m/m_{AU}). Le même processus de formulation a été utilisé pour formuler les AU-NPs contenant du DiI sans ou avec SChol (AU-NPs-DiI ou AUS-NPs-DiI respectivement), du DiD sans ou avec SChol (AU-NPs-DiD ou AUS-NPs-DiD respectivement) ou du DiI et du DiD sans ou avec SChol (AU-NPs-FRET ou AUS-NPs-FRET respectivement). Les échantillons ont été conservés à 4 °C avant leur utilisation.

Pour associer le peptide NFL aux nanoprécipités, 700 μ L de suspension d'AU-NPs ou AUS-NPs ont été mélangés avec 300 μ L d'une solution de peptide NFL à température ambiante sous agitation (barreau aimanté à environ 100 tr/min), à différents rapports massiques AU / NFL allant de 0,33 à 66,67% (m/m). Les échantillons ont été conservés à 4 °C avant leur utilisation.

3. Hydrogels chargés en nanoprecipités d'AU

Un système d'hydrogel thermosensible a été formulé en utilisant deux poloxamères dans du PBS 1X : le P407 et le P188 à 18% et 4,5% (*m/m*), respectivement. Afin de préparer un échantillon d'hydrogel de 2 mL, 360 mg de P407 et 90 mg de P188 ont été pesés, 200 µL de PBS 10X ont été ajoutés, suivis de 1,8 mL d'eau pour avoir une concentration finale de PBS 1X. Pour charger l'hydrogel avec des nanoprecipités, une quantité appropriée de suspensions d'AU-NPs ou AUS-NPs a été ajoutée dans le PBS 10X pour atteindre la concentration finale requise en NPs (0,5 ou 1 mg/mL), puis le volume restant d'eau a été ajouté pour avoir une concentration finale de PBS 1X. Enfin, les tubes ont été placés sous forte agitation à 4 °C pendant au moins 72 h. Les suspensions poloxamères / NPs ont été conservées à 4 °C jusqu'à utilisation.

4. Quantification de l'AU

La concentration d'AU dans chaque suspension d'AU-NPs et AUS-NPs a été quantifiée à l'aide d'un appareil Acquity® H-Class Bio UPLC (Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Les suspensions d'AU-NPs et d'AUS-NPs ont été diluées dans du méthanol (facteur de dilution 5) pour permettre la solubilisation de l'AU. La séparation des constituants a été réalisée à l'aide d'une colonne Acquity UPLC® BEH C18 1,7 µm (2,5 x 50 mm) à 40 °C, avec une phase mobile sous condition isocratique : méthanol + acide trifluoroacétique 0,1 % (v/v) / eau déionisée + acide trifluoroacétique 0,1 % (v/v) 85 / 15 (v/v). Le débit a été maintenu à 0,3 mL/min, le volume d'injection à 10 µL, et la détection a été faite par spectroscopie UV (longueur d'onde : 210 nm). La colonne a été laissée sous flux continu pendant 1 heure pour sa stabilisation, puis la durée de l'analyse pour chaque échantillon a été fixée à 5 min (avec un cycle de nettoyage après chaque échantillon). La quantification de l'AU a été réalisée à l'aide d'une courbe étalon d'AU dans un mélange eau désionisée / méthanol 20 / 80 (v/v) (concentrations allant de 50 à 500 µg/mL) et en quantifiant l'aire sous le pic (coefficient de détermination $R^2 = 0,9993 \pm 0,0008$, $n = 7$).

La quantification de la fraction libre de NFL dans les formulations d'AU-NPs et d'AUS-NPs en présence de NFL a été réalisée par la même méthode que celle de Gazaille *et al.* [29]. Les suspensions ont été filtrées à 0,22µm. La séparation du NFL a été faite sur une colonne Acquity UPLC® Protein BEH SEC column ,200 Å, 1,7µm, 4,6 mm x 300 mm, précédée une pré-colonne (Acquity UPLC® Protein BEH SEC Guard Column, 200 Å, 1,7µm, 4,6 mm x 30 mm, 10 K-500 K) à température ambiante avec une phase mobile composée d'une solution de NaCl à 0,1M, avec un débit de 0,3 mL/min et un volume d'injection de 10 µL. Le NFL a été détecté par spectroscopie UV à 220 nm. La quantification du NFL a été réalisée à l'aide d'une courbe étalon de NFL dans de l'eau désionisée (concentrations allant de 0,05 à 0,8 mg/mL) et en quantifiant l'aire sous le pic ($R^2 > 0,9900$).

5. Distribution de tailles des nanoprécipités d'AU

La diffusion dynamique de la lumière (DLS) a été utilisée pour évaluer la distribution de tailles : Z-average (Z-ave) et indice de polydispersité (PdI), ou diamètre hydrodynamique (distribution en nombre), et le potentiel zêta (PZ) pour les suspensions AU-NPs et AUS-NPs associées ou non au peptide NFL. Les échantillons ont été mesurés sans dilution à l'aide du Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, Worcestershire, Royaume-Uni) qui est équipé d'un faisceau laser hélium-néon 633 nm et d'un angle de diffusion fixé à 173°. Les fonctions de corrélation ont été ajustées à l'aide d'un ajustement exponentiel : approche des cumulants pour les déterminations du Z-ave et du PdI, ou approche CONTIN pour la détermination du diamètre hydrodynamique (distribution en nombre). L'approximation de Smoluchowski a été utilisée pour déterminer la mobilité électrophorétique requise pour la détermination du PZ. Toutes les mesures ont été effectuées à 25 °C.

La distribution de tailles a également été réalisée par l'analyse de suivi des nanoparticules été réalisée à l'aide du Particle Metrix ZetaView PMX-120 (Excilone, Meerbusch, Allemagne), équipé d'un laser à 488 nm. Les distributions de tailles des suspensions d'AU-NPs, AUS-NPs, AU-NPs-DiI, AUS-NPs-DiI NPs, AU-NPs-DiD, AUS-NPs-DiD, AU-NPs-FRET, AUS-NPs-FRET ont été mesurées après une dilution par un facteur d'environ 100 dans de l'eau déionisée pour atteindre le nombre optimal de particules par image dans le mode de diffusion (50-200 particules). L'analyse a été menée à travers les 11 positions de la cellule pour obtenir le mode, la médiane et la moyenne du diamètre hydrodynamique issu d'une distribution en nombre.

6. Caractérisation rhéologique des hydrogels chargés de nanoprécipités d'AU

Les propriétés rhéologiques des échantillons d'hydrogel ont été évaluées à l'aide d'un rhéomètre Kinexus (Malvern Panalytical, Worcestershire, Royaume-Uni) avec une géométrie de cône-plan (diamètre : 40 mm, angle : 2°). Un balayage en amplitude d'oscillation de déformation de cisaillement (de 0,01% à 100%) a été réalisé à fréquence d'oscillation constante (1Hz), à 37 °C, de façon à déterminer le régime linéaire des propriétés viscoélastiques. Dans ce régime (amplitude d'oscillation de déformation de cisaillement constante de 0,1%), les modules élastiques (G') et visqueux (G'') caractérisant les propriétés viscoélastiques des matériaux ont été mesurés en fonction de la fréquence d'oscillation (de 0,1 à 10 Hz), avant gélification à 20 °C et après gélification à 37 °C. Pour déterminer la température de gélification, G' et G'' ont été mesurés en fonction de la température de 20 °C à 37 °C avec une augmentation de la température de 0,5 °C/min, à une amplitude d'oscillation de déformation de cisaillement constante de 0,1% et une fréquence d'oscillation de 1Hz.

7. Cryomicroscopie électronique en transmission

La vitrification de l'échantillon d'AUS-NPs a été effectuée à l'aide d'un congélateur à piston automatique (EM GP, Leica) sous humidité et température contrôlées [30]. Les échantillons ont été déposés sur des grilles de microscope électronique *glow-discharged*, suivi d'un tamponnage et d'une vitrification par congélation rapide et ont été observés à l'aide d'un microscope électronique de 200 kV (Tecnai G² T20 Sphera, FEI) équipé d'une caméra 4k × 4k CCD (XF416, TVIPS). Les micrographes ont été acquis sous de faibles doses d'électrons en utilisant la caméra en mode *binning* 1 et à un grossissement nominal de 25 000 x.

8. Diffraction des rayons X

Les données de diffraction de rayons X ont été collectées sur un diffractomètre D8 Bruker (Cu K α , $\lambda = 1,54184 \text{ \AA}$) (Billerica, MA, États-Unis) équipé avec un détecteur linéaire haute-vitesse Vantec. Les poudres ont été insérées dans des supports et pressées avec une lame en verre. Les diffractogrammes ont été obtenus à température ambiante sur une plage de 2θ allant de 5 à 42° avec un pas de 0,0197°.

9. Étude de la libération *in vitro*

La libération d'AU-NPs ou d'AUS-NPs à partir de l'hydrogel a été étudiée avec du liquide céphalorachidien artificiel (aCSF) (NaCl 1,535 g, KCl 0,055 g, MgCl₂ 0,11 g, CaCl₂ 0,065 g, Na₂HPO₄ 0,015 g, D-glucose 0,15 g, acide L-ascorbique 0,05 g et BSA 0,075 g), eau déionisée 250mL à 37 °C (pH = 7,35 ± 0,05) à 37 °C. Deux mL d'hydrogel contenant des AU-NPs-FRET et des AUS-NPs-FRET, à des concentrations finales de 0,5 ou 1 mg/mL ont été incubés à 37 °C pendant la nuit pour former la rigidité requise avant d'ajouter le aCSF. Une fois gélifié, une quantité équivalente d'aCSF a été ajoutée (rapport 1/1 (v/v)), puis les échantillons ont été conservés dans l'incubateur à 37 °C sans agitation. Les surnageant ont été enlevés après différents temps d'incubation, les hydrogels ont été pesés et la quantité d'AU restante dans les hydrogels a été quantifiée à l'aide de l'UPLC.

10. Caractérisation de la diffusion des nanoprécipités dans les hydrogels en utilisant la technique de *Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP)*

Des expériences de FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) ont été réalisées sur un microscope confocal Leica TCS SP8 AOBS (Leica Microsystems, Wetzlar, Allemagne) équipé d'un objectif Fluotar 10x/NA 0.30 HC PL. Brièvement, quelques gouttes d'hydrogel contenant des AU-NPs-FRET ou AUS-NPs-FRET ont été déposées sur des lames de verre (75 x 26 mm) et analysées à environ 37 °C. Un échantillon d'hydrogel

témoin a été préparé avec de la fluorescéine sans nanoprécipté. Les images FRAP ont été acquises avec un zoom de 3,5x. Le sténopé a été réglé pour générer une résolution XY de 0,65 µm et une résolution Z de 4,8 µm. La région d'intérêt pour l'impulsion de photoblanchiment a été définie dans un cercle de 40 µm de diamètre, placé au centre de chaque image. Le photoblanchiment a été effectué en une seule étape avec le répartiteur de faisceau acousto-optique réglé sur une transmission de 100 % pour cinq lignes laser d'ions argon (458 nm (5 mW), 476 nm (4 mW), 488 nm (40 mW), 496 nm (6 mW) et 514 nm (10 mW)). L'efficacité de photoblanchiment a été augmentée en minimisant le champ d'acquisition et en concentrant la lumière de sortie laser dans la région de photoblanchiment à l'aide de la fonction Leica Zoom-In, et en concentrant l'intensité lumineuse dans le point focal à l'aide de l'amplificateur Leica FRAP. Le couple FRET a été excité avec le laser à ions argon à 514 nm (10 mW) tandis que la fluorescéine a été excitée avec le laser à ions argon à 488 nm (40 mW). Des émissions de fluorescence ont été détectées de 492 à 550 nm pour la fluorescéine et de 637 à 750 nm pour le couple FRET. Les images post-photoblanchiment ont été capturées toutes les cinq secondes pendant cinq min, 0,65 seconde après la séquence de photoblanchiment. La fréquence d'acquisition pour l'acquisition d'images avant et après photoblanchiment était de 400 Hz.

11. Stabilité des nanopréciptés d'AU dans l'hydrogel et dans l'aCSF à 37 °C, en utilisant le transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET)

Dans un premier temps, l'effet FRET a été mesurée à l'aide du spectrofluoromètre FluoroMax-4 (Horiba, Kyoto, Japon) sur des suspensions AU-NPs-FRET, AUS-NPs-FRET et des hydrogels contenant des AU-NPs-FRET ou des AUS-NPs-FRET dissous dans différents pourcentages de méthanol (0-80% (v/v)). Puis, la stabilité des AU-NPs et des AUS-NPs dans l'hydrogel et dans l'aCSF a été évaluée après incubation à 37 °C durant 20 jours. Les spectres d'émission de fluorescence ont été mesurés à température ambiante avec une longueur d'onde d'excitation de 520nm. Le signal FRET induit par la proximité du donneur (DiI) et de l'accepteur (DiD) a été utilisé pour évaluer l'intégrité des AU-NPs-FRET en utilisant le rapport d'efficacité de FRET calculé avec la formule suivante :

$$\text{Rapport d'efficacité de FRET} = \frac{I_{DiD}}{I_{DiI} + I_{DiD}}$$

où I_{DiI} correspond à l'intensité maximale du spectre d'émission du donneur (DiI) (longueur d'onde de 569 nm) et I_{DiD} correspond à l'intensité maximale du spectre d'émission de l'accepteur (DiD) (longueur d'onde de 680 nm).

12. Culture cellulaire

Les lignées cellulaires U-87 MG et T98G (ATCC, Manassas, VA, Etats-Unis) ont été cultivées dans du milieu *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France), supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal (Biowest, Nuaille, France) et de 1% d'antibiotiques (10 unités de pénicilline et 10 mg de streptomycine) (Biowest, Nuaille, France). Les cellules ont été cultivées dans des flacons de 75 cm³ et incubées à 37 °C sous atmosphère humide avec 5% de CO₂.

13. Internalisation des nanoprecipités dans les cellules T98G

Les cellules T98G ont étéensemencées dans des plaques 6 puits à une densité de 100 000 cellules par puit et incubées à 37 °C et 5% de CO₂ pendant 24h. Les cellules ont ensuite été traitées pendant 3, 6 ou 24h avec des suspensions d'AU-NPs ou d'AUS-NPs associées ou non du NFL (3,33% (m/m_{AU})). Au terme des traitements, les cellules ont été lavées avec du PBS 1X froid puis ont été trypsinées (trypsin-EDTA 1X (Biowest, France)) pendant 5 min à 37 °C et suspendues à nouveau dans du PBS 1X. Les cellules ont été centrifugées à 150 g pendant 3 min puis à nouveau suspendues dans du PBS 1X froid. Cette étape de lavage a été répétée 3 fois. L'analyse par cytométrie en flux a été effectuée sur un Cytoflex LX (Beckman Coulter, Villepinte, France) avec environ 10 000 cellules analysées par échantillon. Le DiI a été excité à 488nm et collecté avec un filtre 610/20 nm ; le DiD a été excité à 633 nm et collecté avec un filtre 660/10 nm ; et le FRET a été excité à 488 nm et collecté avec un filtre 660/10 nm.

14. Viabilité cellulaire

Pour les essais de viabilité cellulaire, les cellules ont étéensemencées dans des plaques de 96 puits à une densité de 5 000 cellules/puit ou 4 000 cellules/puit pour les lignées cellulaires U-87 MG et T98G, respectivement. Les cellules ont été laissées en prolifération pendant 24 h, puis 100 µL de diverses concentrations (de 1,5 à 20 µg/mL) de AU-NPs, de AUS-NPs, d'hydrogels contenant des AU-NPs ou des AUS-NPs (dissous dans le milieu de culture) ont été ajoutés aux cellules. Après 72 h, le milieu contenant le traitement a été retiré, les cellules ont été lavées avec du PBS 1X, puis 100 µL de résazurine (25 µg/mL) ont été ajoutés dans chaque puit. La fluorescence de chaque puit a été mesurée en utilisant un lecteur de plaque CLARIOstar Plus (BMG Labtech SARL, Champsigny-sur-Marne, France) à des longueurs d'onde d'excitation et d'émission fixées à 560 et 590 nm, respectivement. La viabilité cellulaire (exprimée en pourcentage) a été calculée grâce à l'équation suivante :

$$\text{Viabilité cellulaire (\%)} = \frac{I_{F \text{ cellules traitées}} - I_{F \text{ puit vide}}}{I_{F \text{ cellules non-traitées}} - I_{F \text{ puit vide}}} \times 100$$

avec I_F cellules traitées, I_F cellules non-traitées et I_F puit vide les intensités de fluorescence des puits comprenant les cellules ayant subi un traitement (AU-NPs et AUS-NPs issus de la dissolution des hydrogels ou non), des puits comprenant des cellules n'ayant pas subi de traitement (milieu de culture, contrôle négatif), et des puits vides, respectivement

15. Analyses statistiques

Tous les résultats sont exprimés par les paramètres statistiques moyenne et écart-type. L'ANOVA 1F et le test post-hoc de Tukey ont été effectués pour comparer les valeurs Z-ave, PZ et CI50. Le coefficient de corrélation de rang de Spearman a été utilisé pour évaluer le degré d'association entre la libération d'AU et la dissolution des hydrogels. La différence entre deux groupes a été définie comme significative lorsque la valeur du seuil de significativité p était inférieure à 0,05.

Résultats et discussion

1. Formulation et caractérisation des nanoprecipités d'AU en présence de Schol

Le peptide NFL (site de liaison de la tubuline sur la sous-unité des neurofilaments légers) est un peptide qui possède des propriétés d'internalisation spécifique des cellules de GBM (lignées cellulaires 9L, F98, GL261, T98G et U-87 MG) *in vitro* [24–28], et est capable d'inhiber la prolifération cellulaire en bloquant la polymérisation des microtubules [24]. Sur un modèle murin porteur d'une tumeur de type GBM orthotopique (lignée cellulaire F98), les effets antiprolifératifs ont été observés tout en préservant les cellules saines, telles que les astrocytes ou les neurones [26]. Bien que la propriété antiproliférative du peptide NFL semble dépendre de la concentration, sa capacité de ciblage est préservée à de faibles concentrations. En effet, le peptide NFL peut être partiellement adsorbé à la surface de nanocapsules lipidiques (NCLs) par une simple incubation à température ambiante [28,29,31]. La présence du peptide NFL à leur surface a significativement augmenté l'absorption des NCLs dans les cellules GBM *in vitro* (lignées cellulaires GL261, U-87 MG et F98) par rapport aux NCLs sans peptide. De plus, lorsque les nanocapsules lipidiques ont été chargées de paclitaxel ou de la gemcitabine, la fonctionnalisation par le NFL a réduit de manière significative la prolifération et/ou la viabilité de ces lignées cellulaires par rapport aux NCLs non fonctionnalisées [28,32]. Cette preuve de concept de ciblage actif *in vitro* a été confirmée *in vivo*. L'administration intratumorale de la suspension de NCLs, fonctionnalisées par le peptide NFL et chargées de paclitaxel, à des souris porteuses d'un GBM orthotopique (lignée cellulaire GL261) a réduit de manière significative la progression de la tumeur, et une analyse immunohistochimique a confirmé la localisation préférentielle *in vivo* des NCLs fluorescentes dans la tumeur [28]. De plus, l'association du peptide NFL à un hydrogel de NCLs chargées de gemcitabine, utilisé comme implant post-résection d'un GBM (lignée cellulaire U-87 MG) chez un modèle murin orthotopique, a permis de décaler de manière significative l'apparition des récurrences par rapport à un hydrogel de NCLs chargées de gemcitabine mais sans le peptide de ciblage. Cette meilleure efficacité est due à l'accumulation préférentielle des NCLs libérées de l'hydrogel dans les cellules résiduelles de GBM post-résection par la présence du peptide NFL, confirmé par une étude de biodistribution intracérébrale [32]. Ainsi, il pourrait être intéressant d'associer le peptide NFL aux AU-NPs afin d'améliorer le ciblage des cellules de GBM.

L'association du peptide NFL sur des nanosystèmes est régi par tout un ensemble d'interactions, mais l'interaction majeure semble être une interaction électrostatique. En effet, le peptide NFL a été rapporté comme étant légèrement chargé positivement, avec deux résidus arginine dans sa séquence peptidique [24,25], et nous avons mis en évidence dans une précédente publication que le peptide NFL était capable de s'adsorber totalement et instantanément sur des NCLs chargées négativement [29]. Un contrôle avec des NCLs chargées positivement avait montré l'absence d'adsorption du peptide NFL. Comme vu dans le chapitre précédent, les AU-NPs en suspension ont un PZ négatif qui serait dû à un effet du pH et la forme basique et chargée de l'AU. Néanmoins, ces charges ne sont que transitoires, résultant d'un équilibre acido-basique, et nous avons décidé de chercher à

formuler des AU-NPs en y incorporant du SChol, qui a un groupement sulfate chargé négativement de manière permanente. De plus la « ressemblance » structurale de l'AU et de SChol a aussi été décisive dans cette décision.

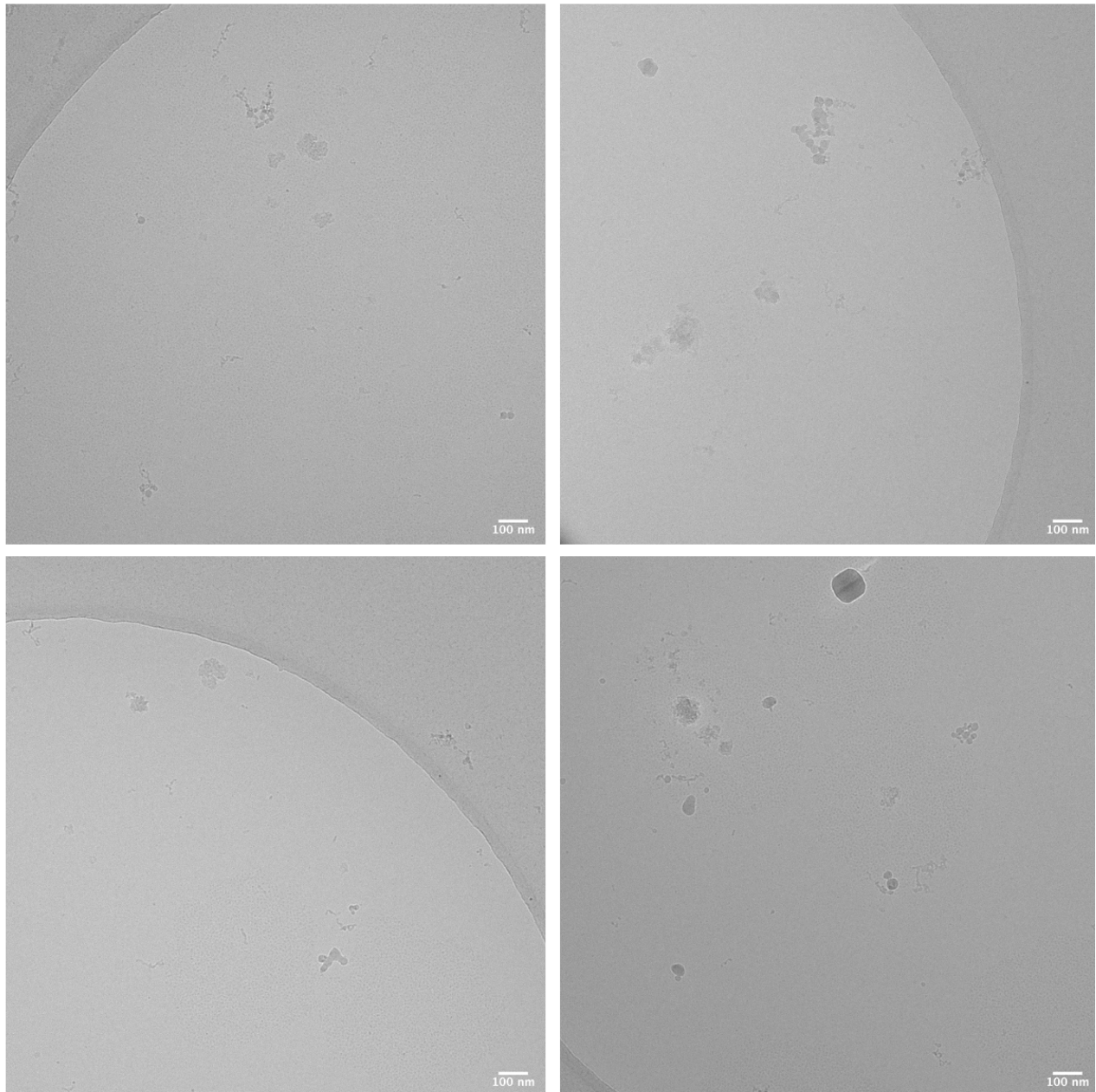


Figure 6-1. Les images de cryomicroscopie électronique en transmission confirment la présence et la distribution de tailles des AUS-NPs.

La méthode de nanoprécipitation par effet antisolvant développée dans le chapitre précédent a également été considérée pour la formulation de ces nano-objets, avec différents mélanges AU et SChol tels que la proportion en SChol soit de 1, 2 et 5% (m/m_{AU}). À la suite de la formulation, un trouble a été observé, similaire à celui observé pour les AU-NPs sans SChol. La diffusion dynamique de la lumière (DLS) a été utilisée pour évaluer la distribution de tailles : Z-ave et PdI, ainsi que le PZ, pour les nano-objets d'AU et de SChol formulés, après évaporation du méthanol. De plus, la quantité finale d'AU dans les formulations a été quantifiée par

chromatographie. Comme le montre le tableau 6-1, les valeurs de Z-ave de toutes les suspensions contenant du SChol sont toutes inférieures à celle des AU-NPs en suspensions ($p = 0,0008$ pour le SChol ajouté à 1% (m/m_{AU})) ce qui est confirmé par les images de cryomicroscopie (figure 6-1), avec des valeurs de PdI comparables. De plus, il y a une diminution significative des valeurs de PZ dès que le SChol est ajouté aux AU-NPs ($p = 0,005$ pour le SChol ajouté à 1% (m/m_{AU})), effet attendu avec l'ajout de charges négatives supplémentaires. La distribution de tailles légèrement plus petite pour ces nanosystèmes peut aussi être expliquée par la contribution des charges négatives supplémentaires puisque nous avons supposé dans le chapitre précédent que l'association dans le nanoprécipité se faisait par un équilibre attraction (hydrophobicité des molécules) / répulsion (charge négatives). Ainsi, en déplaçant cet équilibre du côté de la répulsion, les nanoprécipités deviennent plus petits pour contrebalancer cet effet. On retrouve des rendements de nanoprécipitation en AU proches de ceux obtenus pour les AU-NPs lorsque le SChol est ajouté à 1% (m/m_{AU}), soit environ 75%. Finalement, un spectre de poudre par diffraction des rayons X a également été réalisé sur les nano-objets d'AU et de SChol après lyophilisation et comparé à l'AU et au SChol non formulé. Comme pour les AU-NPs, une perte de cristallinité est observée pour les nano-objets comparativement au produit initial (figure 6-2), et celle-ci n'est pas récupérée post lyophilisation. Ainsi, pour la suite, nous allons dans ce cas-là aussi préférer appeler ces nano-objets des nanoprécipités d'AU et de SChol (AUS-NPs) plutôt que des nanocristaux, et nous allons continuer à travailler avec ceux composés d'une proportion minimale de SChol, soit 1% (m/m_{AU}).

Tableau 6-1. Les AUS-NPs ont une distribution de tailles plus petite que les AU-NPs. Distribution de tailles (Z-ave et PdI), ZP et rendement de nanoprécipitation en AU des suspensions d'AU-NPs et d'AUS-NPs formulés avec des proportions en SChol variant de 0 à 5% (m/m_{AU}) ($n = 2-10$; moyenne \pm écart-type).

SChol (% m/m_{AU})	Z-ave (nm)	PdI	PZ (mV)	Rendement de nanoprécipitation en AU (%)
0 ^a	194 \pm 9	0,24 \pm 0,03	-26 \pm 1	66 \pm 8
1 ^b	129 \pm 8	0,32 \pm 0,02	-41 \pm 5	72 \pm 16
2 ^c	120 \pm 26	0,20 \pm 0,03	-39 \pm 4	n.d.
5 ^c	137 \pm 6	0,18 \pm 0,06	-48 \pm 1	n.d.

n.d. : non déterminé

a) $n = 10$; b) $n = 9$; c) $n = 2$

Nous avons par la suite formulé des AUS-NPs marqués par fluorescence afin d'optimiser les expériences de suivi de ces nano-objets. Le DiI, le DiD et un mélange DiI et DiD ont été ajoutés lors du procédé de formulation à la concentration de 0,1% (m/m_{AU}) pour obtenir les AUS-NPs-DiI, les AUS-NPs-DiD et les AUS-NPs-FRET en suspension, respectivement. Comme dans le chapitre précédent, la propriété de FRET sera utilisée pour suivre la stabilité des AUS-NPs. Néanmoins, nous avons cherché à aller plus loin et à caractériser la distribution de tailles de ces nanoprécipités. Étant donné que la longueur d'onde du laser du Zetasizer[®] Nano ZS ne permet pas une analyse correcte des échantillons contenant du DiD (AUS-NPs-DiD et AUS-NPs-FRET), l'analyse de suivi des nanoparticules (NTA) a été préférée pour évaluer le diamètre hydrodynamique des échantillons marqués par

fluorescence. Le dispositif Particle Metrix ZetaView PMX-120, doté d'un laser à 488 nm qui ne génère pas d'interférence avec les molécules fluorescentes incorporés dans les formulations a été employé à cet effet.

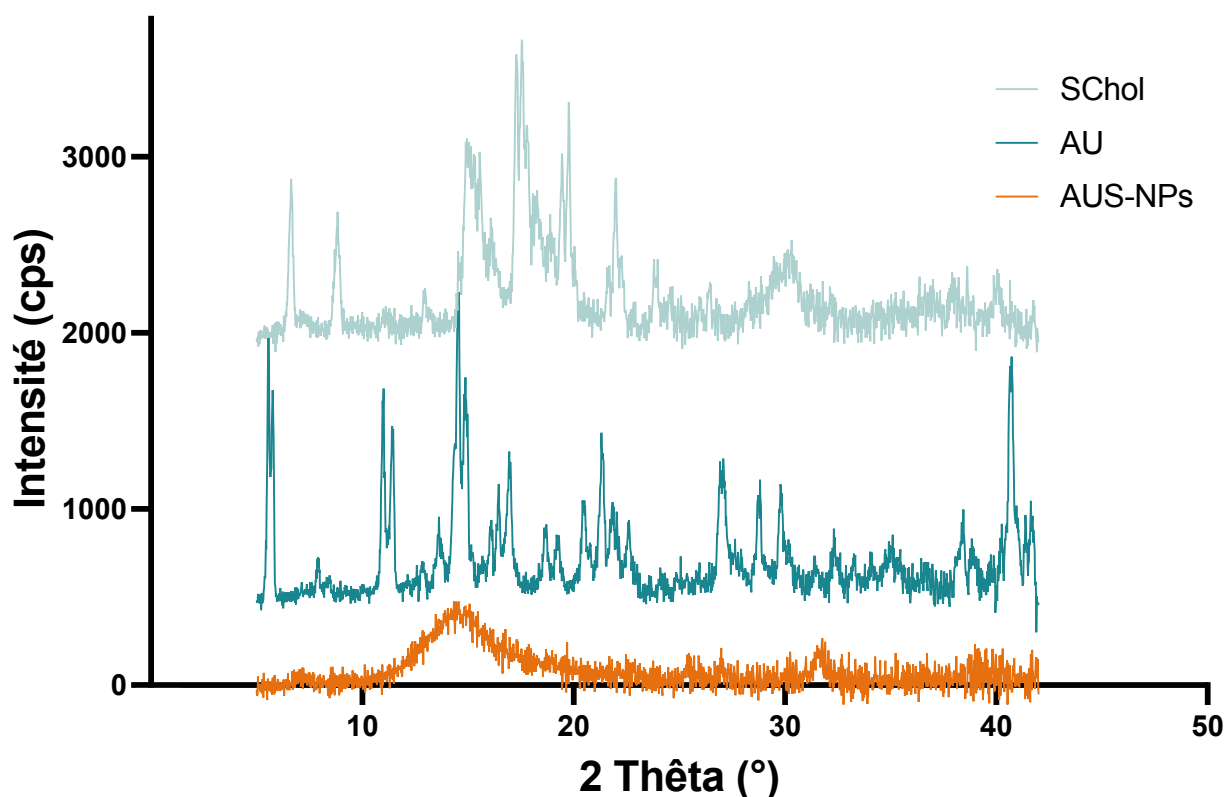


Figure 6-2. L'AU et le SChol perdent leur cristallinité lorsqu'ils sont à l'état de nanoprécipités formulés par une méthode *bottom-up*. Diffractogrammes à rayon X de poudres : AU (non formulé), SChol (non formulé) et AUS-NPs. Les diffractogrammes ont été décalés pour une meilleure visibilité.

Comme montré dans la figure 6-3, la moyenne des diamètres hydrodynamiques pour tous les échantillons se situe aux alentours de 100 – 120 nm, quelles que soient les formulations : AU-NPs ou AUS-NPs, et quelles que soient les molécules fluorescentes utilisées : DiI, DiD ou mélange DiI et DiD. Cette distribution de tailles est une distribution en nombre de particules, issue d'un comptage par la technique de NTA. Ainsi, nous avons cherché à comparer les diamètres hydrodynamiques avec les distributions de tailles en nombre par l'approche NTA et l'approche DLS. Alors qu'aucune différence n'est perceptible pour les AUS-NPs quelle que soit la méthode utilisée, il y a une différence significative ($p < 0,001$) entre les distributions en nombre des diamètres hydrodynamiques pour les AU-NPs comme montré dans la figure 6-4. Plusieurs explications peuvent être avancées. Premièrement, les concentrations en nanoprécipités sont vraiment très différentes suivant la méthode utilisée et cette différence peut impacter la caractérisation. Deuxièmement, il convient de noter que le NTA donne directement les informations sur le diamètre hydrodynamique en se basant sur une distribution en nombre, tandis que la DLS fournit une valeur de diamètre hydrodynamique qui est basée sur l'intensité de diffusion des particules, donc une distribution en intensité, avant de la convertir grâce à des modèles mathématiques en une distribution en nombre.

La distribution en intensité est fortement impactée par la présence de particules de grande taille, ce qui impactera également la distribution en nombre.

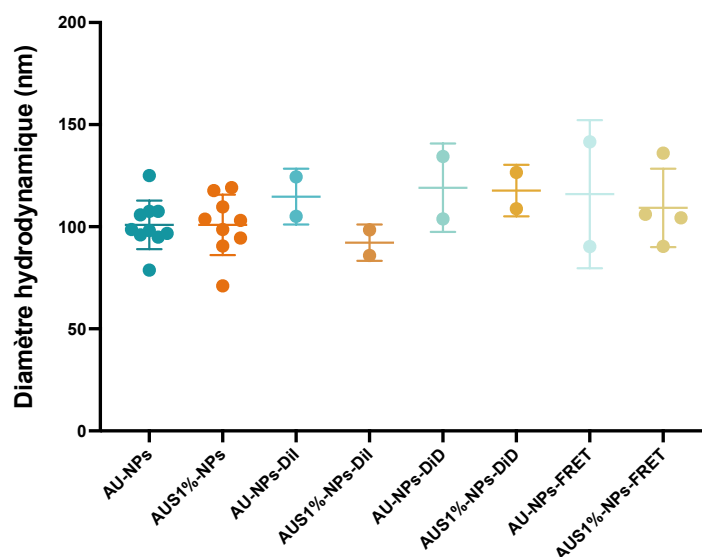


Figure 6-3. Les distributions de tailles des AU-NPs et des AUS-NPs marqués par fluorescence ou non sont similaires par la mesure au NTA. Moyenne du diamètre hydrodynamique (distribution en nombre) mesuré par NTA pour les suspensions AU-NPs et AUS-NPs, contenant ou non du DiI, du DiD ou un mélange DiI et DiD (FRET) à la concentration de 1% (m/m_{AU}) ($n=2-10$; moyenne \pm écart-type).

Ainsi, au vu des résultats montrés sur la figure 6-4, il semble que la distribution de tailles des AUS-NPs présente des diamètres hydrodynamiques plus homogènes que celle des AU-NPs. On pourrait aussi conclure qu'il semblerait que des agrégats soient présents dans les suspensions d'AUS-NPs comparativement à celles d'AUS-NPs montrant ainsi l'impact du Schol en tant que « lipide aidant » (*helper lipid*) pour la formulation des AU-NPs.

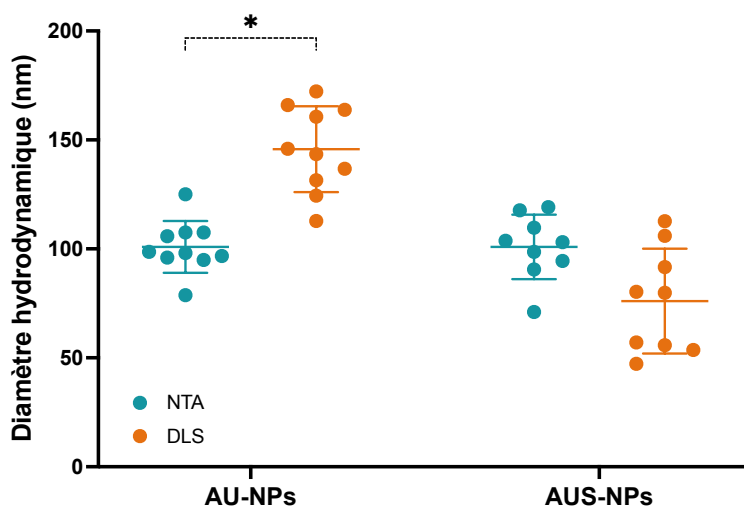


Figure 6-4 : La distribution de tailles des AUS-NPs semble plus homogène que celle des AU-NPs. Moyenne du diamètre hydrodynamique (distribution en nombre) mesuré par NTA et DLS pour les suspensions d'AUS-NPs et de AUS-NPs. ($n=9-10$; moyenne \pm écart-type, * $p < 0,05$).

2. Adsorption du peptide NFL sur les AU-NPs et AUS-NPs

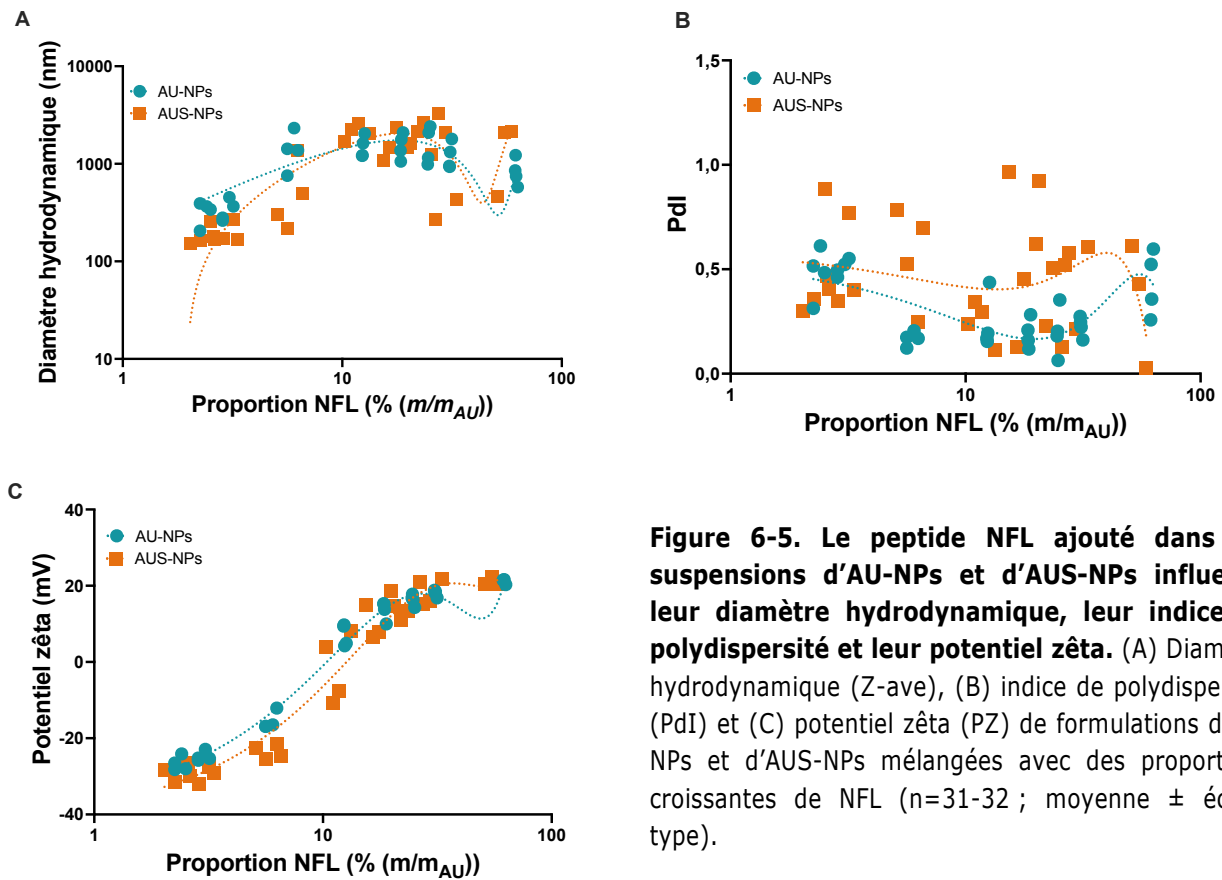


Figure 6-5. Le peptide NFL ajouté dans les suspensions d’AU-NPs et d’AUS-NPs influence leur diamètre hydrodynamique, leur indice de polydispersité et leur potentiel zêta. (A) Diamètre hydrodynamique (Z-ave), (B) indice de polydispersité (PdI) et (C) potentiel zêta (PZ) de formulations d’AU-NPs et d’AUS-NPs mélangées avec des proportions croissantes de NFL (n=31-32 ; moyenne ± écart-type).

La figure 6-5A illustre la variation du diamètre hydrodynamique des nanoprecipités en fonction de la concentration en peptide NFL. Il est observé que le diamètre hydrodynamique des nanoprecipités augmente fortement aux alentours d’une proportion de peptide NFL de 5% (m/m_{AU}) quelle que soit la nature des nanoprecipités. En dessous de cette proportion, les nanoprecipités ont une taille inférieure à 300 nm et on peut noter que les AUS-NPs ont une taille plus faible que les AU-NPs, visibles pour les proportions en peptide NFL inférieures à 3% (m/m_{AU}). Pour des proportions supérieures, le diamètre hydrodynamique des nanoprecipités continue d’augmenter pour atteindre des valeurs approchant les 2 000 à 3 000 nm, indépendamment de la nature des nanoprecipités. Cette variation de taille pourrait résulter de la formation d’agrégats d’AU-NPs ou d’AUS-NPs en raison de la proportion élevée en NFL.

L’indice de polydispersité (PdI) en fonction de la proportion de peptide NFL (m/m_{AU}) est présenté dans la figure 6-5B. L’ajout de peptide NFL dans les suspensions de nanoprecipités semble entraîner une plus grande variabilité des valeurs de PdI à partir d’une proportion de 3% en peptide NFL (m/m_{AU}). En dessous cette proportion des valeurs de de PdI aux alentours de 0,5 sont obtenus pour les deux types de nanoprecipités.

Enfin, en ce qui concerne le PZ en fonction de la proportion de peptide NFL (figure 6-5C), une augmentation importante est observée à mesure que la proportion en peptide NFL augmente. Dans le cas des AU-NPs, le PZ évolue de -25 mV à 20 mV, tandis que dans le cas des AUS-NPs, le PZ évolue de -35 mV à 20 mV lorsque que la proportion en peptide NFL augmente jusqu'à environ 66% (m/m_{AU}). Cette variation s'explique par la charge positive du peptide. Son adsorption à la surface des nanopréciipités d'AU fait diminuer leur charge négative globale, augmentant les valeurs de PZ. La neutralité du complexe NFL / AU-NPs ou AUS-NPs se situe à une proportion en peptide NFL de 10% (m/m_{AU}). Avec des proportions supérieures, les valeurs de PZ continuent à augmenter et cette variation pourrait être expliquée par une adsorption plus importante de peptide aux fortes proportions en peptide NFL. Enfin, en comparant les valeurs obtenues pour les AU-NPs avec celles obtenues pour les AUS-NPs, on remarque que les deux courbes suivent une tendance similaire, bien que le PZ soit légèrement inférieur pour les formulations d'AUS-NPs. Cette différence s'explique par la charge négative du SChol. Cependant, cette distinction semble disparaître pour les proportions les plus élevées.

Les profils de variation du Z-ave et du PZ semblent parfaitement corrélés en considérant la proportion de peptide NFL ajouté aux suspensions de nanopréciipités. L'apparition des agrégats est liée à l'augmentation du PZ avec des tailles beaucoup plus importantes lorsque les valeurs de PZ sont positives. La neutralité du PZ va favoriser la formation de ces agrégats puisqu'il n'y a plus de répulsions électrostatiques entre les nanopréciipités et donc une perte de stabilité colloïdale. De plus, le peptide NFL pourrait aussi faciliter la formation des agrégats, en créant des pontages entre les nanopréciipités. Cet effet avait été aussi suggéré lors de l'étude de l'interaction NCL et peptide NFL dans les hydrogels de NCLs [32].

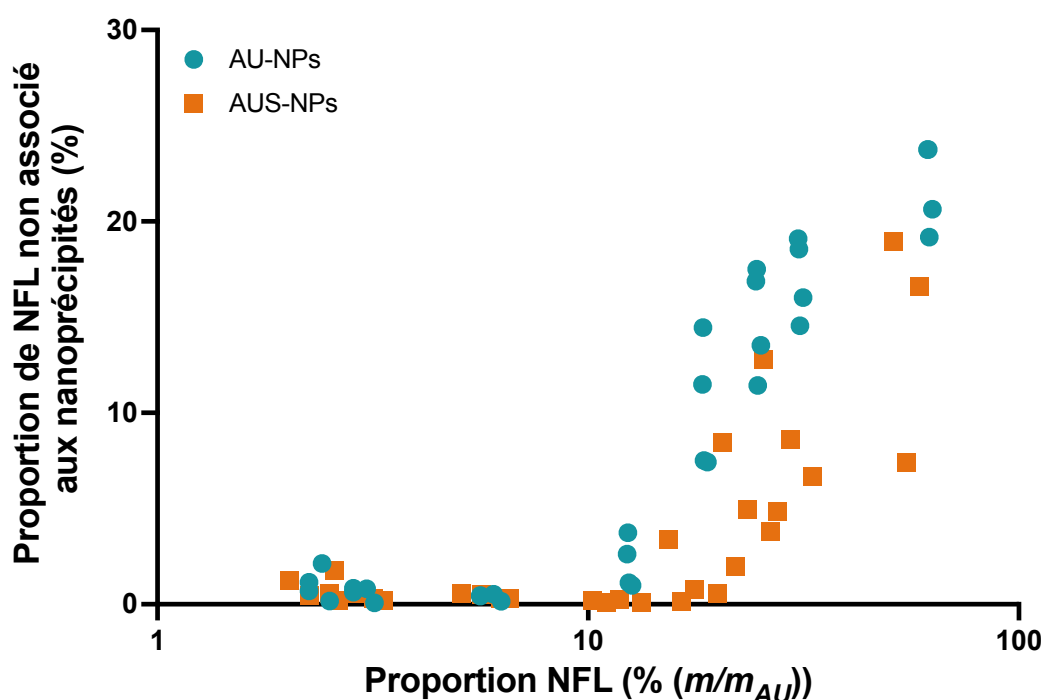


Figure 6-6. Le SChol améliore l'adsorption du peptide NFL à la surface des nanopréciipités d'AU. Proportion de NFL non associé aux nanopréciipités, quantifiée par UPLC en fonction de la proportion initiale en peptide NFL dans des suspensions d'AU-NPs ou d'AUS-NPs. (n=31-32)

La proportion de NFL libre dans les formulations d'AU-NPs et AUS-NPs est dépendante de la proportion en NFL initialement ajoutée aux suspensions de nanoprecipités. Pour des proportions en NFL > 20% (m/m_{AU}), la proportion de NFL non associé aux nanoprecipités est quantifiable : entre 10 et 20%. Au contraire, pour de plus faibles proportions de NFL, la proportion de NFL non associé aux nanoprecipités est difficilement quantifiable (inférieure à la limite de détection par UPLC). En comparant les AU-NPs et les AUS-NPs, il semblerait que la proportion de peptide NFL non associé aux nanoprecipités soit plus faible par la présence du SChol (figure 6-6). Le SChol semble donc aider à l'adsorption du NFL sur les nanoprecipités comme nous l'avons observé dans le cas des NCLs [29,32].

3. Internalisation

La capacité du NFL à améliorer l'internalisation des AU-NPs et AUS-NPs dans des cellules de GBM a ensuite été évaluée par cytométrie en flux (figure 6-7). La lignée cellulaire T98G a été traitée pendant 3, 6 ou 24h avec des AU-NPs ou des AUS-NPs contenant du NFL (AU-NFL-NPs et AUS-NFL-NPs, respectivement) (3,33% (m/m_{AU})) et les intensités médianes de fluorescence pour le FRET ont été mesurées. Aucune différence d'internalisation n'est observée lorsque le peptide NFL est associé aux nanoprecipités contrairement à ce qui avait été vu pour les NCLs [32]. Des conformations différentes de peptide NFL post association sur les nanoprecipités pourraient expliquer ce manque de reconnaissance des cellules de GBM. On peut de plus noter que la présence de SChol ne modifie les profils d'internalisation des nanoprecipités d'AU.

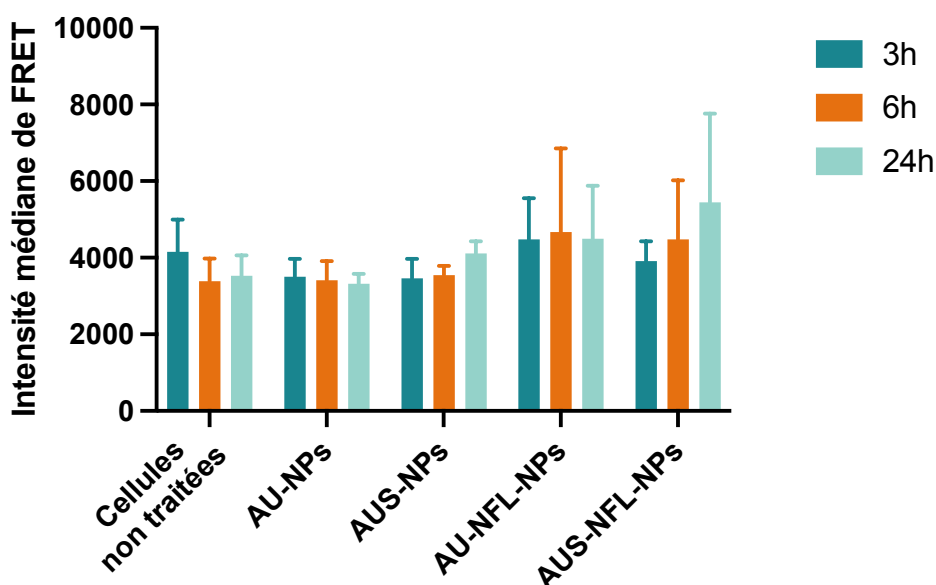


Figure 6-7. L'ajout de NFL aux formulations d'AU-NPs et d'AUS-NPs ne semble pas améliorer leur internalisation dans la lignée cellulaire T98G. Médianes d'intensité de fluorescence par cellule du signal FRET, mesurées par cytométrie en flux dans des cellules de GBM (lignée cellulaire T98G) lorsque celles-ci ont été traitées pendant 3, 6 ou 24h avec des AU-NPs ou des AUS-NPs contenant ou non du NFL (3,33% (m/m_{AU})) ($n = 3$; moyenne \pm écart-type).

4. Propriétés rhéologiques des hydrogels chargés en AU-NPs et AUS-NPs

Afin de vérifier si les nanoprecipités peuvent être administrés par une voie locale, nous avons exploré la possibilité de formuler des hydrogels d'AU-NPs et AUS-NPs et mélangé ces nanoprecipités avec des solutions de P407 et P188 en combinaison. Le mélange choisi permet d'avoir un hydrogel thermosensible passant d'une solution visqueuse à température ambiante, facilitant l'injection, à un hydrogel à 37 °C permettant la localisation de la thérapie. L'augmentation de la température permet la formation d'interaction hydrophobe formant le réseau à 3 dimensions [33]. La température de gélification ainsi que les caractéristiques viscoélastiques des hydrogels à 20 et 37 °C, avec et sans nanoprecipité, ont été déterminées.

La figure 6-8 rapporte les températures de transitions solution - gel des hydrogels combinés ou non au nanoprecipités. Nous avons considéré deux températures : une température d'initiation de la gélification (T_i) pour laquelle G' commence à augmenter, et une température de terminaison (T_f) pour laquelle on retrouve une stabilisation des valeurs de G' et G'' post gélification comme illustré sur la figure 6-8A. L'étape de gélification pour l'hydrogel se trouve bien entre la température ambiante et 37 °C comme observé sur la figure 6-8B. De plus, la présence d'AU-NPs et AUS-NPs à la concentration de 1mg/mL dans l'hydrogel ne modifie pas de manière significative les valeurs des transitions de température. Une diminution d'environ 1 à 2 °C est observée pour les 2 températures de transition. Il semblerait qu'une plus faible concentration en AU-NPs (0,5 mg/mL) soit capable d'avoir un impact plus fort sur les températures de transition. Néanmoins, la dispersion des points ne nous permet pas de conclure sur un réel effet, qui ne semble pas non plus forcément cohérent par rapport à ce à quoi on imaginerait s'attendre.

De la même manière, l'incorporation des nanoprecipités, quelles que soient leur nature et leur concentration, ne modifie pas les propriétés viscoélastiques qui ont été analysées à température ambiante et à 37 °C (figure 6-9). A température ambiante, on retrouve bien un profil de liquide Maxwell, donc un matériau de type solution capable de s'écouler, tandis qu'à 37 °C, le profil typique d'un matériau de type solide en rhéologie est obtenu, avec des valeurs $G' > G''$ et constantes indépendamment des valeurs de fréquences (figure 6-9A). A 37 °C, soit une fois l'étape de gélification achevée, des hydrogels sont obtenus avec des valeurs de G' proches de 1000 Pa et de G'' entre 100 et 200 Pa, capables d'incorporer différents nanoprecipités sans modification significative des propriétés viscoélastiques (figure 6-9B). Ces valeurs de modules viscoélastiques sont proches de celles qui avaient été obtenues lors de la formulation d'hydrogels de NCLs pour une application de type post-réssection de GBM, des hydrogels optimisés en matière de rigidité et qui n'avaient pas montré d'effet indésirable *in vivo* dû à la dureté de l'implant [32,34,35].

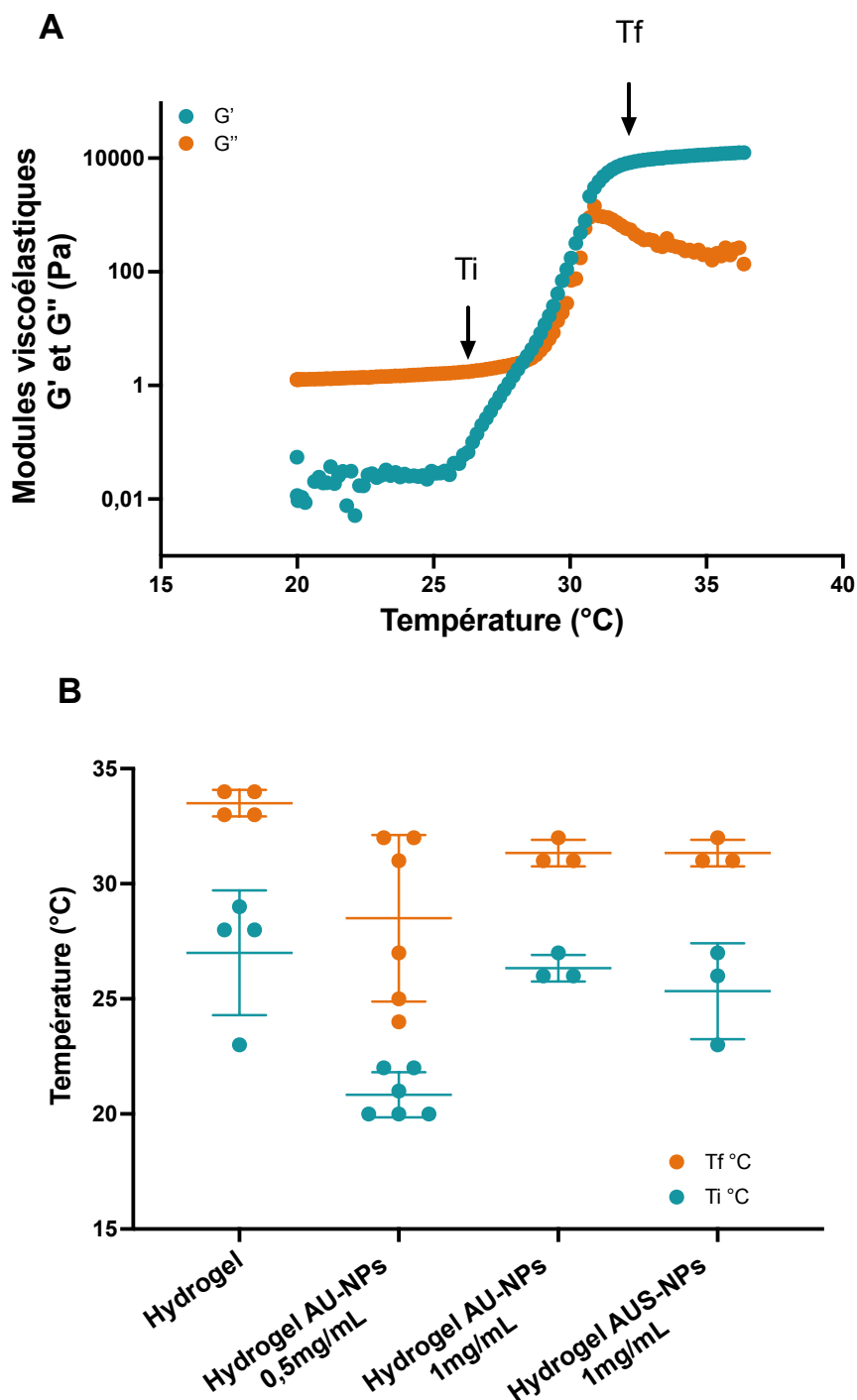


Figure 6-8. Les températures de transition solution – gel ne sont pas modifiées lorsque les AU-NPs ou les AUS-NPs sont incorporés dans un hydrogel de poloxamère. A) Modules élastique G' et visqueux G'' en fonction de la température pour un hydrogel P407 / P188 18% / 4,5% (m/m) (dans du PBS 1X) chargé en AU-NPs à 1 mg/mL (amplitude d'oscillation de déformation de cisaillement constante de 0,1% et fréquence d'oscillation de 1Hz). B) Température d'initiation (Ti) et de terminaison (Tf) de l'étape de gélification pour des hydrogels P407 / P188 18% / 4,5% (m/m) (dans du PBS 1X) chargés ou non en AU-NPs à 0,5 ou 1 mg/mL ou en AUS-NPs à 1 mg/mL (n=3-6 ; moyenne ± écart-type).

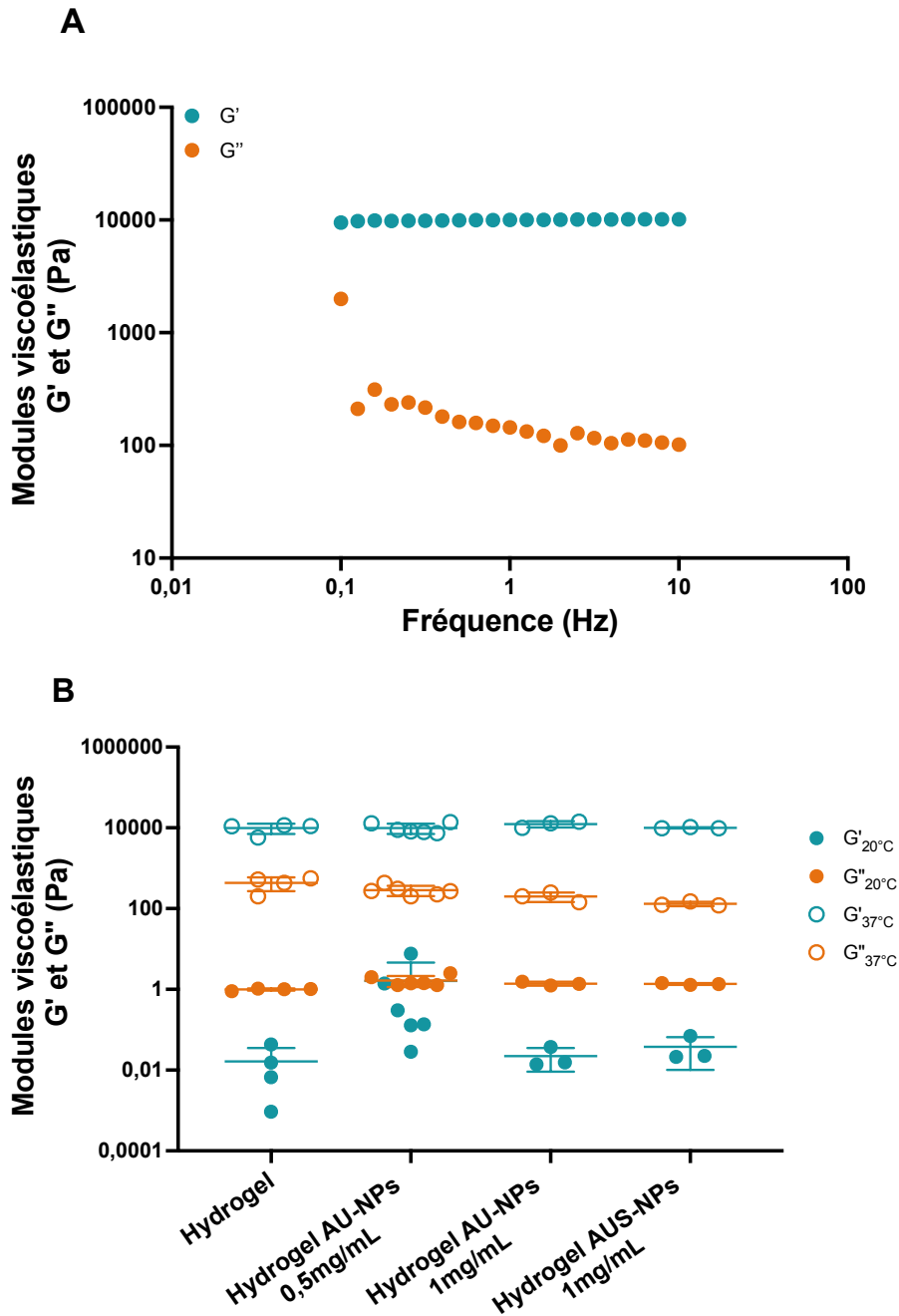


Figure 6-9. Les propriétés viscoélastiques des hydrogels de poloxamère ne sont pas modifiées par l'incorporation d'AU-NPs ou d'AUS-NPs. A) Propriétés viscoélastiques : modules élastique G' et visqueux G'' en fonction de la fréquence d'oscillation de déformation de cisaillement pour un hydrogel P407 / P188 18% / 4,5% (m/m) (dans du PBS 1X) chargé en AU-NPs à 1 mg/mL, mesurés à 37 °C (amplitude d'oscillation de déformation de cisaillement à 0,1%). B) Propriétés viscoélastiques : modules élastique G' et visqueux G'' pour des hydrogels P407 / P188 18% / 4,5% (m/m) (dans du PBS 1X) chargés ou non en AU-NPs à 0,5 ou 1 mg/mL ou en AUS-NPs à 1 mg/mL, mesurés à 20 et 37 °C (amplitude d'oscillation de déformation de cisaillement à 0,1% et fréquence d'oscillation à 1 Hz) ($n=3-6$; moyenne \pm écart-type).

5. Étude de la libération *in vitro* des nanoprecipités à partir de l'hydrogel, et étude de leur comportement dans l'hydrogel

La libération des AU-NPs et AUS-NPs à partir des hydrogels a été menée à 37 °C vers un milieu mimant artificiellement le liquide céphalorachidien. Afin de déterminer ces profils de libération, dépendants de la nature et de la concentration des nanoprecipités, nous avons quantifié la quantité restante d'AU dans les hydrogels, ainsi que la quantité restante des hydrogels, à différents temps d'incubation après contact entre les hydrogels de P407 et P188, chargés en AU-NPs à 0,5 mg/mL ou 1 mg/mL ou chargés en AUS-NPs à 1 mg/mL, et le liquide céphalorachidien simulé.

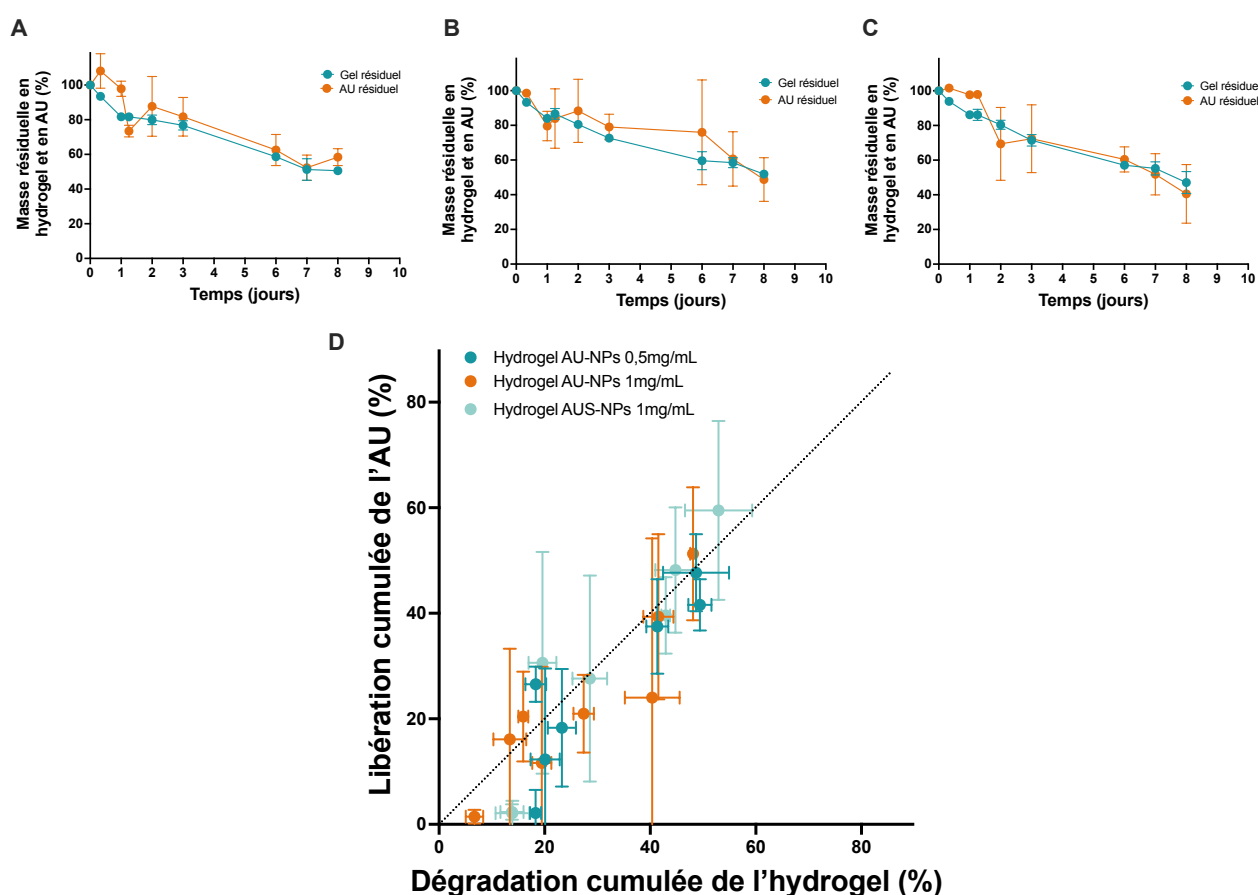


Figure 6-10. La libération des nanoprecipités d'AU est corrélée à la dissolution des hydrogels de poloxamère, et la nature et la concentration des nanoprecipités n'impactent pas les profils de libération. Proportions massiques d'AU restant dans les hydrogels et d'hydrogel non dissous lors des expériences de libération contre du liquide céphalorachidien simulé (37 °C, hydrogel / liquide céphalorachidien simulé 1 / 1 (v/v)) pour des hydrogels de P407 / P188 18% / 4,5% (m/m) (dans du PBS 1X) chargés en (A) AU-NPs à 0,5 mg/mL, (B) AU-NPs à 1 mg/mL ou (C) AUS-NPs à 1 mg/mL (n = 3 ; moyenne ± écart-type). (D) Corrélation entre la proportion massique d'AU libérée et la proportion massique d'hydrogel dégradé lors des expériences de libération illustrées par les figures 6-10A, B et C (N = 24 ; n = 3 ; moyenne ± écart-type).

Comme attendu, les hydrogels de poloxamères (formés par des interactions non covalentes) se dissolvent progressivement au contact du liquide céphalorachidien simulé. Après 8 jours d'incubation à 37 °C et sans agitation, environ la moitié de l'hydrogels de poloxamères est dissous, et ces profils de dissolution ne dépendent pas de la nature et de la concentration en nanoprecipités présents dans les hydrogels (figures 6-10A, B et C). De manière intéressante, les profils de quantité restantes d'AU dans les hydrogels sont équivalentes quelles que soit la nature et la concentration en nanoprecipités. On observe une disparition progressive de l'AU des hydrogels, due à une libération vers le liquide céphalorachidien simulé pour atteindre 50% d'AU restant dans les hydrogels après 8 jours d'incubation (figures 6-10A, B et C). Les 2 profils libération de l'AU et dissolution de l'hydrogel semblent bien corrélés, comme aussi représenté sur la figure 6-10D (coefficient de corrélation = 0,964 ; $p = 5 \times 10^{-20}$). Ainsi, il semblerait que l'AU et les nanoprecipités ne puissent pas se libérer de l'hydrogel de poloxamères et ce n'est seulement que la dissolution de l'hydrogel qui entrainerait la libération de l'AU.

Afin de contrôler l'absence de diffusion des AU-NPs et AUS-NPs dans les hydrogels de poloxamères, nous avons réalisé des expériences de FRAP sur les hydrogels, en utilisant les nanoprecipités marqués FRET : AU-NPs-FRET et AUS-NPs-FRET, à la concentration de 1 mg/mL dans les hydrogels. Un échantillon contrôle a été réalisé en préparant l'hydrogel de poloxamères avec du PBS 1X contenant de la fluorescéine. Cette molécule fluorescente est hydrophile et devrait être libre de se déplacer dans la phase aqueuse entourant le réseau de poloxamères et cet échantillon nous servira de contrôle positif. Comme le montre la figure 6-11, après photoblanchiment de la zone d'intérêt, la perte de fluorescence de la zone photoblanchie est rapidement récupérée : une récupération quasiment totale après 1 min et totale après 5 min. Comme attendu, la fluorescéine est capable de diffuser dans l'hydrogel et les molécules non photoblanchies fluorescentes remplacent les molécules photoblanchies non fluorescentes. En revanche, pour les hydrogels contenant des AU-NPs ou des AUS-NPs, après photoblanchiment de la zone d'intérêt, la perte de fluorescence n'est pas récupérée et reste toujours visible et quasi inchangée après 5 min. Quelle que soit la nature des nanoprecipités, il semble qu'ils restent piégés dans l'hydrogel de poloxamères sans possibilité de diffuser librement au travers du réseau tridimensionnel. Cette observation est parfaitement en accord avec les résultats obtenus pour les expériences de libération puisqu'ils témoignent de l'absence de diffusion des nanoprecipités et confirment qu'ils suivent la dynamique de dissolution de l'hydrogel de poloxamères. Ces constatations suggèreraient de plus que la libération des nanoprecipités d'AU peut être efficacement maîtrisée par une modulation adéquate de la rigidité de l'hydrogel qui doit influencer sa vitesse de dissolution.

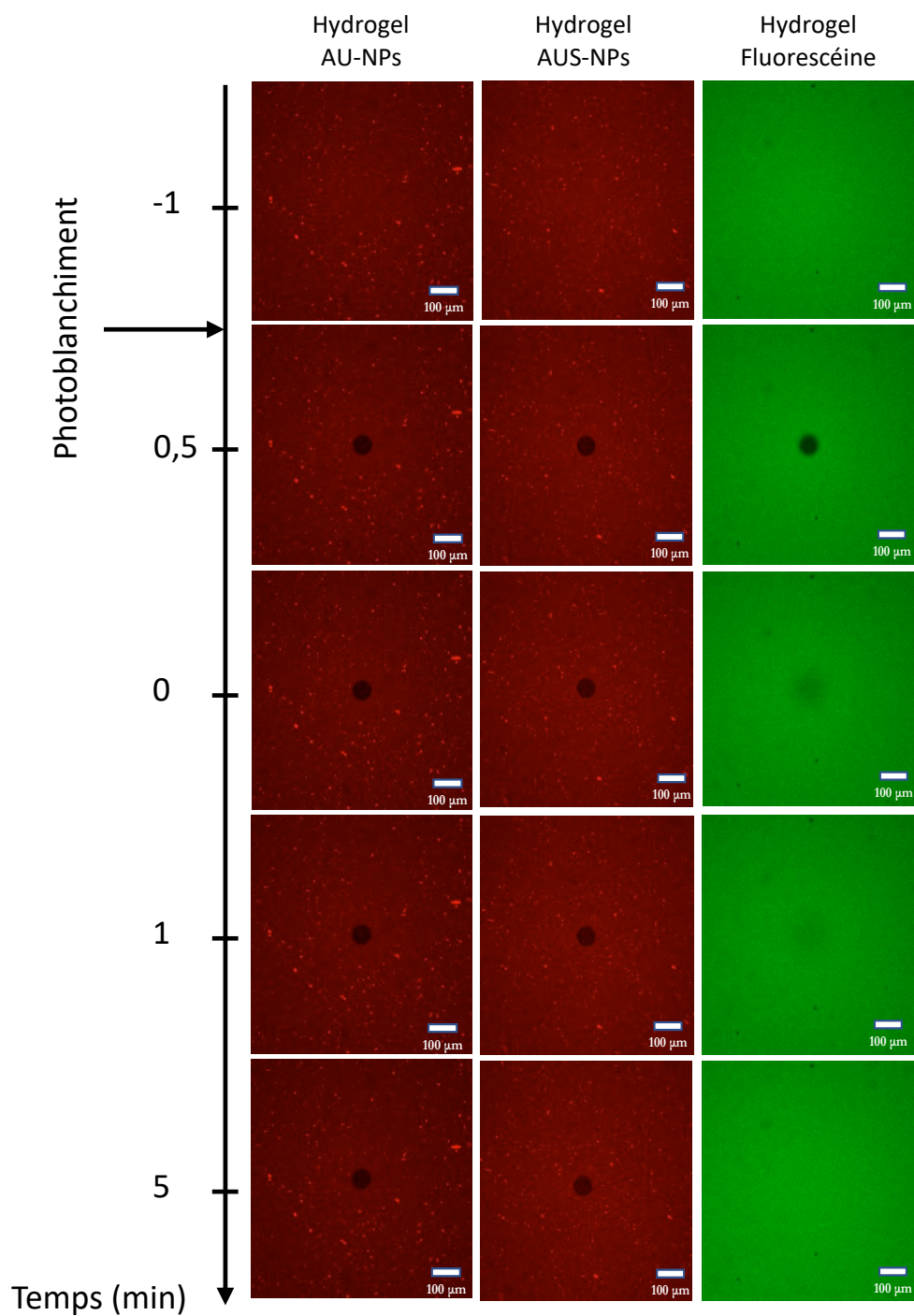


Figure 6-11. Les nanoprecipités d’AU, quelle que soit leur nature, ne peuvent pas diffuser à l’intérieur des hydrogels de poloxamères. Images de FRAP obtenues pré- et post-photoblanchiment (jusqu’à 5 min), montrant la diffusion des AU-NPs ou des AUS-NPs (1 mg/mL) ou de la fluorescéine dans les hydrogels de P407 / P188 18% / 4,5% (m/m) (dans du PBS 1X).

6. Stabilité des nanoprecipités dans l'hydrogel de poloxamères et dans du liquide céphalorachidien simulé.

Comme vu dans le chapitre précédent, la propriété de FRET peut être utilisée pour suivre l'intégrité des AU-NPs. Sous l'action du méthanol, les AU-NPs se dissolvent et le rapport d'efficacité de FRET se retrouve proche de 0,2. Lorsque du SChol est rajouté dans les nanoprecipités, la propriété de FRET peut toujours être utilisée pour suivre leur intégrité. Les AUS-NPs-FRET se dissolvent lorsque la proportion de méthanol atteint environ 55% (v/v) dans le milieu extérieur (figure 6-12). On peut noter que cette valeur est proche de celle qui avait été obtenue pour les AU-NPs. Donc l'ajout de SChol n'entraîne pas de modification de stabilité des nanoprecipités avec l'effet d'un solvant de l'AU. De plus après dissolution des hydrogels de poloxamères contenant des AU-NPs ou des AUS-NPs, les nanoprecipités se dissolvent lorsque la proportion de méthanol atteint encore environ 55% (v/v) dans le milieu extérieur (figure 6-12). Ainsi, la présence de poloxamère entourant les nanoprecipités ou dans le milieu extérieur ne modifie toujours pas la stabilité des nanoprecipités avec l'effet d'un solvant de l'AU.

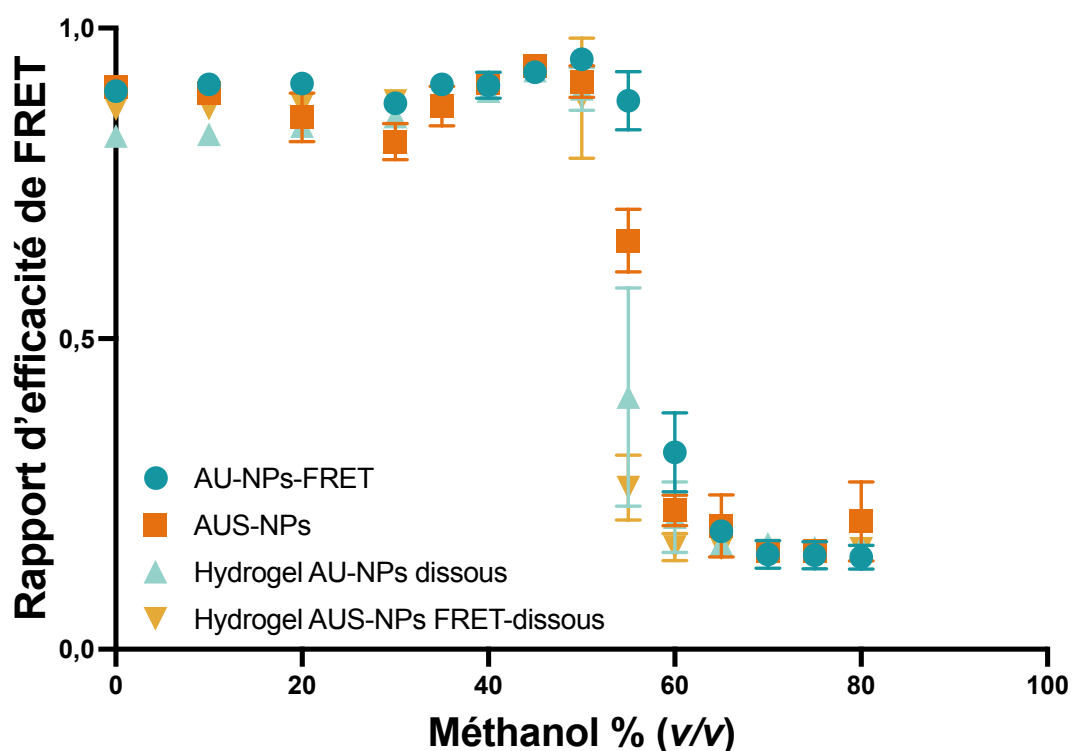


Figure 6-12. Le signal FRET permet toujours de suivre l'intégrité des nanoprecipités, indépendamment de leur nature ou de la présence de poloxamères. Rapport d'efficacité de FRET pour les AU-NPs-FRET et les AUS-NPs-FRET (1 mg/mL) (obtenus par le mélange DiI / DiD) en suspension dans l'eau ou après dissolution des hydrogels de P407 / P188 18% / 4,5% (m/m) (dans du PBS 1X), en fonction de la proportion de méthanol dans le milieu extérieur (n=3 ; moyenne \pm écart-type).

La stabilité des nanoprecipités d'AU a ainsi été vérifiée dans les hydrogels de poloxamères et dans le liquide céphalorachidien simulé en utilisant la technique de FRET (figure 6-13). Après 20 jours à 37 °C, les nanoprecipités, quelles que soient leur nature et leur concentration, semblent rester stables dans les hydrogels. La perte d'efficacité de FRET observée est minimale : $7 \pm 4 \%$ pour les AU-NPs à 0,5 mg/mL, $18 \pm 2 \%$ pour les AU-NPs à 1 mg/mL et $14 \pm 2 \%$ pour les AUS-NPs à 1 mg/mL. Lorsqu'ils sont incubés dans le liquide céphalorachidien à 37 °C, les nanoprecipités semblent également rester stables, quels que soient leur nature et leur concentration. La perte d'efficacité de FRET observée est un peu plus importante : $39 \pm 3\%$ pour les AU-NPs à 0,5 mg/mL, $32 \pm 1 \%$ pour les AU-NPs à 1 mg/mL et $28 \pm 1 \%$ pour les AUS-NPs à 1 mg/mL, mais sans pour autant laisser présager de leur totale dégradation dans le temps étudié. Cela suggère que la structure nanoprecipité d'AU pourra être préservée dans l'hydrogel, à 37 °C après une administration locale le temps de leur libération prolongée. Une fois libérés, les nanoprecipités pourront résister à la présence de liquide céphalorachidien pendant au moins 20 jours, ce qui devrait leur laisser suffisamment de temps pour être internalisés de manière intégrée dans les cellules résiduelles de GBM proches de l'implant hydrogel.

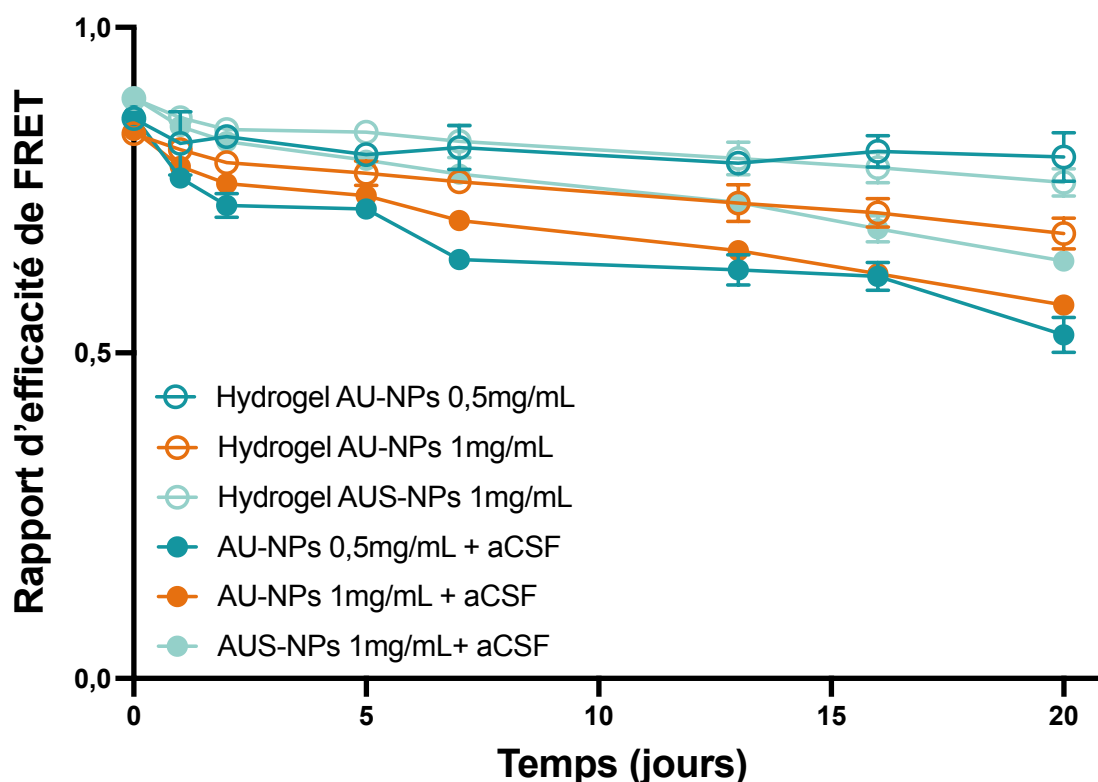


Figure 6-13. Quelle que soit leur nature et leur concentration, les nanoprecipités d'AU ne sont déstabilisés ni dans un hydrogel de poloxamères ni dans du liquide céphalorachidien simulé. Rapport d'efficacité de FRET pour les AU-NPs-FRET (0,5 ou 1 mg/mL) et les AUS-NPs-FRET (1 mg/mL) (obtenus par le mélange DiI / DiD) dans les hydrogels de P407 / P188 18% / 4,5% (*m/m*) (dans du PBS 1X) ou dans du liquide céphalorachidien simulé (aCSF), à 37 °C, mesuré au cours du temps ($n = 3$; moyenne \pm écart-type).

7. Cytotoxicité des nanoprecipités après dissolution des hydrogels de poloxamères.

Après dissolution totale des hydrogels de poloxamères contenant les AU-NPs ou AUS-NPs, nous avons évalué la distribution de tailles et le PZ des nanoprecipités (tableau 6-2). La distribution de tailles post dissolution n'est pas modifiée de manière significative comparativement aux nanoprecipités de départ. En revanche, les valeurs de PZ initialement négatives (voir tableau 6-1) se retrouvent proche de la neutralité après la dissolution. Cela laisse supposer que les poloxamères libérés lors de la dissolution de l'hydrogel se complexent avec les nanoprecipités par interaction hydrophobe, indépendamment de leur nature, camouflant ainsi la charge de surface des nanoprecipités.

Tableau 6-2. Les poloxamères semblent recouvrir les AU-NPs et les AUS-NPs après dissolution des hydrogels. Distribution de tailles (Z-ave et PdI) et PZ des AU-NPs et AUS-NPs après dissolution des hydrogels de P407 / P188 18% / 4,5% (m/m) (dans du PBS 1X) contenant les nanoprecipités à la concentration de 1 mg/mL (n = 3 ; moyenne ± écart-type).

#	Z-ave (nm)	PdI	PZ (mV)
UA-NPs	203 ± 17	0,31 ± 0,06	-2 ± 1
UAS-NPs	155 ± 7	0,24 ± 0,03	-4 ± 1

Il est donc important d'examiner la cytotoxicité des nanoprecipités post dissolution des hydrogels pour vérifier l'impact des poloxamères entourant les nanoprecipités. Ainsi, les cytotoxicités des AU-NPs et AUS-NPs en suspension mais aussi des AU-NPs et AUS-NPs post dissolution des hydrogels, c'est-à-dire en présence de poloxamères, ont été évaluées sur deux lignées cellulaires de GBM : U-87 MG (figure 6-14) et T98G (figure 6-15).

Comme le montre la figure 6-14, la présence de SChol dans les nanoprecipités augmente leur cytotoxicité sur la lignée cellulaire U-87 MG. La concentration inhibitrice médiane (CI50) en AU des AUS-NPs : 8,87 ± 0,83 µg/mL est significativement (p = 0,004) inférieure à celle des AU-NPs : 12,30 ± 0,25 µg/mL. Il en va de même pour la lignée cellulaire T98G avec une valeur de CI50 en AU pour les AUS-NPs de 4,01 ± 0,34 µg/mL plus petite que celle pour les AU-NPs de 5,14 ± 0,89 µg/mL (figure 6-15). Nous n'avons pas montré que le SChol influençait les vitesses d'internalisation et d'accumulation intracellulaire ce qui aurait pu expliquer une cytotoxicité plus forte observée quand le SChol est associé aux nanoprecipités. Cette cytotoxicité plus importante n'avait pas été non plus observée pour des NCLs modifiées avec du SChol [32]. En revanche, comme déjà observé pour le chapitre précédent, les cellules de GBM surexprimant la MGMT (lignée cellulaire T98G) semblent plus sensibles à l'AU que les cellules de GBM n'exprimant pas la MGMT (lignée cellulaire U-87 MG) même en présence de SChol.

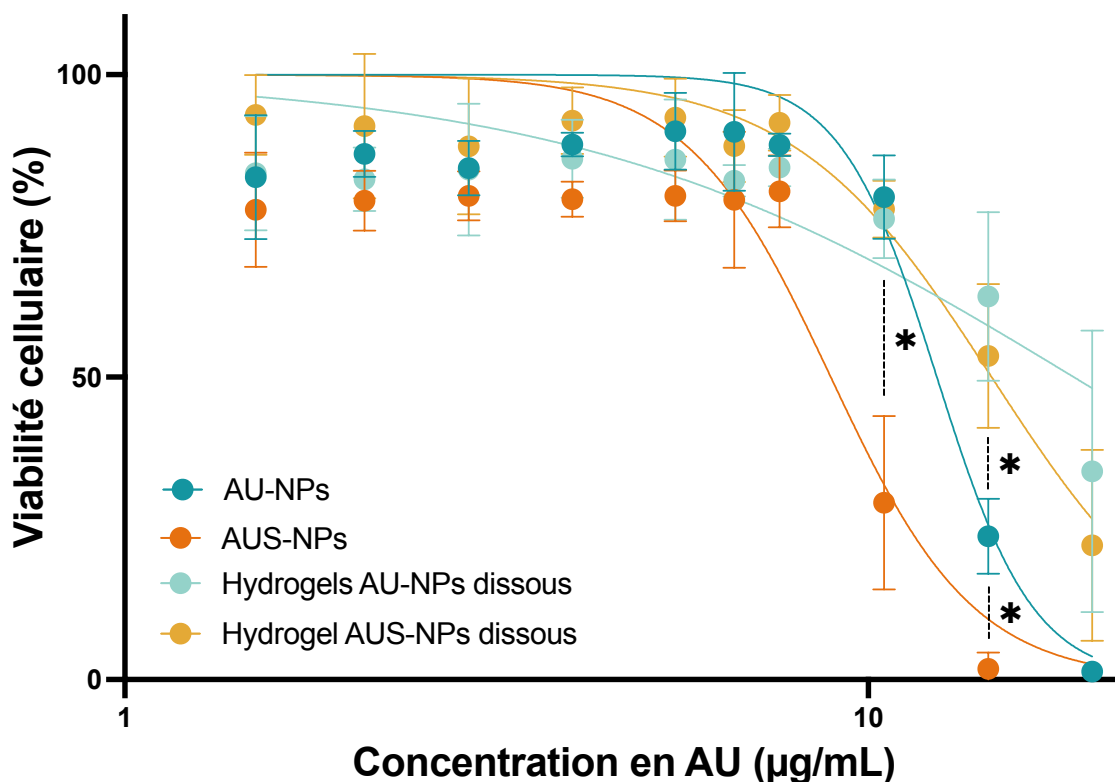


Figure 6-14. Les cellules de GBM n'exprimant pas la MGMT sont plus sensibles aux nanoprecipités d'AU quand ils sont associés au Schol. En revanche, la présence de poloxamères entourant les nanoprecipités diminue cette sensibilité. Cytotoxicité des AU-NPs et des AUS-NPs en suspension ou après dissolution des hydrogels de P407 / P188 18% / 4,5% (m/m) (dans du PBS 1X) contenant les nanoprecipités à la concentration de 1 mg/mL, après 72h de traitement sur la lignée cellulaire U-87 MG (n = 2 ; N = 3 ; moyenne ± écart-type ; * p < 0,05).

Après dissolution des hydrogels, les nanoprecipités d'AU sont entourés de poloxamères ce qui devrait aussi affecter la viabilité cellulaire des cellules de GBM après incubation. Sur la lignée cellulaire U-87 MG n'exprimant pas la MGMT, les CI50 en AU des AU-NPs et des AUS-NPs post dissolution des hydrogels sont significativement ($p = 0,0001$ et $0,009$, respectivement) augmentées, soient $18,15 \pm 3,90$ et $15,87 \pm 3,72$ µg/mL, respectivement, par rapport aux AU-NPs et des AUS-NPs en suspension (sans poloxamère) (figure 6-14). La présence de Schol dans ces nanoprecipités entourés de poloxamères entraîne aussi une plus grande cytotoxicité comme dans le cas des nanoprecipités en suspension. Les poloxamères entourant les nanoprecipités pourraient réduire leur internalisation et ainsi réduire leur cytotoxicité.

En revanche, dans le cas des cellules de GBM exprimant la MGMT (lignée cellulaire T98G), nous pouvons voir que les cellules T98G sont beaucoup plus sensibles lorsque les nanoprecipités sont en présence de poloxamères (figure 6-15). Une cytotoxicité très élevée a été observée pour les AU-NPs et des AUS-NPs post dissolution des hydrogels. Les valeurs de CI50 en AU n'ont pas pu être déterminées mais on peut considérer qu'elles sont inférieures à 2 µg/mL. Cela suggère que les poloxamères peuvent aussi impacter les mécanismes de toxicité des nanoprecipités d'AU, et que ce phénomène reste dépendant des lignées cellulaires. Le mécanisme

complet de la toxicité des poloxamères n'est pas encore entièrement compris, avec parfois des produits de dégradations qui peuvent être cytotoxiques [36].

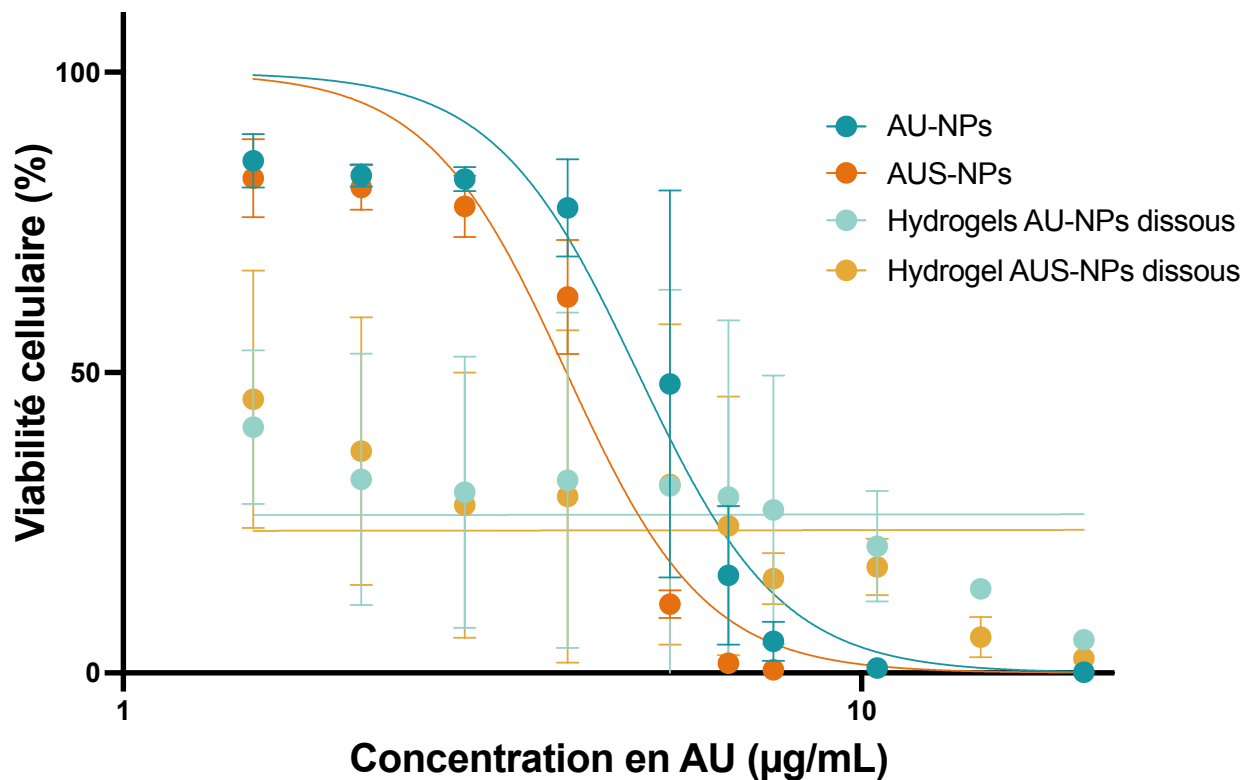


Figure 6-15. Les cellules de GBM surexprimant la MGMT sont plus sensibles aux nanoprécipités d'AU quand ils sont associés au Schol. La présence de poloxamères entourant les nanoprécipités augmente également cette sensibilité. Cytotoxicité des AU-NPs et des AUS-NPs en suspension ou après dissolution des hydrogels de P407 / P188 18% / 4,5% (*m/m*) (dans du PBS 1X) contenant les nanoprécipités à la concentration de 1 mg/mL, après 72h de traitement sur la lignée cellulaire T98G (n = 2 ; N = 4 ; moyenne ± écart-type).

Conclusion

Dans cette étude, nous avons proposé des pistes d'amélioration des nanoprecipités d'AU développés dans le chapitre précédent, en matière de ciblage des cellules de GBM et en matière de dispositifs implantables de type hydrogel de poloxamères pouvant localiser la thérapie au plus proche de la cible à traiter.

L'association d'un peptide de ciblage à la surface des nanoprecipités : le peptide NFL, connu et reconnu pour son action sur les cellules de GBM a été envisagée. Le SChol a été ajouté dans les nanoprecipités car ce lipide avait déjà montré sa capacité à renforcer l'association avec le peptide NFL. L'ajout de ce lipide aidant a permis de diminuer la distribution de tailles des nanoprecipités, améliorant certainement leur stabilité, sans non plus avoir à ajouter des tensioactifs ou des agents stabilisants, comme dans le cas des AU-NPs. Bien que l'association NFL / nanoprecipité soit renforcée par l'ajout de SChol, l'objectif de ciblage préférentiel n'a pas été atteint *in vitro*. Aucune internalisation préférentielle des nanoprecipités n'a été observée sur la lignée cellulaire T98G, ce qui reste un échec pour cette première piste d'amélioration.

Le deuxième objectif des pistes d'amélioration est quant à lui atteint puisque : i) les AU-NPs ou AUS-NPs peuvent être dispersés dans un hydrogel de poloxamères sans affecter ses propriétés mécaniques, ii) les AU-NPs ou AUS-NPs restent stables et ne peuvent pas diffuser dans l'hydrogel, iii) une libération prolongée des AU-NPs et AUS-NPs a été observée et est liée à la dissolution des hydrogels, et iv) les AU-NPs et AUS-NPs restent stables dans du liquide céphalorachidien simulé. Dans le cadre d'une application anti-GBM post résection, nous avons ici des résultats plus que prometteurs pour administrer localement des actifs qui permettraient de lever les résistances au TMZ et éviter le défi de franchir la barrière hémato-encéphalique (BHE).

Bien entendu, beaucoup de travail restent encore à réaliser afin de confirmer cette levée de résistance par inhibition de la MGMT et comprendre l'impact des poloxamères entourant les nanoprecipités d'AU, qui semblent réagir différemment dépendamment des cellules utilisées. Il y a certainement des phénomènes d'internalisation différents qui sont mis en jeu dépendamment que les cellules surexpriment ou n'expriment pas la MGMT, ainsi que des mécanismes de cytotoxicité différents, qui nécessitent d'être mieux appréhendés et maîtrisés. Finalement, la preuve de concept *in vivo* sera la clé de tous ces travaux en vérifiant : i) la biocompatibilité de l'implant dans le cerveau et sa résorption par dissolution, ii) le ciblage sélectif des cellules résiduelles de GBM par les nanoprecipités, sans affecter les cellules saines, iii) l'inhibition prolongée de la MGMT des cellules de GBM surexprimant la MGMT, permettant ainsi de sensibiliser les cellules au TMZ administré par voie orale. Finalement, au vu des diverses propriétés pharmacologiques rapportées pour l'AU, cette stratégie de formulation pourrait aussi être appliquée dans des protocoles thérapeutiques autre que le cancer, qui nécessiteraient une activité locale et/ou une libération prolongée d'AU.

Bibliographie

- 1 Ostrom QT, Cioffi G, Waite K, *et al.* CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2014–2018. *Neuro-Oncol* 2021;**23**:iii1–105. doi:10.1093/neuonc/noab200
- 2 Louis DN, Perry A, Wesseling P, *et al.* The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro-Oncol* 2021;**23**:1231–51. doi:10.1093/neuonc/noab106
- 3 Miller KD, Ostrom QT, Kruchko C, *et al.* Brain and other central nervous system tumor statistics, 2021. *CA Cancer J Clin* 2021;**71**:381–406. doi:10.3322/caac.21693
- 4 Pandey N, Anastasiadis P, Carney CP, *et al.* Nanotherapeutic treatment of the invasive glioblastoma tumor microenvironment. *Adv Drug Deliv Rev* 2022;**188**:114415. doi:10.1016/j.addr.2022.114415
- 5 Arvanitis CD, Ferraro GB, Jain RK. The blood–brain barrier and blood–tumour barrier in brain tumours and metastases. *Nat Rev Cancer* 2020;**20**:26–41. doi:10.1038/s41568-019-0205-x
- 6 Cohen MH, Shen YL, Keegan P, *et al.* FDA Drug Approval Summary: Bevacizumab (Avastin®) as Treatment of Recurrent Glioblastoma Multiforme. *The Oncologist* 2009;**14**:1131–8. doi:10.1634/theoncologist.2009-0121
- 7 Ortiz R, Perazzoli G, Cabeza L, *et al.* Temozolomide: An Updated Overview of Resistance Mechanisms, Nanotechnology Advances and Clinical Applications. *Curr Neuropharmacol* 2021;**19**:513–37. doi:10.2174/1570159X18666200626204005
- 8 Fisher JP, Adamson DC. Current FDA-Approved Therapies for High-Grade Malignant Gliomas. *Biomedicines* 2021;**9**:324. doi:10.3390/biomedicines9030324
- 9 Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, *et al.* Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N Engl J Med* 2005;**352**:987–96. doi:10.1056/NEJMoa043330
- 10 Rapp M, Baernreuther J, Turowski B, *et al.* Recurrence Pattern Analysis of Primary Glioblastoma. *World Neurosurg* 2017;**103**:733–40. doi:10.1016/j.wneu.2017.04.053
- 11 Hombach-Klonisch S, Mehrpour M, Shojaei S, *et al.* Glioblastoma and chemoresistance to alkylating agents: Involvement of apoptosis, autophagy, and unfolded protein response. *Pharmacol Ther* 2018;**184**:13–41. doi:10.1016/j.pharmthera.2017.10.017
- 12 Hegi ME, Diserens A-C, Gorlia T, *et al.* MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *N Engl J Med* 2005;**352**:997–1003. doi:10.1056/NEJMoa043331
- 13 Happold C, Stojcheva N, Silginer M, *et al.* Transcriptional control of O6 -methylguanine DNA methyltransferase expression and temozolomide resistance in glioblastoma. *J Neurochem* 2018;**144**:780–90. doi:10.1111/jnc.14326
- 14 Balmaceda C, Peereboom D, Pannullo S, *et al.* Multi-institutional phase II study of temozolomide administered twice daily in the treatment of recurrent high-grade gliomas. *Cancer* 2008;**112**:1139–46. doi:10.1002/cncr.23167

- 15 Kaina B, Margison GP, Christmann M. Targeting O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase with specific inhibitors as a strategy in cancer therapy. *Cell Mol Life Sci CMLS* 2010;**67**:3663–81. doi:10.1007/s00018-010-0491-7
- 16 Liu J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J Ethnopharmacol* 1995;**49**:57–68. doi:10.1016/0378-8741(95)90032-2
- 17 Shan J, Xuan Y, Ruan S, et al. Proliferation-inhibiting and apoptosis-inducing effects of ursolic acid and oleanolic acid on multi-drug resistance cancer cells in vitro. *Chin J Integr Med* 2011;**17**:607–11. doi:10.1007/s11655-011-0815-y
- 18 Xavier CPR, Lima CF, Pedro DFN, et al. Ursolic acid induces cell death and modulates autophagy through JNK pathway in apoptosis-resistant colorectal cancer cells. *J Nutr Biochem* 2013;**24**:706–12. doi:10.1016/j.jnutbio.2012.04.004
- 19 Zhang Y, Kong C, Wang L, et al. Ursolic acid overcomes Bcl-2-mediated resistance to apoptosis in prostate cancer cells involving activation of JNK-induced Bcl-2 phosphorylation and degradation. *J Cell Biochem* 2010;**109**:764–73. doi:10.1002/jcb.22455
- 20 Zhu Z, Du S, Ding F, et al. Ursolic acid attenuates temozolomide resistance in glioblastoma cells by downregulating O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) expression. *Am J Transl Res* 2016;**8**:3299–308.
- 21 Kohsaka S, Wang L, Yachi K, et al. STAT3 inhibition overcomes temozolomide resistance in glioblastoma by downregulating MGMT expression. *Mol Cancer Ther* 2012;**11**:1289–99. doi:10.1158/1535-7163.MCT-11-0801
- 22 Wang L, Yin Q, Liu C, et al. Nanoformulations of Ursolic Acid: A Modern Natural Anticancer Molecule. *Front Pharmacol* 2021;**12**:706121. doi:10.3389/fphar.2021.706121
- 23 Gazaille C, Sicot M, Saulnier P, et al. Local Delivery and Glioblastoma: Why Not Combining Sustained Release and Targeting? *Front Med Technol* 2021;**3**:791596. doi:10.3389/fmedt.2021.791596
- 24 Bocquet A, Berges R, Frank R, et al. Neurofilaments bind tubulin and modulate its polymerization. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 2009;**29**:11043–54. doi:10.1523/JNEUROSCI.1924-09.2009
- 25 Berges R, Balzeau J, Takahashi M, et al. Structure-Function Analysis of the Glioma Targeting NFL-TBS.40-63 Peptide Corresponding to the Tubulin-Binding Site on the Light Neurofilament Subunit. *PLoS ONE* 2012;**7**:e49436. doi:10.1371/journal.pone.0049436
- 26 Berges R, Balzeau J, Peterson AC, et al. A Tubulin Binding Peptide Targets Glioma Cells Disrupting Their Microtubules, Blocking Migration, and Inducing Apoptosis. *Mol Ther* 2012;**20**:1367–77. doi:10.1038/mt.2012.45
- 27 Lépinoux-Chambaud C, Eyer J. The NFL-TBS.40-63 anti-glioblastoma peptide enters selectively in glioma cells by endocytosis. *Int J Pharm* 2013;**454**:738–47. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.04.004
- 28 Balzeau J, Pinier M, Berges R, et al. The effect of functionalizing lipid nanocapsules with NFL-TBS.40-63 peptide on their uptake by glioblastoma cells. *Biomaterials* 2013;**34**:3381–9. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.01.068

- 29 Gazaille C, Sicot M, Akiki M, *et al.* Characterization of Biological Material Adsorption to the Surface of Nanoparticles without a Prior Separation Step: a Case Study of Glioblastoma-Targeting Peptide and Lipid Nanocapsules. *Pharm Res* 2021;**38**:681–91. doi:10.1007/s11095-021-03034-8
- 30 Dubochet J, McDowell AW. VITRIFICATION OF PURE WATER FOR ELECTRON MICROSCOPY. *J Microsc* 1981;**124**:3–4. doi:10.1111/j.1365-2818.1981.tb02483.x
- 31 Carradori D, Saulnier P, Pr at V, *et al.* NFL-lipid nanocapsules for brain neural stem cell targeting in vitro and in vivo. *J Control Release Off J Control Release Soc* 2016;**238**:253–62. doi:10.1016/j.jconrel.2016.08.006
- 32 Gazaille C, Bozzato E, Madadian-Bozorg N, *et al.* Glioblastoma-targeted, local and sustained drug delivery system based on an unconventional lipid nanocapsule hydrogel. *Biomater Adv* 2023;**153**:213549. doi:10.1016/j.bioadv.2023.213549
- 33 Marques AC, Costa PC, Velho S, *et al.* Injectable Ploxamer Hydrogels for Local Cancer Therapy. *Gels* 2023;**9**:593. doi:10.3390/gels9070593
- 34 Bastiancich C, Vanvarenberg K, Ucakar B, *et al.* Lauroyl-gemcitabine-loaded lipid nanocapsule hydrogel for the treatment of glioblastoma. *J Control Release Off J Control Release Soc* 2016;**225**:283–93. doi:10.1016/j.jconrel.2016.01.054
- 35 Bastiancich C, Bianco J, Vanvarenberg K, *et al.* Injectable nanomedicine hydrogel for local chemotherapy of glioblastoma after surgical resection. *J Control Release Off J Control Release Soc* 2017;**264**:45–54. doi:10.1016/j.jconrel.2017.08.019
- 36 Wang R, Hughes T, Beck S, *et al.* Generation of toxic degradation products by sonication of Pluronic® dispersants: implications for nanotoxicity testing. *Nanotoxicology* 2013;**7**:1272–81. doi:10.3109/17435390.2012.736547

Discussion, conclusions et perspectives

Table des matières

INTERETS DES APPLICATIONS LOCALES	194
L'ACIDE URSOLIQUE EST-IL REELLEMENT UNE MOLECULE EFFICACE POUR SENSIBILISER LES PATIENTS RESISTANTS AU TMZ ?	197
COMMENT EXPLOITER LES MULTIPLES FACETTES DE L'AU ?	199
BIBLIOGRAPHIE	202

Le glioblastome (GBM), le type de cancer cérébral le plus fréquent et le plus particulièrement agressif, représente actuellement l'une des énigmes les plus complexes en cancérologie. Cette tumeur maligne se développe rapidement à partir des cellules gliales du cerveau, et sa croissance incontrôlée envahit rapidement les tissus environnants [1]. Les défis liés au traitement du GBM sont nombreux rendant cette maladie très difficile à combattre [2-4]. Tout d'abord, la localisation du GBM dans le cerveau rend l'accès des traitements compliqué. Le cerveau est un organe délicat et complexe, où chaque millimètre de tissu a une fonction essentielle d'un point de vue cognitif voire vitale. L'excision chirurgicale complète de la tumeur est souvent impossible en raison de sa proximité avec des zones sensibles et fragiles du cerveau, dont les ablations non souhaitées pourraient provoquer des lésions irréversibles pour les patients. Les cellules tumorales infiltrées, difficiles à distinguer des cellules saines, échappent donc souvent à l'intervention chirurgicale [5,6]. Ensuite, le GBM est notoirement résistant aux traitements conventionnels tels que la radiothérapie et la chimiothérapie. Les cellules tumorales ont la capacité de développer une résistance aux médicaments, ce qui limite l'efficacité des traitements et peut entraîner des rechutes. C'est le cas par exemple de la résistance au témozolomide (TMZ) induite par une trop forte expression de la 6-O-méthylguanine-ADN-méthyltransférase (MGMT) et qui concerne environ la moitié des patients [7]. De plus, le GBM présente une grande hétérogénéité cellulaire qui se traduit par une forte diversité au niveau chimique, physique et biologique, ce qui signifie qu'il peut différer considérablement d'un patient à l'autre. Cela rend difficile l'élaboration de traitements standardisés et chaque cas doit nécessiter une approche personnalisée. Enfin, la rapidité avec laquelle le GBM progresse est déconcertante. Les symptômes peuvent se manifester rapidement, laissant peu de temps pour l'intervention médicale, et la médiane de survie après le diagnostic est généralement de l'ordre de quelques mois à un an [1,8-10].

Certaines stratégies thérapeutiques ont été proposées pour faire face à ces obstacles. C'est le cas par exemple de la délivrance intratumorale directe. De manière générale, le GBM ne produit pas de métastase probablement en raison de la faible espérance de vie des patients et de la présence de la barrière hémato-encéphalique [2,11,12]. L'administration locale de médicament paraît alors une solution appropriée d'autant plus que deux méta-analyses de 2021 et 2023 montrent que les approches locales dans le traitement du GBM sont plus efficaces que les approches systémiques [13,14].

L'objectif principal de cette thèse était de proposer une amélioration du protocole standard du traitement du GBM. Actuellement, la prise en charge du GBM suit généralement les recommandations de Stupp, impliquant une résection chirurgicale maximale, si possible, suivie d'une période de récupération de 4 à 6 semaines, puis un protocole de radiothérapie et de chimiothérapie. Le concept novateur de ce projet consistait à administrer des plateformes de type hydrogel contenant des molécules actives, lesquelles pourraient être appliquées directement dans la cavité de résection au cours de la chirurgie, dans le but d'améliorer la sensibilité des patients aux agents de chimiothérapie et d'empêcher la prolifération des cellules résiduelles présentes aux abords de la cavité de résection. Ces plateformes hydrogels ont été développées de manière à pouvoir contrôler les cinétiques de libération des molécules actives, ces molécules pouvant être des agents de chimiothérapie ou comme ici des inhibiteurs de la MGMT permettant de sensibiliser les patients résistants au TMZ.

Intérêts des applications locales

Les implants de type hydrogel, bien que l'un des systèmes de délivrance de médicament les plus anciens, font encore preuve d'un réel intérêt et peuvent s'avérer des sources d'innovation avec des avancées remarquables dans le domaine de la médecine et de la biotechnologie. Ces matériaux souvent à base de polymère, composés principalement d'eau, présentent des propriétés uniques qui les rendent idéaux pour une variété d'applications médicales [15]. L'un de leurs avantages les plus significatifs réside dans leur capacité à imiter les tissus biologiques, ce qui les rend souvent compatibles avec le corps humain [16]. Les implants hydrogels peuvent être conçus pour libérer des médicaments de manière contrôlée sur une période prolongée, offrant ainsi un traitement efficace pour de nombreuses affections [16–19].

Formés de polymères hydrophiles, synthétiques ou naturels, réticulés de manière covalente ou non dans un environnement aqueux, les hydrogels sont des structures tridimensionnelles [15]. La variété de polymères disponibles permet de moduler les propriétés des hydrogels : bioadhésion, biodégradabilité, biocompatibilité, etc. pour qu'ils soient adaptés à des applications à long ou court terme sur des tissus biologiques [16]. Le tissu cérébral exige en particulier une haute biocompatibilité [17]. Les hydrogels peuvent contenir une large variété d'actifs pharmaceutiques, hydrophiles ou légèrement lipophiles, mais aussi des molécules biologiques de type protéine ou acide nucléique [20–22]. La libération de ces molécules peut être modulée par la distribution et la nature des réticulations [18]. En raison de leur nature hydrophile, les hydrogels ne peuvent pas incorporer des agents cytotoxiques hydrophobes, limitant ainsi leur utilisation dans les stratégies thérapeutiques contre les tumeurs, et pour surmonter cette limitation, des nanosystèmes peuvent être associés aux hydrogels. Ces dernières années, les nanovecteurs ont été largement étudiés comme solution thérapeutique contre le GBM [23,24]. Ils sont capables de transporter tout type de molécules actives vers les cellules tumorales, grâce à leurs propriétés physiques et chimiques ajustables. Ces nanosystèmes ont la capacité de protéger les molécules actives de la dégradation, améliorant ainsi leur durée de vie et réduisant leurs effets indésirables. Ainsi, la combinaison d'hydrogels et de nanovecteurs ouvre la voie au développement de stratégies thérapeutiques combinant les avantages des deux approches, pour diverses applications biomédicales [25], mais aussi pour améliorer les thérapies anti-GBM comme vu dans le chapitre 1.

Afin d'innover sur la thématique des hydrogels de nanoparticules, nous avons pensé dans un premier temps au développement de nouvelles structures d'hydrogel basées exclusivement sur la réticulation covalente de nanocapsules lipidiques (NCLs). Nous avons réussi à fonctionnaliser les NCLs avec des groupements maléimide et à les réticuler en utilisant des agents de réticulation thiolés, s'appuyant sur la réaction maléimide-thiol (addition de Michael). Dans le chapitre 2, de nombreux facteurs ont été identifiés comme exerçant une influence significative sur la formulation des hydrogels, notamment la concentration en NCLs, le taux de maléimide à la surface des NCLs, la nature des agents de réticulation thiolés et le rapport molaire entre les fonctions maléimide et thiol. Tous ces paramètres jouent un rôle crucial dans les propriétés viscoélastiques des hydrogels obtenus. En résumé, nous avons constaté que les hydrogels les plus rigides sont obtenus avec des concentrations en NCLs et des compositions en maléimide plus élevées. De plus, des rapports équimolaires maléimide/thiol sont optimaux

pour obtenir les hydrogels avec la plus forte élasticité. La nature de l'agent de réticulation est aussi importante puisque les agents en étoile (*i.e.* 4arm-PEG-SH), possédant une réticulation intrinsèque, permettent d'obtenir les hydrogels les plus stables, restant quasi intact lors des expériences de libération. Les hydrogels formés par les agents de réticulation linéaires (*i.e.* 2arm-PEG-SH) se sont pratiquement complètement dégradés. Les expériences de FRAP ont complété les profils de libération de système modèles libérés des hydrogels, montrant une diffusion limitée pour les grandes masses molaires et une diffusion beaucoup plus importante dans le cas des faibles masses molaires. De plus, ces hydrogels se caractérisent par une capacité de gonflement quasi nulle, ce qui pourrait s'avérer avantageux dans le contexte d'applications intracérébrales par exemple, pour lesquelles un gonflement important pourrait provoquer des effets indésirables.

Cependant il n'existe aucune limite à la fantaisie que nous pouvons déployer dans la conception de nouvelles architectures d'hydrogels de nanoparticules. On peut très bien imaginer des hydrogels conçus à partir de nanovecteurs autres que des NCLs. Des liposomes pourraient aussi être utilisés au même titre que les NCLs pour former ces hydrogels, avec des agents de réticulation agissant par liaison covalente ou non. L'avantage de ces hydrogels à base de liposome est qu'il serait possible d'encapsuler un éventail plus large de molécules : i) des molécules lipophiles qui se placeraient dans la bicouche lipidique et ii) des molécules hydrophiles dans le cœur aqueux des liposomes. Il serait également possible de proposer des implants dont la libération des actifs thérapeutiques encapsulés pourrait être déclenchée à un moment défini par une stimulation extérieure. Des hydrogels de nanoparticules formulés avec des agents de réticulations possédant des fonctions clivables pourraient être envisagés. Parmi les options de fonctions clivables, on pourrait retrouver i) des fonctions photoclivables avec des groupements de type o-nitrobenzyle et ses dérivés [26,27] ou des groupements coumarine et ses dérivés [28,29] ; ii) des fonctions dépendantes du pH avec des groupements de type β -thiopropionate [30] hydrazine [31], acétal/kétal [32,33], imine [34], orthoester [35], ou encore iii) des fonctions sensibles à l'oxydo-réduction telles que les ponts disulfure. Ces hydrogels de nanoparticules pourraient également être constitués de deux réseaux interpénétrés avec des liaisons covalentes différentes de type alcyne/azoture [36], amine/N-hydroxysuccinimide [37], thiol/thiolpyridine [38], furane/maléimide [39] ou azlactone/amine [40]. Il serait également possible d'envisager de combiner des liaisons covalentes et non covalentes, ou bien d'utiliser différentes fonctions clivables de manière à séquencer la libération des actifs thérapeutiques. Il est finalement tout à fait possible d'incorporer dans ces hydrogels des nano-objets non réticulés comme nous l'avons fait pour l'étude de la diffusion au sein des hydrogels de NCLs dans le chapitre 2, où des NCLs non réticulées ont été utilisées. De cette manière, des cinétiques de libération différentes des nanoparticules permettraient de séquencer la libération des actifs thérapeutiques encapsulés.

Ainsi, une approche "hyperpersonnalisée" pourrait consister à combiner toutes ces propositions en créant des hydrogels complexes avec des réseaux interpénétrés ou non, constitués de liaisons covalentes ou non, clivables ou non, associés à divers types de nanoparticules, réticulées ou non, encapsulant des agents lipophiles ou hydrophiles. Un cas particulier de ce type de scénario est proposé en figure 7-1 mais l'imagination n'a aucune limite. Ces développements ouvrent des perspectives prometteuses pour la conception d'implants innovants et hautement personnalisés pour le traitement du GBM mais aussi d'autres pathologies nécessitant une application locale et une libération prolongée des actifs thérapeutiques.

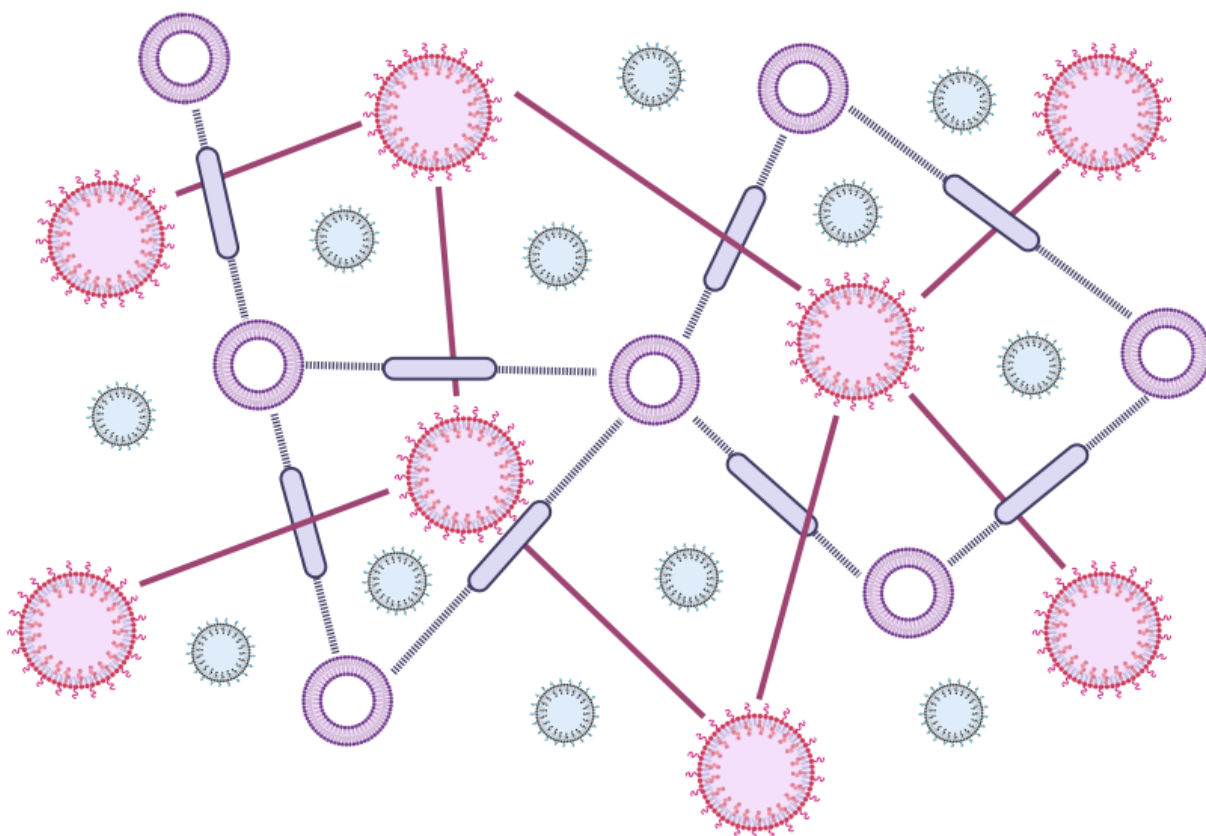


Figure 7-1. Exemple d'un hydrogel complexe constitué de NCLs libres (particules bleues) dispersées dans deux réseaux interpénétrés : un premier de NCLs réticulées les unes avec les autres (particule roses) par des liaisons covalentes (roses) et un deuxième de liposomes réticulés (particules violettes) par des fonctions clivables (violettes). Chaque nanoparticule peut encapsuler des molécules actives différentes dont les cinétiques de libération peuvent être adaptées et différentes les unes des autres. Figure réalisée avec BioRender.com.

L'acide ursolique est-il réellement une molécule efficace pour sensibiliser les patients résistants au TMZ ?

Comme discuté précédemment dans le chapitre 3, un certain niveau de MGMT dans les cellules profère une protection contre les mutations et est un des principaux mécanismes de défense contre les dommages induits par les carcinogènes mais aussi par les agents alkylants. Ainsi, la MGMT joue un double rôle où son expression entraîne une diminution de la carcinogenèse mais aussi une diminution de l'efficacité des agents alkylants thérapeutiques. La réponse au protocole de Stupp (décrit dans le chapitre 1) impliquant l'agent alkylant TMZ, pour les patients atteints de GBM, est directement corrélé au statut méthylé ou non méthylé du promoteur de la MGMT dans les tumeurs des patients. Hegi *et al.* ont montré que l'hyperméthylation de la MGMT joue un rôle clé dans la réponse positive au TMZ, par une analyse multicentrique effectuée sur 206 patients en 2005 [7]. Environ 45% des patients avaient un promoteur de la MGMT hyperméthylé. Chez les patients avec un promoteur de la MGMT hyperméthylé, soit n'exprimant pas la MGMT, et traités par TMZ et radiothérapie, la médiane de survie était de 21,7 mois contre 12,7 mois pour les patients avec un promoteur de la MGMT non-méthylé, soit surexprimant la MGMT.

Notre objectif a donc été d'améliorer les hydrogels de NCLs en proposant une formulation sans liaison covalente mais avec un inhibiteur de la MGMT : l'acide ursolique (AU). Ce dispositif présente trois caractéristiques majeures : premièrement, il ne comporte pas de réseau polymère, ce qui permet de réduire les effets secondaires indésirables ; deuxièmement, il est chargé d'un inhibiteur de la MGMT : l'AU, capable de sensibiliser de manière continue les cellules qui surexpriment la MGMT, afin d'améliorer le traitement standard ; troisièmement, il est conçu pour être implanté dans la cavité laissée par l'ablation chirurgicale de la tumeur par le neurochirurgien. Comme vu dans le chapitre 4, les propriétés mécaniques de ces hydrogels de NCLs, formulés en présence d'AU, se sont avérées optimales pour une administration dans la cavité résiduelle après la résection de la tumeur. De plus, ces hydrogels ont permis une libération prolongée de l'AU sur une période d'au moins 9 jours, même si l'AU n'était pas encapsulé au cœur des NCLs. Cette forme d'hydrogel n'a en aucun cas altéré la fonction désirée de l'AU, car elle a permis d'inhiber de manière efficace l'expression de la MGMT dans la lignée cellulaire T98G qui surexprime cette protéine. En conséquence, cette formulation se révèle prometteuse pour restaurer la sensibilité des cellules du GBM au TMZ chez les patients présentant un GBM avec un promoteur non-méthylé de la MGMT.

Cependant, nous avons estimé l'absence d'encapsulation de l'AU dans les NCLs insatisfaisante, ce qui nous a conduit à reconsidérer la méthode d'administration de l'AU. Dans le but de rétablir la sensibilité de ces patients au TMZ, nous avons développé des nanoprecipités d'AU (AU-NPs) dans le chapitre 5. La fabrication de ces AU-NPs repose sur un processus de nanoprecipitation utilisant une méthode *bottom-up* par effet antisolvant. Les AU-NPs ont un diamètre hydrodynamique d'environ 200 nm, et leur suspension reste stable en milieu aqueux pendant au moins un mois. Nous avons optimisé la formulation des AU-NPs en y intégrant des sondes fluorescentes qui génèrent un signal FRET. Cette approche nous a permis de surveiller en temps réel l'intégrité de ces nanoprecipités. Cette approche a aussi été utilisée pour confirmer leur internalisation dans les cellules de GBM et

observer leur dégradation intracellulaire sur une période de 72 h. En comparaison avec l'AU non-formulé, les AU-NPs se sont avérés plus efficaces pour réduire l'expression de la protéine MGMT. Cette réussite ouvre la voie à une potentialisation de l'efficacité du traitement chimiothérapeutique chez les cellules du GBM qui surexpriment cette protéine.

Même si l'AU a semblé montrer des effets d'inhibition de la MGMT, l'effet obtenu n'est pas aussi remarquable que celui auquel nous nous serions attendus en utilisant une simple lignée cellulaire. La diminution de l'expression de la MGMT a été limitée à seulement 40% avec les AU-NPs. On peut se poser la question de l'effet d'inhibition de la MGMT qui sera obtenu lors de l'utilisation de modèles plus complexes comme des modèles de GBM primaires *in vitro* et *in vivo*, et pour lesquels cet effet risque de ne pas être observé avec l'AU. Peut-être aurait-il été intéressant de travailler avec d'autres inhibiteurs de la MGMT aux vues du large éventail disponible présenté dans le chapitre 3. Le disulfirame par exemple a déjà été encapsulé dans des NCLs [41], dont la composition est très proche de celles utilisées dans les chapitres précédents [42]. De plus, des combinaisons d'inhibiteurs avec des modes d'action différents : inhibitions de l'expression ou de l'activité de la protéine, pourraient également être utilisés dans le même implant de manière à renforcer l'inhibition de la MGMT. Dans de telles formulations, les NCLs qui forment les hydrogels pourraient aussi contenir des principes actifs antitumoraux de manière à compléter l'action du ou des inhibiteurs. Des hydrogels de NCLs avec des combinaisons d'actifs ont déjà été formulés, notamment des hydrogels de NCLs formulés avec l'agent de réticulation cytotoxique GemC12 et contenant du paclitaxel. L'encapsulation de paclitaxel au cœur des NCLs fait qu'il n'est pas impliqué dans la formation de l'hydrogel. Ainsi, les propriétés mécaniques des hydrogels n'ont pas été modifiées et reste dès lors adapté à une implantation dans le cerveau. De par sa localisation, le paclitaxel n'influence pas non plus la dissolution de l'hydrogel puisque la libération de la GemC12 reste inchangée [43]. Ainsi, on pourrait imaginer encapsuler un agent alkylant dans les NCLs et avoir une action combinée avec l'activité de l'inhibiteur de la MGMT. L'encapsulation d'autres actifs qui pourraient être complémentaires à toute autre action pharmacologique de l'inhibiteur pourrait aussi être envisagée.

Même si la diminution de l'expression de la MGMT nous semble limitée avec les AU-NPs, nous avons quand même observé une sensibilisation assez remarquable des cellules au TMZ d'un facteur 10 avec la combinaison AU-NPs / TMZ, comparativement à la combinaison AU unimoléculaire / TMZ ou au TMZ seul. On peut s'interroger sur un tel effet qui pourrait ne pas être uniquement dû à la simple inhibition de la MGMT. Comme vu dans le chapitre 3 et dans les introductions des chapitres suivants, l'AU possède de multiples propriétés autres que la simple inhibition de l'expression de la MGMT. Ainsi, il pourrait exister un effet synergique de la combinaison AU / TMZ qui permettrait de renforcer l'effet du TMZ. Cette piste de réflexion mérite d'être explorée en détail afin d'identifier les mécanismes biologiques impliqués.

Comment exploiter les multiples facettes de l'AU ?

L'AU est un triterpène pentacyclique naturel présent dans de nombreux fruits et plantes et est connu pour ses nombreux effets biologiques [44]. Cependant, toutes ces actions biologiques ont-elles un avantage pour une stratégie thérapeutique comme la nôtre ? L'AU semble avoir des propriétés de protections contre de nombreuses pathologies ce qui à première vue paraît très intéressant. Néanmoins, cette action pléiotropique pourrait également entraîner un effet tumorigène supplémentaire en activant des mécanismes non-cibles ou sous silence chez les patients atteints de GBM. C'est en ce sens que nous nous sommes intéressés aux impacts qu'un traitement à l'AU pourrait avoir sur le métabolisme des cellules de GBM.

Les cellules U-87 MG et T98G ont été traitées pendant 72h avec 3µg/mL d'AU puis leur signature métabolique a été établie grâce au dosage de 630 métabolites et ratios de métabolites (Kit Biocrates, MxP® Quant 500 Kit). Pour les cellules U-87 MG, 21 métabolites ont été significativement augmentés pour les cellules traitées avec l'AU par rapport à celles non traitées. Il s'agit de l'acide gamma-aminobutyrique (p = 0,004), de la trans-4-hydroxyproline (p = 0,011), de la leucine (p = 0,011), de l'acétylcarnitine (p = 0,011), de la taurine (p = 0,011), de la propionylcarnitine (p = 0,011), de l'acide 5-aminovalérique (p = 0,011), de la thréonine (p = 0,015), de la sarcosine (p = 0,020), de l'isoleucine (p = 0,022), du glutamate (p = 0,022), de la putrescine (p = 0,022), de l'acide alpha-aminobutyrique (p = 0,022), de l'acide alpha-aminoadipique (p = 0,025), de l'alanine (p = 0,025), de la carnitine (p = 0,025), de la beta-alanine (p = 0,029), de la 1-méthylhistidine (p = 0,031), de la méthionine (p = 0,044), de la diméthylarginine symétrique (p = 0,044) et de l'asparagine (p = 0,049) (figure 7-2). Les cellules T98G quant à elles ont vu 7 de leurs métabolites significativement surexprimés avec un traitement à l'AU. Il s'agit de la lysophosphatidylcholine C16:0 (p = 0,001), de la lysophosphatidylcholine C18:1 (p = 0,001), de la lysophosphatidylcholine C16:1 (p = 0,001), de la lysophosphatidylcholine C17:0 (p = 0,12), de la lysophosphatidylcholine C18:0 (p = 0,14), de la choline (p = 0,018) et de la diméthylarginine symétrique (p = 0,041) (figure 7-3).

De toute évidence, l'AU modifie les signatures métabolomiques des cellules de GBM et différemment d'une lignée cellulaire à l'autre. Ces modifications pourraient avoir des impacts importants sur les cellules tumorales mais aussi sur les cellules saines environnantes. Par exemple, la diméthylarginine symétrique qui est surexprimée dans les deux lignées cellulaires est impliquée dans les dysfonctionnements endothéliaux et rénaux, dans des pathologies vasculaires et dans l'internalisation de la L-arginine qui participe au maintien du cycle de l'urée et à la migration cellulaire [45,46]. De même, les lysophosphatidylcholines qui sont surexprimées dans les cellules T98G sont impliquées entre autres dans la stabilité de la fonction mitochondriale, dans la migration et la prolifération cellulaire, et leur surexpression cérébrale a été montrée comme pouvant entraîner des dommages à la barrière hémato-encéphalique, une démyélinisation des neurones, un défaut des fonctions motrices et une augmentation des risques neurodégénératifs [47]. Enfin, l'acide gamma-aminobutyrique et le glutamate surexprimés dans les cellules U-87 MG avec un traitement à l'AU sont impliqués dans l'homéostasie de la balance excitation/inhibition de l'activité cérébrale. Une perturbation de cette balance par surexpression de l'un ou de l'autre est observée notamment dans des pathologies neurologiques telles que la maladie d'Alzheimer, l'épilepsie,

la schizophrénie ou encore les troubles du spectre autistique, et entraîne des dysfonctionnements de neurotransmission, ce qui peut impacter les fonctions cognitives et motrices [48].

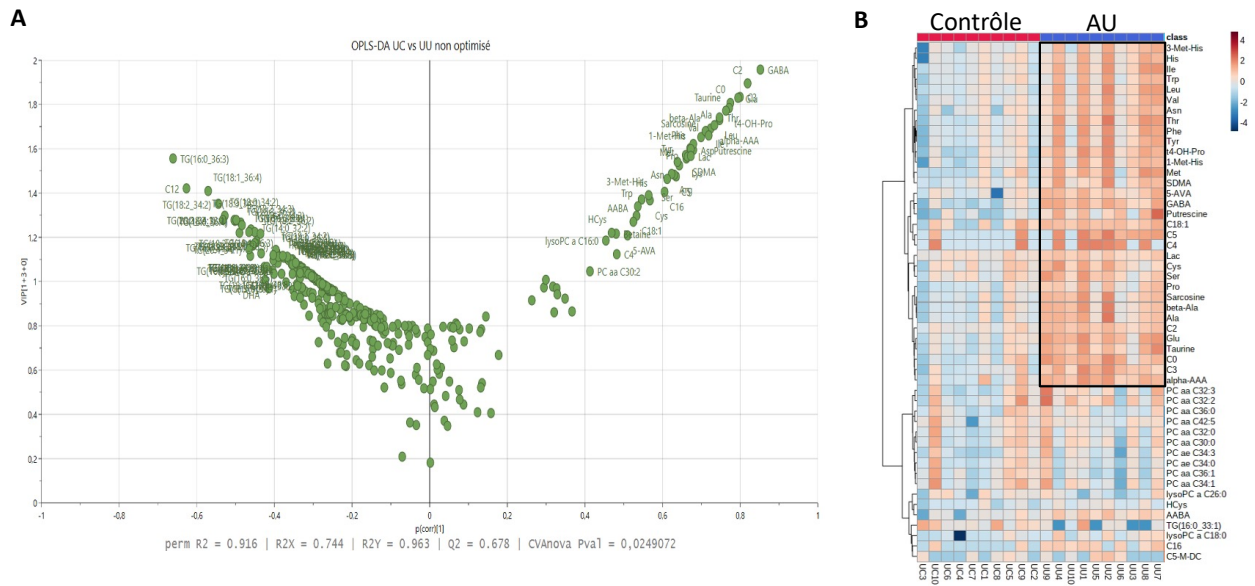


Figure 7-2. L'AU modifie la signature métabolique des cellules U-87MG. (A) Coefficients versus VIP pour le modèle OPLS-DA obtenu pour l'analyse métabolomique des cellules U-87 MG traitées ou non avec 3µg/mL d'AU. Les coefficients négatifs (à gauche) et positifs (à droite) indiquent une expression diminuée ou augmentée des métabolites dans les cellules traitées avec de l'AU par rapport au contrôle. (B) Heat-map de l'expression de certains métabolites dans des cellules U-87MG traitées ou non avec 3 µg/mL d'AU.

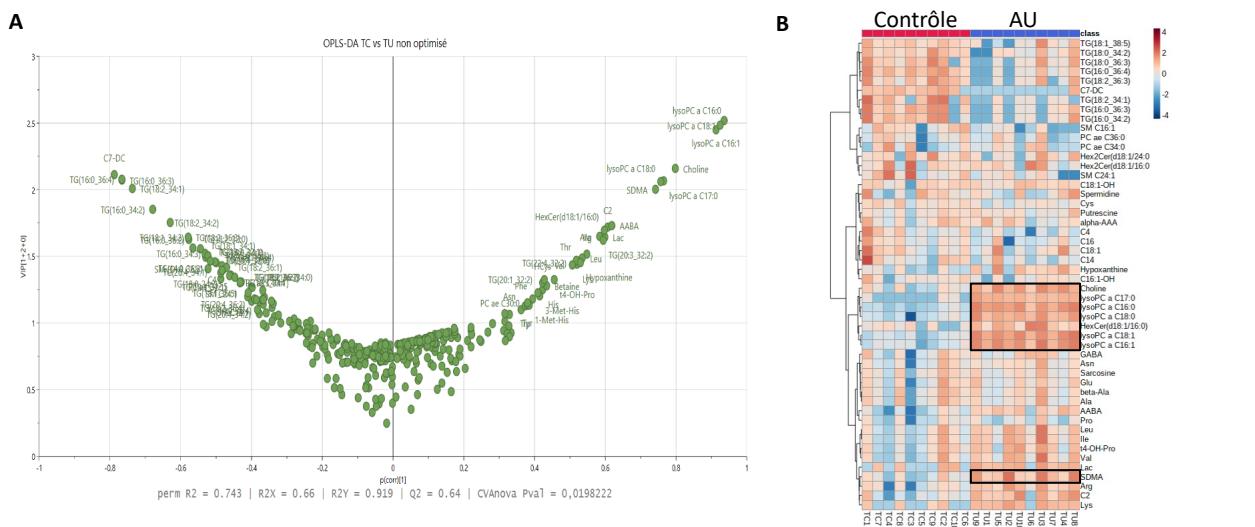


Figure 7-3. L'AU modifie la signature métabolique des cellules T98G. (A) Coefficients versus VIP pour le modèle OPLS-DA obtenu pour l'analyse métabolomique des cellules T98G traitées ou non avec 3µg/mL d'AU. Les coefficients négatifs (à gauche) et positifs (à droite) indiquent une expression diminuée ou augmentée des métabolites dans les cellules traitées avec de l'AU par rapport au contrôle. (B) Heat-map de l'expression de certains métabolites dans des cellules U-87MG traitées ou non avec 3 µg/mL d'AU.



Dans les deux lignées cellulaires traitées avec l'AU, l'expression d'autres métabolites se retrouvent également significativement diminuée, ce qui peut aussi impacter des voies de signalisation biologiques spécifiques. Dans tous les cas, la balance bénéfice-risque quant à l'administration d'un traitement à l'AU dans le cadre du traitement contre le GBM reste à évaluer. Cette analyse méritera une identification approfondie afin de décrire les voies métaboliques impliquées lors du traitement avec l'AU. Cette étude préliminaire peut être à l'origine d'une étude métabolomique plus conséquente afin de vérifier l'effet de l'AU mais aussi pourquoi identifier des cibles thérapeutiques complémentaires au traitement à l'AU.

Le gros point positif de ce travail est que nous avons réussi à formuler des AU-NPs stables, avec une capacité de charge de 100%. Bien que nous nous sommes intéressés uniquement au GBM, l'AU possède de multiples actions biologiques. En effet, l'AU aurait des propriétés antiépileptiques [49], antitumorales [50] et antibactériennes[51]. Il permettrait aussi de protéger contre les pathologies métaboliques [52], contre des substances toxiques comme l'éthanol au niveau hépatique, contre les modifications de la pression artérielle, contre les pathologies musculaires (sarcopénie, amyotrophie, sclérose latérale amyotrophique, etc.), contre l'ostéolyse en inhibant la formation d'ostéoclastes, etc. [44]. La nouvelle formulation que nous avons mise au point, plus efficace que l'AU unimoléculaire dans le cas du GBM, pourrait être testée dans ces différentes applications. Cette nanoformulation pourrait avoir des propriétés de biodisponibilité et des profils de pharmacocinétique et de biodistribution qui pourraient s'avérer intéressants pour améliorer les activités thérapeutiques de l'AU citées précédemment. De bien belles perspectives pour cette molécule.

Bibliographie

- 1 Alexander BM, Cloughesy TF. Adult Glioblastoma. *J Clin Oncol* 2017;**35**:2402–9. doi:10.1200/JCO.2017.73.0119
- 2 Janjua TI, Rewatkar P, Ahmed-Cox A, et al. Frontiers in the treatment of glioblastoma: Past, present and emerging. *Adv Drug Deliv Rev* 2021;**171**:108–38. doi:10.1016/j.addr.2021.01.012
- 3 Cruz JVR, Batista C, Afonso B de H, et al. Obstacles to Glioblastoma Treatment Two Decades after Temozolomide. *Cancers* 2022;**14**:3203. doi:10.3390/cancers14133203
- 4 Lim M, Xia Y, Bettgowda C, et al. Current state of immunotherapy for glioblastoma. *Nat Rev Clin Oncol* 2018;**15**:422–42. doi:10.1038/s41571-018-0003-5
- 5 Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N Engl J Med* 2005;**352**:987–96. doi:10.1056/NEJMoa043330
- 6 Davis M. Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. *Clin J Oncol Nurs* 2016;**20**:S2–8. doi:10.1188/16.CJON.S1.2-8
- 7 Hegi ME, Diserens A-C, Gorlia T, et al. MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *N Engl J Med* 2005;**352**:997–1003. doi:10.1056/NEJMoa043331
- 8 Chaichana KL, Parker SL, Olivi A, et al. Long-term seizure outcomes in adult patients undergoing primary resection of malignant brain astrocytomas: Clinical article. *J Neurosurg* 2009;**111**:282–92. doi:10.3171/2009.2.JNS081132
- 9 Miller KD, Ostrom QT, Kruchko C, et al. Brain and other central nervous system tumor statistics, 2021. *CA Cancer J Clin* 2021;**71**:381–406. doi:10.3322/caac.21693
- 10 Ostrom QT, Cioffi G, Waite K, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2014–2018. *Neuro-Oncol* 2021;**23**:iii1–105. doi:10.1093/neuonc/noab200
- 11 Lun M, Lok E, Gautam S, et al. The natural history of extracranial metastasis from glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* 2011;**105**:261–73. doi:10.1007/s11060-011-0575-8
- 12 Ginat DT, Schaefer PW. Imaging guidelines and findings of extracranial glioblastoma. *J Neurooncol* 2014;**118**:9–18. doi:10.1007/s11060-014-1404-7
- 13 Wang Y, Bastiancich C, Newland B. Injectable local drug delivery systems for glioblastoma: a systematic review and meta-analysis of progress to date. *Biomater Sci* 2023;**11**:1553–66. doi:10.1039/D2BM01534J
- 14 Bastiancich C, Bozzato E, Henley I, et al. Does local drug delivery still hold therapeutic promise for brain cancer? A systematic review. *J Controlled Release* 2021;**337**:296–305. doi:10.1016/j.jconrel.2021.07.031
- 15 Peppas NA, Bures P, Leobandung W, et al. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Pharm Verfahrenstechnik EV* 2000;**50**:27–46. doi:10.1016/s0939-6411(00)00090-4
- 16 Chai Q, Jiao Y, Yu X. Hydrogels for Biomedical Applications: Their Characteristics and the Mechanisms behind Them. *Gels Basel Switz* 2017;**3**:E6. doi:10.3390/gels3010006

- 17 Budday S, Sommer G, Birkl C, *et al.* Mechanical characterization of human brain tissue. *Acta Biomater* 2017;**48**:319–40. doi:10.1016/j.actbio.2016.10.036
- 18 Hoffman AS. Stimuli-responsive polymers: biomedical applications and challenges for clinical translation. *Adv Drug Deliv Rev* 2013;**65**:10–6. doi:10.1016/j.addr.2012.11.004
- 19 Zhu J, Marchant RE. Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds. *Expert Rev Med Devices* 2011;**8**:607–26. doi:10.1586/erd.11.27
- 20 Larrañeta E, Stewart S, Ervine M, *et al.* Hydrogels for Hydrophobic Drug Delivery. Classification, Synthesis and Applications. *J Funct Biomater* 2018;**9**:E13. doi:10.3390/jfb9010013
- 21 McKenzie M, Betts D, Suh A, *et al.* Hydrogel-Based Drug Delivery Systems for Poorly Water-Soluble Drugs. *Mol Basel Switz* 2015;**20**:20397–408. doi:10.3390/molecules201119705
- 22 Puente P de la, Fettig N, Luderer MJ, *et al.* Injectable Hydrogels for Localized Chemotherapy and Radiotherapy in Brain Tumors. *J Pharm Sci* 2018;**107**:922–33. doi:10.1016/j.xphs.2017.10.042
- 23 Pourgholi F, Hajivalili M, Farhad J-N, *et al.* Nanoparticles: Novel vehicles in treatment of Glioblastoma. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother* 2016;**77**:98–107. doi:10.1016/j.biopha.2015.12.014
- 24 Karim R, Palazzo C, Evrard B, *et al.* Nanocarriers for the treatment of glioblastoma multiforme: Current state-of-the-art. *J Control Release Off J Control Release Soc* 2016;**227**:23–37. doi:10.1016/j.jconrel.2016.02.026
- 25 Pitorre M, Gondé H, Haury C, *et al.* Recent advances in nanocarrier-loaded gels: Which drug delivery technologies against which diseases? *J Control Release Off J Control Release Soc* 2017;**266**:140–55. doi:10.1016/j.jconrel.2017.09.031
- 26 Kloxin AM, Kasko AM, Salinas CN, *et al.* Photodegradable hydrogels for dynamic tuning of physical and chemical properties. *Science* 2009;**324**:59–63. doi:10.1126/science.1169494
- 27 Rosales AM, Vega SL, DelRio FW, *et al.* Hydrogels with Reversible Mechanics to Probe Dynamic Cell Microenvironments. *Angew Chem Int Ed* 2017;**56**:12132–6. doi:10.1002/anie.201705684
- 28 Goswami PP, Syed A, Beck CL, *et al.* BODIPY-Derived Photoremovable Protecting Groups Unmasked with Green Light. *J Am Chem Soc* 2015;**137**:3783–6. doi:10.1021/jacs.5b01297
- 29 Zeng X, Zhou X, Wu S. Red and Near-Infrared Light-Cleavable Polymers. *Macromol Rapid Commun* 2018;**39**:e1800034. doi:10.1002/marc.201800034
- 30 Oishi M, Nagasaki Y, Itaka K, *et al.* Lactosylated Poly(ethylene glycol)-siRNA Conjugate through Acid-Labile β -Thiopropionate Linkage to Construct pH-Sensitive Polyion Complex Micelles Achieving Enhanced Gene Silencing in Hepatoma Cells. *J Am Chem Soc* 2005;**127**:1624–5. doi:10.1021/ja044941d
- 31 Etrych T, Jelínková M, Ríhová B, *et al.* New HPMA copolymers containing doxorubicin bound via pH-sensitive linkage: synthesis and preliminary in vitro and in vivo biological properties. *J Control Release Off J Control Release Soc* 2001;**73**:89–102. doi:10.1016/s0168-3659(01)00281-4
- 32 Gillies ER, Goodwin AP, Fréchet MJM. Acetals as pH-sensitive linkages for drug delivery. *Bioconjug Chem* 2004;**15**:1254–63. doi:10.1021/bc049853x
- 33 Gu Y, Zhong Y, Meng F, *et al.* Acetal-Linked Paclitaxel Prodrug Micellar Nanoparticles as a Versatile and Potent Platform for Cancer Therapy. *Biomacromolecules* 2013;**14**:2772–80. doi:10.1021/bm400615n

- 34 Li Y, Song L, Lin J, *et al.* Programmed Nanococktail Based on pH-Responsive Function Switch for Self-Synergistic Tumor-Targeting Therapy. *ACS Appl Mater Interfaces* 2017;**9**:39127–42. doi:10.1021/acsami.7b08218
- 35 Huang X, Du F, Cheng J, *et al.* Acid-Sensitive Polymeric Micelles Based on Thermoresponsive Block Copolymers with Pendent Cyclic Orthoester Groups. *Macromolecules* 2009;**42**:783–90. doi:10.1021/ma802138r
- 36 Wilder LM, Fies WA, Rabin C, *et al.* Conjugation of an α -Helical Peptide to the Surface of Gold Nanoparticles. *Langmuir* 2019;**35**:3363–71. doi:10.1021/acs.langmuir.9b00075
- 37 Zangoli M, Maria FD, Zucchetti E, *et al.* Engineering thiophene-based nanoparticles to induce phototransduction in live cells under illumination. *Nanoscale* 2017;**9**:9202–9. doi:10.1039/C7NR01793F
- 38 Nagy P. Kinetics and Mechanisms of Thiol–Disulfide Exchange Covering Direct Substitution and Thiol Oxidation-Mediated Pathways. *Antioxid Redox Signal* 2013;**18**:1623–41. doi:10.1089/ars.2012.4973
- 39 N'Guyen TTT, Duong HTT, Basuki J, *et al.* Functional iron oxide magnetic nanoparticles with hyperthermia-induced drug release ability by using a combination of orthogonal click reactions. *Angew Chem Int Ed Engl* 2013;**52**:14152–6. doi:10.1002/anie.201306724
- 40 Ho HT, Bénard A, Forcher G, *et al.* Azlactone-based heterobifunctional linkers with orthogonal clickable groups: efficient tools for bioconjugation with complete atom economy. *Org Biomol Chem* 2018;**16**:7124–8. doi:10.1039/c8ob01807c
- 41 Zhang L, Tian B, Li Y, *et al.* A Copper-Mediated Disulfiram-Loaded pH-Triggered PEG-Shedding TAT Peptide-Modified Lipid Nanocapsules for Use in Tumor Therapy. *ACS Appl Mater Interfaces* 2015;**7**:25147–61. doi:10.1021/acsami.5b06488
- 42 Gazaille C, Sicot M, Akiki M, *et al.* Characterization of Biological Material Adsorption to the Surface of Nanoparticles without a Prior Separation Step: a Case Study of Glioblastoma-Targeting Peptide and Lipid Nanocapsules. *Pharm Res* 2021;**38**:681–91. doi:10.1007/s11095-021-03034-8
- 43 Bastiancich C, Bozzato E, Luyten U, *et al.* Drug combination using an injectable nanomedicine hydrogel for glioblastoma treatment. *Int J Pharm* 2019;**559**:220–7. doi:10.1016/j.ijpharm.2019.01.042
- 44 Woźniak Ł, Skąpska S, Marszałek K. Ursolic Acid—A Pentacyclic Triterpenoid with a Wide Spectrum of Pharmacological Activities. *Molecules* 2015;**20**:20614–41. doi:10.3390/molecules201119721
- 45 Schwedhelm E, Böger RH. The role of asymmetric and symmetric dimethylarginines in renal disease. *Nat Rev Nephrol* 2011;**7**:275–85. doi:10.1038/nrneph.2011.31
- 46 Wu G, Meininger CJ, McNeal CJ, *et al.* Role of L-Arginine in Nitric Oxide Synthesis and Health in Humans. *Adv Exp Med Biol* 2021;**1332**:167–87. doi:10.1007/978-3-030-74180-8_10
- 47 Law S-H, Chan M-L, Marathe GK, *et al.* An Updated Review of Lysophosphatidylcholine Metabolism in Human Diseases. *Int J Mol Sci* 2019;**20**:1149. doi:10.3390/ijms20051149
- 48 Sears SM, Hewett SJ. Influence of glutamate and GABA transport on brain excitatory/inhibitory balance. *Exp Biol Med* 2021;**246**:1069–83. doi:10.1177/1535370221989263
- 49 Kazmi I, Afzal M, Gupta G, *et al.* Antiepileptic Potential of Ursolic Acid Stearoyl Glucoside by GABA Receptor Stimulation. *CNS Neurosci Ther* 2012;**18**:799–800. doi:10.1111/j.1755-5949.2012.00369.x

- 50 Wang Q, Zhao T, Liu Y, *et al.* An evaluation of anti-tumor effect and toxicity of PEGylated ursolic acid liposomes. *J Nanoparticle Res* 2016;**18**:34. doi:10.1007/s11051-016-3339-8
- 51 Qian W, Wang W, Zhang J, *et al.* Antimicrobial and antibiofilm activities of ursolic acid against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *J Antibiot (Tokyo)* Published Online First: 12 February 2020. doi:10.1038/s41429-020-0285-6
- 52 Kunkel SD, Elmore CJ, Bongers KS, *et al.* Ursolic Acid Increases Skeletal Muscle and Brown Fat and Decreases Diet-Induced Obesity, Glucose Intolerance and Fatty Liver Disease. *PLoS ONE* 2012;**7**:e39332. doi:10.1371/journal.pone.0039332

Titre : Nouvelles stratégies thérapeutiques localisées et capables d'inhiber la 6-O-méthylguanine-ADNméthyltransférase (MGMT) pour améliorer la prise en charge post-résection du glioblastome

Mots clés : Glioblastome, Hydrogel, 6-O-méthylguanine-ADN-méthyltransférase, Acide ursolique

Résumé : Les patients atteints de glioblastome (GBM) sont actuellement traités selon le protocole Stupp : une radio-chimiothérapie concomitante avec du témozolomide (TMZ). L'une des causes de résistance au traitement est l'expression de la 6-O-méthylguanine-ADN-méthyltransférase (MGMT). La MGMT appartient aux mécanismes globaux de réparation de l'ADN et élimine les groupements alkyles ajoutés sur l'ADN. Cependant, l'action pharmacologique du TMZ, un agent alkylant, consiste en la méthylation de l'ADN pour détruire les cellules tumorales. L'action du TMZ est donc inhibée par la MGMT, ce qui pose un problème majeur car la moitié des patients atteints de GBM surexprime cette protéine. Afin d'améliorer la prise en charge des patients et son protocole standard, deux pistes ont été explorées : la délivrance locale grâce à des implants hydrogel et l'inhibition de la MGMT.

Dans un premier temps, une plateforme de type hydrogel composé de nanocapsules lipidiques, réticulées par des liaisons covalentes, a été mise au point pour prolonger la libération de molécules actives. L'acide ursolique a ensuite été sélectionné pour sa capacité à inhiber la MGMT et a été formulé sous la forme de nanoprecipités. Son efficacité a ainsi été améliorée avec une meilleure inhibition de la MGMT et la sensibilisation au TMZ de cellules résistantes. Enfin ces nanoprecipités ont été inclus dans un hydrogel thermosensible permettant leur administration locale et prolongée. Ces approches novatrices pourraient permettre d'améliorer le pronostic et la qualité de vie des patients atteints de GBM, marquant une avancée significative dans la lutte contre cette tumeur cérébrale agressive.

Title: Novel localized therapeutic strategies able to inhibit the O6-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT) for the improvement of the post-resection glioblastoma standard of care

Keywords: Glioblastoma, Hydrogel, O6-methylguanine-DNA-methyltransferase, Ursolic acid

Abstract: Patients with glioblastoma (GBM) are currently treated according to the Stupp protocol, which includes radiotherapy and concomitant chemotherapy with temozolomide (TMZ). One of the causes of treatment resistance is the expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT). MGMT is part of the main DNA repair mechanisms, and this protein removes alkyl groups from DNA. However, the pharmacological action of TMZ, an alkylating agent, involves adding methyl groups to DNA to destroy tumor cells. MGMT inhibits the action of TMZ, posing a major problem as half of GBM patients overexpress MGMT. To improve patient care, two avenues of enhancement to the standard protocol have been explored: local delivery through hydrogel implants and MGMT inhibition.

First, a hydrogel platform composed of lipid nanocapsules cross-linked with covalent bonds, was developed to allow the sustained release of active molecules. Ursolic acid was then selected for its ability to inhibit MGMT and formulated into nanoprecipitates to enhance its efficacy. This led to improved MGMT inhibition and sensitization of resistant cells to TMZ. Finally, these nanoprecipitates were incorporated into a thermosensitive hydrogel for local and sustained administration. These innovative approaches could potentially improve the prognosis and quality of life for GBM patients, representing a significant advancement in the fight against this aggressive brain tumor.