



HAL
open science

Évaluation de nanoparticules polymères à base de dérivés du poly(malate de benzyle) et fonctionnalisation par des peptides hépatotropes pour le ciblage du carcinome hépatocellulaire

Élise Vène

► **To cite this version:**

Élise Vène. Évaluation de nanoparticules polymères à base de dérivés du poly(malate de benzyle) et fonctionnalisation par des peptides hépatotropes pour le ciblage du carcinome hépatocellulaire. Médecine humaine et pathologie. Université de Rennes, 2024. Français. NNT : 2024URENB004 . tel-04960701

HAL Id: tel-04960701

<https://theses.hal.science/tel-04960701v1>

Submitted on 21 Feb 2025

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

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

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES

ECOLE DOCTORALE N° 637

Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Oncologie

Par

Elise VENE

« Evaluation de nanoparticules polymères à base de dérivés du poly(malate de benzyle) et fonctionnalisation par des peptides hépatotropes pour le ciblage du carcinome hépatocellulaire »

« Thérapie vectorisée du carcinome hépatocellulaire »

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 24 janvier 2024

Unité de recherche : Institut Nutrition, Métabolismes et Cancer Inserm UMR1317, INRAe UMR1341

Thèse N° :

Rapporteurs avant soutenance :

Ariane BOUDIER
Laurence MOINE

Professeure, Université Nancy-Lorraine, Faculté de Pharmacie
Directrice de Recherche CNRS, UMR CNRS 8612, Institut Galien Paris-Saclay

Composition du Jury :

Président : Vincent LAGENTE

Professeur, Université de Rennes, Faculté de Pharmacie, UMR1317,
INRAe UMR1341

Examineurs : Emilie ROGER
Soizic CHEVANCE

Maitresse de Conférences, Université Angers, INSERM U1066, CNRS 6021
Maitresse de Conférences, Université de Rennes, Institut des Sciences
Chimiques de Rennes, UMR CNRS 6226

Mickaël BOURGEOIS

Maître de Conférences, Praticien Hospitalier, Université de Nantes,
ARRONAX, Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers

Dir. de thèse : Pascal LOYER

Directeur de Recherche Inserm, Inserm UMR1317, INRAe UMR1341

Co-dir. de thèse : Sandrine CAMMAS-MARION

Chargée de Recherche CNRS, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de
Rennes, UMR CNRS 6226

*« La clé de toutes les sciences est sans contredit le point d'interrogation ;
nous devons la plupart des grandes découvertes au : Comment ? »*

Honoré de Balzac

REMERCIEMENTS

Une expression populaire dit que lorsque l'on aime, on ne compte pas. Je pense cet adage s'applique parfaitement à cette thèse dont les 6 années ont été remplies de travaux passionnants et d'échanges enrichissants et stimulants. L'aboutissement de ce long parcours de thèse, semé de beaucoup de joies et de quelques moments difficiles, n'aurait pu se faire sans le fruit de l'investissement de toute une équipe bienveillante et généreuse qui trouvera ici le témoignage de ma reconnaissance

Je tiens tout d'abord à remercier avec beaucoup d'émotion mon directeur de thèse, **Pascal Loyer**. Ces quelques lignes ne seront jamais suffisantes pour te dire à quel point je te suis reconnaissante de m'avoir encadrée depuis mon Master 2. Je te remercie infiniment pour ta disponibilité, tes compétences scientifiques que tu partages toujours avec générosité, ta gentillesse et ton soutien sans faille dans tous mes projets. Ta passion pour la recherche est contagieuse et j'ai énormément de chance d'avoir pu travailler avec toi.

Je remercie également du fond du cœur ma co-directrice de thèse, **Sandrine Cammas-Marion**. Je ne pouvais rêver meilleure co-encadrante pour ma thèse que toi. Je te remercie infiniment pour ta bienveillance, ta disponibilité, ta bonne humeur, tes conseils et ton aide précieuse dans tous les domaines et plus particulièrement en chimie. Je te suis extrêmement reconnaissante pour tout ce que tu m'as apporté tant d'un point de vue professionnel que personnel.

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé grâce à un financement de **la Fondation ARC pour la recherche contre le cancer**. Je remercie donc vivement les membres de la Fondation ARC de l'intérêt porté à notre travail de recherche au travers de l'attribution de ces trois années d'aide individuelle doctorale médico-scientifique.

J'adresse également mes plus vifs remerciements au **Professeur Ariane Boudier** de l'université Nancy-Lorraine ainsi qu'au **Docteur Laurence Moine** de l'institut Galien Paris-Saclay pour leur disponibilité et l'honneur qu'elles m'accordent en tant que rapporteur de ces travaux.

Mes remerciements s'adressent également au **Docteur Emilie Roger**, au **Docteur Soizic Chevance** et au **Docteur Mickaël Bourgeois** pour l'intérêt qu'ils ont manifesté à l'égard de mon travail en me faisant l'honneur de participer au jury de ma thèse.

Je remercie aussi sincèrement le **Professeur Vincent Lagente** qui me fait l'honneur de présider cette thèse et qui m'a permis de découvrir le monde de l'enseignement durant mon doctorat en m'intégrant à son équipe en tant que chargé d'enseignement.

Des contraintes personnelles et professionnelles ont grandement retardé la date initialement prévue pour la soutenance de ma thèse et je tiens à remercier **l'ensemble des membres de mon jury de thèse** de leur bienveillance et leur compréhension à mon égard.

J'ai eu la chance de réaliser ma thèse au sein de l'Institut NuMeCan et j'adresse donc mes remerciements aux directeurs, le **Docteur Bruno Clément** et le **Docteur Olivier Loréal**, pour m'avoir accueillie dans leur unité de recherche. Je remercie également **l'ensemble des membres des 3 équipes de recherche ainsi que les membres de l'équipe support** pour leur accueil et leur aide au quotidien. Cela a été un grand plaisir de travailler avec vous. J'adresse des remerciements plus particuliers :

- A **Catherine Ribault**. Je te remercie pour ton aide précieuse en culture cellulaire et en manip. On en a passé des heures sur les essais de captation et sans ta technique infallible des gommettes on aurait perdu la tête!

- Au **Docteur Anne Corlu**. Un grand merci pour ta gentillesse et nos échanges toujours très enrichissants pour moi.
- Au **Docteur Nicolas Lepareur**. Je te remercie pour tes conseils et remarques constructives lors de nos réunions d'équipe.
- Aux **doctorants** qui ont partagé un bout de chemin avec moi: **Killian, Perla, Julien, Yoan, Yann, Luis, Simon, Dounia, Brendan et Kevin**. Merci beaucoup pour les *brain storming* et les discussions plus ou moins sérieuses le midi, au café ou le soir autour d'un verre mais aussi pour votre bonne humeur, votre écoute et votre dynamisme. J'ai vraiment apprécié travailler avec vous dans cette ambiance d'entraide et de solidarité.
- A **Kathleen, Coralie et Tatiana**: Merci pour votre aide technique et vos sourires.

Je remercie aussi les membres de mon comité de suivi de thèse, le **Professeur Gilles Ponchel** et le **Professeur Sophie Tomasi** pour leurs remarques toujours constructives, leurs conseils et leur gentillesse.

Je tiens à remercier également mes collègues du CHU de Rennes et plus particulièrement **Fabienne Aubin, Vincent Gicquel, Hélène Dumas et Anaïs Tanguy** pour leur soutien.

Au-delà du cercle professionnel, je souhaite également remercier ici ma famille et mes proches qui ont été d'un immense soutien tous au long de ces années.

LISTE DES ABREVIATIONS

AA	Acides aminés
Acétyl-CoA	Acétyl-Coenzyme A
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFB₁	Aflatoxine B ₁
AG	Acides gras
AMM	Autorisation de mise sur le marché
ApoE	Apolipoprotéine E
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messager
aROP	Polymérisation anionique par ouverture de cycle (<i>anionic ring opening polymerization</i>)
ATP	Adénosine triphosphate
AuNPs	Nanoparticules d'or
BCLC	Barcelona Clinic Liver Cancer
Biot-PEG₆₂-b-PMLABe₇₃	Biotine-poly(éthylène glycol) ₆₂ - <i>bloc</i> -poly(malate de benzyle) ₇₃
CDCA	Acide chénodésoxycholique
CHC	Carcinome hépatocellulaire
CSCs	Cellules souches cancéreuses
DCA	Acide désoxycholique
DMF	Diméthyle formamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EASL	Association Européenne de l'Etude du Foie (<i>european association for the study of the liver</i>)
EPR	<i>Enhanced permeability and retention</i>
FDA	Food and Drug Administration
G6P	Glucose-6-phosphate
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i>
HDL	Lipoprotéine de haute densité (<i>high density lipoprotein</i>)
IARC	Centre international de recherche sur le cancer
Ig	Immunoglobuline
INRS	Institut national de recherche et de sécurité
IRM	Imagerie par résonance magnétique
KCs	Cellules de Küpffer
LSECs	Cellules endothéliales sinusoidales du foie (<i>liver sinusoidal endothelial cells</i>)
LPS	Lipopolysaccharides
MAA	Macroagregats d'albumine
MFI	Moyenne de l'intensité de fluorescence (<i>mean fluorescence intensity</i>)
MLABe	Malolactonate de benzyle
Mo-MFs	Macrophages dérivés des monocytes
NAFLD	Stéatose hépatique non alcoolique (<i>non alcoholic fatty liver disease</i>)
NASH	Stéatohépatite non alcoolique (<i>non alcoholic steato hepatitis</i>)
NIR	Proche infrarouge (<i>near infrared</i>)
NM	Nanomatériaux
NNI	<i>National Nanotechnology Initiative</i>
NO	Monoxyde d'azote
NP	Nanoparticule

OMS	Organisation mondiale de la santé
P-gp	P-glycoprotéine
PA	Principe actif
PBS	Tampon phosphate salin (<i>phosphate buffer saline</i>)
PEG	Poly(éthylène glycol)
PEG₄₂-<i>b</i>-PMLABe₇₃	Poly(éthylène glycol) ₄₂ - <i>bloc</i> -poly(malate de benzyle) ₇₃
PFA	Paraformaldéhyde
PLGA	Poly(acide glycolique-co-acide lactique)
PMLA	Poly(acide malique)
PMLABe₇₃	Poly(malate de benzyle) ₇₃
QD	<i>Quantum Dot</i>
R&D	Recherche et développement
RFA	Ablation par radiofréquence (<i>radiofrequency ablation</i>)
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SEC	Chromatographie d'exclusion stérique
siARN	Petit ARN interférant
SIRT	Radiothérapie interne sélective (<i>selective internal radiation therapy</i>)
SVF	Sérum de veau fœtal
TACE	Chimioembolisation transartérielle (<i>transarterial chemoembolisation</i>)
TEP	Tomographie par émission de positons
TG	Triglycérides
THF	Tétrahydrofurane
U.A	Unité arbitraire
VHB	Virus de l'hépatite B
VHC	Virus de l'hépatite C
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein</i>

AVANT-PROPOS

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est la principale tumeur maligne primitive du foie et représente la complication majeure des hépatopathies chroniques et de la cirrhose. Avec 906 000 nouveaux cas estimés en 2020, le CHC se place au sixième rang des cancers les plus fréquents au monde. Actuellement, le nombre de cas liés à l'infection par le virus de l'hépatite B, principal facteur de risque de CHC, diminue essentiellement grâce aux progrès sanitaires et la mise en place de la vaccination. Cependant, ces trente dernières années ont été marquées par une augmentation de l'incidence du CHC et ce, principalement dans les pays occidentaux. Au niveau mondial, cette augmentation est probablement due à plusieurs facteurs tels que le développement du diabète et de l'obésité, une meilleure identification diagnostique et une amélioration de la prise en charge de la cirrhose. Du fait d'un très mauvais pronostic, le CHC a un taux de mortalité élevé, qui le place au troisième rang mondial des causes de décès par cancer. Les patients porteurs d'un CHC au stade initial peuvent être guéris par résection chirurgicale, transplantation hépatique ou techniques ablatives. Les patients ayant un CHC à un stade avancé se voient proposer des traitements palliatifs tels que la chimio-embolisation transartérielle, la radioembolisation ou un traitement systémique impliquant soit l'association de deux anticorps monoclonaux (anti-angiogénique et inhibiteur des points de contrôle immunitaire), soit un inhibiteur de tyrosine kinase. Malgré ces progrès, l'arsenal thérapeutique pour le traitement des CHC reste limité en partie à cause de la chimiorésistance des tumeurs hépatiques aux agents anti-tumoraux conventionnels et de la distribution souvent insuffisante de ces agents au niveau du site tumoral. La recherche de nouvelles solutions thérapeutiques est donc un enjeu majeur de santé publique.

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

Dans le tissu hépatique, les nanoparticules sont reconnues et phagocytées par les macrophages, des cellules du système immunitaire. Les macrophages ne correspondant pas au type cellulaire responsable du CHC, l'accumulation au sein de ces cellules n'est donc pas optimale pour espérer un traitement efficace. De plus, les derniers développements de la recherche focalisent sur l'adjonction de motifs fonctionnels à la surface des nanovecteurs dans le but d'améliorer le ciblage cellulaire. Le principe est de greffer un motif qui reconnaîtra, à la surface des cellules cibles, un récepteur afin de faciliter sa fusion ou endocytose avec cette cellule et la libération intracellulaire du principe actif. Dans ce contexte, l'institut Nutrition Métabolisme et Cancer Inserm UMR1317 développe des nanoparticules à base de dérivés du poly(acide malique), biodégradables et biocompatibles, en collaboration avec l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes. Ces nanoparticules sont formulées à partir d'un copolymère associant le poly(éthylène glycol), connu pour diminuer la reconnaissance par les macrophages, et le poly(malate de benzyle). L'objectif de l'équipe est de cibler les cellules hépatiques tumorales en couplant des peptides hépatotropes à des nanoparticules ou à des radionucléides.

Désireuse de me spécialiser en cancérologie au travers d'un master 2 puis d'une thèse de science, j'ai immédiatement été intéressée par la thématique de recherche portée par Pascal Loyer et Sandrine Cammas-Marion. En effet, en tant que pharmacienne, le développement de nouvelles solutions thérapeutiques était un sujet sur lequel j'avais particulièrement envie de travailler et cette stratégie de vectorisation de principe actif vers les tumeurs hépatiques a éveillé mon intérêt et ma curiosité. Ce travail m'a fait plonger dans le monde de la nanomédecine qui m'était jusqu'alors inconnu et m'a fait découvrir un domaine de recherche où s'allient notamment la biologie, la chimie et la pharmacologie. Dans ce manuscrit je vous présente donc le fruit de nos travaux de recherche qui visent à développer des nanovecteurs ciblant les cellules hépatiques cancéreuses, comme de minuscules chevaux de Troie destinés à faire la guerre au CHC. Dans un premier temps, nous avons évalué la biocompatibilité et la biodisponibilité des NPS à base de dérivés du poly(malate de benzyle). Puis, nous avons évalué le potentiel hépatotrope de onze peptides afin de sélectionner les meilleurs candidats pour être des agents de ciblage du CHC. Enfin, nous avons encapsulé un PA organométallique dans nos NPs et avons réalisé des essais *in vitro* de captation et de cytotoxicité.

LISTE DES PUBLICATIONS & DES COMMUNICATIONS EN LIEN AVEC LE SUJET DE THESE

Publications

Brossard C, Vlach M, Jacquet L, **Vène E**, Dorcet V, Loyer P, Cammas-Marion S, Lepareur N. *Hepatotropic Peptides Grafted onto Maleimide-Decorated Nanoparticles: Preparation, Characterization and In Vitro Uptake by Human HepaRG Hepatoma Cells*. *Polymers (Basel)*. 2022 Jun 16;14(12):2447. doi: 10.3390/polym14122447.

Vène E, Jarnouen K, Ribault C, Vlach M, Verres Y, Bourgeois M, Lepareur N, Cammas-Marion S, Loyer P. *Circumsporozoite Protein of Plasmodium berghei- and George Baker Virus A-Derived Peptides Trigger Efficient Cell Internalization of Bioconjugates and Functionalized Poly(ethylene glycol)-b-poly(benzyl malate)-Based Nanoparticles in Human Hepatoma Cells*. *Pharmaceutics*. 2022 Apr 6;14(4):804. doi: 10.3390/pharmaceutics14040804.

Brossard C, Vlach M, **Vène E**, Ribault C, Dorcet V, Noiret N, Loyer P, Lepareur N, Cammas-Marion S. *Synthesis of Poly(Malic Acid) Derivatives End-Functionalized with Peptides and Preparation of Biocompatible Nanoparticles to Target Hepatoma Cells*. *Nanomaterials (Basel)*. 2021 Apr 9;11(4):958. doi: 10.3390/nano11040958.

Casajus H, Saba S, Vlach M, **Vène E**, Ribault C, Tranchimand S, Nugier-Chauvin C, Dubreucq E, Loyer P, Cammas-Marion S, Lepareur N. *Cell Uptake and Biocompatibility of Nanoparticles Prepared from Poly(benzyl malate) (Co)polymers Obtained through Chemical and Enzymatic Polymerization in Human HepaRG Cells and Primary Macrophages*. *Polymers (Basel)*. 2018 Nov 10;10(11):1244. doi: 10.3390/polym10111244.

Vène E, Barouti G, Jarnouen K, Gicquel T, Rauch C, Ribault C, Guillaume SM, Cammas-Marion S, Loyer P. *Oponisation of nanoparticles prepared from poly(β -hydroxybutyrate) and poly(trimethylene carbonate)-b-poly(malic acid) amphiphilic diblock copolymers: Impact on the in vitro cell uptake by primary human macrophages and HepaRG hepatoma cells*. *Int J Pharm*. 2016 Nov 20;513(1-2):438-452. doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.09.048.

Vène E, Jarnouen K, Huang Z-W, Bedhouche W, Montier T, Cammas-Marion S, Loyer P. *In vitro Toxicity Evaluation and in vivo Biodistribution of Polymeric Micelles Derived from Poly(ethylene glycol)-b-poly(benzyl malate) Copolymers*. *Pharmaceutical Nanotechnology*, 2016, 4, 24-37.

Communications orales

Vène E, Ribault C, Cammas-Marion S, Loyer P. *Des peptides à la surface de nanoparticules pour cibler les cellules hépatiques cancéreuses : ce n'est pas qu'une affaire de séquence peptidique*. 13^{èmes} journées du Cancéropôle Grand-Ouest, 1^{er} et 2 juillet 2019, Tours.

Cammass-Marion S, **Vène E**, Saba S, Lepareur N, Loyer P. Poly(malic acid) derivatives as versatile building blocks in the design of multifunctional therapeutic nanoparticles. XIII Coloquio Biental en Ciencia de Materiales (Desafios en Salud y Ambiente), 3-5 avril 2019, Mexico.

Lepareur N, **Vène E**, Bouvry C, Cammas-Marion S, Loyer P. Development of biocompatible and functionalized polymer nanoparticles for the specific vectorization of an imaging agent. 19th European Symposium on Radiopharmacy and Radiopharmaceuticals, 2018, Groningen (Pays-Bas).

Lepareur N, **Vène E**, Cammas-Marion S, Loyer P. Développement de nanoparticules polymères biocompatibles et fonctionnalisés pour la vectorisation spécifique d'un agent d'imagerie. 1^{ère} journée Scientifique du Département Matière-Matériaux de l'UBL « Matière, Molécules et Matériaux pour la Santé et l'Environnement », 2017, Rennes.

Communications affichées

Vène E, Ribault C, Jarnouen K, Vlach M, Lepareur N, Cammas-Marion S, Loyer P. *In vitro evaluation of synthetic peptides as active-binding agents to target hepatoma cells*. Journée jeunes chercheurs en cancérologie de la Fondation ARC, 30 novembre 2020, Congrès virtuel. **Poster récompensé par le prix spécial du jury Hélène Starck.**

Vène E, Vlach M, Jarnouen K, Ribault C, Cammas-Marion S, Loyer P. *GBVA10-9-like peptides strongly enhanced cell uptake of polymeric nanoparticles in a non-specific amino acid sequence manner*. 9^{ème} journée Recherche campus santé, 16 janvier 2019, Rennes.

Vène E, Jarnouen K, Ribault C, Vlach M, Cammas-Marion S, Loyer P. *Effect of hepatotropic peptides on cell uptake of nanoparticles derived from poly(benzyl malate) in hepatoma cells and human macrophages*. 12^{èmes} journées du Cancéropôle Grand Ouest, 2 et 3 juillet 2018, Vannes.

Vène E, Barouti G, Jarnouen K, Gicquel T, Rauch C, Ribault C, Guillaume S, Cammas-Marion S, Loyer P. *Opsonisation of nanoparticles prepared from poly(β -hydroxy butyrate) and poly(trimethylene carbonate)-*b*-poly(malic acid) amphiphilic diblock copolymers : Impact of the in vitro cell uptake by primary human macrophages and HepaRG hepatoma cells*. 3rd annual meeting. SFNano, 12-14 décembre 2016, Paris.

Vène E, Jarnouen K, Ribault C, Cammas-Marion S, Loyer P. *Peptide ligands enhancing the in vitro hepatoma cell uptake of nanoparticles prepared from poly(ethylene glycol) and poly(benzyl malate) copolymers*. 3rd annual meeting. SFNano, 12-14 décembre 2016, Paris.

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Localisation du foie.....	21
Figure 2 : Anatomie du foie.....	21
Figure 3 : Représentation schématique simplifiée des flux sanguin et biliaire.....	22
Figure 4 : Le lobule hépatique.....	23
Figure 5 : Les différentes populations cellulaires au sein du lobule hépatique.....	24
Figure 6 : Polarisation de l'hépatocyte.....	25
Figure 7 : Lumière d'un sinusoïde hépatique.....	26
Figure 8 : Cellules endothéliales et production de monoxyde d'azote.....	27
Figure 9 : Les différentes phases du métabolisme hépatique des xénobiotiques.....	31
Figure 10 : Cycle entérohépatique des sels biliaires et transporteurs de sels biliaires dans le foie et l'intestin humain.....	33
Figure 11 : Les principales étapes de la carcinogénèse.....	38
Figure 12 : Progression du CHC.....	40
Figure 13 : Les altérations géniques majeures dans le CHC.....	41
Figure 14 : Plasticité et origine des CSCs dans le carcinome hépatocellulaire.....	42
Figure 15 : Représentation schématique du développement des modèles de cultures de cellules hépatocytaires.....	44
Figure 16 : Morphologie et expression de fonctions hépatocytaires dans les cellules HepaRG.....	46
Figure 17 : Données globales de l'incidence et de la mortalité des cancers dont les tumeurs hépatiques.....	47
Figure 18 : Incidence du CHC et impact des facteurs de risque au niveau Mondial.....	48
Figure 19 : Algorithme diagnostique de CHC chez les patients cirrhotiques d'après l'EASL 2018.....	51
Figure 20 : Classification BCLC et stratégie thérapeutique associée.....	53
Figure 21 : Destruction tumorale percutanée par radiofréquence avec guidage échographique.....	55
Figure 22 : Principe schématique de la chimioembolisation.....	56
Figure 23 : Cibles thérapeutiques des traitements systémiques du CHC avancé.....	57
Figure 24 : Thérapies systémiques du CHC.....	58
Figure 25 : CyberKnife®.....	59
Figure 26 : Radioembolisation ou radiothérapie interne sélective du CHC.....	61
Figure 27 : Intérêt de l'analyse des macroagrégats d'albumine (MAA) par PET scan (SPECT) pour l'utilisation de la radiothérapie interne sélective (SIRT) selon le scénario clinique pour les patients atteints de CHC.....	62
Figure 28 : Nanorugosité des feuilles de lotus.....	63
Figure 29 : Echelle de taille des nanotechnologies.....	63
Figure 30 : Les figures emblématiques des nanotechnologies.....	64
Figure 31 : Représentation d'un fullerène C60 et d'un nanotube.....	64
Figure 32 : Investissements dans les nanotechnologies aux USA lors des vingt dernières années.....	65
Figure 33 : « Patchwork » de photographies illustrant les domaines d'application des nanotechnologies.....	66
Figure 34 : Exemples de groupes de réflexion sur les enjeux réglementaires des nanotechnologies en santé.....	67
Figure 35 : Schéma du corps humain avec les voies d'exposition aux nanoparticules, les organes affectés et les maladies potentiellement associées à cette exposition.....	68
Figure 36 : Les voies d'élimination des nanoparticules (NPs) selon leurs propriétés physico-chimiques.....	70

Figure 37 : Applications médicales des nanotechnologies.....	71
Figure 38 : Exemple de lab-on-chip.....	72
Figure 39 : Principe général d'un biocapteur.....	72
Figure 40 : Apports des nanotechnologies pour améliorer les outils de diagnostics actuels.....	73
Figure 41: Les différents types de nanovecteurs et thérapies vectorisées et leurs applications en médecine.....	76
Figure 42 : Concentration dans le sang d'un principe actif après injection systémique.....	77
Figure 43 : Les différentes générations de nanovecteurs et leurs principales caractéristiques.....	78
Figure 44 : Obtention d'autorisation de mise sur le marché de nanoformulations entre 1989 et 2020.....	80
Figure 45 : Différentes stratégies de transfert de genes.....	81
Figure 46 : Représentation d'une nanoparticule fonctionnalisée par un agent de ciblage incorporant une molécule dédiée à la détection tumorale et un principe actif.....	83
Figure 47 : Structure des différents antigènes ou particules utilisés en vaccinologie.....	84
Figure 48 : Synthèse et modifications des virosomes.....	85
Figure 49 : Représentation schématique de la structure d'une nanoparticule lipidique pour la vectorisation d'ARNm en vaccinologie.....	86
Figure 50 : Les méthodes de formulations des nanoparticules lipidiques complexant des acides nucléiques.....	87
Figure 51 : Les études cliniques des nanoparticules en oncologie.....	88
Figure 52 : Intérêt des nanoparticules en oncologie.....	89
Figure 53 : Quelques exemples de nano-objets utilisés en oncologie.....	90
Figure 54 : Technique de formulation de nanoparticules polymère par nanoprécipitation avec l'exemple des polymères dérivés du poly(malate de benzyle).....	91
Figure 55 : Encapsulation du fluorochrome DiDoil et de la doxorubicine dans les nanoparticules polymères préparées à partir du copolymère poly(éthylène glycol) ₄₂ -b-poly(malate de benzyle) ₇₃ ...	91
Figure 56 : Représentation schématique du processus d'élaboration des Hybridosomes® via la nanoprécipitation de NPs hydrophobes à la surface de gouttelettes d'Ouzo.....	93
Figure 57 : L'effet Enhanced Permeation and Retention (EPR).....	94
Figure 58 : Représentation schématique de l'effet EPR.....	95
Figure 59 : Degrés variables de l'effet EPR en fonction des tumeurs.....	96
Figure 60 : Visualisation et quantification de l'accumulation tumorale de ⁸⁹ Zr-CPC634 objectivant un effet EPR chez l'Homme.....	97
Figure 61 : Nanoparticules organiques utilisées dans les stratégies de traitement anticancéreux présentant des fonctionnalisations possibles pour les 3 ^{ème} et 4 ^{ème} générations.....	98
Figure 62 : Influence de la nature de copolymères sur l'opsonisation et la captation de NPs.....	100
Figure 63 : Mécanismes d'internalisation cellulaires pour différents types de NPs.....	102
Figure 64 : Stratégies anticancéreuses basées sur la nanomédecine.....	103
Figure 65 : Exemples de nanoparticules ayant reçu une autorisation de mise sur le marché pour des applications en oncologie.....	104
Figure 66 : Représentation de la structure de liposomes conventionnels ou PEGylés.....	104
Figure 67 : La technologie « Nanoparticle albumin-bound (nab TM) ».....	105
Figure 68 : Vectorisations développées dans l'équipe Métaux, Pathologies et Thérapies Vectorisées (METHER) au sein de l'Institut Nutrition, Métabolismes et Cancer (NuMeCan, Inserm UMR1317, INRAe UMR1341).....	109
Figure 69 : Les différents (co)polymères utilisés durant le travail de thèse ou dans la suite du projet d'équipe en continuité avec la thèse.....	110
Figure 70 : Microscopie à contraste de phase de macrophages humains en culture primaire.....	118

Figure 71 : Schéma d'analyse de la captation de NPs par des cellules HepaRG	120
Figure 72 : Captation de NPs par des cellules HepaRG et les macrophages en culture primaire	123
Figure 73 : Analyse de la captation de NPs par des cellules HepaRG et les macrophages humains en culture primaire.....	125
Figure 74 : Test d'opsonisation in vitro	126
Figure 75 : Impact de la présence de sérum de veau foetal sur la captation de NPs par les cellules HepaRG et les macrophages humains.....	127
Figure 76 : Impact de la présence de sérum de veau foetal sur la captation de NPs à base de PMLABe ₇₃ et PEG ₄₂ -b-PMLABe ₇₃ par les macrophages en culture primaire issus de 4 donneurs.....	128
Figure 77 : Impact d'une pré-opsonisation des NPs de PMLABe ₇₃ sur la captation par les macrophages humains	129
Figure 78 : Concentrations en cytokines pro-inflammatoires dans les milieux de culture des macrophages et cellules HepaRG progéniteurs	130
Figure 79 : Schéma résumant le greffage de peptides biotinylés à la surface de NPs Biot-PEG ₆₂ -b-PMLABe ₇₃ via la streptavidine	132
Figure 80 : Evaluation de l'incidence des concentrations en copolymère Biot-PEG ₆₂ -b-PMLABe ₇₃ , streptavidine et peptide sur la captation de NPs par des cellules HepaRG	134
Figure 81 : Captation par les cellules progénitrices HepaRG de NPs fluorescentes mesurée par cytométrie en flux et microscopie.....	135
Figure 82 : Biodistribution in vivo des NPs de PEG ₆₂ -b-PMLABe ₇₃ chez la souris nude.....	136
Figure 83 : Evaluation de la biocompatibilité des NPs à base de Biot-PEG ₆₂ -b-PMLABe ₇₃ fonctionnalisées ou non par le peptide RGD	137
Figure 84 : Complexe streptavidine et peptides biotinylés.....	142
Figure 85 : Coculture de cellules d'hépatome Huh7 et macrophages humains	145
Figure 86 : Pourcentages de cellules hépatiques positives en cytométrie en flux après incubation avec les NPs fluorescentes.....	148
Figure 87 : Evaluation du tropisme hépatique des peptides	149
Figure 88 : Rapports d'intensité de fluorescence après captation des NPs fonctionnalisées pour l'ensemble des types cellulaires étudiés	151
Figure 89 : Moyennes d'intensité de fluorescence après captation des complexes peptides-streptavidine et NPs fonctionnalisées avec les peptides CPB et GBVA10-9 et leurs contrôles	152
Figure 90 : Opsonisation des NPs fonctionnalisées avec les peptides CPB et GBVA10-9 et leurs contrôles modifiés.....	154
Figure 91 : Captation de la streptavidine fonctionnalisée par les peptides CPB et GBVA10-9 et leurs peptides modifiés dans un modèle de coculture de cellules Huh7 GFP+ et de macrophages humains	156
Figure 92 : Ligands et radionucléides sélectionnés dans le cadre du projet de thèse.....	159
Figure 93 : Images en microscopie optique à contraste de phase des différentes lignées cellulaires	163
Figure 94 : Plan de plaque pour les essais de captation cellulaire	165
Figure 95 : Représentation schématique des différentes étapes du protocole d'évaluation de la captation cellulaire de la molécule OMC-1 sous forme libre ou encapsulée.....	166
Figure 96 : Principe de la réaction luciférine/luciférase générant un signal lumineux corrélé à la viabilité cellulaire. D'après le manuel technique du laboratoire Promega	167
Figure 97 : Résultats des analyses par cytométrie en flux des cellules incubées avec les NPs chargées en composé OMC-1 et avec la molécule libre pendant 24 heures	168
Figure 98 : Résultats des essais de captation des NPs chargées en OMC-1 et du OMC-1 libre.....	169

Figure 99 : Signaux obtenus par cytométrie en flux et images de microscopie correspondantes (contraste de phase et fluorescence) après 72h de traitement sur des cellules HepaRG progénitrices	170
Figure 100 : Localisation de la fluorescence de la molécule OMC-1 (vert) dans les cellules HepaRG différenciées après 48h de traitement.....	171
Figure 101 : Images obtenues par microscopie confocale des cellules HepaRG progénitrices après 24h d'incubation.....	171
Figure 102 : Images obtenues par microscopie confocale des cellules HepaRG progénitrices après 24h d'incubation.....	172
Figure 103 : Résultats du test de cytotoxicité in vitro après 48 à 72 heures d'incubation	173
Figure 104 : Images obtenues par microscopie des cellules HepaRG différenciées après 48h d'incubation.....	174
Figure 105: Caractéristiques des tumeurs pouvant influencer le ciblage tumoral par les NPs	182
Figure 106: Expériences de captation des NPs formulées à partir de PMLABe ₇₃ sur plusieurs jours et avec des expositions réitérées	184
Figure 107: Prolifération des cellules HepaRG	185
Figure 108: Effet des peptides sur l'internalisation des NPs Biot-PEG ₆₂ -b-PMLABe ₇₃	187

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Nombre de nouveaux cas de cancer du foie estimé par région géographique et par sexe d'après les études GLOBOCAN 2012 et 2020 de l'IARC.....	48
Tableau 2 : Calcul du score de Child-Pugh définissant la gravité d'une cirrhose, d'après la Société Nationale Française de Gastro-Entérologie	52
Tableau 3 : Caractéristiques physicochimiques des (co)polymères et NPs utilisés	122
Tableau 4 : Nanovecteurs fonctionnalisés évalués pour leur capacité de ciblage de cellules hépatiques cancéreuses	131
Tableau 5 : Combinaisons de streptavidine, peptide et copolymère utilisées pour déterminer les quantités et ratio des différents constituants des NPs pour un criblage de peptides hépatotropes .	133
Tableau 6: Peptides et peptides contrôles négatifs	143
Tableau 7 : Compositions des milieux de culture des types cellulaires utilisés	144
Tableau 8 : Caractéristiques des différents lots de NPs utilisés	164
Tableau 9 : Caractéristiques des marqueurs employés et lasers utilisés en microscopie confocale..	166
Tableau 10 : Caractéristiques des NPs vides	167

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	19
I. CARCINOME HÉPATOCELLULAIRE	21
I.1. Généralités sur le foie.....	21
I.1.1. Anatomie macroscopique	21
I.1.2. Flux sanguin et biliaire.....	22
I.1.3. Micro-anatomie du foie : le lobule hépatique	23
a. Organisation structurelle.....	23
b. Populations cellulaires.....	23
I.1.4. Principales fonctions hépatiques	28
a. Métabolisme énergétique	28
b. Détoxification	29
c. Production des protéines plasmatiques et de coagulation	31
d. Production de la bile.....	32
I.2. Carcinogénèse hépatique.....	34
I.2.1. Principaux facteurs de risque de CHC	34
a. Hépatites virales chroniques B et C.....	35
b. Aflatoxines.....	36
c. Alcool	37
d. Syndrome métabolique et maladies héréditaires.....	37
I.1.2. Bases cellulaires et moléculaires de la carcinogénèse hépatique.....	38
I.2.3. Modèles cellulaires <i>in vitro</i> d'hépatocytes normaux et transformés	42
I.2. Prise en charge des CHC.....	47
I.2.2. Quelques données épidémiologiques : incidence et mortalité.....	47
a. Au niveau mondial.....	47
b. En France	49
I.2.3. Dépistage, diagnostic et classification pronostique	49
a. Dépistage	49
b. Diagnostic	50
c. Classification pronostique Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC).....	51
I.2.4. Traitements	53
a. Traitements à visée curative	54
b. Traitements palliatifs des CHC avancés.....	55
c. Perspectives thérapeutiques	58
II. NANOMEDECINE	63
II.1. Du concept de nanomonde à l'émergence de la nanomédecine.....	63
II.1.1. Nanomonde et définitions	63
II.1.2. Historique	64
II.1.3. Aujourd'hui.....	65
II.1.4. Applications médicales	70
a. Diagnostic	71
b. Médecine régénérative	74
c. Applications thérapeutiques.....	75
d. Nanothéranostique	82
e. Vaccins	84
II.2. Nanomédecine et cancer	87
II.2.1. Place de la nanomédecine en oncologie	87
II.2.2. Nanovecteurs et mécanismes de ciblage des tumeurs	90
a. Encapsulation de principes actifs	90
b. Ciblage passif et effet EPR	93

c. Ciblage actif et nanovecteurs de 3 ^{ème} génération.....	97
d. Internalisation cellulaire des nanoparticules	101
e. Nanoparticules et thérapies anticancéreuse.....	103
CONTEXTE ET OBJECTIFS	107
RESULTATS.....	113
CHAPITRE I : Évaluation de la biocompatibilité <i>in vitro</i> et biodistribution <i>in vivo</i> des nanoparticules polymères à base de dérivés du poly(malate de benzyle)₇₃	115
I. CONTEXTE DE L'ETUDE	116
II. METHODOLOGIE.....	116
II.1. Les polymères et la formulation des nanoparticules	116
II.2. Les modèles cellulaires.....	117
II.3. Mesure de la viabilité cellulaire.....	118
II.4. Mesure de la captation de nanoparticules par les cellules	119
II.5. Evaluation de l'opsonisation	121
II.6. Mesure des cytokines pro-inflammatoires	121
III. RESULTATS.....	121
III.1. Nanoparticules produites et caractéristiques physicochimiques	121
III.2. Captation des nanoparticules formulées à partir de PMLABe ₇₃ et PEG ₄₂ - <i>b</i> -PMLABe ₇₃ par des cellules d'hépatome et des macrophages en culture.....	122
III.3. Opsonisation des nanoparticules à base du PMLABe ₇₃ et influence sur la captation ...	126
III.4. Fonctionnalisation des nanoparticules Biot-PEG ₆₂ - <i>b</i> -PMLABe ₇₃ par greffage non-covalent de peptides.....	131
III.5. Biocompatibilité des nanoparticules à base de dérivés du PMLABe ₇₃	136
IV. ARTICLE 1.....	138
V. DISCUSSION ET PERSPECTIVES EXPERIMENTALES.....	139
CHAPITRE II : Des peptides dérivés de la protéine circumsporozoïte de <i>Plasmodium berghei</i> et du virus A George Baker potentialisent l'internalisation de bioconjugués et de nanoparticules polymères à base de poly(éthylène glycol)₄₂-<i>b</i>-poly(malate de benzyle)₇₃ dans les cellules d'hépatome humain	141
I. CONTEXTE DE L'ETUDE	142
II. METHODOLOGIE.....	144
II.1. Les types cellulaires.....	144
II.2. Couplage des peptides biotinylés à la streptavidine fluorescente.....	145
II.3. Incubation des complexes streptavidine-peptides et nanoparticules fonctionnalisées.	145
II.4. Observation en microscopie confocale	146
II.5. Analyses statistiques	146
III. RESULTATS ET DISCUSSION	146
IV. ARTICLE 2.....	157
V. TRAVAUX EN COURS ET PERSPECTIVES.....	158
CHAPITRE III : Internalisation et cytotoxicité d'un complexe organométallique à l'or sous formes libre et encapsulée dans des nanoparticules polymères à base de dérivés du PMLABe₇₃ dans les cellules d'hépatome	161
I. CONTEXTE DE L'ETUDE	162
II. METHODOLOGIE.....	163
II.1. Lignées cellulaires utilisées.....	163
II.2. Formes libre et encapsulée de la molécule OMC-1.....	164
II.3. Essais de captation cellulaire.....	165
II.3.1. Evaluation de la captation cellulaire par cytométrie en flux.....	165
II.3.2. Etude de la localisation cellulaire par microscopie confocale.....	166
II.3.3. Essais de cytotoxicité.....	167
II.3.4. Analyse des données	168
III. RESULTATS.....	168

III.1.	Captation cellulaire de la molécule OMC-1 sous forme libre ou encapsulée	168
III.1.1.	Captation sur 24h	168
III.1.2.	Cinétique de captation	169
III.1.3.	Localisation intra-cellulaire	170
III.2.	Evaluation de la cytotoxicité induite par la molécule OMC-1 libre ou encapsulée	173
IV.	DISCUSSION ET PERSPECTIVES EXPERIMENTALES.....	174
	DISCUSSION GENERALE	179
	BIBLIOGRAPHIE	191

INTRODUCTION

I. CARCINOME HÉPATOCELLULAIRE

I.1. Généralités sur le foie

I.1.1. Anatomie macroscopique

Le foie est l'organe interne le plus volumineux du corps humain. Il pèse environ 2% du poids corporel total soit en moyenne 1,5kg chez l'adulte. Il fait partie de l'appareil digestif et se situe dans la partie supérieure de la cavité abdominale sous le diaphragme, à droite de l'estomac, au-dessus du duodénum et de l'angle colique droit (Figure 1). Le foie est entouré d'une fine couche de tissu conjonctif appelée capsule de Glisson.

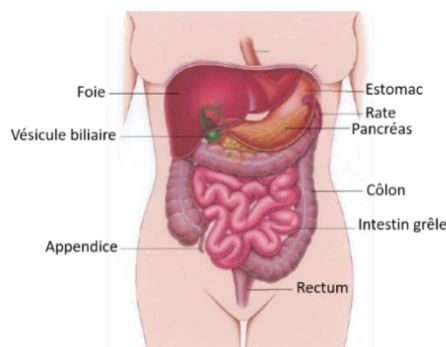


Figure 1 : Localisation du foie.

Le foie se situe au niveau de l'hypochondre droit. Adapté de : <https://www.msmanuals.com>

Le foie est composé de quatre lobes. Le lobe droit et le lobe gauche sont délimités par le ligament falciforme qui relie le foie au diaphragme. Entre ces deux lobes se trouvent le lobe carré et le lobe caudé séparés par le hile du foie. Ce dernier est le sillon par lequel pénètrent la veine porte et l'artère hépatique et sortent les canaux biliaires (Figure 2A). D'un point de vue fonctionnel, le foie est divisé en huit segments indépendants, chacun irrigué par des ramifications de la veine porte (Figure 2B). Chaque segment est résécable chirurgicalement car ils disposent de leur propre vascularisation et drainage biliaire. Ce système de segmentation décrit par Couinaud (1957) simplifie notamment les hépatectomies partielles dans les cancers primitifs du foie ou l'exérèse d'un segment contenant une lésion tumorale.

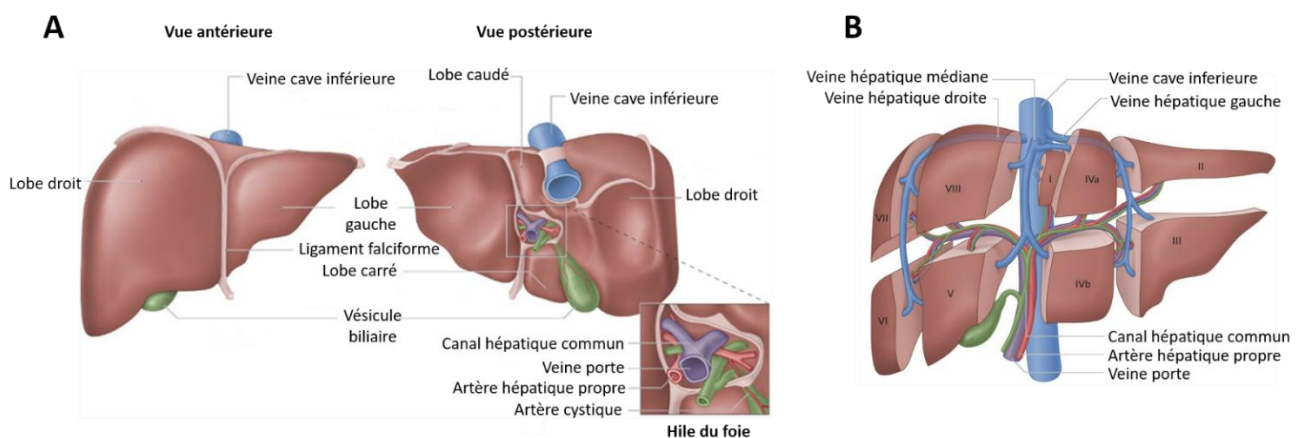


Figure 2 : Anatomie du foie.

(A) Au niveau de sa morphologie externe, le foie est divisé en 4 lobes : droit, gauche, carré et caudé. Le hile du foie est le carrefour d'entrée de la veine porte et de l'artère hépatique propre et de sortie des canaux biliaires. (B) Au niveau fonctionnel, la segmentation hépatique décrite par Couinaud sépare le foie en 8 segments indépendants ayant chacun son propre flux vasculaire d'entrée et de sortie et son drainage biliaire. D'après : <https://www.amboss.com>

I. CARCINOME HEPATOCELLULAIRE

I.1.2. Flux sanguin et biliaire

Le foie est l'un des organes les plus densément vascularisés du corps humain. Il contient plus de 10% du volume sanguin total et le débit sanguin hépatique est de l'ordre de 1,5 litres par minute chez l'adulte. Le foie est irrigué par deux circulations sanguines afférentes : l'artère hépatique « propre » et la veine porte (Figure 3). L'artère hépatique propre est issue de l'aorte et fournit donc du sang oxygéné. Elle représente 20 à 30% du débit sanguin hépatique. La veine porte est issue de la réunion de la veine mésentérique supérieure, de la veine mésentérique inférieure et de la veine splénique. Elle apporte donc du sang contenant des substances provenant de l'estomac, des intestins et de la rate. Elle assure 70 à 80% du débit sanguin. En pénétrant dans le foie par le hile, ces vaisseaux se ramifient pour former un réseau vasculaire dense et extrêmement fin se déversant dans les sinusoides qui irriguent ainsi tout le parenchyme hépatique. Le sang sort du foie via les veines sus-hépatiques qui se jettent dans la veine cave inférieure drainant le sang vers le cœur.

Parallèlement aux vaisseaux sanguins, le foie est parcouru par un réseau de canalicules biliaires qui collectent la bile sécrétée par les hépatocytes. Toutes ces voies biliaires intrahépatiques se rejoignent pour former des canaux plus larges appelés canaux hépatiques droit et gauche. Ces derniers fusionnent ensuite pour former le canal hépatique commun qui mène la bile à la sortie du foie en passant par le hile. La bile est ensuite acheminée, soit dans la vésicule biliaire via le canal cystique pour y être stockée et concentrée, soit vers le duodénum grâce au canal cholédoque pour participer à la digestion des graisses (Figure 3).

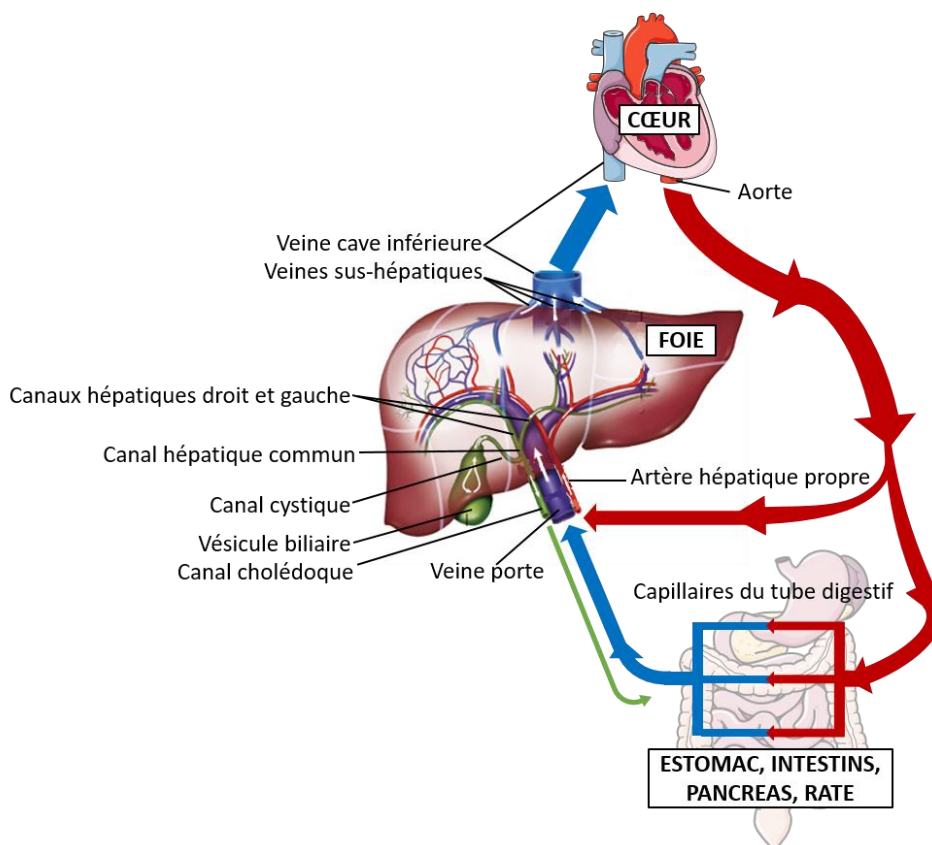


Figure 3 : Représentation schématique simplifiée des flux sanguin et biliaire

Le foie est irrigué par une circulation sanguine artério-veineuse (artère hépatique propre et veine porte) et drainé par les veines sus-hépatiques qui se jettent dans la veine cave inférieure. Le foie produit la bile qui est collectée par les voies biliaires intrahépatiques (canaliculaires biliaires, canaux hépatiques droit et gauche et canal hépatique commun) puis acheminée, en dehors du foie, vers la vésicule biliaire via le canal cystique et vers le duodénum via le canal cholédoque. Adapté de https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les_cancers/Cancer-du-foie/Anatomie-du-foie

I. CARCINOME HEPATOCELLULAIRE

I.1.3. Micro-anatomie du foie : le lobule hépatique

a. Organisation structurelle

Au niveau microscopique, le tissu hépatique est composé d'unités structurales de forme polyédrique mesurant 1 mm : les lobules hépatiques (Figure 4A et B). Chaque lobule est centré sur une veine centro-lobulaire, aussi appelée veine centrale, et limité, en périphérie, par des espaces portes. Ces derniers sont localisés au niveau de chacun des angles du polyèdre et comprennent la triade portale c'est-à-dire : une ramification de l'artère hépatique, une ramification de la veine porte et un canal biliaire. Le sang artériel et le sang portal rentrent dans le lobule via les espaces portes et se mélangent dans les sinusoides qui drainent la circulation sanguine vers la veine centro-lobulaire. Cette dernière se jette ensuite dans les veines sus-hépatiques qui conduisent le sang vers la veine cave inférieure. Dans les lobules hépatiques, les hépatocytes sont empilés en travées monocouches séparées par les sinusoides. Ces travées hépatocytaires sont disposées de manière radiale, convergeant depuis les espaces portes vers la veine centrale. Les canalicules biliaires sont formés entre des hépatocytes adjacents. Ils véhiculent la bile sécrétée par les hépatocytes jusqu'au canal biliaire situé au niveau de l'espace porte en périphérie du lobule. La bile circule donc à contre-sens du flux sanguin sinusoidal.

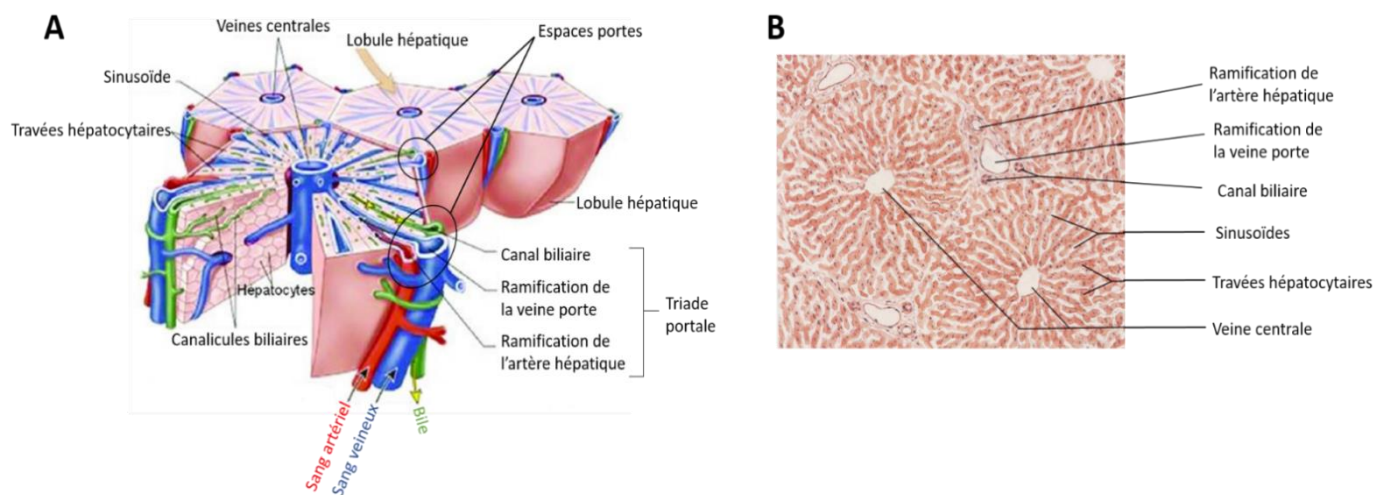


Figure 4 : Le lobule hépatique.

(A) Représentation schématique de la structure des lobules hépatiques vus en coupe et reconstruction tridimensionnelle. Le sang artério-veineux traverse le lobule hépatique de l'espace porte en périphérie vers la veine centrale via les sinusoides qui cheminent entre les travées hépatocytaires. D'après (Patton & Thibodeau, 2013). (B) Dessin représentant une coupe histologique standard de foie après une coloration de type hématoxyline/éosine.

b. Populations cellulaires

Comme décrit dans le paragraphe précédent, les travées d'hépatocytes, appelées travées de Remak, sont séparées les unes des autres par les sinusoides. L'endothélium sinusoidal hépatique a la particularité d'être fenestré et dépourvu de lame basale. Cette structure permet d'offrir une vaste surface d'échanges entre le compartiment sanguin et le compartiment hépatocyttaire au niveau de l'espace périsinguoidal, nommé espace de Disse (Figure 5). Cet espace, localisé entre l'endothélium sinusoidal et le pôle basal des hépatocytes, contient une matrice cellulaire essentiellement composée de collagène de type IV ainsi que des cellules étoilées (Leclercq & Sempoux, 2018). En situation physiologique, les cellules étoilées (aussi appelées cellules stellaires) ont comme rôles principaux le stockage de la vitamine A et le *turn-over* (synthèse et dégradation) de la matrice extracellulaire

I. CARCINOME HEPATOCELLULAIRE

hépatique. En réponse à des stimuli inflammatoires, ces cellules se transdifférencient en myofibroblastes qui sont contractiles et qui jouent un rôle majeur dans la synthèse et le dépôt de la matrice extracellulaire lors de la fibrogénèse hépatique (Musso et al., 2021).

Les hépatocytes sécrètent la bile au niveau des canalicules biliaires formés entre deux hépatocytes adjacents. Ces canalicules biliaires cheminent le long des hépatocytes et se déversent via le canal de Hering dans le canal biliaire situé au niveau de l'espace porte (Figure 5). Le canal biliaire est tapissé de cellules épithéliales appelées cholangiocytes. Les cellules de la paroi du canal de Hering sont des progéniteurs bipotents impliqués dans la régénération hépatocytaire et biliaire au cours de certaines situations pathologiques (Musso et al., 2021). Ces cellules sont accolées d'un côté aux hépatocytes et de l'autre côté aux cholangiocytes, assurant ainsi la continuité entre canalicules et canal biliaires. Contrairement aux hépatocytes, les cellules du canal de Hering et du canal biliaire reposent sur une membrane basale (Leclercq & Sempoux, 2018).

Le foie est baigné par un sang en provenance notamment des organes digestifs, il est ainsi constamment exposé aux antigènes circulants, endotoxines et pathogènes et constitue donc une barrière avec le milieu extérieur. Ceci explique la présence de nombreuses cellules immunitaires résidentes dans la lumière des sinusoides hépatiques (Figure 5) : les cellules de Küpffer (macrophages) et les pit cells (lymphocytes).

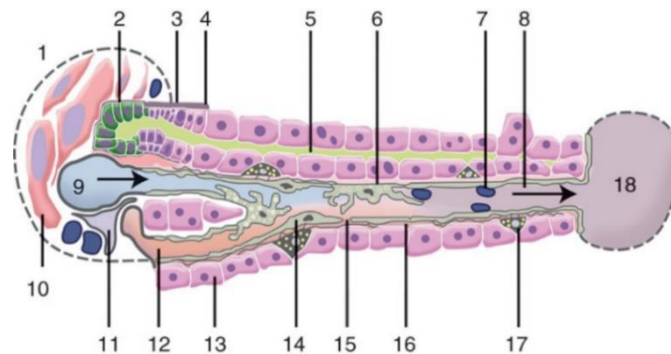


Figure 5 : Les différentes populations cellulaires au sein du lobule hépatique

Représentation schématique d'une section d'un lobule hépatique : 1. espace porte ; 2. canal biliaire ; 3. canal de Hering ; 4. membrane basale ; 5. canalicule biliaire ; 6. cellule de Küpffer ; 7. Lymphocytes (pit cells) ; 8. sinusoïde ; 9. ramification de la veine porte ; 10. fibroblastes ; 11. macrophage ; 12. ramification de l'artère hépatique ; 13. hépatocyte ; 14. cellules endothéliales ; 15. fenêtre ; 16. espace de Disse ; 17. cellule étoilée ; 18. Veine centrale. D'après (Musso et al., 2021).

Dans le cadre de cette introduction de thèse, ne seront détaillées que les populations cellulaires rencontrées par les nanoobjets sur leur trajet dans le foie.

Les hépatocytes

Les hépatocytes sont les principales cellules fonctionnelles hépatiques et représentent 70% des cellules du foie (Leclercq & Sempoux, 2018). Ce sont de grandes cellules polyédriques épithéliales de 20 à 30µm, mono- ou binucléées et polarisées. En effet, les hépatocytes comportent trois pôles distincts tant au niveau organisationnel que fonctionnel : apical, basal et latéral (Figure 6). Le pôle apical correspond au pôle biliaire spécialisé dans la sécrétion des composés biliaires (acides biliaires, cholestérol, bilirubine etc...). Cette portion de la membrane plasmique est composée de microvillosités où se localisent les pompes d'excrétion biliaire. L'apposition des pôles biliaires de deux hépatocytes adjacents forme un canalicule biliaire. Le pôle basal, aussi appelé pôle sinusoidal, est en contact avec la matrice extracellulaire de l'espace de Disse et les cellules endothéliales des sinusoides. La membrane plasmique du pôle basal possède de nombreuses microvillosités permettant d'offrir une importante surface d'échange avec la circulation sanguine. Ainsi, ce pôle est le lieu de captation des xénobiotiques

I. CARCINOME HEPATOCELLULAIRE

ou d'éléments nécessaires aux activités de synthèse et le lieu de sécrétion des protéines plasmatiques et métabolites vers le compartiment sanguin. Enfin, le pôle latéral s'étend entre le pôle basal et apical. Il joue un rôle primordial dans l'adhésion des hépatocytes entre eux et l'organisation des travées via des jonctions serrées, des jonctions adhérentes et des desmosomes. Le pôle latéral permet aussi d'assurer la communication intercellulaire grâce à la présence de jonctions communicantes, ou *gap junctions*, par lesquelles s'effectue le passage de petites molécules entre les hépatocytes (Musso et al., 2021).

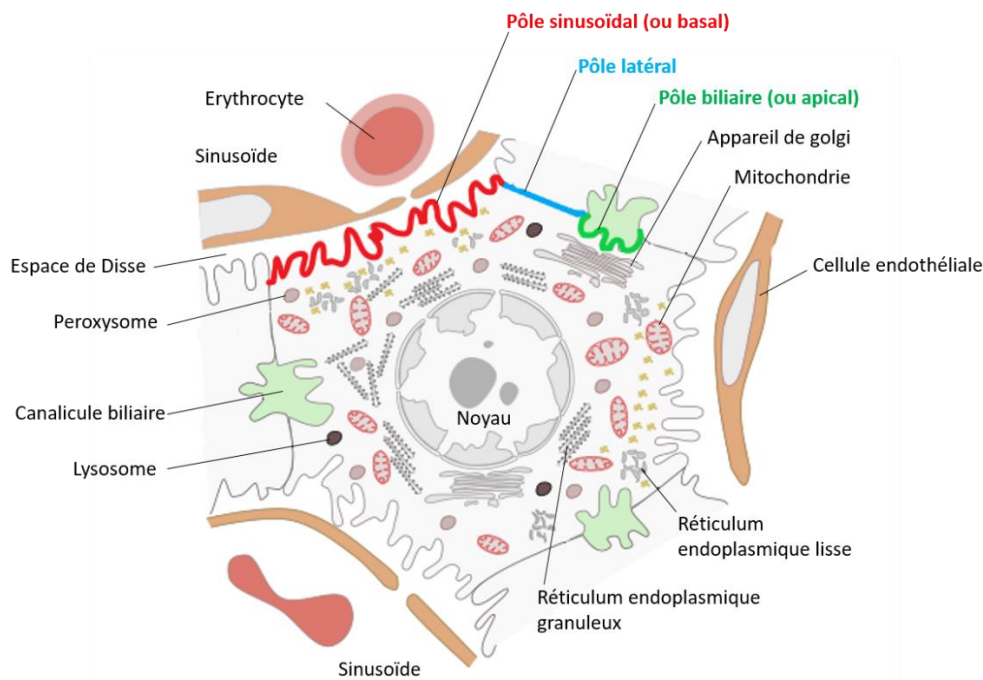


Figure 6 : Polarisation de l'hépatocyte

Le pôle sinusoidal (ou basal) fait face au sinusoïde et permet les échanges entre le compartiment sanguin et hépatocytaire. Le pôle biliaire (ou apical) représente la zone de sécrétion biliaire. L'apposition des pôles biliaires de deux hépatocytes adjacents forme un canalicule biliaire. Le pôle latéral est composé de jonctions intercellulaires permettant la cohésion et la communication entre les hépatocytes. Les hépatocytes sont riches en organites intracellulaires : peroxydase, lysosomes, réticulum endoplasmiques granuleux et lisse, mitochondries, appareil de Golgi. D'après: <https://mmegias.webs.uvigo.es/02-english/8-tipos-celulares/hepatocito.php>.

Les hépatocytes sont le siège de nombreuses fonctions métaboliques, endocrines et exocrines indispensables à la survie de l'organisme. Ils sont, par conséquent, riches en organites cytoplasmiques : mitochondries, réticulum endoplasmique rugueux et lisse, appareil de Golgi, lysosomes, peroxydases... (Figure 6). Ces fonctions hépatiques assurées par les hépatocytes seront détaillées dans le paragraphe suivant (I.1.4 Fonctions hépatiques).

En situation physiologique, le renouvellement cellulaire dans le foie est très faible. Les hépatocytes ont une durée de vie de 300 jours et se divisent rarement (0,0012 à 0,01% de mitose) (Koniaris et al., 2003). Cependant, lors d'une atteinte hépatique qui nécessite une compensation de la perte tissulaire (après une résection chirurgicale par exemple), les hépatocytes sont capables de sortir de leur quiescence et de proliférer massivement. La prolifération des hépatocytes débute au niveau de la triade porte et se poursuit vers la zone autour de la veine centro-lobulaire (Musso et al., 2021).

I. CARCINOME HEPATOCELLULAIRE

Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales sinusoidales du foie (Liver Sinusoidal Endothelial Cells, LSECs) représentent environ 15 à 20% des cellules hépatiques. Elles forment les parois des sinusoides hépatiques et constituent donc l'interface entre la circulation sanguine d'un côté et les cellules étoilées et les hépatocytes de l'autre côté.

Les LSECs ne reposent pas sur une membrane basale et possèdent des fenestrations, ou pores, d'environ 50 à 150µm de diamètre (Figure 7). Ces fenestrations sont formées par la fusion des membranes plasmiques lumineuse et ablumineuse (Poisson et al., 2017) et sont maintenues par le cytosquelette (Mönkemöller et al., 2015). La taille et le nombre des pores varient le long de l'axe portocentral des sinusoides hépatiques. En effet, le diamètre des pores diminue tandis que leur densité augmente de la zone périportale vers la zone centrolobulaire (Braet & Wisse, 2002). De plus, une autre particularité des LSECs est leur très grande capacité d'endocytose. De part ces caractéristiques structurales et fonctionnelles, les LSECs constituent donc une barrière hautement perméable entre le compartiment vasculaire et le parenchyme hépatique. Ainsi, en situation physiologique, les LSEC retiennent les cellules sanguines dans les sinusoides, tandis que les macromolécules (protéines plasmatiques, xénobiotiques, lipoprotéines...), les exosomes et certains virus passent vers l'espace de Disse (Poisson et al., 2017).

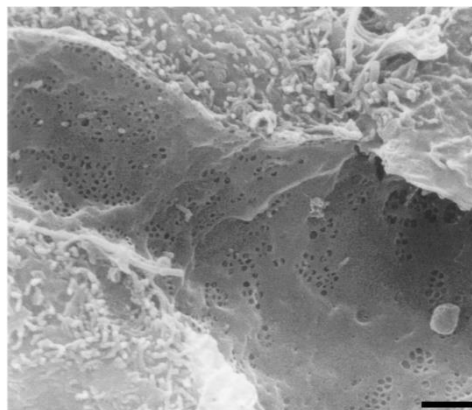


Figure 7 : Lumière d'un sinusioïde hépatique

Image en microscopie électronique à balayage des parois d'un sinusioïde hépatique de rat mettant en évidence les fenestrations (ou pores) de l'endothélium. Echelle = 1 µm. D'après (Braet & Wisse, 2002).

Au-delà de leur rôle de filtre, les LSECs jouent un rôle clé dans la régulation du tonus vasculaire sinusoidal en interagissant de manière paracrine avec les cellules étoilées qui enveloppent les sinusoides et possèdent des propriétés contractiles. En situation physiologique, les LSECs vont libérer du monoxyde d'azote (NO) dans l'espace de Disse. Le NO va permettre de maintenir les cellules étoilées (Hepatic stellate cells : HSC) dans un état quiescent, inhibant ainsi leur effet vasoconstricteur, leur évolution vers un phénotype myofibroblastique et le développement d'une fibrose (Poisson et al., 2017; Wilkinson et al., 2020). Ce système de régulation contribue au maintien d'un flux sanguin à faible débit nécessaire pour maximiser les échanges entre le sang et les cellules du parenchyme hépatique. Dans la cirrhose, situation pathologique qui sera abordée ultérieurement dans cette thèse, l'endothélium se modifie avec une perte des fenestrations et l'apparition d'une membrane basale abondante. Ce phénomène, appelé capillarisation des sinusoides, induit une perturbation des échanges entre le compartiment sanguin et les hépatocytes (Leclercq & Sempoux, 2018). Les LSECs contribuent ainsi à l'activation des cellules étoilées (Figure 8) et leur changement phénotypique en

I. CARCINOME HEPATOCELLULAIRE

myofibroblastes très producteurs d'éléments matriciels largement impliqués dans le développement de la fibrose et de la cirrhose hépatique.

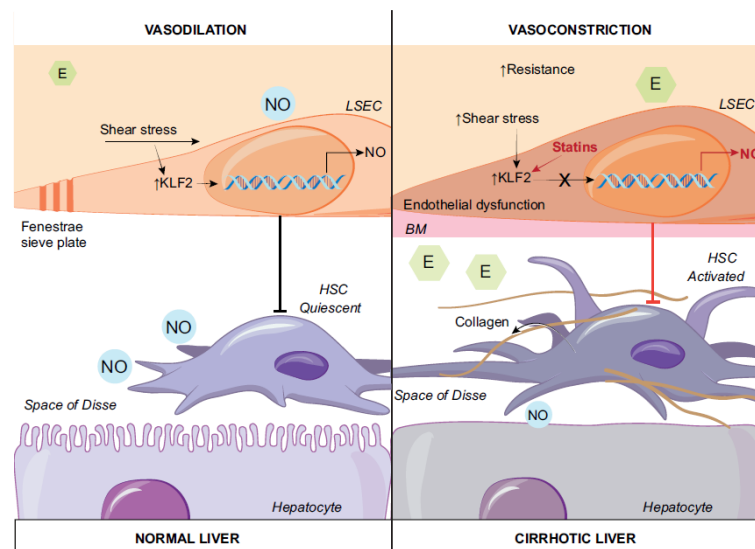


Figure 8 : Cellules endothéliales et production de monoxyde d'azote

Les LSECs participent au maintien du phénotype des cellules étoilées via la production de NO régulée par un mécanisme transcriptionnel dépendant de la pression vasculaire. Cette production de NO contribue au maintien du phénotype quiescent des cellules étoilées (HSC). Dans des conditions de surpression vasculaire, la réduction de la production de NO entraîne une activation des cellules étoilées et la production d'éléments matriciels par ces cellules. D'après (Poisson et al., 2017).

Les macrophages

Le foie héberge près de 90% de l'ensemble des macrophages de l'organisme et il est constamment « patrouillé » par des monocytes circulants (Leclercq & Sempoux, 2018; Roohani & Tacke, 2021). La population des macrophages hépatiques se divise en deux catégories : les macrophages résidents du foie appelés cellules de Küpffer (KCs) d'une part, et les macrophages dérivés des monocytes (Mo-MFs) d'autre part (D. Cheng et al., 2021). Les KCs sont issus du sac vitellin embryonnaire et de la moelle osseuse et sont capables de s'auto-renouveler (Scott et al., 2016). Les Mo-MFs proviennent des monocytes circulants du sang qui s'infiltrent dans le foie puis se différencient en macrophages. En situation physiologique, la proportion de KCs est largement supérieure à celle des Mo-MFs. Cependant, cette balance peut s'inverser notamment au cours d'une réaction inflammatoire induisant un recrutement massif de Mo-MFs dans le foie.

Les macrophages hépatiques jouent un rôle essentiel dans la réponse immunitaire innée. Leur localisation dans la lumière des sinusoides hépatiques leur permet de phagocyter efficacement les corps étrangers (agents pathogènes, endotoxines, particules exogènes...) provenant de la circulation portale et/ou artérielle (L. J. Dixon et al., 2013). Ainsi, ces cellules assurent la protection du foie et de l'ensemble de l'organisme en limitant le passage des corps étrangers vers le parenchyme hépatique et la circulation sanguine générale. Les macrophages hépatiques sont également capables d'éliminer les érythrocytes sénescents et les débris cellulaires apoptotiques ou nécrotiques. De plus, ils participent à la réponse immunitaire adaptative en interagissant notamment avec les cellules dendritiques par leur capacité à présenter les antigènes et à sécréter des cytokines pro-inflammatoires.

I. CARCINOME HEPATOCELLULAIRE

I.1.4. Principales fonctions hépatiques

Le foie est un organe vital assurant des fonctions indispensables à notre organisme dont les principales sont détaillées ci-dessous.

a. Métabolisme énergétique

Les nutriments sont apportés par l'alimentation et constituent la source d'énergie nécessaire à notre organisme pour fonctionner. Les apports étant discontinus, l'organisme doit être capable de stocker les nutriments pour assurer l'homéostasie énergétique même lors des périodes plus ou moins longues de jeûne entre deux prises alimentaires. Le foie joue un rôle majeur dans le maintien de cet équilibre en participant au métabolisme des glucides et des lipides.

Métabolisme glucidique

En période post-prandiale, après un repas, le glucose afflue dans la circulation sanguine et pénètre dans les hépatocytes par l'intermédiaire de transporteurs transmembranaires spécifiques nommés GLUT-2 (*glucose transporter 2*). Dans les hépatocytes, le glucose est phosphorylé par la glucoquinase pour former du glucose-6-phosphate (G6P) qui sera utilisé pour produire du pyruvate via la glycolyse, d'une part, et du glycogène via la glycogénogénèse, d'autre part. Le glycogène est la forme de stockage du glucose. A distance des repas, le stock de glycogène peut être mobilisé pour générer du G6P : c'est la glycogénolyse. Ce G6P pourra, d'une part, être converti en glucose qui sera exporté dans la circulation sanguine pour maintenir la glycémie et, d'autre part, être utilisé pour produire du pyruvate et ainsi alimenter le cycle de Krebs afin de générer de l'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP). Lors d'un jeûne prolongé, les hépatocytes peuvent synthétiser *de novo* du glucose à partir de précurseurs non glucidiques tel que le lactate, les acides aminés (alanine, glutamine) et le glycérol (Maitre & Klein, 2016; Musso et al., 2021). Ce mécanisme est appelé néoglucogénèse (ou gluconéogénèse).

Métabolisme lipidique

En période post-prandiale, le métabolisme lipidique dans les hépatocytes est orienté vers la production d'acides gras (AG) grâce à la lipogénèse *de novo*. Ce processus métabolique permet la synthèse d'AG à partir de molécules d'acétyl-coenzyme A (Acétyl-CoA) principalement produites à partir du glucose via la glycolyse. Ces AG sont transformés par un complexe multienzymatique en triglycérides (TG). Ces derniers sont ensuite soit stockés dans le cytosol des hépatocytes sous forme de gouttelettes lipidiques soit incorporés pour l'assemblage des lipoprotéines de très basse densité appelées VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*) (Bechmann et al., 2012). Les VLDL sont constitués d'apolipoprotéines (Apo B-100, Apo E et ApoC) et principalement de TG mais aussi, dans une moindre mesure, de cholestérol et de phospholipides. Ces lipoprotéines sont synthétisées par les hépatocytes puis sécrétées dans la circulation sanguine (Feingold, 2000).

En période de jeûne ou lors d'un besoin accru en énergie (au cours d'un effort intense prolongé par exemple), les réserves de TG sont hydrolysées pour libérer des AG et du glycérol (Lass et al., 2011). Le catabolisme des AG ainsi libérés constituera la principale source d'énergie utilisée par le foie mais aussi

I. CARCINOME HEPATOCELLULAIRE

par le cœur et les muscles. Les AG sont oxydés dans les peroxysomes et les mitochondries pour générer des acétyl-CoA par un processus métabolique appelé β -oxydation. Les acétyl-CoA vont s'intégrer dans le cycle de Krebs pour produire l'ATP nécessaire à la néoglucogénèse et vont générer des corps cétoniques grâce à la céto-génèse, une voie métabolique spécifique du foie. Les corps cétoniques seront utilisés par le cœur, les muscles et le cerveau (Musso et al., 2021).

b. Détoxification

Cycle de l'urée

Le catabolisme des acides aminés (AA) génère des ions ammonium (NH_4^+) toxiques pour les cellules notamment pour les neurones. Le foie est en charge de la détoxification de ce composé. Dans les hépatocytes, les ions NH_4^+ doivent donc être rapidement transformés en urée grâce à une succession de réactions enzymatiques appelée cycle de l'urée. L'élimination de l'urée se fait ensuite par excrétion rénale dans les urines (Musso et al., 2021).

Métabolisme des xénobiotiques

Un xénobiotique est une substance synthétique étrangère à l'organisme c'est-à-dire ni produite par l'organisme lui-même, ni apportée par son alimentation naturelle. Les pesticides, les polluants environnementaux, l'alcool, les toxines et les médicaments sont des xénobiotiques. Le foie est le principal organe impliqué dans le métabolisme des xénobiotiques. Ce processus permet de faciliter l'élimination de ces substances potentiellement toxiques pour l'organisme en les transformant en composés plus hydrophiles que la molécule de départ. Les métabolites ainsi formés sont ensuite excrétés dans les urines, les fèces (via la bile), la salive et la sueur. Le métabolisme des xénobiotiques se déroule en plusieurs étapes :

- Phase 0

Les xénobiotiques présents dans la circulation sanguine entrent dans les hépatocytes au niveau de leur pôle basal, c'est la phase 0 du métabolisme des xénobiotiques (Figure 9). Cette entrée se fait soit par diffusion passive si le xénobiotique est suffisamment lipophile, soit de manière facilitée ou active par l'intermédiaire de transporteurs transmembranaires d'influx (Krol et al., 2015).

- Phase I

Cette phase, aussi appelée phase de fonctionnalisation, va permettre d'introduire des groupements réactifs et polaires sur les xénobiotiques (Figure 9). Ces groupements fonctionnels seront ensuite attaqués lors de la phase II. La plupart des enzymes de phase I sont des mono-oxygénases à cytochrome P450 (CYP) qui transforment les xénobiotiques par des réactions d'oxydation et de réduction. Les CYP constituent une famille d'enzymes particulièrement impliquées dans le métabolisme des médicaments. Chez l'Homme, le CYP3A4 est le cytochrome P450 le plus exprimé au niveau hépatocytaire et il est capable de métaboliser plus de 50% des médicaments. Il est important de noter qu'il existe aussi d'autres enzymes de phase I telles que les mono-oxygénases à flavines (FMO) ou les estérases par exemple (Krol et al., 2015; Musso et al., 2021).

I. CARCINOME HEPATOCELLULAIRE

- Phase II

La phase II est également appelée phase de conjugaison. Elle met en jeu des réactions permettant le transfert d'un substrat hydrophile (acide glucuronique, sulfate, glutathion, etc.) sur le groupement fonctionnel d'un métabolite issu de la phase I (Figure 9). Les réactions de phase II permettent ainsi de générer des molécules généralement plus solubles et donc plus facilement éliminables. Les principales enzymes intervenant au cours de cette phase II sont les UDP-glucuronyltransférases (UGT), les glutathion-S-transférases (GST), les sulfotransférases (SULT) et les N-acétyltransférases (NAT). La glucuroconjugaison, c'est-à-dire l'addition d'acide glucuronique activé sous forme d'UDP-glucuronyl (uridine-5-diphospho-D-glucuronyl) sur une molécule acceptrice par l'intermédiaire d'une UGT est le système de clairance de phase II le plus développé chez l'Homme. Les UGT interviennent dans le métabolisme de 40 à 70% des médicaments (Musso et al., 2021).

- Phase III

La phase III correspond à la phase d'excrétion. Au cours de cette phase, les métabolites issus des phases I et II ou les xénobiotiques sous forme inchangée sont rejetés hors de la cellule dans le sang ou la bile via des transporteurs d'efflux transmembranaires (Figure 9). Ces transporteurs appartiennent principalement à la superfamille des ABC (*ATP binding cassette*) transporteurs. Il s'agit de pompes à efflux utilisant l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie pour transporter les molécules à travers la membrane cellulaire (Krol et al., 2015). En l'état actuel des connaissances, chez l'Homme, la superfamille des ABC transporteurs est composée d'au moins 48 membres ayant des fonctions différentes et pouvant être répartis en 7 sous-familles nommées ABCA à ABCG (J.-Q. Wang et al., 2021). La P-glycoprotéine (P-gp), aussi dénommée MDR1 ou ABCB1, a été l'un des premiers ABC transporteurs reconnus comme ayant un rôle important dans la distribution et l'élimination des médicaments de l'organisme. La P-gp prend en charge un large spectre de molécules telles que les médicaments amphiphiles cationiques, les hormones stéroïdiennes, les peptides hydrophobes et les glycopeptides. La sous-famille ABCC est constituée de 12 membres parmi lesquels sont retrouvés les MRP (*Multidrug resistance-associated protein*) dont, par exemple le MRP1 (ou ABCC1) impliqué dans l'efflux des anions organiques comme le méthotrexate ou l'arsenic, et le MRP2 (ou ABCC2) jouant un rôle clé dans l'excrétion biliaire des glucurono- et sulfo-conjugués (Köck & Brouwer, 2012; J.-Q. Wang et al., 2021).

I. CARCINOME HEPATOCELLULAIRE

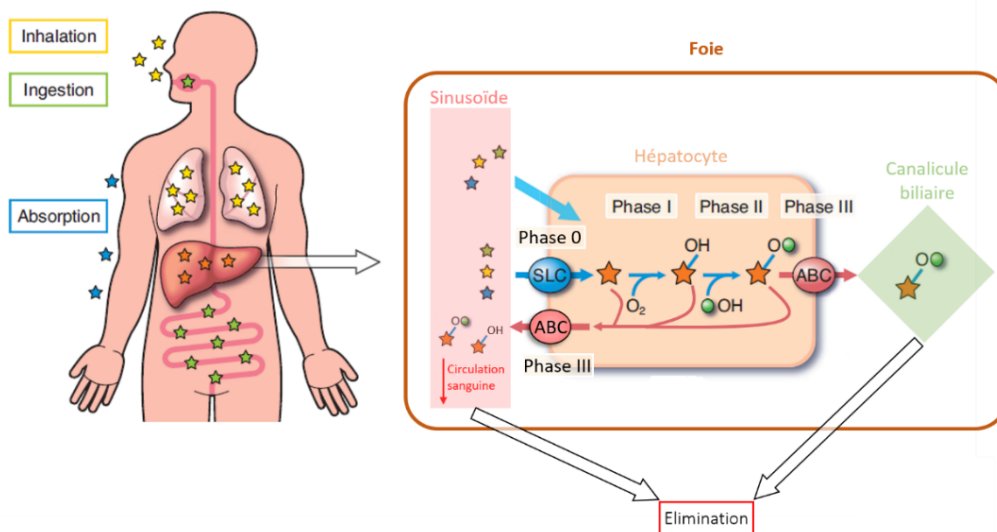


Figure 9 : Les différentes phases du métabolisme hépatique des xénobiotiques

Les xénobiotiques sont ingérés (étoiles vertes), inhalés (étoiles jaunes) ou absorbés (étoiles bleues) par l'organisme. La phase 0 correspond à l'entrée des molécules dans les hépatocytes par diffusion passive ou via des transporteurs d'influx appartenant à la super-famille des *solute carrier* (SLC). Les xénobiotiques sont ensuite métabolisés par des enzymes de phase I (fonctionnalisation) puis de phase II (conjugaison). L'excrétion des molécules à l'extérieur des hépatocytes implique des pompes d'efflux : les ABC transporteurs (*ATP-Binding Cassette*). Une fois excrétées, ces molécules sont éliminées dans les liquides biologiques (urines, bile, salive, sueur). Adapté de (Krol et al., 2015).

c. Production des protéines plasmatiques et de coagulation

Le foie est capable de synthétiser et sécréter la majeure partie des protéines plasmatiques. La plus abondante d'entre-elles est l'albumine. Cette dernière représente la moitié de la teneur totale en protéines dans le plasma, avec une concentration plasmatique de 30 à 50 g/L chez l'Homme en bonne santé. L'albumine est essentiellement synthétisée par les hépatocytes et elle est rapidement excrétée dans la circulation sanguine à raison de 10 à 15 g par jour, représentant ainsi environ 10% de la synthèse protéique totale du foie. Sa concentration plasmatique est donc un indicateur important du fonctionnement des hépatocytes. L'albumine est le modulateur principal de la pression oncotique du système vasculaire. De plus, elle est capable de se lier à une grande variété de substances endogènes et exogènes tel que des acides gras à longues chaînes, des acides biliaires, des hormones ou des médicaments, modulant ainsi leur activité biologique, leur biodistribution et leur clairance (Carvalho & Verdelho Machado, 2018; Moman et al., 2021). Le foie synthétise aussi d'autres protéines de transport comme par exemple la céruloplasmine transportant le cuivre, la transferrine transportant le fer, la transcortine transportant notamment le cortisol, etc...

Le foie est le site de synthèse de la plupart des protéines impliquées dans l'hémostase. Il joue donc un rôle clé dans ce processus biologique qui permet, suite à une lésion vasculaire, de colmater la brèche et d'arrêter ainsi le saignement. L'hémostase se déroule en 3 étapes successives : i) L'hémostase primaire aboutissant à la formation d'un clou plaquettaire ; ii) La coagulation plasmatique permettant la transformation du fibrinogène soluble en fibrine insoluble dont l'organisation en réseau va consolider le clou plaquettaire ; iii) La fibrinolyse conduisant à la dissolution du caillot fibrinoplaquettaire. Le foie synthétise la quasi-totalité des facteurs de coagulation (FI : Fibrinogène, FII : Prothrombine, etc...) mais aussi des protéines anticoagulantes telles que l'antithrombine III, la protéine S et la protéine C. Le foie produit également des protéines impliquées dans l'étape de fibrinolyse à

I. CARCINOME HEPATOCELLULAIRE

savoir le plasminogène, l' α 2-antiplasmine et le TAFI (*Thrombin activable fibrinolysis inhibitor*) (de Raucourt, 2018).

Le foie produit aussi de nombreuses protéines de la phase aiguë de l'inflammation (α 1-antitrypsine, protéine C-réactive, α 2-macroglobuline, etc.), des hormones notamment l'hepcidine, des facteurs de croissance ou encore des cofacteurs de la cascade du complément.

d. Production de la bile

La bile est produite par le foie. Il s'agit d'une sécrétion complexe constituée d'eau dans laquelle sont dissous des électrolytes et de nombreux autres composés tels que : des acides biliaires, des phospholipides, du cholestérol, de la bilirubine, des vitamines, des métaux lourds, des dérivés de médicaments ou de substances exogènes, des acides aminés, des protéines, des immunoglobulines (Ig)... La bile assure de nombreuses fonctions telles que l'excrétion de certains xénobiotiques, l'émulsification des graisses alimentaires dans l'intestin permettant ainsi leur absorption, l'élimination du cholestérol ou encore la protection vis-à-vis des infections d'origine intestinale via la sécrétion d'Ig et de cytokines notamment (Erlinger, 2018).

Au niveau du foie, ce sont les hépatocytes qui synthétisent de nombreux composants de la bile, en particulier les acides biliaires. Le rôle de l'hépatocyte doit être replacé dans le cycle entérohépatique des sels biliaires qui s'organise autour de 3 types cellulaires majeurs : l'hépatocyte, le cholangiocyte et l'entérocyte (Figure 10). Les acides biliaires sont les produits du catabolisme du cholestérol. La synthèse des acides biliaires est un processus complexe qui met en jeu deux voies principales : la voie classique entraînant la formation de l'acide cholique et la voie alternative conduisant à la synthèse de l'acide chénodésoxycholique (CDCA) (Kullak-Ublick et al., 2004). La voie classique, aussi appelée voie neutre, est la voie prépondérante de synthèse des acides biliaires chez l'Homme. La voie alternative, aussi appelée voie acide, ne génère qu'environ 10% des acides biliaires. Cela explique pourquoi le pool d'acides biliaires est composé de près de 50% d'acide cholique et de 20% de son métabolite, l'acide désoxycholique (DCA), alors que l'acide chénodésoxycholique constitue seulement 30% du pool total d'acides biliaires chez l'Homme (Kullak-Ublick et al., 1995).

Les acides biliaires primaires (cholique et chénodésoxycholique) issus du métabolisme du cholestérol, sont conjugués dans le foie avec un acide aminé (glycine ou taurine) pour produire les sels biliaires primaires : glycocholate, glycochérate, taurocholate et taurochérate. Cette conjugaison rend les sels biliaires plus solubles dans la lumière intestinale que leur acide correspondant. Le cholestérol lui-même et les sels biliaires sont excrétés dans la bile vers l'intestin. Ils sont des cofacteurs indispensables à l'action de la lipase pancréatique au cours de la digestion des lipides, dans le duodénum et le jéjunum (Martin et al., 2017). Dans l'iléon et le colon surtout, sous l'action des bactéries intestinales, les sels biliaires sont déconjugués et transformés. L'acide cholique est partiellement transformé en acide désoxycholique et l'acide chénodésoxycholique en acide lithocholique qui sont les acides biliaires secondaires.

I. CARCINOME HEPATOCELLULAIRE

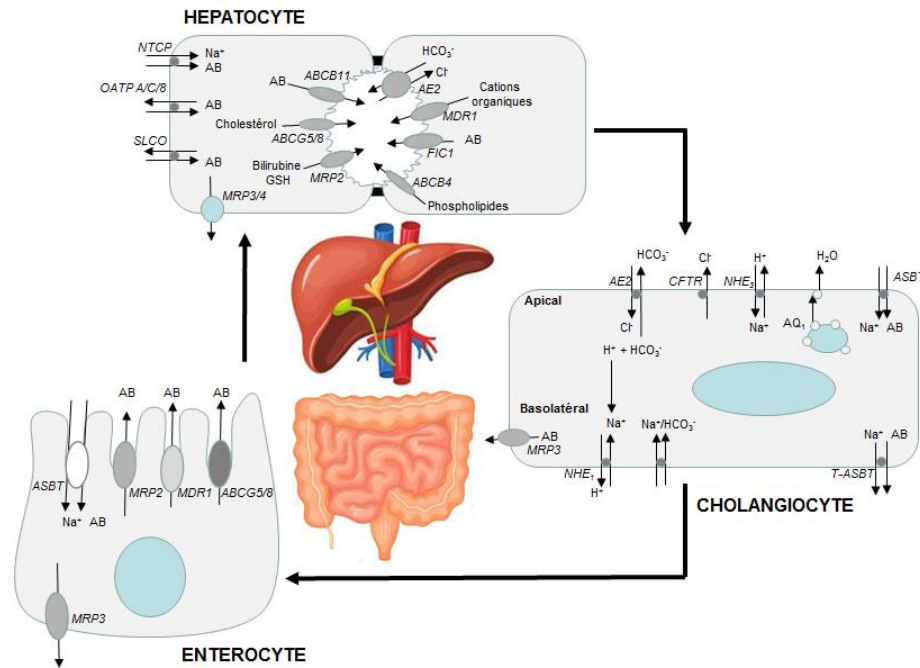


Figure 10 : Cycle entérohépatique des sels biliaires et transporteurs de sels biliaires dans le foie et l'intestin humain

Au niveau des entérocytes de l'intestin grêle, les sels biliaires et le cholestérol sont fortement réabsorbés grâce à différents transporteurs membranaires tels que MRP3 et ABCG5/ABCG8 et rejoignent ainsi le foie via la circulation sanguine portale. Au niveau du foie, les sels biliaires et le cholestérol sont absorbés par les hépatocytes via des transporteurs situés au niveau de leur membrane basolatérale : transporteurs dépendants du sodium (NTCP : Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide) et transporteurs indépendants du sodium (OATP : organic anion transporting polypeptides). La réabsorption efficace des sels biliaires par les entérocytes de l'intestin grêle et leur transport dans la circulation portale est une étape cruciale dans la circulation entéro-hépatique. L'excrétion des sels biliaires et des autres composants de la bile par les hépatocytes se fait majoritairement au niveau de la membrane canaliculaire via de nombreux transporteurs tel que la pompe d'export BSEP (ABCB11) qui permet l'efflux des sels biliaires conjugués à la glycine ou la taurine. Au niveau des cholangiocytes, des sels biliaires peuvent être réabsorbés notamment par le biais de la protéine ASBT («Apical sodium-dependent bile salt transporter»). La protéine MRP3 est également présente dans les cholangiocytes humains et joue un rôle dans l'exportation baso-latérale des sels biliaires. Cette circulation en boucle des acides biliaires entre le foie et l'intestin est appelé cycle entérohépatique.

La majeure partie des acides biliaires primaires et secondaires et environ 50% du cholestérol biliaire sont réabsorbés au niveau de l'iléon puis transportés vers le foie via la veine porte. Cette quantité de cholestérol réabsorbé est aussi importante que l'apport de cholestérol alimentaire et endogène. L'ensemble des acides biliaires recaptés par le foie sont à nouveau conjugués comme les acides biliaires primaires, sauf l'acide lithocholique qui est sulfoconjugué ou réoxydé en ursodésoxycholate, acide biliaire tertiaire (Martin et al., 2017). Dans l'intestin, la partie des acides biliaires primaires et secondaires déconjugués qui n'est pas réabsorbée est éliminée dans les fèces. Ainsi, une quantité importante des sels biliaires présente dans l'organisme, bien qu'issue initialement du métabolisme du cholestérol, est « recyclée » par ce processus excréteur/réabsorption des acides biliaires ou cycle entérohépatique via l'activité de transporteurs membranaires situés aux différents pôles des hépatocytes, cholangiocytes et entérocytes assurant la « circulation » de ces composés entre le sang, la bile et le contenu digestif de la lumière intestinale (Figure 10). L'entrée des sels biliaires dans les hépatocytes se fait via des transporteurs placés au niveau de leur membrane basolatérale. Le principal système d'absorption des sels biliaires conjugués est le transporteur dépendant du sodium : NTCP (SLC10A1). L'absorption des sels biliaires non conjugués est indépendante du sodium. Elle est médiée par les polypeptides de transport d'anions organiques multispécifiques : OATP-A (SLC21A3), OATP-C (SLC21A6) et, dans une moindre mesure, OATP8 (SLC21A8). La sécrétion des composants de la bile par les hépatocytes se fait majoritairement via leur pôle biliaire (ou apical) vers les canalicules biliaires. Au

I. CARCINOME HEPATOCELLULAIRE

niveau de la membrane canaliculaire des hépatocytes, l'excrétion des sels biliaires conjugués à la glycine ou la taurine est assurée par la pompe d'export BSEP (ABCB11), tandis que l'excrétion d'anions organiques non biliaires tels que les glucuronides de bilirubine, ainsi que des sels biliaires divalents sulfatés ou glucuronidés, est régulée par la protéine MRP2 associée à la multirésistance aux médicaments (ABCC2). L'excrétion biliaire des phospholipides et du cholestérol est assurée par MDR3 (ABCB4) et ABCG5/ABCG8, respectivement. Le produit du gène FIC1, qui pourrait être impliqué dans le transport des sels biliaires, est également exprimé à la membrane canaliculaire des hépatocytes. Des transporteurs d'efflux sont également présents au niveau de la membrane basolatérale des hépatocytes tels que MRP3 (ABCC3) et MRP4 (ABCC4) qui permettent l'excrétion de conjugués anioniques et de sels biliaires monovalents ou sulfatés. MRP3 est exprimé dans les hépatocytes, les cholangiocytes et les entérocytes. Dans les cholangiocytes et les entérocytes, l'absorption des sels biliaires à travers la membrane luminale est régie par le transporteur apical dépendant du sodium ASBT (SLC10A2). L'écoulement basolatéral dans le capillaire périductulaire se produit par l'intermédiaire de mécanismes d'échange d'anions organiques via MRP3. La bile ductulaire est modifiée par les canaux chlorure tels que le régulateur de conductance transmembranaire de la fibrose kystique (CFTR) et l'échangeur chlorure/bicarbonate (échangeur d'anions 2, AE2). Les entérocytes expriment également MRP2, le transporteur de cholestérol ABCG5/ABCG8 et la pompe d'efflux de xénobiotique MDR1 au niveau de leur membrane apicale.

I.2. Carcinogénèse hépatique

La carcinogénèse hépatique, comme la plupart des développements de tumeurs solides, est un processus long et multi-séquentiel conduisant à l'apparition d'une ou plusieurs tumeurs malignes au niveau du foie. Ces tumeurs qui prennent naissance dans le foie portent le nom de cancers primitifs du foie. Le carcinome hépatocellulaire (CHC), aussi appelé hépatocarcinome, représente plus de 70% des cas de cancer primitif du foie (Nahon et al., 2021) et se développe le plus souvent à partir des hépatocytes adultes ou de cellules progénitrices s'engageant ensuite vers le lignage hépatocytaires (Cabillic & Corlu, 2016).

Il existe d'autres types de cancers primitifs du foie, parmi lesquels peuvent être cités :

- Le cholangiocarcinome intra-hépatique qui se développe à partir des cholangiocytes
- L'hépatoblastome qui est constitué principalement de cellules épithéliales immatures (fœtales ou embryonnaires). Cette tumeur atteint presque exclusivement les enfants
- L'angiosarcome qui se développe à partir des cellules endothéliales bordant les sinusoides

Il peut arriver que des tumeurs apparaissent au niveau du foie suite à la migration de cellules cancéreuses issues d'un autre organe (sein, poumon, côlon, etc...). Ces tumeurs sont appelées métastases hépatiques ou tumeurs secondaires du foie.

La suite de ce manuscrit s'intéressera uniquement au CHC, type de cancer du foie le plus fréquent.

I.2.1. Principaux facteurs de risque de CHC

Le CHC se développe presque toujours chez des patients atteints d'une pathologie hépatique chronique, associant la survenue d'une fibrose, une inflammation chronique et des altérations

I. CARCINOME HEPATOCELLULAIRE

métaboliques évoluant vers la cirrhose. Le CHC survient et progresse le plus souvent au stade de cirrhose et plus rarement à un stade pré-cirrotique. La cirrhose, quelle qu'en soit la cause, est le facteur de risque majeur de développer un CHC. Au total, environ un tiers des patients cirrhotiques développeront un CHC au cours de leur vie (European Association for the Study of the Liver, 2018) tandis que la survenue d'un CHC sur un foie sain est exceptionnelle. Les pathologies et les xénobiotiques induisant une cirrhose constituent donc les facteurs de risques principaux de développer un CHC, et incluant les hépatites B et C chroniques, le diabète, l'obésité, la consommation chronique excessive d'alcool et les aflatoxines.

a. Hépatites virales chroniques B et C

Classées comme carcinogènes chez l'Homme par l'IARC depuis 1994 (IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2012a), les infections chroniques par le virus de l'hépatite B (VHB) et le virus de l'hépatite C (VHC) demeurent, à l'heure actuelle, le facteur de risque majeur de CHC à l'échelle mondiale. La lutte contre ces pathologies virales constitue donc la pierre angulaire dans la stratégie de prévention du CHC. L'amélioration de la sécurité transfusionnelle via le dépistage des infections dans les dons de sang, la vaccination des nouveau-nés contre le VHB et l'utilisation de nouveaux médicaments antiviraux plus efficaces pour traiter les porteurs du VHB et du VHC contribuent à diminuer de manière importante le taux de CHC associé aux hépatites chroniques B et C (McGlynn et al., 2021). Certains cofacteurs peuvent augmenter le risque de CHC chez les patients atteints d'hépatite chronique tels que : la coinfection VHB/VHC, la coinfection avec le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine), l'exposition aux aflatoxines, la consommation d'alcool et/ou de tabac, l'obésité et le diabète.

Hépatite B

Le VHB est un virus à ADN capable de s'intégrer dans le génome des cellules hôtes et d'y activer des oncogènes pouvant entraîner le développement d'un CHC même en l'absence de cirrhose. Ce virus se propage par exposition à du sang contaminé (voie parentérale ou percutanée), par voie sexuelle via les liquides biologiques (sperme, sécrétions vaginales) ou par transmission verticale de la mère à l'enfant (à la naissance et dans la période péri-natale). Une fois infectée par le VHB, une personne ne développe pas systématiquement une hépatite chronique. La probabilité que l'infection devienne chronique dépend de l'âge auquel elle est contractée. En effet, selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), une infection à VHB contractée dans la petite enfance conduit dans 95% des cas au développement d'une hépatite B chronique. A l'inverse, chez l'adulte, le passage à la chronicité s'observe seulement dans moins de 5% des cas. Par conséquent, plus un individu a été infecté jeune par le VHB, plus la probabilité qu'il développe un CHC est importante (Bosetti et al., 2014). En 2019, l'OMS estimait que 296 millions de personnes vivaient avec une hépatite B chronique. Globalement, il est estimé qu'un individu porteur d'une hépatite B chronique a 10 à 25% de risque de développer un CHC au cours de sa vie (McGlynn et al., 2021).

La vaccination contre le VHB permet de réduire l'incidence des hépatites B et de leurs complications à court terme (hépatite fulminante) et long terme (cirrhose et CHC). Selon les dernières données de l'OMS, la part des enfants âgés de moins de 5 ans présentant une hépatite B chronique est passée de 5% à un peu moins de 1% depuis le début de la vaccination contre le VHB. En 30 ans, la politique vaccinale contre le VHB à Taïwan a permis de diminuer l'incidence du CHC de plus de 80% et la mortalité de plus de 90% dans les cohortes nées après le début du programme de vaccination (Chiang et al., 2013).

I. CARCINOME HEPATOCELLULAIRE

Pour les personnes atteintes d'une infection chronique par le VHB ayant développée une maladie hépatique, le traitement actuel repose sur l'utilisation d'analogues nucléos(t)idiques tel que l'entécavir (Baraclude®) et le ténofovir (Viread®) et/ou de l'interféron pégylé α -2a (Pegasys®) (European Association for the Study of the Liver, 2017). Les analogues nucléos(t)idiques inhibent l'activité ADN polymérase virale et permettent ainsi d'obtenir un ADN viral indétectable dans l'immense majorité des cas. Les médicaments utilisés permettent de contrôler la réplication virale et d'améliorer la fonction hépatique. L'objectif principal du traitement des patients atteints d'une infection chronique par le VHB est d'améliorer leur qualité de vie et leur survie en prévenant la progression de la pathologie hépatique vers la cirrhose ou le CHC. Chez les patients présentant un CHC induit par le VHB, le traitement par analogues nucléos(t)idiques doit permettre de supprimer la réplication virale afin de stabiliser la maladie hépatique et d'éviter sa progression. Chez les patients ayant pu bénéficier d'un traitement curatif de leur CHC, l'utilisation des analogues nucléos(t)idiques permet de réduire le risque de récurrence (European Association for the Study of the Liver, 2017).

Hépatite C

Le VHC est un virus à ARN (acide ribonucléique), ne s'intégrant pas dans le génome des cellules hôtes à la différence du VHB. Ce virus se transmet par le sang, principalement par l'utilisation de matériel souillé, pour l'injection de drogue par exemple, et par la transfusion de sang ou de produits dérivés n'ayant pas fait l'objet de dépistage. Le passage à la chronicité est plus fréquent qu'avec le VHB puisque, selon l'OMS, en moyenne 70% des individus infectés par le VHC développent la forme chronique de la maladie. En 2019, l'OMS estimait que 58 millions d'individus étaient porteurs chroniques du VHC au niveau mondial. L'hépatite C chronique induit des lésions répétées au niveau du foie entraînant le développement d'une fibrose puis éventuellement d'une cirrhose. Les patients atteints d'une hépatite C chronique ont 15 à 30% de risque de développer une cirrhose sur 20 ans. Parmi ces patients cirrhotiques, l'incidence annuelle de CHC est de 0,5 à 10% (McGlynn et al., 2021).

Il n'existe aucun vaccin contre l'hépatite C mais la maladie peut être traitée par des antiviraux. L'objectif du traitement est de guérir l'infection virale afin de prévenir les complications hépatiques et extra-hépatiques liées à l'infection chronique par le VHC, d'améliorer la qualité de vie des patients et de prévenir la transmission ultérieure du virus (European Association for the Study of the Liver, 2020). La majorité des patients traités par des antiviraux d'action directe pangénotypiques, tels que le Maviret® (Glapaprevir + Pibrentasvir) ou l'Eplusa® (Sofosbuvir + Velpatasvir), réussissent à atteindre une réponse virologique soutenue (c'est-à-dire l'indétectabilité d'ARN virale 6 mois après la fin d'un traitement complet). Cette guérison virologique s'accompagne d'une diminution de 76% du risque de développer un CHC (Kanwal et al., 2017). Chez les patients présentant une fibrose avancée ou une cirrhose, l'obtention d'une réponse virologique soutenue réduit le taux de décompensation hépatique et diminuera également le risque de CHC (European Association for the Study of the Liver, 2020). Cependant, pour les patients ayant une cirrhose induite par le VHC, le risque de développer un CHC restera supérieur à 2% par an malgré l'obtention d'une guérison virologique (Llovet et al., 2021). Ainsi, chez ces patients, une surveillance clinique de l'apparition d'un CHC doit être poursuivie.

b. Aflatoxines

Les aflatoxines sont des mycotoxines produites par des champignons appartenant au genre *Aspergillus*, majoritairement *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* (McGlynn et al., 2015). Ces espèces fongiques contaminent principalement le maïs, les pistaches, les cacahuètes et les graines de coton cultivés et/ou stockés dans un environnement chaud et humide. Ces toxines sont considérées

I. CARCINOME HEPATOCELLULAIRE

comme carcinogènes et génotoxiques chez l'Homme selon la classification de l'IARC (IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2012b).

L'aflatoxine B₁ (AFB₁) est la plus fréquente et la plus toxique. Après ingestion d'aliments contaminés, l'AFB₁ est métabolisée au niveau hépatique en un dérivé époxyde actif capable de générer des dommages à l'ADN. Plus particulièrement, l'exposition à l'AFB₁ est associée à une mutation caractéristique du gène suppresseur de tumeur p53 au niveau du codon 249. Dans les zones où la contamination des aliments est la plus forte (Afrique subsaharienne et Asie), cette signature mutationnelle est observée dans 30 à 60% des cas de CHC. Le risque de développer un CHC est 4 fois plus important chez les personnes ayant un taux sanguin élevé d'AFB₁ en comparaison avec les individus sans ce facteur de risque (McGlynn et al., 2015). Dans des régions fortement contaminées, telles que la Chine et Taiwan, le développement d'une politique de sécurité alimentaire a permis de réduire de manière importante l'exposition des individus et, par conséquent, le taux de mortalité lié au CHC (Bosetti et al., 2014).

c. Alcool

La consommation excessive d'alcool représente une cause majeure de cirrhose dans les pays développés et est associée avec une augmentation du risque de CHC. Une méta-analyse récente de 19 études prospectives a estimé que le risque de CHC est augmenté de 16% chez les personnes consommant plus de 3 verres d'alcool par jour (Turati et al., 2014). Actuellement, le nombre de personnes présentant une cirrhose causée par une consommation excessive d'alcool est en constante augmentation. L'incidence annuelle d'apparition d'une cirrhose dans la population alcoolique est d'environ 1 à 3%. La consommation excessive d'alcool est responsable de 15 à 30% de cas de CHC selon la zone géographique étudiée (Llovet et al., 2021).

d. Syndrome métabolique et maladies héréditaires

Le syndrome métabolique correspond à l'association d'au moins 3 désordres métaboliques parmi les suivants : une obésité abdominale, une hypertriglycéridémie, une diminution du taux de HDL cholestérol, une hyperglycémie à jeun et une hypertension artérielle. L'incidence de ce syndrome est en constante augmentation ces dernières années, en particulier dans les pays occidentaux où 20 à 25% de la population adulte présente un syndrome métabolique. Il s'agit d'un important problème de santé publique puisque le syndrome métabolique est associé à une augmentation du risque de développer des maladies cardiovasculaires, des pathologies hépatiques ou rénales, un diabète de type 2, etc... L'obésité, le diabète de type 2 et le syndrome métabolique sont des facteurs de risque de CHC. En effet, ces pathologies sont fréquemment associées avec le développement d'une stéatose non alcoolique (*non alcoholic fatty liver disease* : NAFLD) qui se caractérise par l'accumulation de graisses dans les cellules hépatiques. La NAFLD peut évoluer vers une stéatohépatite non alcoolique (*non alcoholic steato hepatitis* : NASH) lorsqu'une composante d'inflammation vient compliquer le tableau clinique, puis vers une cirrhose (Rinella ME, 2015). Pour les personnes ayant développé une cirrhose à la suite d'une NASH, l'incidence du CHC est de 1 à 2% par an. Depuis les années 80, la prévalence de l'obésité et du diabète de type 2 a augmenté de manière continue. Par conséquent, la proportion de CHC relative à ces pathologies s'accroît considérablement (McGlynn et al., 2015). Depuis 2010, la proportion de CHC causés par les NASH augmente fortement et représente, à l'heure actuelle, 15 à 20% des cas de CHC dans les pays occidentaux (Llovet et al., 2021). La NASH pourrait bientôt dépasser les facteurs viraux en tant que principale cause de CHC à l'échelle mondiale.

I. CARCINOME HEPATOCELLULAIRE

Certaines maladies héréditaires comme l'hémochromatose, générant une forte surcharge hépatique en fer, ou le déficit en alpha-1 antitrypsine sont également associées à un risque accru de CHC (Bosetti et al., 2014). De façon générale, l'exposition à de fortes concentrations en métaux conduit à des pathologies systémiques et divers symptômes incluant des dysfonctions hépatiques, des cirrhoses et des CHC (Cano et al., 2021).

I.1.2. Bases cellulaires et moléculaires de la carcinogénèse hépatique

Le terme de carcinogénèse est le terme « générique » décrivant le processus conduisant au développement d'un cancer (Hanahan & Weinberg, 2000; Yuspa, 2000). Ce processus est classiquement divisé en trois ou quatre étapes : l'initiation, la promotion, la progression et la phase métastatique (Figure 11).

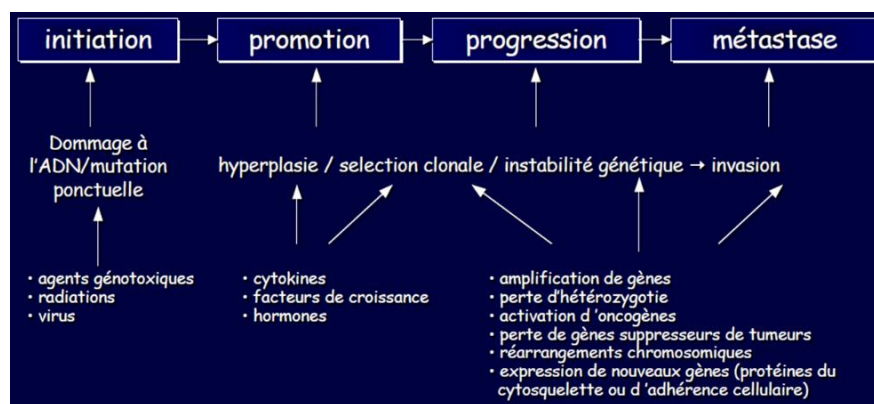


Figure 11 : Les principales étapes de la carcinogénèse

Le processus est divisé en 4 étapes : l'initiation, la promotion, la progression et la dissémination métastatique. Ces étapes sont généralement représentées de façon séparée bien que les frontières entre les étapes successives se chevauchent. Le processus débute avec des altérations du génome qui, pour certaines d'entre elles non corrigées par les systèmes de réparation, vont donner un avantage prolifératif aux cellules mutées. Dans un contexte de maladie chronique sous-jacente et d'inflammation, la promotion générera une hyperplasie favorable à l'acquisition d'autres altérations à l'origine de l'installation d'un génotype tumoral et souvent d'une hétérogénéité qui favoriseront l'expansion de la tumeur avant l'émergence d'un pouvoir métastatique de pronostic très défavorable.

La première étape de la carcinogénèse, ou initiation (Berenblum & Shubik, 1947), est causée par des changements génétiques irréversibles (mutations, translocations) dus à des agents génotoxiques tels que les radiations ionisantes, à des insertions de génomes viraux ou à des carcinogènes chimiques générant également des adduits puis des mutations. Ces altérations vont conduire à l'activation de gènes normalement régulés comme les proto-oncogènes (*Myc*, *Ras*, *Bcl2*), pour donner des formes oncogéniques et/ou conduire à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs [*P53*, *Rb* (Retinoblastoma-associated)] (Hanahan & Weinberg, 2000). Ces altérations vont produire un déséquilibre dans la régulation de la prolifération cellulaire, souvent associé à une résistance à l'apoptose. A cette étape, les cellules sont dites initiées ou pré-néoplasiques, mais ne sont pas encore néoplasiques. L'élimination de ces cellules par mort cellulaire ou leur « correction » par des systèmes de réparation de l'ADN peuvent intervenir avant que ces altérations génétiques ne s'accumulent et soient irréversibles (K. Dixon & Kopras, 2004; Oliveira et al., 2007).

Lors de la promotion, des promoteurs tumoraux (cytokines, facteurs de croissance) vont créer un environnement, notamment un contexte inflammatoire (Colotta et al., 2009), favorisant la

I. CARCINOME HEPATOCELLULAIRE

prolifération des cellules initiées. L'augmentation du taux de division cellulaire et des altérations de points de contrôle du cycle cellulaire vont également favoriser l'accumulation des cellules hyperplasiques. Ces altérations sont de nature épigénétique car les promoteurs tumoraux n'interagissent pas directement avec l'ADN. En effet, les promoteurs ne sont pas, en général, des agents mutagènes ou carcinogènes mais peuvent être présents pendant de très longues périodes, parfois des années. L'étape de promotion est réversible et la disparition des promoteurs entraînent une régression de la prolifération cellulaire et leur élimination par apoptose (Oliveira et al., 2007; Trosko, 2001).

La progression est l'étape de « basculement » vers la carcinogénèse qui confère aux cellules un phénotype néoplasique par le biais de mécanismes d'altérations génétiques et épigénétiques. La progression est irréversible et se caractérise par une instabilité génétique, une croissance rapide ainsi que par des changements biochimiques, métaboliques et morphologiques (Klaunig et al., 2000). Les cellules ainsi transformées acquièrent des caractéristiques spécifiques comme leur relative indépendance vis-à-vis de la stimulation mitogénique, une insensibilité aux signaux inhibant la croissance et un échappement à l'apoptose (Hanahan & Weinberg, 2000).

La dernière phase, qui ne se différencie pas vraiment de la progression, est l'acquisition d'un potentiel invasif et métastatique, un potentiel de réplication illimité et une angiogenèse active (Hanahan & Weinberg, 2000).

Ces grandes caractéristiques de la carcinogénèse sont communes à la formation des différentes tumeurs solides mais certaines « associations » d'altérations génétiques et épigénétiques caractérisent des tumeurs particulières d'organe et/ou définissent des sous-types de tumeurs dans un ou plusieurs organes.

Dans le cas du foie, les cancers sont souvent classés en deux grandes classes en fonctions de l'absence ou la présence d'une hépatopathie sous-jacente :

- Les tumeurs hépatiques « sur foie sain »

Il s'agit de patients atteints de CHC sur foie non cirrhotique qui représentent moins de 10% des cas avec : i) les patients sans pathologie connue et une histologie hépatique normale qui représentent de très rares cas (Bralet et al., 2000); ii) les patients atteints d'une maladie chronique du foie à un stade pré-cirrhotique, ils représentent la majorité des cas. Cette situation est plus fréquente lors d'infection par le VHB et pourrait être associée à l'intégration du génome du VHB, ce qui constituerait une forme de mutagenèse insertionnelle à l'origine d'une instabilité chromosomique (El-Serag, 2011; El-Serag & Rudolph, 2007).

- Les tumeurs hépatiques sur foie cirrhotique

Elles représentent 70 à 90% des CHC, et émergent, pour la plupart, des maladies chroniques d'origine infectieuse (VHB, VHC), alimentaire (alcool, obésité), toxique (aflatoxine B1) ou génétique (hémochromatose, déficit en α 1-antitrypsine). Ces maladies chroniques évoluent vers une fibrose, puis une cirrhose, qui se caractérisent par un contexte inflammatoire et une synthèse abondante de composants matriciels comme le collagène, notamment par les cellules étoilées activées en myofibroblastes (Wallace et al., 2008) mais également par les hépatocytes transformés. La cirrhose, qui représente le stade ultime de la fibrose, se caractérise par une désorganisation du foie et la formation de nodules hépatiques anormaux entourés par des dépôts de collagène. Au sein de ces nodules, des cycles répétés de nécrose et régénération (Farazi & DePinho, 2006) produisent une prolifération hépatocytaire contribuant à la promotion et progression du processus tumoral hépatique. Il y a ensuite apparition de nodules hyperplasiques puis de nodules dysplasiques qui vont conduire au CHC (Figure 12).

I. CARCINOME HEPATOCELLULAIRE

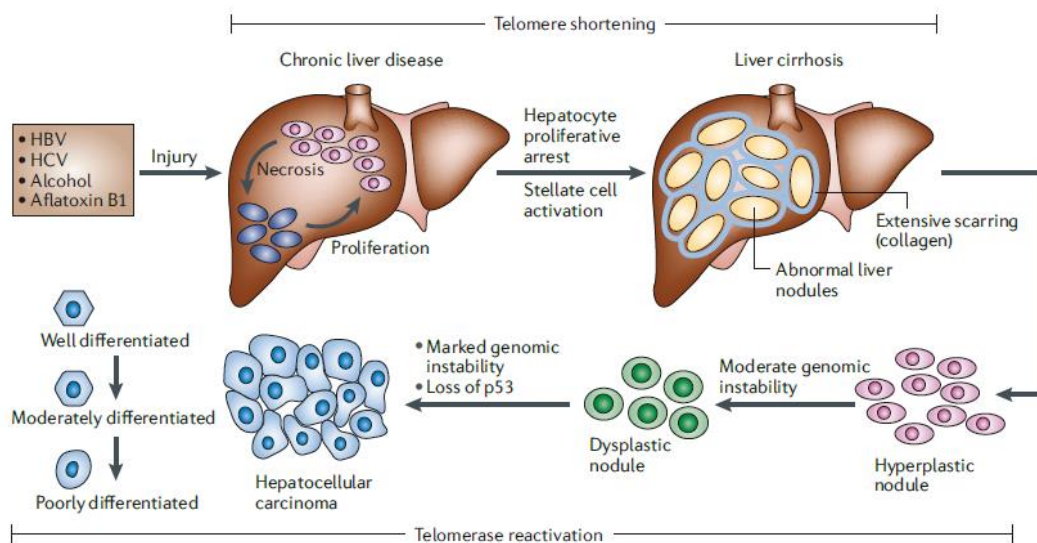


Figure 12 : Progression du CHC

Après une atteinte hépatique induite par l'un ou l'autre des facteurs de risque (hépatites virales, alcool et aflatoxine B₁), les cycles continus de nécrose et prolifération hépatocytaire (processus destructeur-régénératoire) favorisent une maladie chronique du foie qui culmine en cirrhose du foie. La cirrhose est caractérisée par la formation anormale de nodules hépatiques entourés de dépôt de collagène. Par la suite, des nodules hyperplasiques sont observés, suivis de nodules dysplasiques et finalement de carcinome hépatocellulaire (CHC), qui peuvent être classés en tumeurs bien différenciées, modérément différenciées et peu différenciées. Le raccourcissement des télomères est une caractéristique des maladies chroniques du foie et de la cirrhose. La réactivation de la télomérase, la perte et/ou la mutation de p53 et l'instabilité génomique caractérisent également les stades tardifs des CHC. D'après (Farazi & DePinho, 2006).

L'hépatocarcinogénèse, ou carcinogénèse hépatique, est donc un long processus durant lequel s'accumulent de nombreuses altérations génétiques. Au cours de ces dernières années, plusieurs équipes ont caractérisé les différentes altérations génétiques responsables de la survenue du CHC à partir de biopsies de patients et d'analyses moléculaires qui ont permis d'identifier les mutations les plus fréquentes. Ces études ont permis de clarifier des voies de signalisation impliquées dans l'hépatocarcinogénèse et d'établir des classifications de CHC. Une des premières classifications par Hoshida en 2009 a été réalisée par une méta-analyse des profils d'expression génique de 603 patients avec une corrélation entre l'activation de voies de signalisation et des sous-classes de CHC établis sur des critères cliniques. Cette classification comporte 3 sous-classes de CHC nommées S1, S2 et S3. Les sous-classes S1 et S2 correspondent à des CHC peu ou moyennement différenciés, de grosses tailles et de mauvais pronostics. La sous-classe S1 est définie par une activation des voies TGF- β et Wnt tandis que la classe S2 est définie par une expression de EpCam, une forte expression d'alpha-foetoprotéine (AFP) et une activation des voies AKT et MYC. La sous-classe S3 correspond à des CHC plus différenciés, de petites tailles, de meilleurs pronostics avec un phénotype proche de celui des hépatocytes (Hoshida et al., 2009).

En 2012, Guichard et ses collaborateurs ont également réalisé une étude, sur une cohorte de 125 patients, définissant les principales altérations génétiques en particulier au niveau de la voie P53 qui contrôle le cycle cellulaire et la réparation de l'ADN, la voie Wnt/ β -caténine, la voie PI3K, la voie des MAPK, les altérations de l'organisation de la chromatine et le stress oxydatif (Guichard et al., 2012) (Figure 13). L'implication de ces voies avait été déjà proposée par des travaux antérieurs de Puig et Edamoto (Edamoto et al., 2003; Laurent-Puig & Zucman-Rossi, 2006). Cette étude a conforté que les mutations au niveau des voies P53 (IRF2, TP53 et CDKN2A) et Wnt/ β -caténine (CTNNB1, AXIN1 et APC) étaient les plus fréquentes (Figure 13). D'autres études ont également montré l'incidence de

I. CARCINOME HEPATOCELLULAIRE

l'altération de la voie PI3K/AKT/mTOR et de la voie des MAPK (Mitogen Associated Protein Kinase) sur le CHC (Ma et al., 2015).

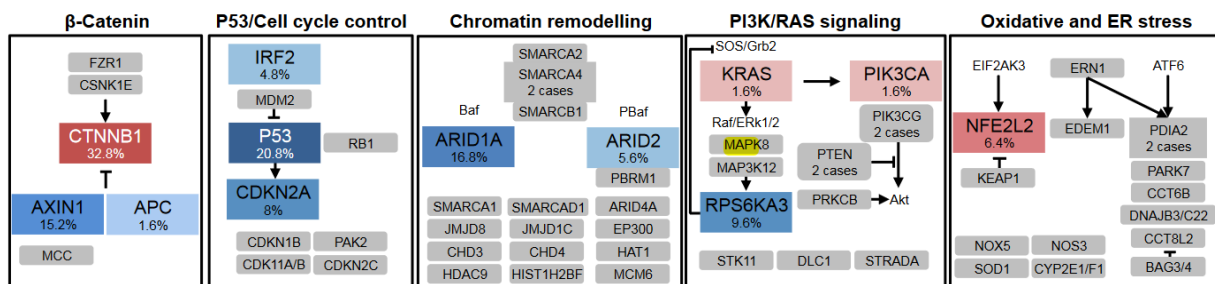


Figure 13 : Les altérations génétiques majeures dans le CHC

Le CHC, comme les autres tumeurs solides et hématopoïétiques, présente un ensemble d'anomalies génétiques qui permettent une classification moléculaire des tumeurs en sous-types tumoraux des CHC. D'après (Guichard et al., 2012).

Plus récemment, des travaux du laboratoire ont permis de définir les caractéristiques cliniques, pathologiques et moléculaires de CHC non prolifératifs, par des analyses de métadonnées transcriptomiques de plus de mille CHC (Désert et al., 2017). Il a été montré que les CHC non prolifératifs gardent le programme de zonation qui distribue les fonctions métaboliques le long de l'axe porto-central dans le foie normal. Plus précisément, il a été identifié deux sous-classes de CHC peu proliférants et bien différenciés, à savoir le type périportal (β -caténine de type sauvage) et le type périverneux (β -caténine mutante), qui expriment des réseaux de gènes négativement corrélés. La nouvelle sous-classe de type périportale, qui représentait 29 % de l'ensemble des CHC, exprime un réseau de gènes dirigé par le facteur nucléaire 4A des hépatocytes. Cette classe de CHC correspond à des tumeurs à un stade précoce selon la classification de Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC). De plus, il a été identifié une signature de huit gènes caractérisant le CHC de type périportal. Ce travail a également confirmé l'existence d'une sous-classe de CHC prolifératifs superposant la classe S2 (Hoshida et al., 2009) avec un mauvais pronostic et l'expression de marqueurs progéniteurs et/ou souches.

De nombreuses publications suggèrent l'existence d'une faible population de cellules cancéreuses ayant les caractéristiques des cellules souches au sein des tumeurs hépatiques (Nio et al., 2017). De plus, il a été signalé que ces cellules souches cancéreuses (CSCs) seraient responsables de l'initiation, la progression, la résistance thérapeutique, les métastases et la rechute du carcinome hépatocellulaire (Recalcati et al., 2019). Aussi, le ciblage des CSCs est considéré comme primordial pour la réussite des traitements des cancers hépatiques (Nio et al., 2017).

Goodell et collaborateurs ont été les premiers à décrire la technique d'isolement d'une population cellulaire dite « side-population » (SP) grâce à la capacité des cellules souches d'effluer le Hoechst 33342 (Goodell et al., 1996). Ce dernier, un colorant fluorescent qui se fixe à l'ADN des cellules vivantes et excitable par un rayonnement ultraviolet, est classiquement utilisé comme marqueur du cycle cellulaire, car sa fixation est proportionnelle à la quantité d'ADN cellulaire. Ces auteurs ont mis en évidence que la capacité des cellules SP à effluer le Hoechst 33342 disparaît complètement en présence de vérapamil, un inhibiteur des pompes à efflux de type MDR (MultiDrug Resistance), ce qui justifie un mécanisme d'efflux actif transmembranaire. Les cellules SP expriment fortement le gène MDR et cette population est enrichie en cellules ayant les propriétés des CSCs (Chiba et al., 2006; Haraguchi et al., 2006).

Bien que l'existence des CSCs hépatiques ait été prouvée, leur origine n'est pas encore totalement élucidée. Certains auteurs interprètent l'origine des CSCs hépatiques comme étant des cellules

I. CARCINOME HEPATOCELLULAIRE

souches/progénitrices hépatiques transformées (Mishra et al., 2009). En effet, les cellules souches normales peuvent donner naissance aux CSCs suite aux altérations génétiques et/ou épigénétiques. Mais ce processus n'est sans doute pas le cas général au sein des tumeurs hépatiques (Figure 14). Selon le modèle de division hiérarchique des CSCs, une fois qu'une cellule cancéreuse non souche (CCs : cellules progénitrices et différenciées) est engendrée, elle serait incapable de « rétrograder » dans la hiérarchie. Cependant, tous les cancers ne suivraient pas ce processus unidirectionnel. Dans un modèle alternatif, il a été démontré que les cellules différenciées présentent une certaine plasticité (Figure 14), et pourraient subir une rétrodifférenciation en CSCs sous l'influence de mutations multiples (Fábián et al., 2013). Récemment, Holczbauer et collaborateurs ont rapporté que la transformation oncogénique des hépatocytes adultes, des hépatoblastes et des progéniteurs hépatiques par le H-RAS entraîne leur reprogrammation « partielle » en CSCs (Holczbauer et al., 2013). Des données expérimentales *in vitro* obtenues par l'équipe avec la lignée d'hépatome humain HepaRG sont en faveur du fort caractère de plasticité des cellules hépatiques cancéreuses (Cabillic & Corlu, 2016; Cerec et al., 2007; Dubois-Pot-Schneider et al., 2014; Fekir et al., 2019), notamment dans un contexte de reprogrammation métabolique (Daniel et al., 2021).

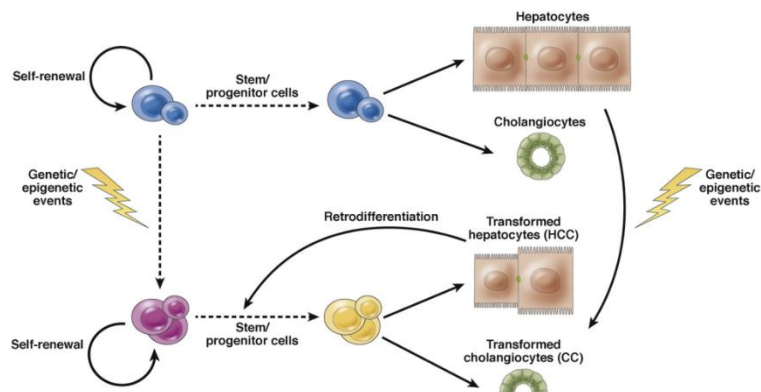


Figure 14 : Plasticité et origine des CSCs dans le carcinome hépatocellulaire

Le processus de carcinogénèse hépatique pourrait survenir à la suite d'altérations génétiques et épigénétiques touchant des cellules adultes différenciées ou de cellules souches. Les cellules mutées présenteraient des phénotypes partiellement différenciés et une forte plasticité cellulaire produisant des phénotypes variés en fonction des conditions du microenvironnement tumoral. Adapté de (Cabillic & Corlu, 2016)

1.2.3. Modèles cellulaires *in vitro* d'hépatocytes normaux et transformés

Au cours des quarante dernières années, les progrès dans les méthodologies de culture des cellules ont permis de disposer de multiples modèles *in vitro* de cellules hépatocytaires incluant les cultures primaires d'hépatocytes normaux et des lignées d'hépatomes murins et humains.

La dissociation de parenchyme hépatique sain permet d'isoler des hépatocytes normaux (Figure 15) qui peuvent être cultivés en cultures primaires dans différentes conditions de milieu ou de supports (plastique ou matrices). En condition de culture pure, sans milieu complexe, les hépatocytes ont une survie limitée à quelques jours et perdent rapidement leurs fonctions spécifiques (Corlu & Loyer, 2015). Des systèmes de culture primaire plus complexes ont été développés pour améliorer la survie et la différenciation, comme par l'ajout de diméthylsulfoxyde (DMSO) au milieu de culture cellulaire (Isom et al., 1985) et des supports de matrice extracellulaire (Bissell et al., 1987).

I. CARCINOME HEPATOCELLULAIRE

Dans notre laboratoire, il a été mis au point un modèle de coculture constitué d'hépatocytes normaux et de cellules épithéliales hépatiques de rat (RLEC), également appelées cellules épithéliales biliaires, dans lesquelles les contacts cellulaires hétérotypiques sont restaurés (Corlu et al., 1991; Guguen-Guillouzo et al., 1983). Un dépôt abondant de matrice extracellulaire est observé qui permet de maintenir les cellules viables et fonctionnelles pendant plusieurs semaines (Corlu et al., 1991; Guguen-Guillouzo et al., 1983).

D'autres stratégies ont consisté à immortaliser des hépatocytes primaires par transfection à l'aide de gènes immortalisant comme l'antigène T de SV40. Les cellules ainsi dérivées présentent un phénotype hépatocytaire mais ce dernier reste instable et ne peut être maintenu à long terme (Pfeifer et al., 1993).

L'émergence des cultures d'organoïdes a également permis de proposer des cultures primaires de populations hétérogènes hépatiques maintenues à long terme sous une alternance de quiescence et prolifération par l'utilisation des combinaisons de cytokines pro-inflammatoires, notamment l'IL6 et le TNFalpha, et des facteurs de croissance comme l'EGF et l'UGF (Peng et al., 2018).

Depuis plusieurs années, une recherche très active sur la différenciation de cellules souches embryonnaires (ES) et de cellules pluripotentes induites (iPS) permet d'orienter ces cellules souches vers le lignage hépatique. Des protocoles complexes de combinaison de cytokines, facteurs de croissance et facteurs trophiques ont permis de différencier partiellement ces cellules en hépatoblastes, hépatocytes fœtaux et cholangiocytes ce qui constitue en grand progrès et espoir dans des perspectives de thérapies cellulaires (Dianat et al., 2014; Hannoun et al., 2016; Touboul et al., 2010).

I. CARCINOME HEPATOCELLULAIRE

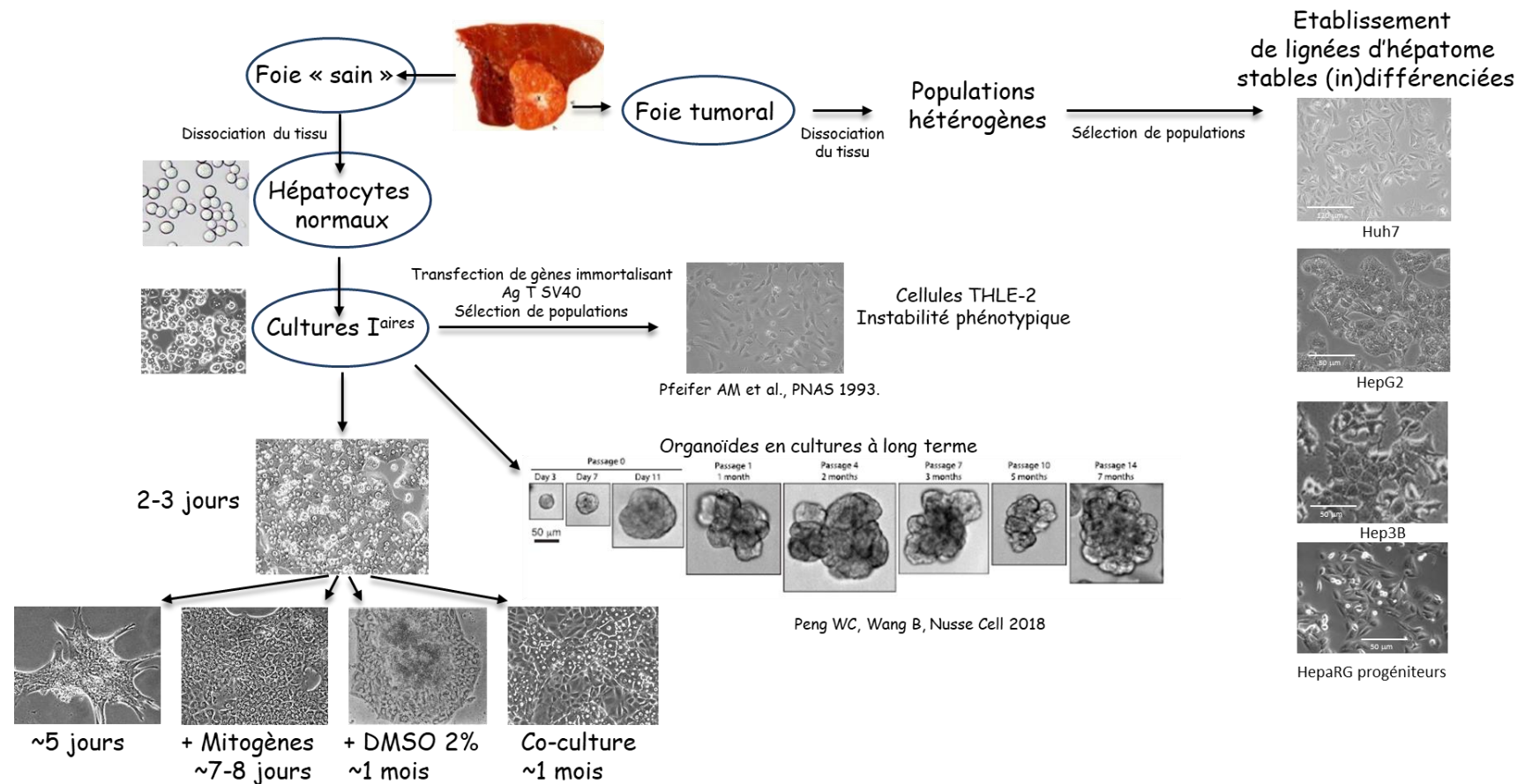


Figure 15 : Représentation schématique du développement des modèles de cultures de cellules hépatocytaires

L'isolement se fait à partir de foies d'animaux ou de pièces hépatiques humaines (photographie du schéma) présentant ou non des zones tumorales. A partir de ces pièces, il est procédé à la dissociation du tissu, généralement par digestion enzymatique, puis à la mise en culture de : 1) cellules normales à partir du foie sain pour produire des cultures primaires dont la survie en monocouche varie de quelques jours à quelques semaines en fonction des conditions de culture, voire quelques mois pour des conditions de culture d'organoides, 2) de cellules « transformées » au sein de populations très hétérogènes mais ayant permis d'établir des lignées stables dont les plus connues sont les lignées humaine Huh7, HepG2 ou encore HepaRG.

I. CARCINOME HEPATOCELLULAIRE

La seconde grande catégorie de modèles de cellules hépatocytaires est constituée des lignées d'hépatome dérivées au cours des dernières décennies à partir de biopsies tumorales. Bien qu'il soit aisé de dériver des populations cellulaires hétérogènes, souvent fibroblastiques, à partir de biopsies de CHC, il est paradoxalement très délicat d'établir des lignées stables au phénotype hépatocyttaire qui se maintiennent dans le temps. Cependant, il existe aujourd'hui d'assez nombreuses lignées d'hépatome murines ou humaines disponibles et utilisées dans les laboratoires de recherche et les industries pharmaceutiques pour les travaux de recherche ou des évaluations pharmacotoxicologiques. Les lignées les plus connues sont, pour le rat, les cellules FAO (Deschatrette & Weiss, 1974), pour la souris, les cellules Hepa1-6 (Grimm et al., 2000), et pour l'Homme, les lignées HepG2 (Knowles et al., 1980), Huh7 (Nakabayashi et al., 1982), HBG (Glaise et al., 1998), ou encore la lignée HepaRG (Gripon et al., 2002).

La lignée HepaRG a été établie à partir des cellules isolées d'un carcinome hépatocellulaire humain (Gripon et al., 2002) dans les travaux conjoints de S. Rumin et P. Gripon, qui donneront leurs initiales « RG » pour nommer la lignée HepaRG, au sein de l'équipe de C. Guillouzo entre 1997 et 2002. Ces cellules sont des cellules progénitrices bipotentes qui ont la capacité de se différencier lorsqu'elles sont à confluence en deux populations de cellules distinctes : les cholangiocytes et les hépatocytes (Cerec et al., 2007; Guillouzo & Guguen-Guillouzo, 2008). Les cellules sont entretenues selon un protocole très codifié issu des travaux du laboratoire. La population est amplifiée à partir d'une population confluyente par décollement des cellules 14 jours après ensemencement (Figure 16).

Les cellules confluentes sont détachées du support de culture puisensemencées à faible densité permettant une forte prolifération pendant la première semaine (Figure 16A). Lors de la seconde semaine, la prolifération ralentit fortement pour atteindre la quiescence lorsque la monocouche est complète, parallèlement à l'engagement de la différenciation dans les lignages hépatocyttaire et cholangiocyttaire (Figure 16A). Il est possible d'accentuer la différenciation des cellules en ajoutant 2% de DMSO au milieu nutritif tout en maintenant la culture confluyente pendant 2 autres semaines afin d'augmenter ainsi l'expression des enzymes hépatiques dans les hépatocytes (Cerec et al., 2007; Dubois-Pot-Schneider et al., 2014; Kanebratt & Andersson, 2008; Vlach et al., 2019) (Figure 16B). Cette lignée représente un modèle de choix pour différents types d'études fondamentales et appliquées et a pris de l'importance dans la littérature récente. Depuis plusieurs années, notre laboratoire a caractérisé la rétrodifférenciation des hépatocytes et des cholangiocytes de la lignée HepaRG en un progéniteur hépatique bipotent (Cerec et al., 2007). De plus, il a été prouvé que sous l'influence des cytokines inflammatoires (IL-6 ou le TNF α) et du TGF β , les cellules hépatocytes-like de la lignée HepaRG se rétrodifférencient en cellules souches/progénitrices hépatiques (Cerec et al., 2007; Dubois-Pot-Schneider et al., 2014; Fekir et al., 2019).

Dans mon travail expérimental, j'ai utilisé plusieurs de ces lignées d'hépatome, plus particulièrement les cellules Huh7 et HepaRG, pour l'étude du ciblage des cellules d'hépatome par des nanoformulations et des peptides fonctionnalisés.

I. CARCINOME HEPATOCELLULAIRE

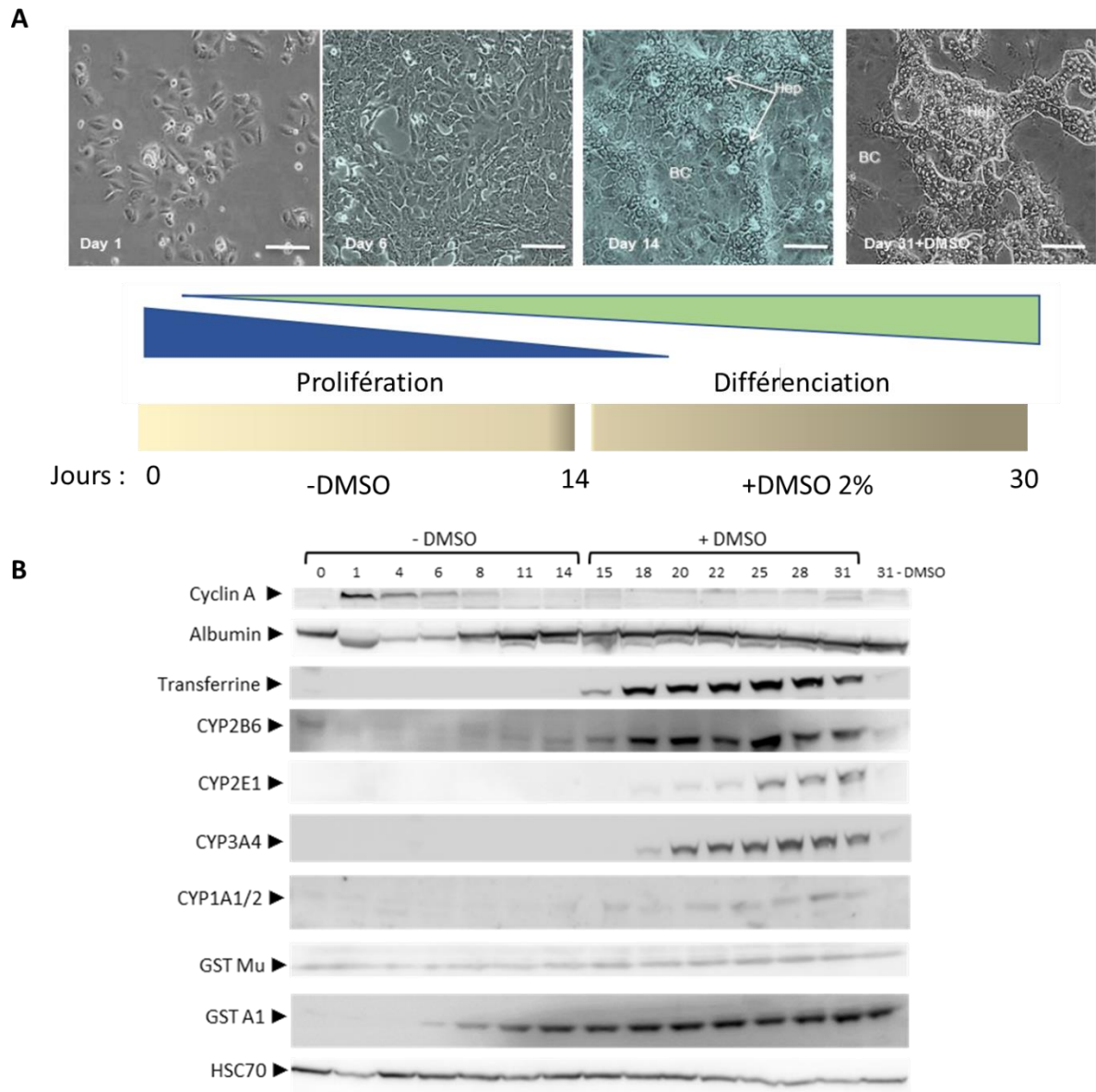


Figure 16 : Morphologie et expression de fonctions hépatocytaires dans les cellules HepaRG

(A) Morphologie en contraste de phase des cellules de la lignée HepaRG. Pendant la première semaine après ensemencement, les cellules progénitrices prolifèrent activement. Les cellules atteignent la confluence et cessent de proliférer par inhibition de contact et engagent le processus de différenciation. Après 2 semaines, les cellules ont engagé la différenciation et deux populations cellulaires peuvent déjà être distinguées. A ce stade, la culture est soit repiquée et les cellules sont réensemencées à faible densité pour être amplifiées, soit 2% de DMSO sont ajoutés dans le milieu de culture pour potentialiser la différenciation. Au bout de 2 semaines supplémentaires de culture, les cellules atteignent leur niveau de différenciation maximal (≈ jour 33). (B) Expression de fonctions spécifiques de l'hépatocytes lors du protocole de différenciation de 30 jours. Détection de protéines par western blot. D'après (Vlach et al., 2019)

I. CARCINOME HEPATOCELLULAIRE

I.2. Prise en charge des CHC

I.2.2. Quelques données épidémiologiques : incidence et mortalité

a. Au niveau mondial

Selon les données publiées par le centre international de recherche sur le cancer (IARC) dans son étude GLOBOCAN 2020 (Figure 17), le CHC est le 6^{ème} cancer le plus fréquent dans la population mondiale avec environ 906 000 nouveaux cas en 2020. Du fait de son très mauvais pronostic, le CHC se classe au 3^{ème} rang des cancers les plus mortels derrière le cancer du poumon et le cancer colorectal.

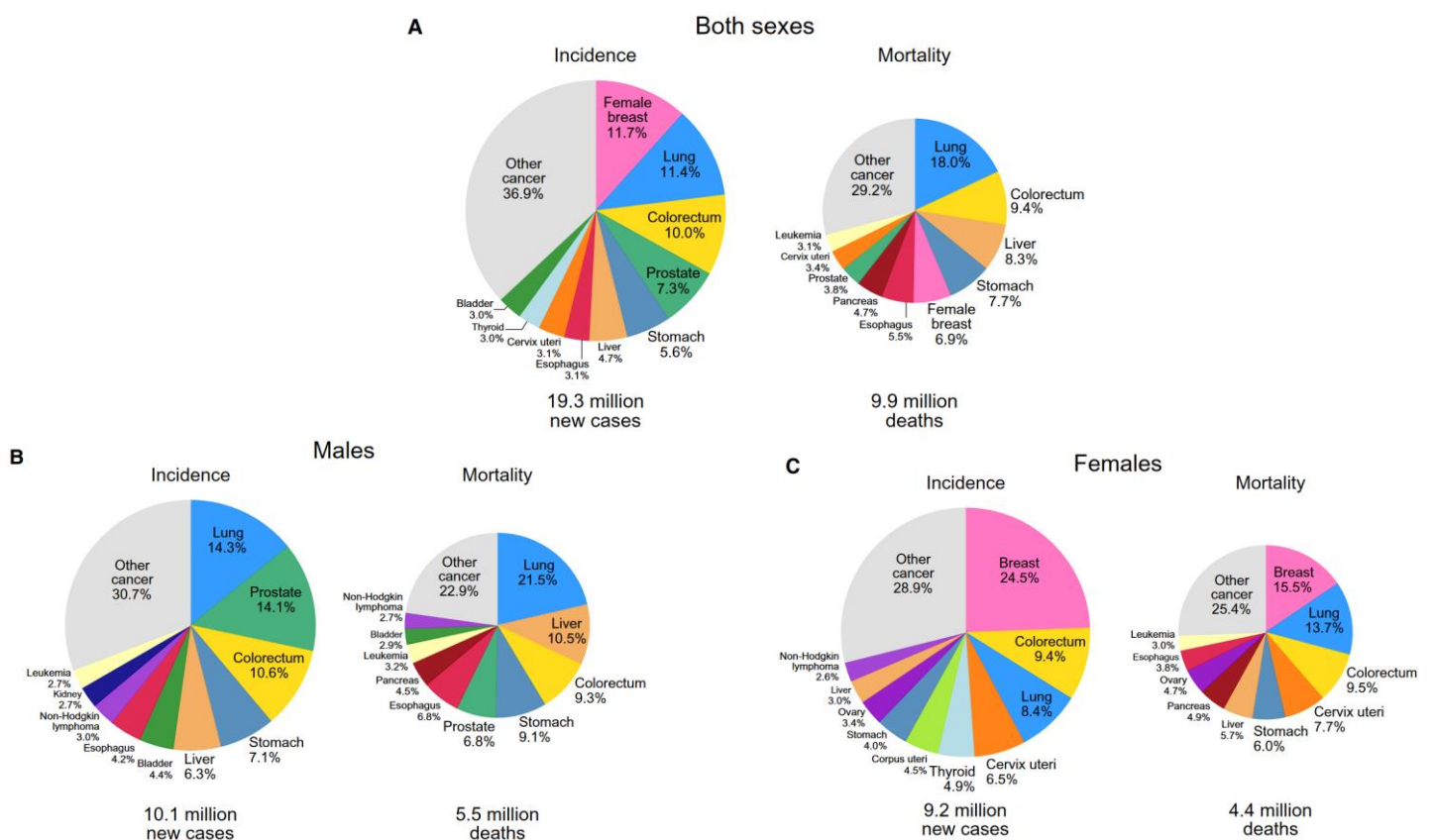


Figure 17 : Données globales de l'incidence et de la mortalité des cancers dont les tumeurs hépatiques.

Répartition des nouveaux cas (incidence) et des décès (mortalité) pour les 10 cancers les plus courants d'après les données GLOBOCAN en 2020 pour (A) les deux sexes, (B) les hommes et (C) les femmes. Pour chaque sexe, la superficie du diagramme circulaire reflète la proportion du nombre total de cas ou de décès. D'après (Sung et al., 2021).

Selon les données GLOBOCAN, en 2020, le CHC a été responsable d'environ 830 000 décès dans le monde (Sung et al., 2021). Au cours de cette même année, l'IARC a dénombré approximativement 906 000 nouveaux cas de CHC, majoritairement répartis en Asie avec près de 657 000 personnes nouvellement diagnostiquées sur ce continent (soit plus de 70% du taux d'incidence mondiale) (Tableau 1).

I. CARCINOME HEPATOCELLULAIRE

Les hommes sont plus touchés que les femmes avec un ratio hommes/femmes de 2,3 au niveau mondial. L'incidence du CHC est en constante augmentation comme en témoigne l'évolution de +15,7% du nombre de nouveaux cas entre 2012 et 2020. D'après les prévisions de l'IARC, l'incidence du cancer du foie va continuer à augmenter dans les années à venir et le nombre de nouveaux cas, dans le monde, est estimé à plus de 1,4 millions en 2040.

Tableau 1 : Nombre de nouveaux cas de cancer du foie estimé par région géographique et par sexe d'après les études GLOBOCAN 2012 et 2020 de l'IARC.

Zones Géographiques	Hommes		Femmes	
	2012	2020	2012	2020
Afrique	38 700	45 142	20 000	25 400
Amériques	40 300	53 990	22 900	32 104
Asie	430 700	471 999	163 700	184 993
Europe	42 800	58 079	20 600	29 551
Océanie	1 900	3 110	800	1 309
TOTAL (Monde)	554 400	632 320	228 000	273 357

Le taux d'incidence du CHC et le facteur de risque prédominant mis en cause dans son développement varient selon les zones géographiques concernées (Figure 18). Dans la plupart des régions où l'incidence du CHC est élevée comme en Chine, en Corée et en Afrique subsaharienne, le facteur de risque principal est l'infection chronique par le VHB. L'hépatite C chronique est le facteur de risque majeur de développement du CHC aux Etats-Unis, en Europe de l'Ouest et au Japon par exemple. Tandis qu'en Europe centrale et en Europe de l'Est, la consommation excessive et chronique d'alcool représente le facteur de risque principal de CHC.

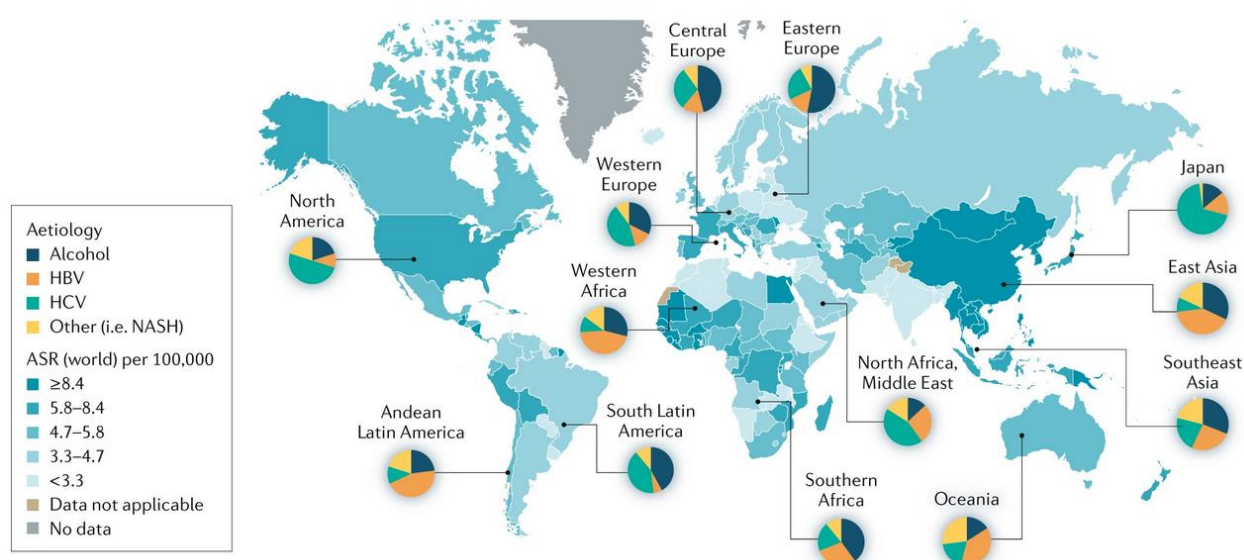


Figure 18 : Incidence du CHC et impact des facteurs de risque au niveau Mondial

Cette carte représente les taux d'incidence standardisés sur l'âge (ASR = Age Standardized Rate) et les principaux facteurs étiologiques impliqués dans le développement du CHC en fonction des zones géographiques. Les ASR sont calculés sur l'ensemble de la population mondiale (tous âges confondus, hommes et femmes) et sont issus de l'études GLOBOCAN 2020 de l'IARC (<http://gco.iarc.fr/today>). D'après (Llovet et al., 2021).

I. CARCINOME HEPATOCELLULAIRE

Actuellement, l'impact des différents facteurs de risque sur le développement du CHC est en train de changer puisqu'on observe d'un côté une diminution des facteurs viraux en lien avec la généralisation de la vaccination contre le VHB et la découverte de traitements antiviraux et d'un autre côté une augmentation de la prévalence du diabète de type 2, de l'obésité et de la NASH. L'Asie reste la région du globe la plus touchée par le cancer du foie mais le nombre de nouveaux cas par an a tendance à se stabiliser depuis une dizaine d'années. A l'inverse, l'incidence du cancer du foie est en forte augmentation en Amérique et en Europe avec une augmentation de plus de 30% du nombre de nouveaux cas chez les hommes et plus de 40% chez les femmes entre 2012 et 2020 (Tableau 1). Aux États-Unis, le cancer du foie pourrait devenir la 3^{ème} cause de décès par cancer d'ici 2030 (Rahib et al., 2014).

b. En France

Selon les données de l'IARC, le cancer du foie se classe en 12^{ème} position en termes de fréquence et en 5^{ème} position en termes de mortalité en France en 2020. L'alcoolisme chronique constitue la principale cause de CHC, suivie de l'infection chronique par le VHC, la NASH et l'infection chronique par le VHB. En 2018, d'après les données de l'Institut National du Cancer (INCa), 10500 nouveaux cas ont été diagnostiqués et 8700 personnes sont décédées d'un cancer du foie. Comme cela est le cas au niveau mondial, en France, les hommes sont également plus touchés que les femmes avec un nombre de nouveaux cas estimés à 8100 chez l'homme et 2400 chez la femme en 2018. L'âge médian au diagnostic est de 69 ans pour l'homme et 73 ans pour la femme. Au niveau national, l'incidence du cancer du foie a augmenté sur la période 1990-2018 avec un taux qui s'accroît en moyenne chaque année de 1,6% dans la population masculine et de 3,5% dans la population féminine (Defossez et al., 2019). Cette augmentation de l'incidence résulte notamment de l'épidémie d'infections par le VHC dans les années 80, de l'augmentation de l'obésité et de l'amélioration de la prise en charge de la cirrhose qui prolonge la vie des patients jusqu'à parfois atteindre l'âge de survenue d'un cancer du foie.

I.2.3. Dépistage, diagnostic et classification pronostique

a. Dépistage

Le but du dépistage est de diminuer la mortalité liée au CHC en identifiant le cancer à un stade pouvant bénéficier d'un traitement curatif. Les tumeurs concernées par ce type de traitement sont de petites tailles et généralement asymptomatiques. Selon les recommandations de l'association européenne pour l'étude du foie (EASL : European Association for the Study of the Liver) publiées en 2018, il est donc nécessaire de les rechercher par une surveillance régulière dans la population dite à haut risque (European Association for the Study of the Liver, 2018) :

- Patients présentant une cirrhose Child-Pugh A ou B, toutes étiologies confondues
- Patients présentant une cirrhose Child-Pugh C en attente de transplantation hépatique
- Patients non cirrhotiques porteurs du VHB à risque intermédiaire ou élevé de développer un CHC
- Patients ayant une fibrose hépatique sévère (stade F3) quelqu'en soit l'étiologie, selon l'évaluation individuelle du risque de développer un CHC

I. CARCINOME HEPATOCELLULAIRE

Cette surveillance consiste en la réalisation semestrielle d'une échographie hépatique (European Association for the Study of the Liver, 2018).

b. Diagnostic

Jusqu'au début des années 1970, le diagnostic du CHC était fait, le plus souvent, lors de l'apparition de signes cliniques tels que des douleurs abdominales, une altération importante de l'état général et de la fièvre. Mais comme toutes les tumeurs du foie, le CHC pouvait également être découvert par « hasard » en absence de signes cliniques, par exemple lors d'une radiographie ou d'un scanner prescrit pour une autre raison. La tumeur était souvent volumineuse et/ou métastasée, le traitement curatif par résection chirurgicale n'était donc pas envisageable et la survie des patients était très faible, de l'ordre de quelques mois. Les progrès réalisés dans le domaine de l'imagerie médicale entre 1970 et 1980 ont permis d'améliorer le dépistage et le diagnostic du CHC, en particulier pour les patients à risque. Durant cette période, trois méthodes d'imagerie « non invasive » ont vu successivement le jour : la tomodensitométrie (TDM), l'échographie et l'imagerie par résonance magnétique (IRM) (Trinchet, 2009).

Le diagnostic de CHC est généralement envisagé après la découverte d'une ou plusieurs lésions focales nodulaires hépatiques à l'échographie abdominale, ou à l'occasion de symptômes en cas de tumeur évoluée. La détection d'un taux sérique d'alpha-foetoprotéine (AFP) élevé (> 20 ng/mL) peut également faire suspecter un diagnostic de CHC au sein de la population à haut risque (Llovet et al., 2021). En cas de suspicion de CHC, une évaluation diagnostique est mise en œuvre et ses modalités dépendent principalement de la taille de la lésion détectée ainsi que de l'état du foie non-tumoral (présence ou non d'une cirrhose notamment). La technique de référence pour le diagnostic sans équivoque de CHC est l'analyse histologique d'un fragment tumoral. Celui-ci est obtenu par ponction biopsie hépatique et doit être comparé, chaque fois que possible, à un fragment de foie non tumoral prélevé simultanément. Cependant, chez les patients cirrhotiques, le diagnostic de CHC peut être établi uniquement sur des critères non invasifs. Dans ses recommandations publiées en 2018, l'EASL a défini un algorithme de diagnostic du CHC chez le patient cirrhotique en fonction de la taille du nodule découvert à l'échographie (Figure 19). Selon cette stratégie, le diagnostic de CHC est confirmé si le ou les nodules de plus d'1 cm de diamètre présentent un aspect typique d'hypervascularisation à l'IRM et/ou au scanner. Si le ou les nodule(s) ne présentent pas un aspect typique de CHC à l'imagerie, la réalisation d'une ponction biopsie hépatique pour analyse anatomopathologique est indispensable. Dans le cas où le résultat de la biopsie est non concluant ou discordant avec l'imagerie, cela n'élimine pas le diagnostic de CHC ; une seconde biopsie est conseillée et une surveillance échographique régulière tous les 4 mois est mise en place. Pour les nodules de très petite taille (inférieur à 10 mm de diamètre), la biopsie étant très difficile et la sensibilité des critères non invasifs trop faible, une surveillance échographique est réalisée tous les 4 mois. Chez les patients non cirrhotiques, seule l'analyse anatomopathologique d'une biopsie hépatique permet d'établir le diagnostic de CHC (European Association for the Study of the Liver, 2018).

Au-delà de son utilisation diagnostique, la biopsie hépatique est utile pour la caractérisation des tumeurs à visée thérapeutique et pronostique (Blanc et al., 2021). Bien que les classifications moléculaires ne soient pas encore utilisées en routine pour guider les choix thérapeutiques, selon l'EASL, une plus grande disponibilité des biopsies hépatiques dans le CHC pourrait permettre aux patients concernés d'accéder à un plus grand nombre d'essais cliniques et d'élargir les options thérapeutiques potentielles (European Association for the Study of the Liver, 2018). De plus, disposer d'échantillons de foie tumoral et non tumoral est essentiel pour faire progresser la recherche

I. CARCINOME HEPATOCELLULAIRE

notamment concernant la détermination de biomarqueurs pronostiques et prédictifs de la réponse aux traitements (Blanc et al., 2021).

Après le diagnostic, les mêmes examens permettent d'apprécier l'évolution de la maladie et les effets des différents traitements. L'efficacité d'un traitement est principalement évaluée par la persistance ou non d'une hypervascularisation au sein du nodule qui témoigne de sa vitalité.

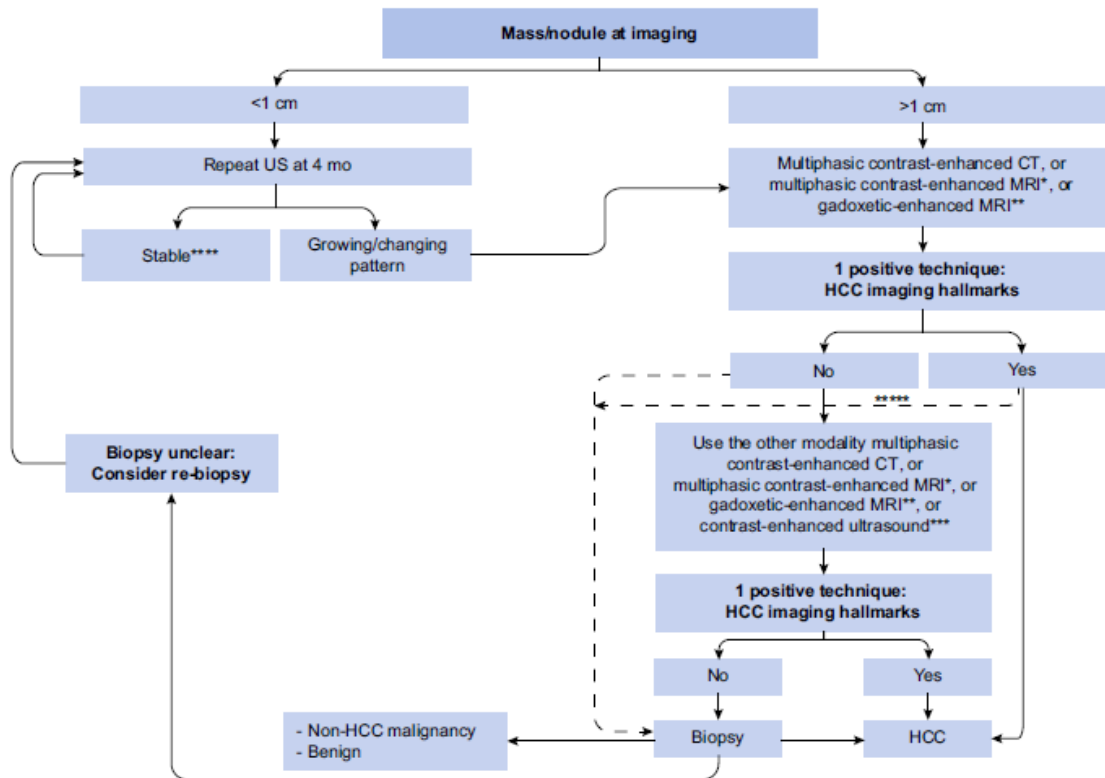


Figure 19 : Algorithme diagnostique de CHC chez les patients cirrhotiques d'après l'EASL 2018

*Utilisation d'agent de contraste extracellulaire ou gadobénate de diméglumine pour l'IRM **Critère diagnostique : Hypervascularisation au temps artériel avec lavage à la phase portale. ***Critère diagnostique : Hypervascularisation au temps artériel avec lavage à la phase tardive (après 60 secondes) ****Si lésion <1 cm stable pendant 12 mois (3 contrôles à 4 mois d'intervalle) alors possibilité de revenir à une surveillance régulière tous les 6 mois. ***** Facultatif, selon les protocoles des centres. D'après (European Association for the Study of the Liver, 2018).

c. Classification pronostique Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC)

Les classifications ont pour but d'établir le pronostic de la maladie et de sélectionner le traitement adapté. Le pronostic du CHC est lié à son stade de développement lors du bilan initial. D'après les recommandations de l'EASL, les principaux facteurs pronostiques cliniques et biologiques chez les patients atteints d'un CHC sont (European Association for the Study of the Liver, 2018) :

- Le statut tumoral : nombre et taille des nodules, présence d'une invasion vasculaire, dissémination extra-hépatique
- La fonction hépatique : calcul du score de Child-Pugh (Tableau 2), hypertension portale, ascite
- L'état général de santé du patient : indice de performance (PST) de l'OMS, comorbidités ...

I. CARCINOME HEPATOCELLULAIRE

Pour la majorité des tumeurs solides, le stade du cancer est défini en utilisant la classification TNM (Tumor/Node/Metastasis ou Tumeur/Ganglion/Métastases) qui consiste à évaluer la taille de la tumeur sur son site primitif, le nombre de ganglions envahis et la présence de métastases. Cependant cette classification n'est pas adaptée au CHC car elle ne tient pas compte du statut de la fonction hépatique et de l'état de santé du patient. Actuellement, l'EASL recommande l'utilisation de la classification pronostique *Barcelona Clinic Liver Cancer* (BCLC). Cette dernière divise les patients atteints de CHC en 5 stades de sévérité (0, A, B, C et D) selon les facteurs pronostics précédemment cités et permet ainsi de proposer une prise en charge thérapeutique (Figure 20).

Tableau 2 : Calcul du score de Child-Pugh définissant la gravité d'une cirrhose, d'après la Société Nationale Française de Gastro-Entérologie

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

D'après (Blanc et al., 2021)

Stades précoces : Stades 0 et A

Les CHC très précoces (stade 0) sont définis par la présence d'une seule tumeur de diamètre inférieur à 2 centimètres sans invasion vasculaire ni dissémination extra-hépatique chez des patients en bon état général et avec une fonction hépatique préservée (Child A). Actuellement, dans les pays occidentaux, 5 à 10 % des patients sont diagnostiqués à ce stade. Ces tumeurs sont facilement accessibles aux traitements curatifs et la survie globale est de 80 à 90 % à cinq ans après résection ou transplantation hépatique (European Association for the Study of the Liver, 2018).

Un CHC est dit précoce (stade A) s'il est constitué d'un seul nodule quelqu'en soit sa taille ou de 2 à 3 nodules de moins de 3 centimètres de diamètre, sans invasion vasculaire ni dissémination extra-hépatique chez un patient en bon état général avec une fonction hépatique peu altérée (Child A ou B). La médiane de survie sans traitement est de 36 mois (European Association for the Study of the Liver, 2018).

Stade intermédiaire : Stade B

Ce stade correspond à des tumeurs multiples sans invasion vasculaire ni dissémination extra-hépatique chez des patients asymptomatiques à la fonction hépatique préservée. Chez ces patients, la médiane de survie sans traitement est 16 mois ou 49% à 2 ans (European Association for the Study of the Liver, 2018).

I. CARCINOME HEPATOCELLULAIRE

Stades avancés : Stades C et D

Le stade avancé (stade C) correspond à des tumeurs développées chez des patients symptomatiques avec invasion intravasculaire ou dissémination extra-hépatique. La médiane de survie est de 6 à 8 mois avec des variations selon le niveau d'altération de la fonction hépatique (European Association for the Study of the Liver, 2018).

Le stade terminal (stade D) concerne des patients présentant une altération sévère de l'état général reflétant une tumeur évoluée. La médiane de survie est de 3 à 4 mois (European Association for the Study of the Liver, 2018).

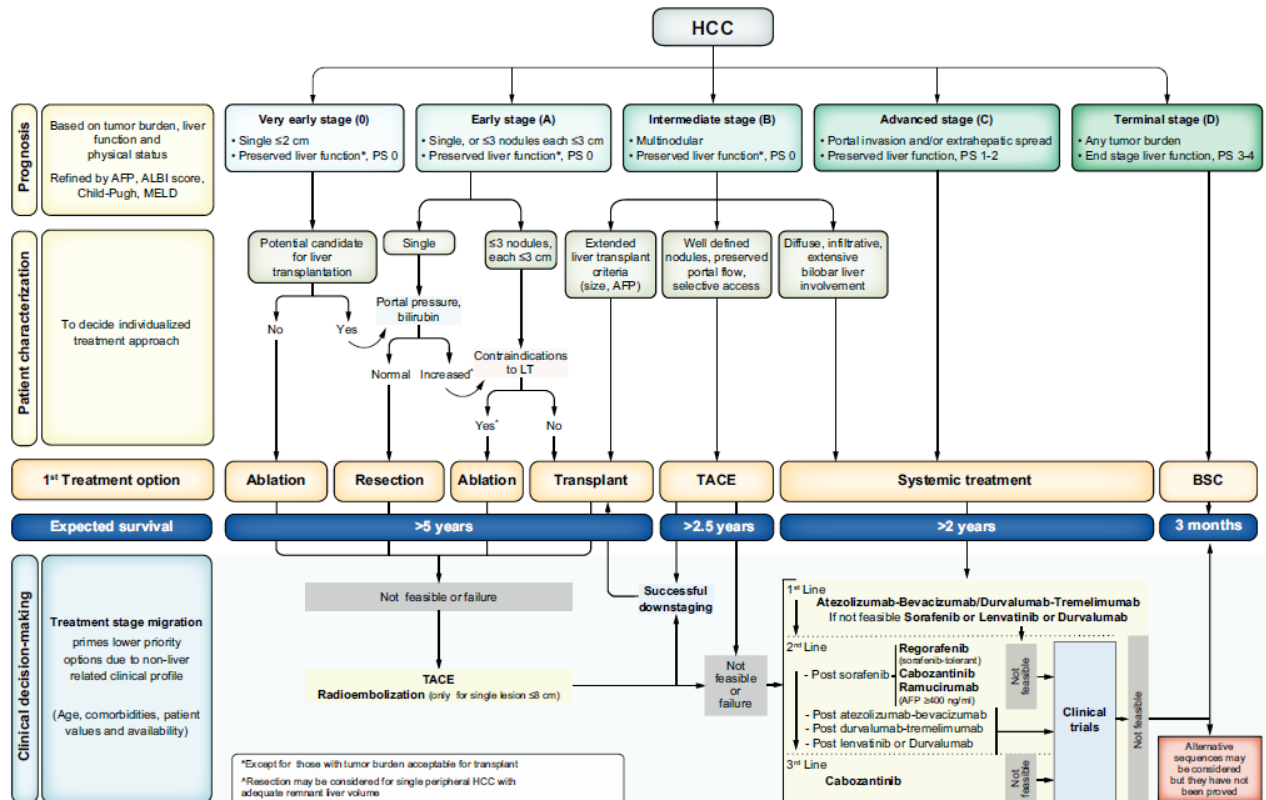


Figure 20 : Classification BCLC et stratégie thérapeutique associée

La classification BCLC établit un pronostic selon les 5 étapes liées à la recommandation thérapeutique de première intention. Le résultat attendu est exprimé en survie médiane de chaque stade tumoral selon les preuves scientifiques disponibles. La prise de décision clinique individualisée, selon les données disponibles au 15 novembre 2021, est définie par des équipes chargées d'intégrer toutes les données disponibles au profil médical de chaque patient. AFP, alpha-fœtoprotéine ; ALBI, albumine-bilirubine ; BCLC, Clinique du Cancer du Foie de Barcelone ; BSC, meilleurs soins de soutien ; ECOG-PS, statut de performance du Eastern Cooperative Oncology Group ; LT, transplantation hépatique ; MELD, modèle de phase finale maladie du foie ; TACE, chimioembolisation transartérielle. D'après (Reig et al., 2022).

1.2.4. Traitements

L'algorithme BCLC permet d'orienter la stratégie thérapeutique (Figure 20). Compte tenu des difficultés diagnostiques et de la complexité des indications thérapeutiques, les dossiers des patients doivent être discutés en réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP) spécialisée afin de valider le diagnostic et d'élaborer la proposition thérapeutique.

a. Traitements à visée curative

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

Transplantation hépatique

La transplantation hépatique est un traitement de choix chez les patients atteints de CHC sur cirrhose car elle permet notamment de traiter de manière simultanée la tumeur et la cirrhose sous-jacente. Elle est indiquée pour des CHC strictement localisés au foie, en l'absence de thrombose portale ou sus-hépatique chez des patients ne pouvant pas être traités par résection ou destruction percutanée. Dans ces conditions, le taux de survie à 5 ans est de l'ordre de 70% (Llovet et al., 2005). Cependant, la transplantation hépatique est limitée par les fréquentes contre-indications (âge, états physiologiques, comorbidités, alcoolisme actif...) et la pénurie de greffons. Cette dernière est responsable d'un long temps d'attente avant la transplantation exposant au risque de progression tumorale et donc de sortie des critères d'éligibilité. Cela peut justifier la mise en place d'un traitement « d'attente » par chimioembolisation artérielle, radiothérapie interne vectorisée, destruction percutanée ou la résection (Blanc et al., 2021).

Résection

La résection hépatique est le traitement de choix du CHC chez les patients non cirrhotiques où des résections importantes peuvent être réalisées avec un faible taux de complications engageant le pronostic vital (European Association for the Study of the Liver, 2018). Pour les CHC sur cirrhose, l'utilisation de cette technique est discutée chez les patients ayant une fonction hépatique préservée (Child A) et en tenant compte du degré d'hypertension portale. Le taux de survie est d'autant plus important que la tumeur réséquée est unique et de petite taille. Le taux de survie à 5 ans pour des nodules ≤ 5 centimètres sans hypertension portale est de 50 à 70 % contre 35 à 55% pour des tumeurs de plus de 5 centimètres ou s'il y a présence d'une hypertension portale (Llovet et al., 2021).

Destruction percutanée

La destruction percutanée est une alternative à la chirurgie. Il s'agit d'une méthode simple et habituellement bien tolérée, ayant l'avantage de préserver le foie non tumoral. La technique la plus utilisée est l'ablation par radiofréquence (RFA) monopolaire qui détruit le tissu tumoral par hyperthermie via l'application d'un courant électrique au sein de la tumeur (Figure 21). Selon les recommandations de l'association américaine pour l'étude des maladies du foie (AASLD) et de l'EASL, la RFA est utilisée en première intention pour les CHC au stade très précoce BCLC A (tumeur unique ≤ 2 cm) et comme alternative à la résection chirurgicale pour les CHC au stade précoce BCLC B. Après RFA, la survie à 5 ans est de plus 70% pour les patients qui étaient atteints d'un CHC au stade très précoce (European Association for the Study of the Liver, 2018). D'autres techniques de destruction percutanée peuvent être utilisées comme l'ablation par micro-ondes et l'alcoolisation percutanée. Comme pour la RFA, l'ablation par micro-ondes met en jeu un dégagement de chaleur pour détruire la

I. CARCINOME HEPATOCELLULAIRE

tumeur. Une onde électromagnétique à haute fréquence émise par un générateur va faire osciller les molécules d'eau et ainsi causer un dégagement de chaleur très important (jusqu'à 180°C) par friction. Selon les données de plusieurs méta-analyses, l'ablation par micro-ondes et la RFA semblent avoir une efficacité similaire (European Association for the Study of the Liver, 2018). Pour les CHC de diamètre inférieur à 2 cm, si la radiofréquence est impossible, l'alcoolisation percutanée est envisageable. Cette technique de destruction chimique consiste en l'injection d'éthanol absolu au niveau de la tumeur ce qui entraîne une déshydratation cellulaire et une occlusion des vaisseaux intratumoraux conduisant à la nécrose tumorale.

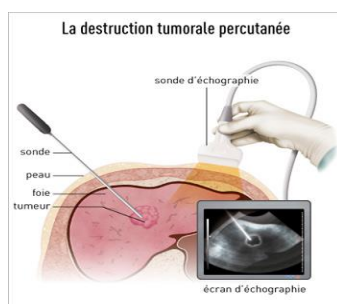


Figure 21 : Destruction tumorale percutanée par radiofréquence avec guidage échographique

Source : www.e-cancer.fr

Après résection ou destruction percutanée, le risque de récurrence est élevé. Cependant, il n'y a, actuellement, aucun consensus validé pour recommander un traitement adjuvant. En revanche, la prise en charge parallèle de l'hépatopathie chronique améliore le pronostic et pourrait réduire le risque de récurrence. Cette démarche passe par le traitement de l'étiologie et des comorbidités ainsi que la prévention des complications de l'hypertension portale en cas de cirrhose (Blanc JF et al., 2015).

b. Traitements palliatifs des CHC avancés

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

Chimioembolisation

La chimioembolisation est une technique de radiologie interventionnelle.

La chimioembolisation trans artérielle (TACE) est considérée comme le traitement de première ligne des patients porteurs d'un CHC de stade intermédiaire (stade BCLC B) avec une fonction hépatique préservée (Child-Pugh \leq B7), en bon état général et en l'absence de métastases et d'anomalie du flux portal. Dans cette population de patients, la médiane de survie après TACE est de 40 à 50 mois. (European Association for the Study of the Liver, 2018).

La chimioembolisation conventionnelle utilise le lipiodol, un agent de contraste huileux iodé, comme vecteur de la chimiothérapie. Dans un premier temps, un cathéter est introduit jusque dans l'artère

I. CARCINOME HEPATOCELLULAIRE

hépatique alimentant la tumeur. Dans un deuxième temps, un agent cytotoxique, le plus souvent la doxorubicine mais également la mitomycine C et/ou le cisplatine, émulsionné dans du lipiodol est injecté via le cathéter (Figure 22). Enfin, un agent embolisant (gélatine ou poly(alcool vinylique)) est utilisé pour obstruer l'artère nourricière de la tumeur afin de permettre de :

- Augmenter la concentration intratumorale en chimiothérapie
- Prolonger l'effet cytotoxique
- Réduire la toxicité systémique
- Entraîner l'ischémie de la tumeur

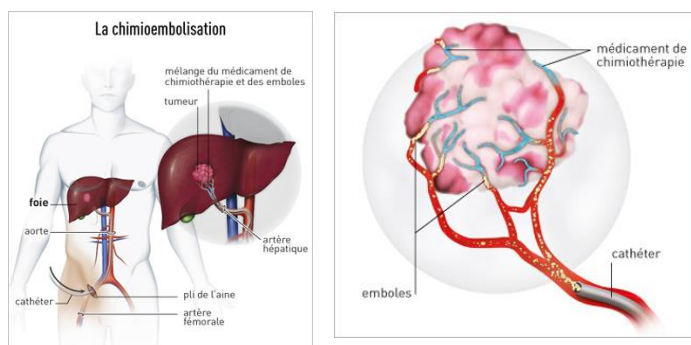


Figure 22 : Principe schématique de la chemoembolisation

Un cathéter est inséré dans l'artère fémorale, il emprunte l'aorte puis entre dans le foie via l'artère hépatique. Ce cathéter sert à injecter directement dans le foie les produits nécessaires à la réalisation de la chemoembolisation. La chemoembolisation associe une chimiothérapie à un agent d'embolisation qui entraîne un blocage du sang qui alimente la tumeur. Source : <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-foie/Chemoembolisation>

Plus récemment, une nouvelle technique de chemoembolisation appelée DEB-TACE, ou *Drug Eluting Beads-Trans Arterial ChemoEmbolization*, s'est développée. Elle utilise des microsphères d'embolisation chargées de cytotoxiques, principalement la doxorubicine. Ces microsphères sont constituées d'un polymère non résorbable qui va libérer le cytotoxique de manière contrôlée au niveau de la tumeur. De plus, elles ont un diamètre calibré et sont disponibles dans différentes tailles permettant ainsi de réaliser une embolisation dite sélective. Plusieurs types de microsphères sont disponibles sur le marché telles que HepaSphere® et DC-Bead®. Cette nouvelle technique est mieux tolérée mais n'est pas supérieure en matière de survie par rapport à la chemoembolisation conventionnelle (Lammer et al., 2010).

Traitements médicamenteux

Les chimiothérapies systémiques utilisant des agents cytotoxiques conventionnels tels que le tamoxifène, les anti-androgènes, l'interféron et l'octréotide sont inefficaces (Blanc JF et al., 2015). Le CHC est connu pour être l'un des cancers les plus chimio-résistants. De plus, l'existence d'une cirrhose peut perturber le métabolisme des chimiothérapies et augmenter leur toxicité. Actuellement, il n'existe pas de chimiothérapie systémique recommandée pour la prise en charge des patients atteints de CHC (European Association For The Study Of The Liver & European Organisation For Research And Treatment Of Cancer, 2012).

L'élaboration d'une thérapie ciblée, le Sorafénib (Nexavar®), a permis une avancée dans le traitement médical du CHC qui était jusqu'alors inexistant. Cette molécule est un inhibiteur multikinase qui a des effets anti-prolifératif sur les cellules tumorales et anti-angiogénique. Son efficacité a été démontrée

I. CARCINOME HEPATOCELLULAIRE

pour la première fois dans l'essai multicentrique randomisé de phase III SHARP ayant comparé Sorafénib et placebo chez 602 malades atteints d'un CHC évolué. La survie globale était significativement allongée dans le bras Sorafénib avec une médiane de 10,7 mois contre 7,9 mois pour le bras placebo (Llovet et al., 2008). De 2007 à 2017, le Sorafénib a été le seul traitement de référence pour les patients atteints d'un CHC au stade avancé avec une fonction hépatique préservée (stade BCLC C) ainsi que pour les patients non éligibles à un traitement spécifique (transplantation hépatique, résection, destruction percutanée ou chimioembolisation) ou en récurrence après un tel traitement, en bon état général et avec une fonction hépatique préservée (European Association for the Study of the Liver, 2018). En cas de progression tumorale avérée ou de survenue d'une toxicité inacceptable, le traitement par Sorafénib était arrêté et des soins de support étaient proposés. Il faudra attendre 10 ans pour qu'un traitement de deuxième ligne, le Regorafénib (Stivarga®), soit approuvé pour les patients atteints d'un CHC avancé ayant été traités par Sorafénib (Faire et al., 2020).

Au cours des six dernières années, des essais cliniques de phase II et III ont démontré l'efficacité de plusieurs autres inhibiteurs de tyrosines kinases mais aussi d'anticorps monoclonaux anti-angiogéniques et de l'immunothérapie contre le CHC au stade avancé (Figure 23). À la suite de ces essais cliniques, ces médicaments ont ensuite été approuvés comme options thérapeutiques systémiques de première ou de deuxième intention pour les patients atteints de CHC non résecable et/ou pour réduire le risque de récurrence après résection chirurgicale (Akateh et al., 2019; Faivre et al., 2020).

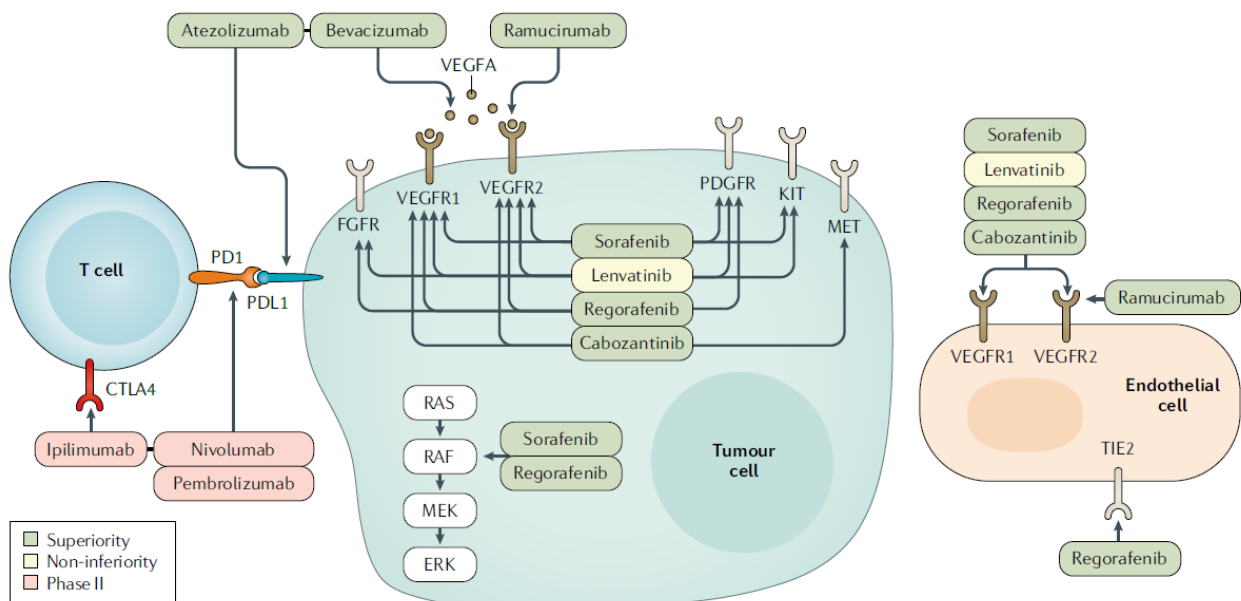


Figure 23 : Cibles thérapeutiques des traitements systémiques du CHC avancé

Bevacizumab et Ramucirumab sont des anticorps monoclonaux anti-angiogéniques. Sorafénib, Lenvatinib, Régorafénib, Cabozantinib sont des inhibiteurs multikinase. Atezolizumab, Nivolumab, Pembrolizumab et Ipilimumab sont des anticorps monoclonaux inhibiteurs des points de contrôle immunitaire. Les cases vertes indiquent des résultats positifs basés sur des essais cliniques de supériorité (Phase III). Les cases jaunes indiquent des résultats positifs basés sur des essais de non-infériorité (Phase III) phase III. Les cases rouges indiquent d'autres médicaments approuvés par la Food and Drug Administration (FDA) et basés sur dans des essais de phase II non randomisés. D'après (Llovet et al., 2021).

Ces thérapies ciblées ont permis de définir de nouvelles lignes de traitement (Figure 24) en fonction de la classification BCLC et de la réponse aux traitements des patients à la fois sur la progression tumorale et la tolérance. Depuis 2021, l'association Atezolizumab-Bevacizumab est le traitement de choix proposé en première ligne aux patients atteints d'un CHC avancé ou non résecable, non éligibles

I. CARCINOME HEPATOCELLULAIRE

aux traitements loco-régionaux ou en échec de l'un de ces traitements, avec une fonction hépatique préservée (Child-Pugh A) et en bon état général (Blanc et al., 2021; Reig et al., 2022). Pour les patients non éligibles à un traitement par Atezolizumab-Bevacizumab, l'association Durvalumab-Trémélimumab est disponible en France dans le cadre d'une autorisation d'accès précoce (AAP) en traitement de première ligne chez des patients ayant une fonction hépatique préservée (Child-Pugh A) non éligibles aux traitements loco-régionaux ou en échec de ces traitements. Les traitements systémiques pouvant être proposés en première ligne pour les CHC avancés sont le Sorafenib ou le Lenvatinib (Figure 20). A noter que le Lenvatinib n'est pas remboursé dans cette indication en France. Concernant les traitements de seconde ligne, seuls les patients en rechute après un traitement par Sorafénib ou intolérants au Sorafénib peuvent se voir proposer un traitement de seconde ligne par Ramucirumab (uniquement pour les patients présentant une AFP > 400ng/mL), Régorafénib ou Cabozantinib (Llovet et al., 2021; Reig et al., 2022). En effet, à ce jour, aucune donnée d'essais cliniques prospectifs après un traitement de première ligne par anticorps monoclonaux ou Lenvatinib n'est disponible (Blanc et al., 2021). Les patients en rechute après un traitement par Atezolizumab-Bevacizumab, Durvalumab-Trémélimumab ou Lenvatinib se verront donc proposer d'être inclus dans des essais cliniques (Figure 20).

Chez les patients avec une maladie en stade terminal (BCLC D), seuls les soins de supports visant à améliorer la qualité de vie ou l'inclusion dans un essai clinique sont préconisés.

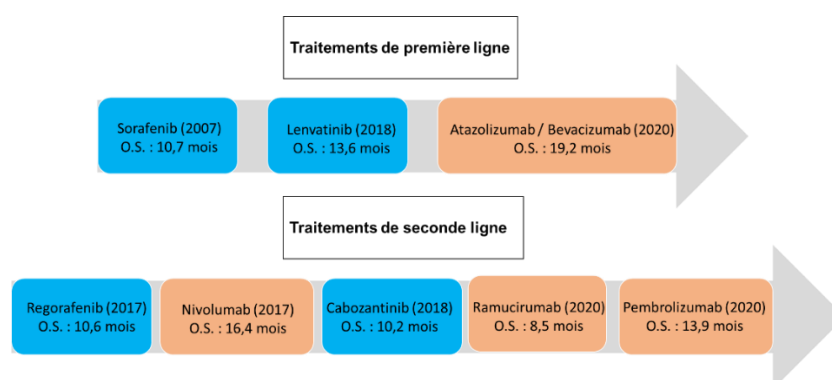


Figure 24 : Thérapies systémiques du CHC

Inhibiteurs de protéines kinases (*-ib*) en bleu et immunothérapies (*-ab*) en orange ayant obtenu une autorisation de mise sur le marché ou en phase d'évaluation clinique. O.S. : overall survival ou survie globale.

c. Perspectives thérapeutiques

Malgré les progrès réalisés ces dernières années dans la prise en charge du CHC, le pronostic de cette pathologie reste très sombre. Le taux de survie à 5 ans est d'environ 20% (Siegel et al., 2022) à l'exception des patients ayant bénéficié d'une transplantation hépatique, seul traitement réellement curatif permettant l'éradication du CHC et de sa cause principale : la cirrhose (Ruiz & Féray, 2015). Le recours à cette option n'est possible que pour une très faible proportion de malades du fait de la pénurie de greffons et des critères d'éligibilité à respecter pour y prétendre. Les espoirs convergent donc tous vers les avancées de la recherche pour trouver des solutions à ce problème majeur de santé publique. Les axes de recherche sont multiples et s'intéressent à tous les domaines de la prise en charge du CHC : prévention des facteurs de risques (cirrhose majoritairement), dépistage, diagnostic,

I. CARCINOME HEPATOCELLULAIRE

identification de facteurs pronostics, mécanismes moléculaires impliqués dans la carcinogénèse, et le développement de thérapies innovantes.

L'amélioration des techniques d'ablation tumorale devrait permettre de prendre en charge des tumeurs plus volumineuses et donc de pouvoir proposer ce type de traitement dit curatif à davantage de patients. Par exemple, l'utilisation de sondes multipolaires pour la radiofréquence ou l'électroporation irréversible. Cette dernière consiste à appliquer des pulses électriques de haut voltage conduisant à l'altération de la perméabilité de la membrane des cellules tumorales puis à leur apoptose. L'électroporation irréversible pourrait trouver une place pour le traitement des patients chez qui l'emploi d'une technique d'ablation thermique est contre-indiquée. Cependant, à l'heure actuelle, plus de données sont nécessaires pour diffuser plus largement son utilisation (Blanc et al., 2021).

Le recours à la radiothérapie stéréotaxique est aussi en évaluation pour le CHC. Récemment, un essai randomisé de phase III a montré la non-infériorité de cette technique par rapport à la RFA pour les récurrences de CHC de diamètre inférieur à 3 cm (Kim et al., 2021). La radiothérapie stéréotaxique utilise des faisceaux de rayons convergents qui délivrent une forte dose d'irradiation à la tumeur avec une précision millimétrique. En France, ce traitement peut être réalisé dans des centres expérimentés disposant d'équipement tel que le CyberKnife® (Figure 25). Son emploi reste encore limité car peu de centres d'oncologie possèdent ce type d'équipement et la décision thérapeutique doit être discutée en RCP. Elle est réservée aux patients avec CHC uniques ou paucinodulaire non éligibles aux autres traitements à visée curative (transplantation hépatique, exérèse chirurgicale, ablation per-cutanée).



Figure 25 : CyberKnife®

Le Cyberknife est un appareil de radiothérapie permettant de réaliser divers traitements de radiothérapie, sous forme d'un grand nombre de faisceaux de rayons X de 6 MegaVolts, avec une très grande précision : inférieure à 1 millimètre contre 3 millimètres pour les appareils de radiothérapie classique. Cette précision permet de moins irradier les tissus sains autour de la lésion. Source : <https://www.unicancer.fr/fr/actualite/la-radiotherapie-stereotaxique-une-technique-de-haute-precision-qui-ameliore-la-survie-des-patients/>

L'utilisation de l'immunothérapie pour le traitement du CHC a suscité un intérêt important en raison du rôle de l'inflammation chronique dans la progression du CHC et du déséquilibre bien documenté du système immunitaire dans les cancers du foie. Plusieurs anticorps monoclonaux anti-angiogéniques et inhibiteurs des points de contrôle immunitaires sont maintenant utilisés en première ligne dans le traitement des CHC avancés. Sur la base de données d'études cliniques de phase Ib/II, le nivolumab et le pembrolizumab (anticorps anti-PD1) utilisés en monothérapie ainsi que l'association nivolumab/ipilimumab (anticorps anti-CTLA4) ont été approuvés par la FDA en deuxième ligne pour les patients ayant un CHC au stade avancé précédemment traités par Sorafénib. Actuellement de nombreuses études sont menées pour évaluer des stratégies combinées d'immunothérapie et d'inhibiteurs de tyrosine kinase. Le lenvatinib en association avec le nivolumab (Kudo et al., 2020), et le regorafenib avec le pembrolizumab (El-Khoueiry et al., 2020), ou l'avelumab (anticorps anti-PD-L1)

I. CARCINOME HEPATOCELLULAIRE

sont testés comme traitements de première ligne. Le cabozantinib en association avec le durvalumab (anticorps anti-PD-L1) (Saeed et al., 2020), et le ramucirumab avec le durvalumab (Bang et al., 2019) sont évalués comme thérapie de seconde ligne. L'association du cabozantinib avec le nivolumab en complément avec ou sans ipilimumab est testée comme traitement de première et/ou de seconde ligne (Yau et al., 2020). Les associations testées lors d'essais cliniques de phase III pour une application comme traitement de première ligne sont le lenvatinib avec le pembrolizumab (Essai clinique LEAP-002 phase III) (Llovet et al., 2019) et le cabozantinib avec l'atezolizumab (Essai clinique COSMIC-312 phase III) (Kelley et al., 2019). Ces immunothérapies montrent cependant une amélioration modérée de la survie globale pour un nombre limité de patients présentant des événements indésirables potentiellement graves (Heinrich et al., 2020). Des essais cliniques évaluent actuellement leur utilisation aux stades précoces du CHC en association comme (néo)adjuvant (Akateh et al., 2019) et en association avec d'autres approches thérapeutiques comme la radioembolisation (Bouvry et al., 2018).

La radioembolisation (transarterial radioembolization) ou radiothérapie interne sélective (Selective Internal Radiation Therapy-SIRT) associe embolisation et radiothérapie « interne » par administration chez les patients d'une molécule ou d'un édifice micrométrique radiomarké. Dans le CHC, elle consiste en l'injection intra-artérielle hépatique d'une substance radioactive, le plus souvent le lipiodol marqué au rhénium 188 (^{188}Re) ou de microsphères couplées à l'Yttrium 90 (^{90}Y). L'injection *via* un cathéter introduit dans l'artère hépatique, sous guidage par artériographie (Figure 26A), permet de « délivrer » dans le lobe présentant la tumeur une dose du composé radiomarké induisant la radiolyse de la zone tumorale tout en préservant le parenchyme non tumoral (Figure 26B).

Cette approche thérapeutique a été particulièrement développée au Centre de Lutte contre le Cancer de Rennes (CLCC Eugène Marquis) par E. Garin (médecin nucléaire), Y. Rolland (médecin radiologue), N. Lepareur (radiochimiste) et J. Edeline (médecin oncologue) qui, pour certains, émargent dans notre équipe de recherche. Cette équipe a développé un protocole de dosimétrie personnalisée partant des constats que :1) l'efficacité de la radioembolisation était très variable d'un patient à l'autre, 2) certains patients accumulaient fortement le lipiodol ou les microsphères et pas d'autres et qu'il était nécessaire de définir des paramètres de dosimétrie, 3) des toxicités pouvaient être observées notamment à cause de shunts pulmonaires.

Cette équipe pluridisciplinaire a établi un protocole d'évaluation de l'accumulation de macro-objets dans la zone tumorale du foie en utilisant des macroagrégats d'albumine (MAA) marqués au technétium 99 métastable ($\text{MAA-}^{99\text{m}}\text{Tc}$) détectés par scintigraphie (Figure 26C). Le patient est soumis à une perfusion de $\text{MAA-}^{99\text{m}}\text{Tc}$ qui, en s'accumulant préférentiellement dans les tumeurs hépatiques, permet de : 1) visualiser les tumeurs, 2) établir le taux d'accumulation de $\text{MAA-}^{99\text{m}}\text{Tc}$ en zone tumorale, 3) de mettre en évidence d'éventuels shunts vasculaires qui pourraient détourner la radioactivité vers les poumons. Le risque de toxicité étant important pour les patients présentant des shunts vasculaires, ils ne sont donc pas éligibles à cette option thérapeutique.

La mesure de l'accumulation de $\text{MAA-}^{99\text{m}}\text{Tc}$ est une donnée particulièrement importante car elle a permis d'identifier les « bons » candidats à la radioembolisation, c'est-à-dire ceux accumulant fortement les $\text{MAA-}^{99\text{m}}\text{Tc}$ (Figure 26D). En effet, il a été démontré que ces patients seront ceux qui accumuleront également très bien les billes de verre ou de résine marquées à l' ^{90}Y qui produisent l'effet thérapeutique de radiolyse (Garin et al., 2021). Pour ces patients, il est donc possible de réaliser une intensification de la dose de radionucléide puisque celui-ci restera en zone tumorale. A l'inverse, pour les patients à faible accumulation intratumorale de $\text{MAA-}^{99\text{m}}\text{Tc}$, les doses de radioactivité doivent être réduites du fait de la dispersion du radioélément dans le parenchyme hépatique ou dans d'autres organes afin de limiter la toxicité. Ce protocole clinique introduit donc une dimension de dosimétrie personnalisée. Il a également été démontré que le niveau de radiolyse de la tumeur était plus important pour les « bons » candidats, que leur survie était prolongée (Figure 26D) et que la

I. CARCINOME HEPATOCELLULAIRE

régénération controlatérale du parenchyme hépatique non irradié était plus importante (Palard et al., 2018).

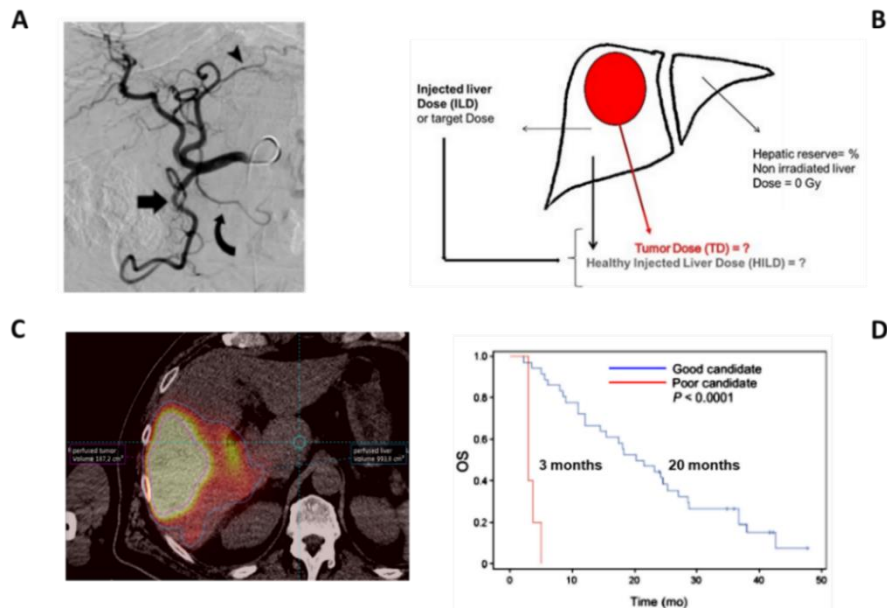


Figure 26 : Radioembolisation ou radiothérapie interne sélective du CHC

(A) Artériographie du foie lors d'une radioembolisation réalisée au CLCC de Rennes. (B) Représentation schématique du principe de la radioembolisation. Des critères importants de dosimétrie ont été définis comme la dose de radioactivité injectée au foie (ILD), la dose accumulée à la tumeur (TD) et la réserve hépatique (zone non-irradiée). (C) Imagerie par scintigraphie d'une zone tumorale lors d'un protocole de perfusion de macroagrégats d'albumine marqués au ^{99m}Tc (MAA- ^{99m}Tc) permettant de définir une dose thérapeutique de microsphères marquées à l' ^{90}Y . (D) La perfusion aux MAA- ^{99m}Tc permet de définir 2 groupes de patients : les bons répondeurs accumulant fortement les MAA- ^{99m}Tc et les faibles répondeurs. La survie des bons répondeurs est très largement supérieure à celle des faibles répondeurs. O.S. : overall survival ou survie globale. D'après (Garin et al., 2015).

Ces avancées ont permis de proposer la radioembolisation en alternative thérapeutique à des patients réfractaires aux traitements systémiques ou en traitement adjuvant aux autres options thérapeutiques (Figure 27) (Edeline, Bridgewater, et al., 2023; Edeline, Rolland, et al., 2023; Edeline & Garin, 2020).

I. CARCINOME HEPATOCELLULAIRE

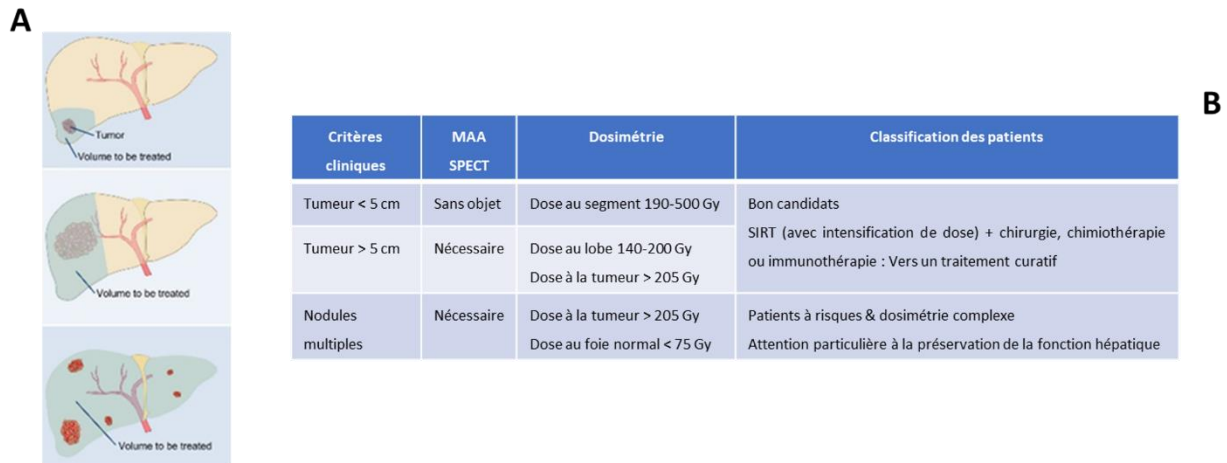


Figure 27 : Intérêt de l'analyse des macroagrégats d'albumine (MAA) par PET scan (SPECT) pour l'utilisation de la radiothérapie interne sélective (SIRT) selon le scénario clinique pour les patients atteints de CHC

(A) Les patients peuvent être initialement classés en trois catégories dans le contexte d'une radioembolisation : Des patients présentant une petite tumeur unique (< 5 cm) bien définie dans un volume hépatique à traiter réduit, des patients avec une tumeur volumineuse nécessitant le traitement d'un lobe entier, des patients avec des nodules multiples répartis dans plusieurs zones du foie. (B) Il découle de ces critères cliniques la nécessité de réaliser ou non un test dosimétrique à l'aide de macroagrégats d'albumine (MAA) radiomarqués au ^{99m}Tc , des critères de dosimétrie personnalisée, une classification des patients en "bons" ou "mauvais" répondeurs et des combinaisons avec d'autres traitements. D'après (Edeline & Garin, 2020).

Les travaux de cette équipe (Garin et al., 2023), en collaboration avec d'autres centres de référence en radioembolisation à l'échelle internationale (Salem et al., 2023), se poursuivent avec plusieurs essais cliniques en phase II (^{188}Re -Lipiodol phase II trial in HCC, PHRC-K2020 ; Neo-adjuvant SIRT+resection trial in ICC vs SIRT+chemotherapy, PHRC-K 2021) et III (Personalized dosimetry in HCC and intrahepatic Cholangiocarcinomas ^{90}Y microspheres phase III trial).

A côté des objets micrométriques utilisés en radioembolisation, les nanovecteurs capables de transporter et libérer des principes actifs de manière ciblée au sein de la tumeur constituent un important champ de recherche en oncologie qui sera développé dans le chapitre II dédié à la nanomédecine

II. NANOMEDECINE

II.1. Du concept de nanomonde à l'émergence de la nanomédecine

II.1.1. Nanomonde et définitions

Depuis plusieurs dizaines d'années, les scientifiques explorent le monde de l'infiniment petit appelé nanomonde. Le préfixe « nano » vient du grec « *nanos* » qui signifie : nain, très petit. Un nanomètre (nm) correspond à un milliardième de mètre soit 10^{-9} m. Comparativement, un nanomètre est 100 000 fois plus petit que l'épaisseur d'un cheveu. Les éléments nanométriques existent dans la nature et sont une source d'inspiration pour l'Homme pour comprendre ces phénomènes et développer des applications biomimétiques. Par exemple, les feuilles de lotus sont tapissées d'aspérités microscopiques appelées papilles, elles-mêmes recouvertes de nanoparticules de cire (Figure 28). Cette structure confère à ces feuilles un caractère très hydrophobe qui ont ainsi la capacité de s'auto-nettoyer car les gouttes d'eau roulent à leur surface en entraînant les contaminants particuliers (Bhushan, 2012).

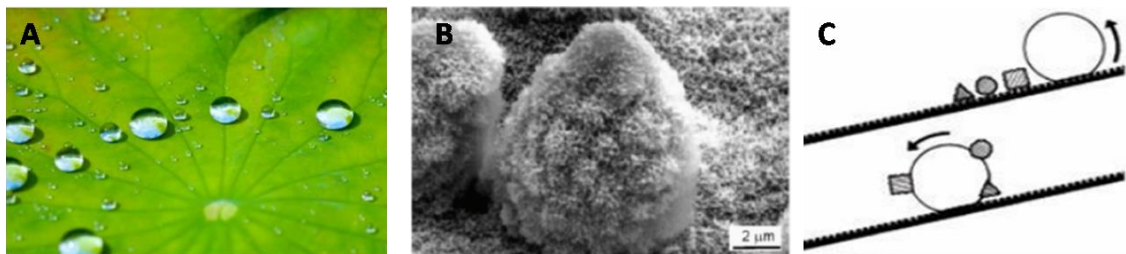


Figure 28 : Nanorugosité des feuilles de lotus

(A) Feuille de lotus. (B) Une papille recouverte de cire observé au microscope à balayage. (C) Capacité d'auto-nettoyage par « lessivage » de contaminants.

A l'échelle nanométrique, la matière possède des propriétés originales, différentes de celles observées à plus grande échelle. Les nanosciences s'intéressent à l'étude des nano-objets et des phénomènes associés découlant spécifiquement de leur taille. En pratique, l'utilisation de ces connaissances a donné naissance aux nanotechnologies qui ont pour but de concevoir, fabriquer et utiliser des structures dont au moins l'une des dimensions est comprise entre de 1 et 100 nm (Roco, 2011). Comparativement au monde du vivant, les nanotechnologies présentent donc une dimension d'un ordre de grandeur compris entre les protéines et les virus (Figure 29).

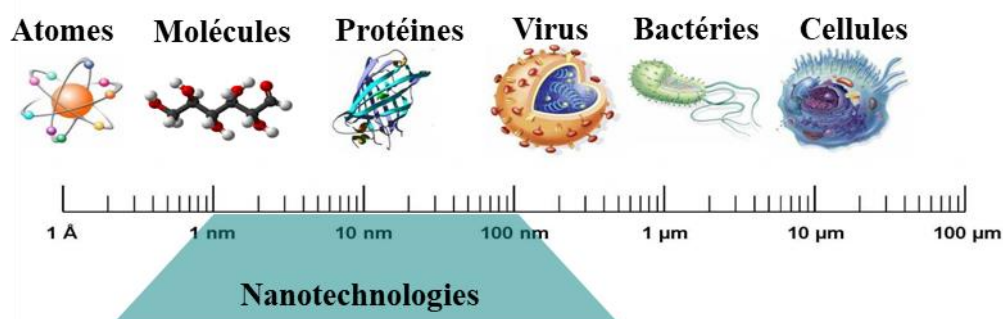


Figure 29 : Echelle de taille des nanotechnologies

Classiquement, les structures sont considérées comme nano-objets lorsqu'au moins l'une de leur dimension est comprise entre 1 et 100 nm, situant cette dimension entre l'échelle moléculaire et une particule virale.

II. NANOMEDECINE

Les nanosciences et les nanotechnologies constituent un champ de recherche transversal impliquant de nombreuses disciplines telles que la chimie, la physique, la biologie, l'informatique, l'optique et plus généralement les sciences des matériaux notamment avec la mécanique des fluides dans le cas de la formulation par microfluidique de nanoparticules à visée thérapeutique.

II.1.2. Historique

Le développement des nanotechnologies a été lié intrinsèquement à celui de la physique quantique. Le physicien Richard Feynman (Figure 30A), prix Nobel de Physique en 1965, est considéré comme le fondateur des nanotechnologies. Au cours de son discours de 1959 intitulé « *There's plenty of room at the bottom* » devant la Société Américaine de Physique, il introduit l'idée de pouvoir manipuler la matière à un niveau atomique et incite la communauté scientifique à explorer le monde de l'extrêmement petit (Hulla et al., 2015). En 1974, Norio Taniguchi (Figure 30B), Professeur à l'Université de Tokyo, utilise pour la première fois le terme « nanotechnologie » pour désigner la possibilité de fabriquer des matériaux à l'échelle du nanomètre.

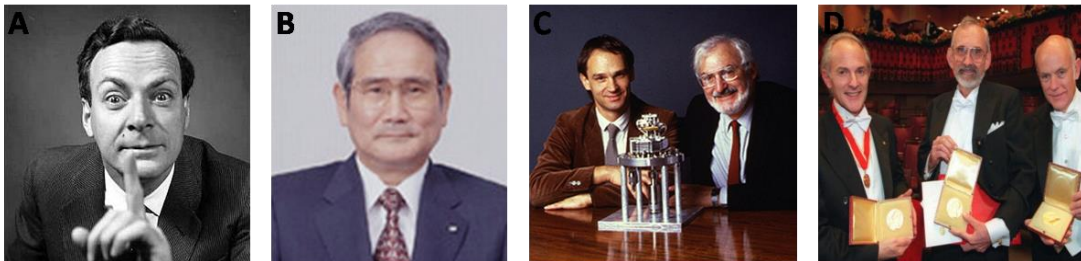


Figure 30 : Les figures emblématiques des nanotechnologies
(A) Feynman, (B) Taniguchi, (C) Binning et Rohrer et (D) Smalley, Curl et Kroto.

Cependant, les nanotechnologies sont réellement nées en 1981 avec l'apparition du microscope à effet Tunnel qui permet, non seulement, d'observer les atomes mais aussi, de les déplacer un à un. Cette invention a valu à Gerb Binning et Heinrich Rohrer (Figure 30C), chercheurs au laboratoire de recherche d'IBM à Zurich, le prix Nobel de physique en 1986. L'exploration du nanomonde s'accélère et trois chercheurs, Richard Smalley, Robert Curl et Harold Kroto (Figure 30D), découvrent les fullerènes en 1985. Il s'agit de nanostructures quasi sphériques composées d'un assemblage d'atomes de carbone (Figure 31). Six ans plus tard, les nanotubes de carbone sont identifiés dans un sous-produit de synthèse des fullerènes.

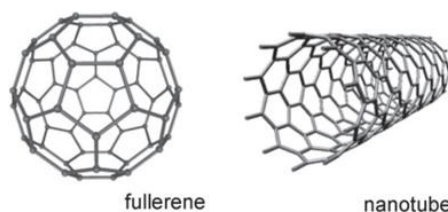


Figure 31 : Représentation d'un fullerène C60 et d'un nanotube
Source : www.surrealsciencestuff.wordpress.com

II. NANOMEDECINE

II.1.3. Aujourd'hui

Depuis quelques dizaines d'années, les nanotechnologies ont connu une extraordinaire expansion et sont devenues l'un des défis technologiques majeurs, parmi les plus prometteurs du XXI^{ème} siècle. La diversité des applications des nanotechnologies a suscité un engagement budgétaire massif dans la recherche et le développement (R&D) pour accélérer l'innovation. Au niveau mondial, les investissements se mesurent en milliards de dollars principalement aux Etats-Unis, en Europe et au Japon, où les nanotechnologies sont un axe prioritaire de recherche. En 2001, les Etats-Unis ont mis en place un programme de financement fédéral appelé « *National Nanotechnology Initiative* » (NNI : <https://www.nano.gov/national-nanotechnology-initiative>) qui coordonne l'activité de 20 agences de R&D en nanotechnologies. Depuis sa création en 2001 jusqu'en 2023, la NNI a investi près de 40 milliards de dollars dans ce domaine de recherche. Compte tenu de l'importance stratégique de ce champ d'étude, l'ensemble de la recherche mondiale se mobilise. En 2000, les dépenses annuelles publiques de R&D en nanotechnologies étaient de l'ordre de 270 millions de dollars pour les Etats-Unis, 245 pour le Japon et 200 pour l'Europe. Ces chiffres annuels ont considérablement augmenté pour atteindre en 2023 : 1,9 milliards de dollars aux Etats-Unis (Figure 32), environ 4,9 milliards pour le Japon et près de 6 milliards pour l'Europe (European Technology Platform-Nanomedicine : <https://etp-nanomedicine.eu>).

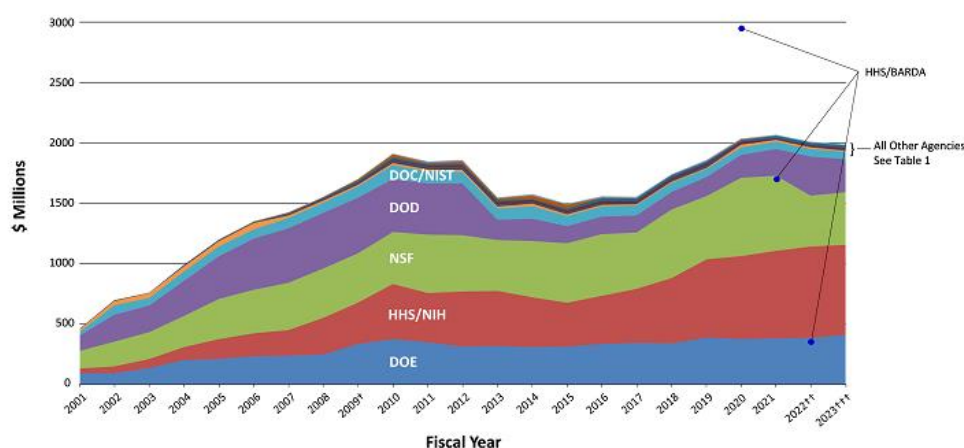


Figure 32 : Investissements dans les nanotechnologies aux USA lors des vingt dernières années

Investissement en millions de dollars, répartis sur différents organismes de recherche utilisant le fon de financement NNI.

Source : <https://www.nano.gov>

Des complexes scientifiques dédiés aux nanosciences et nanotechnologies voient le jour tel que le campus MINATEC à Grenoble (<https://www.minatec.org/fr>). Créé en 2006, ce dernier a été l'un des premiers centres mondiaux dédiés aux micro- et nano- technologies. De nombreux autres centres de recherche ont depuis vu le jour, tels que l'Institut d'Electronique de Microélectronique et de Nanotechnologie (IEMN : <https://www.iemn.fr>) installé sur plusieurs sites des Hauts de France, The Centre for Nanosciences and Nanotechnology (C2N, CNRS et Université Paris-Saclay) en Ile-de-France et, à l'étranger, plus d'une vingtaine de centres répartis dans le monde, incluant : The International Institute for Nanotechnology (IIN, <https://www.iinano.org/>) aux Etats Unis, Center for Nanotechnology (Kochi University for Technologies) au Japon, The National Center for Nanoscience and Technology (NCNST, Beijing) en Chine.

Cette imposante communauté scientifique dédiée au domaine des nanosciences et des nanotechnologies a produit des matériaux et technologies dont les applications sont considérables et concernent de très nombreux secteurs tels que la santé, la cosmétique, l'électronique, l'automobile,

II. NANOMEDECINE

Le travail des groupes de réflexion et de la recherche dans ces domaines a d'abord consisté à établir une terminologie et des définitions pour avoir un langage commun en créant, par exemple, les termes de nanomédecine, nanotoxicologie et nano-déchets. Par ailleurs, différents groupes ont cherché à identifier les enjeux réglementaires pour les produits de santé basés sur la nanotechnologie (Figure 34) et ont proposé une harmonisation dans les techniques à utiliser pour définir les paramètres physico-chimiques des nanoparticules (Hallan et al., 2021) ou encore l'évaluation du risque chez l'Homme (Graham et al., 2017).

Drug Delivery and Translational Research (2022) 12:2145–2156

2151

Table 2 Examples of international associations and initiatives for global harmonisation active in the field of nanotechnology-enabled health products

Name of the organisation/platform	Description
European Federation of Pharmaceutical Sciences (EUFEPS) (https://www.eufeps.org/nano-network.html)	EUFEPS Network on nanomedicine should focus on pharmaceutical and biomedical sciences and the diagnostics and therapeutic aspects of nanomedicine, primarily in cooperation with related nanotechnology fields such as optics, bioinformatics to achieve a wide range platform for pharmaceutical researchers in this field
Global Bioequivalence Harmonisation Initiative (GBHI) (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34481066/)	The GBHI conferences are organised by EUFEPS in collaboration with American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS). The initiative aims to offer the most informative and up to date science and regulatory thinking of bioequivalence in global drug development to support the intended process of a scientific global harmonisation
Lygature (https://www.lygature.org/non-biological-complex-drugs-nbcd-working-group#project-update-1696)	The Non-Biological Complex Drugs (NBCD) Working Group was established to stimulate discussion of the safety and efficacy of NBCD innovation and follow-on products
International Symposium on Scientific and Regulatory Advances in Biological and Non – Biological Complex Drugs (SRACD) (http://sracd.hu/main-topics/)	A series of symposia addressing regulatory aspects of biological and non-biological complex drugs and the paradigm shift compared to the requirements for fully characterised small molecular drugs and the established formulations
European Foundation for Clinical Nanomedicine (CLINAM) (https://clinam.org/?page_id=102)	The recognition of the large future impact of nanoscience on medicine and the observed rapid advance of medical applications of nanoscience has been the main reasons for the creation of the CLINAM Foundation
Global Coalition for Regulatory Science Research (GCRSR) (https://www.fda.gov/about-fda/science-research-nctr/global-coalition-regulatory-science-research)	The Global Summit on Regulatory Science (GSRS) is an international conference for discussion of innovative technologies and partnerships to enhance translation of basic science into regulatory applications within the global context
EDQM's Working Party on Non-Biological Complexes (NBC) (https://www.edqm.eu/en/groups-experts-and-working-parties)	The aim of the working party is the elaboration and revision of monographs on non-biological complexes (e.g. iron sucrose concentrated solution)

Figure 34 : Exemples de groupes de réflexion sur les enjeux réglementaires des nanotechnologies en santé
D'après (Halamoda-Kenzaoui et al., 2022)

En effet, il est démontré que les nano-objets contaminant l'environnement peuvent être inhalés et/ou ingérés par l'Homme (Buzea et al., 2007) et donc contribués à l'exposome tout comme les xénobiotiques d'origine industrielle. Les nano-contaminants peuvent franchir des barrières biologiques (Figure 35), être captés par endocytose et/ou phagocytose par de nombreux types cellulaires et présenter des biodistributions et des mécanismes d'élimination très différents de ceux observés pour les petites molécules de synthèse (Buzea et al., 2007; Graham et al., 2017).

Les nanoparticules (NPs) peuvent se distribuer dans presque tous les organes et tissus du corps après leur administration (Shi et al., 2013). L'accumulation dans un organe individuel dépend de la perméabilité du vaisseau sanguin capillaire, du flux sanguin de l'organe, ainsi que l'affinité et l'abondance des récepteurs membranaires. Pour les petites molécules, la distribution est définie comme le « coefficient de partage tissu:plasma », qui représente le rapport des concentrations d'un

II. NANOMEDECINE

composé entre les tissus et le plasma. Cependant, ce terme ne s'applique pas aux NPs car elles ne forment pas de solutions, mais sont plutôt des dispersions colloïdales qui ne sont pas thermodynamiquement stables (Praetorius et al., 2014). Par conséquent, l'étendue de la distribution tissulaire des nanomatériaux (NM) est généralement décrite en utilisant le terme «coefficient de distribution», qui est le rapport des concentrations/quantités de nano-objets entre les tissus et le plasma à un certain moment et sur une période donnée (Lin et al., 2016; Utembe et al., 2020).

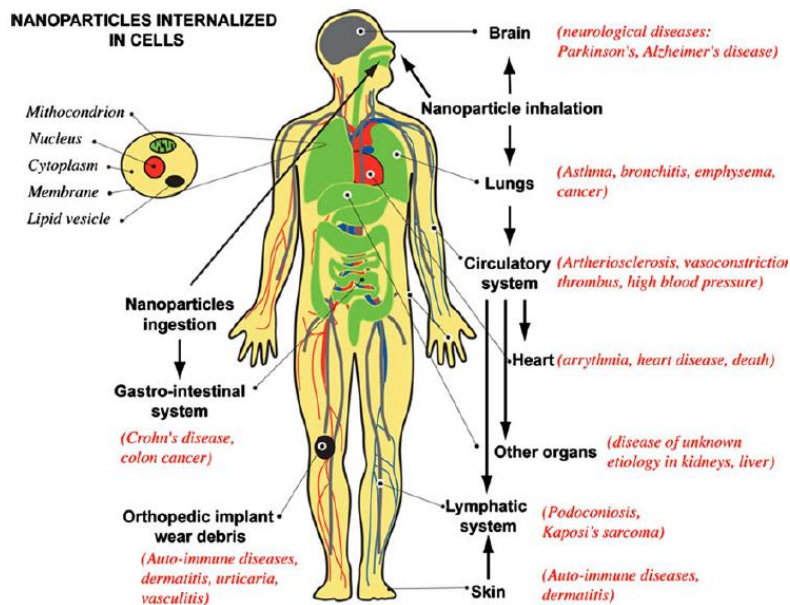


Figure 35 : Schéma du corps humain avec les voies d'exposition aux nanoparticules, les organes affectés et les maladies potentiellement associées à cette exposition

D'après (Buzea et al., 2007).

De la même façon, les NPs destinées à des applications médicales ont nécessité de définir de nouvelles procédures d'évaluation du risque (Q. Chen et al., 2022) notamment sur l'aspect de biodistribution précédemment mentionné (Lin et al., 2016; Utembe et al., 2020). Les études pharmacocinétiques évaluent en général les concentrations circulantes du PA encapsulé mais plus rarement la pharmacocinétique des nanovecteurs. Plusieurs techniques d'imagerie telles que le radiomarquage, l'imagerie nucléaire, l'imagerie par fluorescence, mais également le transfert d'énergie par résonance de Förster (FRET) permettent de déterminer la biodistribution et la pharmacocinétique des NPs (Kaeokhamloed et al., 2022).

Un autre point important est l'adsorption de protéines plasmatiques ou opsonisation. L'opsonisation fait partie du système immunitaire inné, renforçant l'activité du système phagocytaire mononucléaire (MPS) pour éliminer les agents pathogènes du corps. Ce phénomène, bien documenté et observé avec tous les nano-objets, est un processus rapide conduisant à la formation d'une couronne protéique à la surface des nanovecteurs avec un remodelage dynamique au cours du temps dans le sang (Abbina et al., 2020; Owens & Peppas, 2006; Tenzer et al., 2013; Vene et al., 2016). Les analyses protéomiques effectuées sur diverses NPs incubées avec du sérum ont démontré que de nombreuses protéines plasmatiques (> 100 protéines et peptides différents) se lient à des nanovecteurs, notamment des immunoglobulines, des lipoprotéines, des facteurs du complément et de la coagulation (Abbina et al.,

2020; Owens & Peppas, 2006; Tenzer et al., 2013; Vene et al., 2016). Les auteurs ont apporté la preuve que la formation et la dynamique de la couronne protéique pourraient dépendre des caractéristiques physico-chimiques des nanovecteurs, notamment la rigidité, la surface hydrophile ou hydrophobe et le potentiel de charge en surface de l'objet (H. Li et al., 2021). Les protéines interagissent avec les nanovecteurs par différents mécanismes, principalement électrostatiques, hydrophobes et par liaisons hydrogène (H. Li et al., 2021). Les lipoprotéines, en particulier les apolipoprotéines (Apo) E et A-I, sont particulièrement enrichies dans la couronne protéique probablement par interaction directe avec les lipides dans le cas des liposomes (H. Lee, 2021; Sebastiani et al., 2021), et avec le cœur hydrophobe des nanoparticules polymères (Abbina et al., 2020; Owens & Peppas, 2006; Tenzer et al., 2013; Vene et al., 2016). Des publications ont récemment montré que les protéines de la couronne, y compris l'ApoE, induisent des réarrangements structuraux qui peuvent avoir un impact sur leur internalisation cellulaire et leur biodistribution globale *in vivo* (H. Li et al., 2021).

Après injection systémique et opsonisation par les protéines plasmatiques, la plupart des NPs d'une taille de 10 à 100 nm s'accumulent dans le foie et la rate en raison de leur système vasculaire et de la présence de cellules à forte activité de phagocytose. L'endothélium des sinusoides hépatiques présentent de grandes fenestrations, ce qui améliore l'échange entre le parenchyme hépatique et la circulation sanguine provenant de la veine porte et de l'artère hépatique. Cette architecture favorise grandement l'accumulation de nano-objets dans l'espace de Disse, un mince espace entre l'endothélium fenêtré et la couche d'hépatocytes où les NPs sont en contact étroit avec les hépatocytes, les cellules sinusoidales hépatiques (LSECs), les cellules étoilées hépatiques et les macrophages (cellules de Küpffer), première ligne majeure de l'immunité innée. La phagocytose par les cellules de Küpffer est fortement corrélée à la chimie et à la charge de surface, à la taille et à la forme des NPs *via* la formation de la couronne protéique et la fixation des opsonines (anticorps, protéines du complément) sur les NPs (Bertrand et al., 2017; Tenzer et al., 2013).

La taille des NPs, leurs caractéristiques physico-chimiques ainsi que la nature de la couronne protéique conditionnent les voies d'élimination de ces nano-objets (Figure 36). De plus, certaines NPs activent l'inflammasome, une voie majeure du système immunitaire inné déclenchant la production de cytokines pro-inflammatoires (Baron et al., 2015; Kouser et al., 2018) activant la réponse immunitaire globale. Dans une évaluation du risque, ces aspects de biodistribution, d'élimination, de cytotoxicité, d'activation de l'inflammation et du système immunitaire sont des paramètres à définir pour chaque nano-objet en parallèle de données « classiques » en toxicologie comme la dose sans effet nocif observé (NOAEL : No Observed Adverse Effect Level).

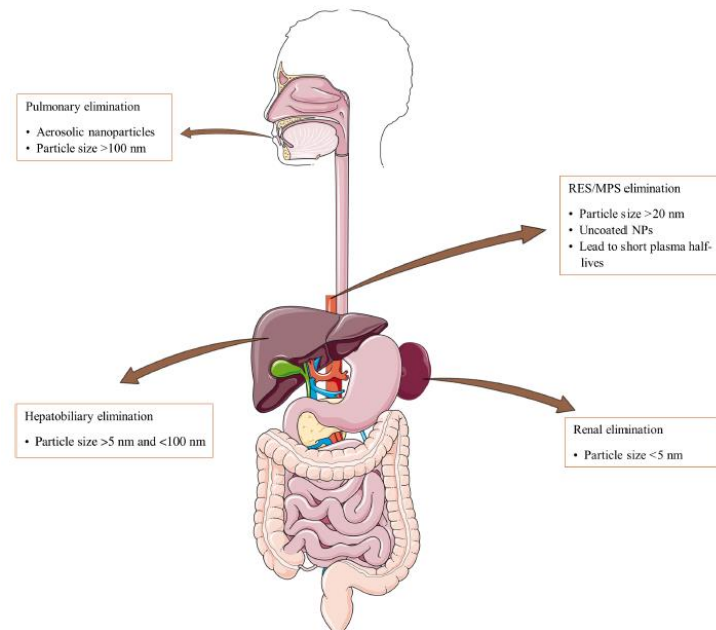


Figure 36 : Les voies d'élimination des nanoparticules (NPs) selon leurs propriétés physico-chimiques

En entrant dans le corps, les NPs non opsonisées ou les grandes NPs peuvent être éliminées par le système phagocytaire mononucléaire (MPS ou RES). Les petites NPs (<5 nm) sont principalement éliminées *via* les reins. Les NPs ayant une taille comprise entre 20 et 100 nm peuvent être excrétées par le foie. Enfin, certaines NPs de grande taille (> 100 nm) synthétisées en phase gazeuse peuvent être phagocytées par les macrophages alvéolaires, puis éliminées à travers l'arbre trachéobronchique vers le larynx. D'après (Q. Chen et al., 2022).

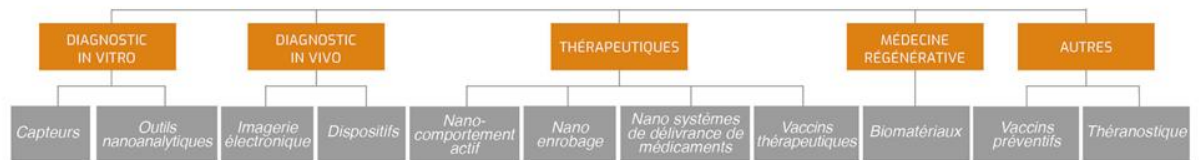
II.1.4. Applications médicales

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

En 2013, le comité Biotechnologies du LEEM (syndicat français des entreprises du médicament) a réalisé une première étude sur le domaine de la nanomédecine et a publié les résultats dans un rapport intitulé « Application des nanotechnologies à la médecine – Compétitivité et attractivité de la France Horizon 2025 » (Comité Biotechnologique du LEEM, 2013). L'analyse a identifié 230 produits de nanomédecine en développement clinique ou ayant une autorisation de mise sur le marché (AMM). La taille des produits inclus dans l'étude pouvait être comprise entre 1 et 1000 nm si leurs propriétés physico-chimiques étaient spécifiques de l'échelle nanométrique. Depuis 2013, ce comité réactualise régulièrement ces données et a classé les produits en fonction de leur domaine d'utilisation : diagnostic *in vitro* ou *in vivo*, thérapeutique, médecine régénérative ou autres (Figure 37). Quelques exemples seront décrits pour chacune de ces applications dans les paragraphes suivants.

A

NANOMÉDECINE



B

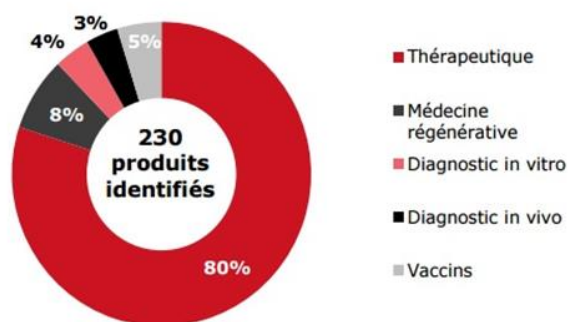


Figure 37 : Applications médicales des nanotechnologies

(A) Classifications des nanomédecines ; (B) Répartition en pourcentage des produits initialement identifiés en 2013. Source : <https://www.leem.org/la-nanomedecine>

a. Diagnostic

Diagnosics in vitro

Les diagnostics *in vitro* s'effectuent par analyses biomédicales d'échantillons biologiques (tissus, liquides biologiques...). Le terme de diagnostic doit être compris comme toutes les analyses incluant la recherche en amont du périmètre médical. Dans ce domaine, l'utilisation des nanotechnologies vise à diminuer les quantités d'échantillons biologiques nécessaires mais aussi à miniaturiser et rendre plus performant les outils d'analyse. Parmi les technologies qui ont connu un développement important ou qui sont en émergence, peuvent être cités :

- Les puces à ADN

Ce sont de petites plaques de verre, de plastique ou de silicium sur lesquelles sont synthétisées ou greffées plusieurs milliers, centaines de milliers voire millions de séquences ADN. Elles permettent de mesurer le niveau d'expression de plusieurs milliers de gènes simultanément. Elles peuvent, par exemple, servir à identifier un microorganisme ou à repérer une anomalie génétique. Ces objets ayant des zones de dépôts de sonde d'acides nucléiques ont connu un énorme essor sur une courte échelle de temps, globalement les vingt dernières années, avant de peu à peu laisser place aux nouvelles techniques de séquençage (exemple : RNAseq). Cependant, les puces à ADN ont fortement contribué aux données massives d'expression de gènes dans de multiples organismes et organes.

II. NANOMEDECINE

- Les laboratoires sur puce (*lab-on-chip*)

Il s'agit de rassembler sur des surfaces de quelques centimètres ou millimètres carrés toutes les étapes du diagnostic, depuis le traitement de l'échantillon jusqu'au rendu du résultat. La miniaturisation des dispositifs d'analyse et les avancées en microfluidique permettent de disposer de systèmes capables de délivrer de multiples informations à partir d'un seul échantillon. De nombreux systèmes ont déjà vu le jour, en particulier des petits instruments portables de détection de maladies à partir d'échantillons sanguins ou de salive tels que les « lab-on-chip » Finder® (Figure 38) et Seeker® développés par la société Baebies (<https://baebies.com>) spécialisée dans la détection de pathologies chez l'enfant.



Figure 38 : Exemple de lab-on-chip

Finder® est un analyseur microfluidique numérique qui permet de dépister la présence de maladies rares chez le nourrisson à partir d'un très petit échantillon sanguin (50 µL). L'échantillon de sang est déposé sur une cartouche jetable (au premier plan) constituée d'un circuit imprimé avec des électrodes et des réservoirs de réactifs. Cette cartouche mesure 0,3mm × 81,6 mm × 19,3 mm. D'après (Sista et al., 2020)

- Les biocapteurs

Ils utilisent un élément biologique, comme une enzyme, un anticorps ou même une cellule, capable de reconnaître et signaler la présence ou l'activité d'une molécule biologique en solution (S. Chen & Bashir, 2023). Le signal biochimique est ensuite converti en signal électrique ou mécanique quantifiable (Figure 39). Parmi ces systèmes, des biosenseurs de tous ordres sont développés permettant de capter une information sur une données biologiques dans une matrice complexe.

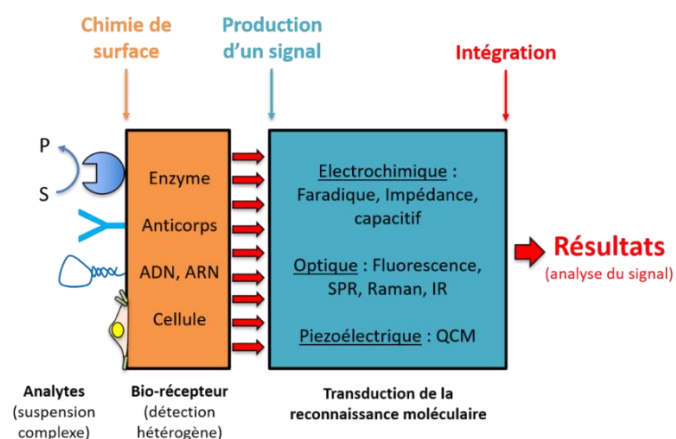


Figure 39 : Principe général d'un biocapteur

Un récepteur va capter spécifiquement et sélectivement les molécules ou organismes cibles. Le récepteur est fonctionnalisé par une molécule chimique ou des molécules d'origine biologique (anticorps, ADN, protéines) ou des cellules. Le transducteur a pour rôle la traduction de l'événement « fixation des cibles sur le récepteur » en un signal physico-chimique. Une chaîne de mesures physico-chimiques permet à l'opérateur d'interpréter les résultats. D'après L. Challier et E. Prado, Ifremer (<https://rd-technologiques.ifremer.fr/R-D-Technologiques/Equipements/Biocapteurs/Bio-Capteurs>).

Diagnosics in vivo

Les diagnostics *in vivo* sont directement réalisés sur un organisme vivant principalement grâce aux techniques d'imagerie médicale comme l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM). Dans ce domaine, l'application des nanotechnologies a pour but de concevoir des systèmes capables de détecter les maladies à un stade précoce et d'évaluer l'efficacité des thérapeutiques utilisées. Les matériaux utilisés pour formuler ces agents de contraste doivent être choisis pour interagir avec le stimulus physique de sorte que le signal recueilli soit le plus intense possible sans produire d'effets néfastes. Les NPs représentent une alternative intéressante aux agents actuellement utilisés (fluorures organiques ou isotopes radioactifs), car elles pourraient améliorer la résolution et la spécificité des images obtenues, tout en étant mieux tolérées par l'organisme (Figure 40).

NANOMEDECINE : AMÉLIORATION DES OUTILS DE DIAGNOSTICS ACTUELS

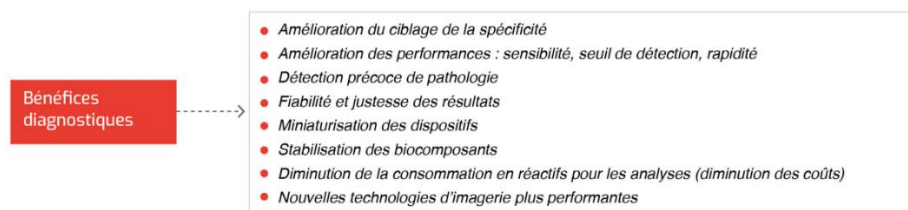


Figure 40 : Apports des nanotechnologies pour améliorer les outils de diagnostics actuels

LEEM Extrait de Santé 2030 : Les vecteurs d'innovation (2019), par N. Mignet (CNRS, Faculté de Pharmacie de l'Université Paris).

De nombreux nano-objets sont en cours de développement comme agent d'imagerie, par exemple :

- Les nanoparticules d'or (AuNPs)

Elles peuvent être détectées par rayons X, imagerie photoacoustique ou IRM (Boisseau & Loubaton, 2011; Nukaly & Ansari, 2023). Par ailleurs, elles peuvent servir de «plate-formes» où sont greffés des agents de contraste comme le gadolinium ce qui permet une augmentation de la détection en IRM (Padmanabhan et al., 2016). Grâce à leurs propriétés optiques (colorimétrique et de fluorescence), les AuNPs sont, par exemple, utilisées pour quantifier des microARN au site tumoral avec pour objectif la détection précoce des CHC (R.-D. Li et al., 2016).

- Les nanoparticules d'oxyde de fer sous forme de nanocristaux de magnétite (Fe_3O_4)

Ces NPs ont des propriétés magnétiques qui peuvent être exploitées en IRM. Après synthèse, les NPs sont dispersées dans une solution tampon à pH physiologique en présence d'un agent stabilisant. Ces agents stabilisants sont adsorbés à la surface des NPs et assurent soit une stabilisation stérique (le dextran, l'aminosilane, la gélatine, les phospholipides) soit une stabilisation électrostatique (ions citrate). Cette stabilisation est essentielle pour conserver les propriétés super-paramagnétiques des NPs, car elle évite qu'elles s'agrègent et donc qu'elles ne soient plus libres de s'orienter dans la direction du champ magnétique appliqué. On distingue deux catégories : 1) les SPIO (*super-paramagnetic iron oxides*) qui possèdent une taille comprise entre 50 nm et 3,5 μm , et 2) les USPIO (*ultrasmall super-paramagnetic iron oxides*) qui mesurent entre 3 et 50 nm. Dans la famille des SPIO, deux composés, dont la taille moyenne est d'environ 60 nm, sont commercialisés : les Ferumoxides (Endorem® [Guerbet], Feridex® [Berlex]), stabilisés par du dextran, et le Ferucarbotran® (Resovist® [Schering]), stabilisé par du carboxydextran. Les applications cliniques de ces produits concernent notamment la détection de tumeurs hépatiques. Dans la famille des USPIO, il existe des NPs stabilisées par du dextran (Ferumoxtran®/Sinerem®/Combidx®) pour l'imagerie du système lymphatique, par de l'amidon PEGylé (Feruglose®) pour l'angiographie coronarienne ou par du carboxydextran (SHU555C,

II. NANOMEDECINE

Bayer) pour l'angiographie générale. Ces NPs sont acceptées pour un usage diagnostique ponctuel, la toxicité du fer qu'elles contiennent étant considérée comme négligeable car celui-ci est éliminé *via* le cycle normal du fer endogène (Boldt, 1999). Néanmoins, la plupart des sociétés ont abandonné la commercialisation des produits cités ci-dessus, vraisemblablement en raison d'une combinaison de risques de toxicité et d'échec commercial. Seul le Feraheme®, un produit prescrit aux États-Unis pour les déficiences en fer, est évalué comme un agent de contraste pour des images de lésions vasculaires, de tumeurs et de ganglions lymphatiques (Bashir et al., 2015; Kolosnjaj-Tabi et al., 2013).

- Les « *quantum dots* » (QD)

Les QD (ou boîtes quantiques) sont des nanocristaux semi-conducteurs de taille variable (quelques nm à 100 nm) capables d'émettre de la lumière fluorescente après excitation par un laser. Leurs propriétés optiques dépendent de leur taille. Comme les NPs d'oxyde de fer, leur préparation consiste à modifier les QD avec un agent stabilisant tel que du mannose fonctionnalisé par le poly(éthylène glycol) qui les stabilise dans les solutions aqueuses et permet des applications en diagnostic et théranostique, par exemple pour le ciblage des macrophages à l'aide de QD de graphène (Yin et al., 2023).

Les QD, mais également les AuNPs, les NPs d'oxyde de fer, les NPs polymères (PNP), les NPs lipidiques solides sont également évaluées dans de multiples applications incluant la détection de maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer (Rastogi et al., 2023), de pathologies digestives (Yue et al., 2023), de pathogènes (Hemmati et al., 2023) et, bien sûr, de cancers (Alrushaid et al., 2023).

Les maladies vasculaires sont multiples, comprenant les maladies coronariennes, cérébrovasculaires, et artérielles des membres inférieurs. Les NPs présentent un potentiel pour l'imagerie moléculaire et pour le diagnostic de maladies vasculaires telles que les infarctus cérébraux et du myocarde (Y. Zhou et al., 2023). L'athérosclérose est une affection physiopathologique systémique contribuant significativement au développement de ces maladies (Golledge, 2022 ; Zhou Y Yue T, 2023). En tant qu'agents de contraste, les NPs contenant différents matériaux métalliques ou non métalliques peuvent fournir une spécificité et une sélectivité élevées pour visualiser les zones lésées dans le système vasculaire, en particulier les zones ischémiques, et faciliter un diagnostic et un traitement, notamment de l'athérosclérose (Chen et al., 2021).

b. Médecine régénérative

La médecine régénérative vise à reconstruire un tissu vivant fonctionnel pour réparer ou remplacer une partie de l'organe ayant perdu sa fonction suite au vieillissement, à une pathologie, à un traumatisme ou à une anomalie génétique. L'élaboration des nanobiomatériaux offre de nouvelles perspectives très prometteuses dans ce domaine (Han et al., 2023; Pelaz et al., 2017). Ces matériaux peuvent être utilisés, non seulement, pour créer des implants et prothèses biocompatibles, mais aussi pour constituer des supports pouvant être colonisées *in vitro* ou *in vivo* par des cellules dans la réparation de multiples organes et tissus tels que la peau, les vaisseaux sanguins ou les os (Han et al., 2023; Pelaz et al., 2017).

Diverses NPs inorganiques formées à partir d'argent, de dioxyde de titane, d'oxydes de cuivre ou de cérium, de poly(acide lactique-co-glycolique) (PLGA), de poly(éthylène glycol) (PEG) et de silice sont évaluées pour la cicatrisation des plaies. Des nanomatériaux organiques tels que le collagène, le chitosane, la curcumine, les dendrimères, le graphène et son dérivé oxyde de graphène sont également testés. Diverses formes de systèmes d'administration de médicaments à base de NPs comme les nanohydrogels, les nanoliposomes, les nanofilms et les nanoémulsions pourraient être associés à ces

nanomatériaux afin de délivrer des agents thérapeutiques aux sites des plaies de manière contrôlée. Ces édifices consisteraient donc en un support favorisant la régénération cutanée par prolifération des cellules des couches basales, la protection vis-à-vis d'agents infectieux et le recrutement de cellules immunitaires (S. Lo et al., 2023).

La réparation des tissus osseux est également un champ important d'application des nanomatériaux particulièrement lors de greffes ou pour les patients souffrant d'un déficit d'ostéogenèse, comme par exemple dans les cas d'ostéoporose. Il a été démontré que les biomatériaux de taille nanométrique avaient la capacité d'induire l'adhésion et la prolifération de cellules osseuses, et une régénération osseuse accrue, dans des modèles *in vitro* et pré-cliniques (Banimohamad-Shotorbani et al., 2021). Les biomatériaux nanostructurés ont été développés dans des échafaudages à base de nanocomposites destinés à être utilisés en ingénierie tissulaire, en particulier pour la régénération osseuse (Lyons et al., 2020). En raison de la petite taille de ces biomatériaux mais qui peuvent être organisés sur de grandes surfaces, ces structures montrent une bonne interaction avec différentes cellules et tissus et peuvent faciliter la régénération d'une matrice calcifiée. Cette reconstruction peut être aussi améliorée par l'introduction dans les biomatériaux, de facteurs trophiques des cellules stromales osseuses incluant les ostéoblastes (Banimohamad-Shotorbani et al., 2021).

c. Applications thérapeutiques

Le champ des applications thérapeutiques des nanotechnologies est très vaste (Figure 37A) et comprend notamment les implants actifs, les nanomédicaments et les nanovecteurs de thérapie génique, trois secteurs qui couvrent de multiples applications à des degrés variables de développement. Cependant, si l'on considère les nanovecteurs de thérapie génique, certains de ces objets sont très proches de ceux développés pour les vaccins préventifs qui appartiennent à une autre catégorie dans la classification du LEEM (Figure 37A). L'exemple emblématique est celui des vaccins à ARN messager (ARNm) contre les virus du SARS-CoV-2 produits durant la pandémie de COVID-19 en 2020 (voir paragraphe « e. Vaccins »). Bien que les vaccins à ARNm ne soient évidemment pas des produits de thérapie génique, il n'en demeure pas moins que ces formulations sont très proches de vecteurs déjà utilisés en corrections géniques, si l'on considère leurs caractéristiques physicochimiques indépendamment du mode d'administration et de l'objectif clinique. La frontière entre différents produits de nanomédecine, pourtant classés dans différentes catégories, est donc parfois ténue. Dans ce paragraphe dédié aux applications thérapeutiques, nous décrirons plusieurs exemples d'applications utilisant des implants actifs, des nanomédicaments et des nanovecteurs de thérapie génique.

Implants actifs

Les nanotechnologies permettent de fabriquer des systèmes miniatures avec des réservoirs et des pompes capables de libérer le principe actif (PA) qu'ils contiennent. Du fait de leur petite taille, jusqu'à l'échelle nanométrique, ces dispositifs sont peu invasifs et peuvent être implantés dans le corps y compris dans le cerveau. De nouveaux bio-hybrides offrent une perspective intéressante dans le domaine pharmaceutique avec la capacité d'être utilisés comme systèmes à libération prolongée pour une grande variété de principes actifs (PAs) anioniques, neutres ou lipophiles (Doufène et al., 2019; Lerner et al., 2020).

II. NANOMÉDECINE

Nanomédicaments

L'application qui suscite le plus d'engouement est la conception de nanomédicaments c'est-à-dire de nanovecteurs transportant un PA et capables, dans l'idéal, de le libérer de manière « ciblée » au niveau de son site d'action.

Depuis la synthèse des premiers liposomes par Gregoriadis et collaborateurs en 1974 et des premières nanosphères à base polymère par Couvreur et collaborateurs en 1977, la recherche dans le domaine des nanovecteurs a connu un véritable développement exponentiel (Couvreur et al., 1977; Couvreur & Vauthier, 2006). Aujourd'hui, il existe une très grande variété de nanovecteurs destinés aux transports de PA qui peuvent être regroupés par catégorie en fonction de leur nature chimique : nanovecteurs lipidiques, nanovecteurs polymère, NPs inorganiques, NPs virales (Figure 41) (Wicki et al., 2015). Dans un périmètre plus large, les nanomédicaments peuvent être classés parmi les thérapies vectorisées qui comprennent également les conjugués vecteur-PA tels que les immunoconjugués (c'est-à-dire une association anticorps-PA) et les protéines modifiées qui n'entrent pas à proprement parlé dans la catégories des nanomédecines du fait de leur échelle de taille beaucoup trop faible (Figure 41).

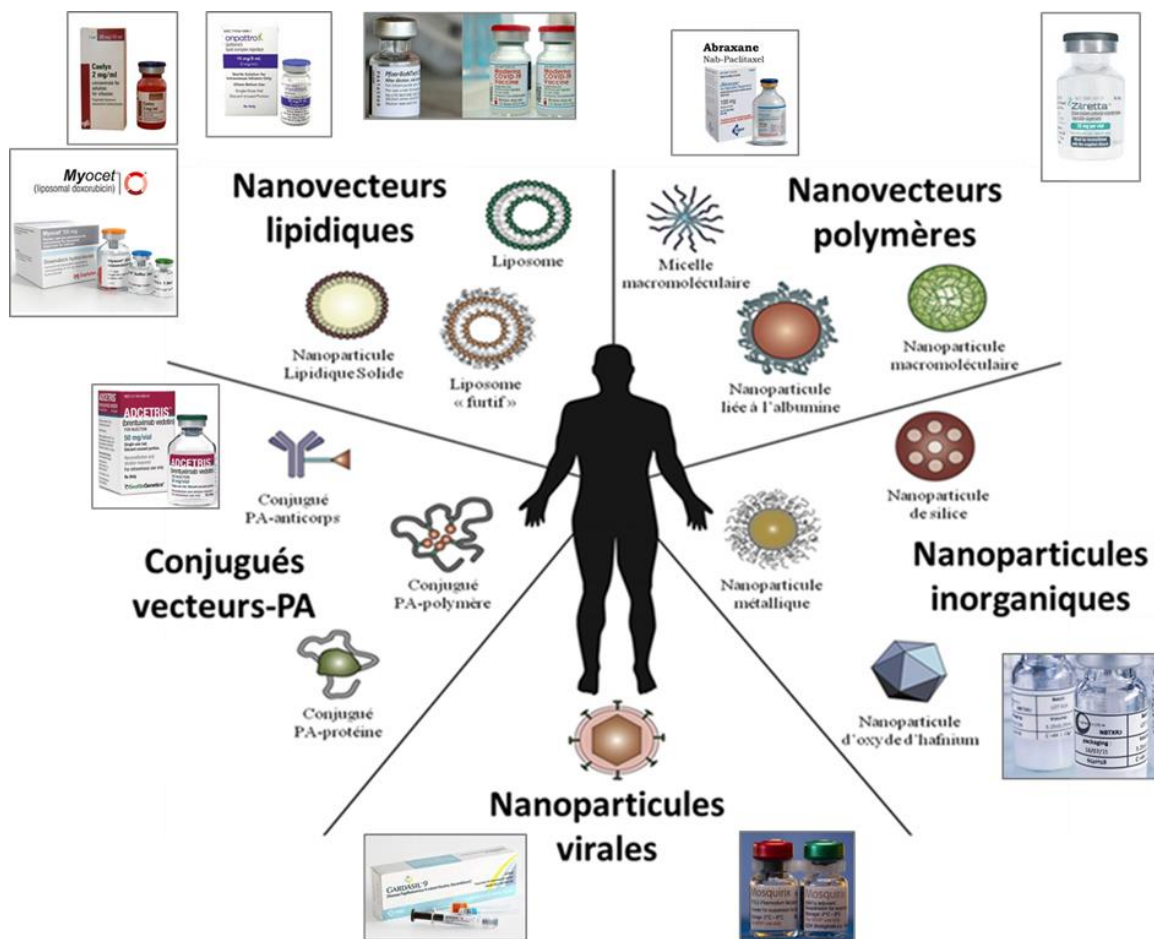


Figure 41: Les différents types de nanovecteurs et thérapies vectorisées et leurs applications en médecine

Différentes catégories de nanovecteurs constituant des thérapies « vectorisées » peuvent être distinguées en fonction de leur nature chimique et organisation supramoléculaire. De multiples formulations ont obtenu des autorisations de mise sur le marché : quelques exemples sont présentés dans cette figure. Adapté de (Wicki et al., 2015).

II. NANOMEDECINE

L'utilisation des nanomédicaments doit permettre de résoudre différentes problématiques rencontrées avec les PA conventionnels. En effet, à la suite d'une administration par voie orale ou systémique, un PA conventionnel (c'est-à-dire sous une forme non-encapsulé dans un nanovecteur) se heurte à différentes barrières mécaniques, physico-chimiques, enzymatiques depuis son site d'administration jusqu'à son élimination par voie urinaire ou dans les fèces, le plus souvent après biotransformation dans le foie, les poumons ou les reins. A une dose donnée, l'efficacité thérapeutique d'une molécule, ses éventuels effets indésirables et sa toxicité dépendent de sa biodistribution dans l'organisme et de sa biodisponibilité, c'est-à-dire de sa concentration plasmatique (Figure 42). Avec ce mode d'administration, un PA conventionnel est « dilué » dans le sang, diffuse le plus souvent dans de nombreux compartiments tissulaires et est rapidement éliminé. Il est donc nécessaire de réaliser des administrations répétées pour maintenir une concentration sanguine suffisante et atteindre un seuil thérapeutique. Dans son concept premier, l'encapsulation d'un PA dans une nanoparticule a pour objectifs de protéger le PA de la dégradation non souhaitée, d'améliorer son absorption, de modifier son profil pharmacocinétique et ses paramètres de biodistribution afin de maintenir la concentration sanguine du PA sur une plus grande durée et réduire le nombre d'administrations (Figure 42). De plus, le développement de certains médicaments est parfois ralenti ou arrêté du fait de problèmes de solubilité ou de stabilité des PAs. Les nanovecteurs présentant un cœur hydrophobe peuvent alors être une alternative intéressante pour l'administration de PAs lipophiles difficiles à administrer sous une forme « libre » (Couvreur & Vauthier, 2006). Suivant ce concept, le développement d'une première « génération » de nanovecteurs (Figure 43) a abouti, dès les années 90, à quelques autorisations (Anselmo & Mitragotri, 2021): la supplémentation en fer (CosmoFer®, Ferrisat®), une formulation anesthésique de propofol (Diprivan®), une formulation liposomale de vertéporfine (un dérivé de benzoporphyrine photoactivable) pour lutter contre la néovascularisation de la macula, et en oncologie plusieurs formulations comme le DaunoXome® et le Myocet®, deux formulations liposomales encapsulant respectivement la daunorubicine et la doxorubicine. Certaines de ces formulations anticancéreuses seront décrites plus en détails dans le chapitre « II.2 Nanomédecines et Cancer ».

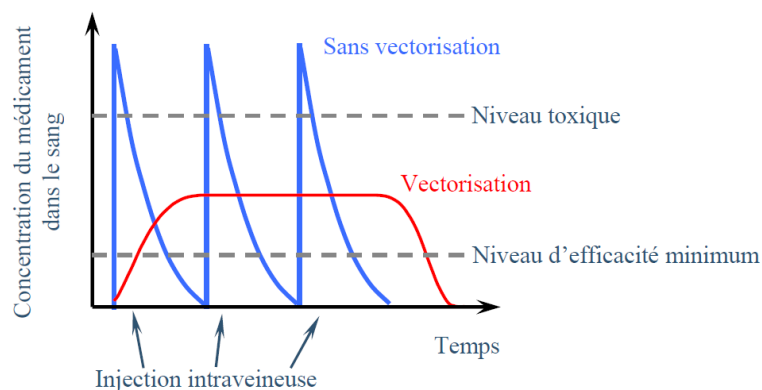


Figure 42 : Concentration dans le sang d'un principe actif après injection systémique

Un principe actif (PA) injecté par voie intra-veineuse sans vectorisation (courbe bleue) voit sa concentration sérique croître rapidement puis décroître rapidement du fait de son élimination. Pour être efficace, le PA doit atteindre une concentration sérique suffisante pour permettre un effet thérapeutique dans dépasser une dose maximale au-delà de laquelle des effets secondaires pourraient apparaître. En utilisant un nanovecteur, la concentration du PA devrait rester dans la zone d'efficacité après une seule injection du fait d'une biotransformation et d'une élimination plus lente (courbe rouge).

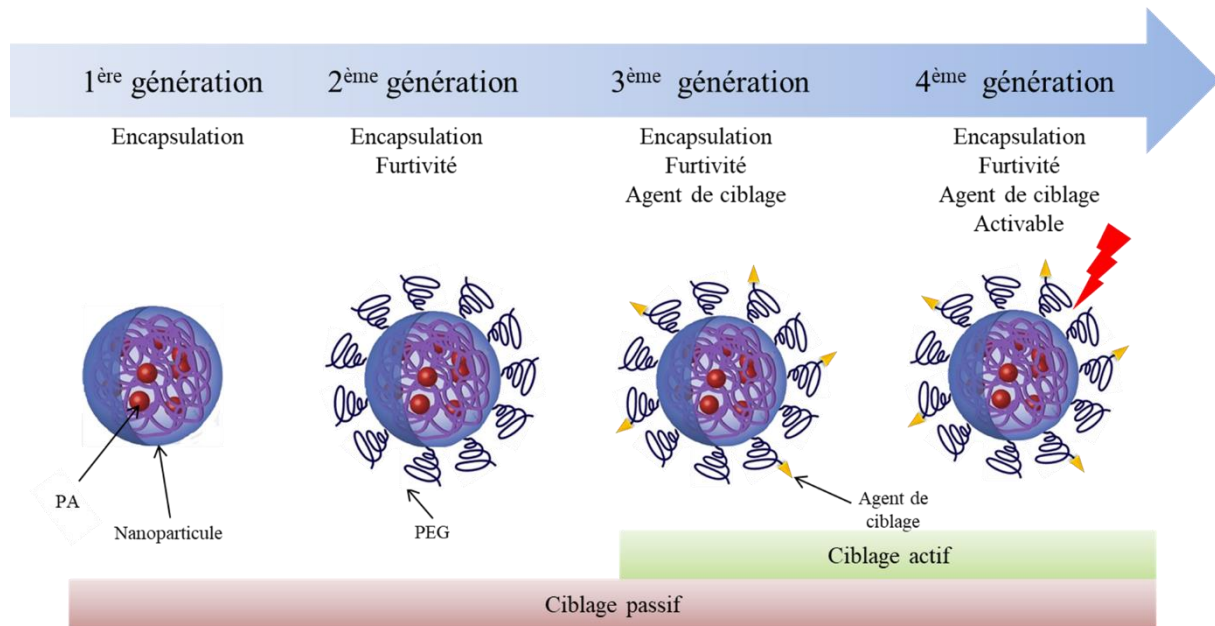


Figure 43 : Les différentes générations de nanovecteurs et leurs principales caractéristiques

Les nanoparticules sont représentées sous forme d'un maillage qui peut faire penser à des nanoparticules polymères mais ce schéma peut s'appliquer aux liposomes ou à des nano-objets inorganiques. Ces différentes générations sont en partie liées à la chronologie d'élaboration des nanoparticules. Les propriétés sont : la capacité d'encapsulation d'un principe actif (PA), la furtivité apportée par les chaînes neutres présentes en surface comme le PEG, la capacité de ciblage « actif » apportée par un agent de ciblage. Le terme « activable » fait référence à des formulations sensibles à un stimulus externe ou interne qui déstabilise la structure de la formulation.

Dans un objectif plus complexe, les nanovecteurs ont été optimisés et fonctionnalisés pour modifier leurs caractéristiques physicochimiques et leur faire acquérir de nouvelles propriétés (Figure 43), en particulier pour des administrations par voie systémique. Un désavantage majeur de la première génération était une élimination rapide par le système phagocytaire mononucléaire en partie due à l'opsonisation des nanovecteurs par les protéines plasmatiques, dont les protéines du complément et les anticorps, activant ainsi la première ligne de défense immunitaire. Cet aspect a été plus largement développé dans le paragraphe II.1.3 de cette introduction.

Afin de réduire l'opsonisation et le piégeage par le système phagocytaire mononucléaire, les nanovecteurs ont été optimisés grâce à la modulation de leur taille, leur forme (Blanco et al., 2015), leur charge de surface (Arviso et al., 2011) et leur structure chimique (Mahon et al., 2012; Moghimi et al., 2001; Nel et al., 2009), en particulier avec la synthèse de copolymères à blocs amphiphiles comportant un bloc PEG. Le PEG est le plus couramment utilisé pour modifier les propriétés de surface des nanovecteurs car il présente l'avantage d'être biocompatible, soluble en milieu aqueux, non toxique et faiblement immunogène. Les NPs PEGylées présentent une configuration appelée cœur-couronne avec un noyau hydrophobe et une couronne hydrophile formée par les blocs PEG qui agissent comme un bouclier stérique réduisant la liaison des opsonines et l'absorption par le système phagocytaire mononucléaire. Cette seconde génération d'objets présente donc un caractère de « furtivité » vis-à-vis du système immunitaire prolongeant ainsi leur durée de circulation systémique (Moghimi et al., 2001; Owens & Peppas, 2006; Tenzer et al., 2013) tout en gardant la capacité d'encapsulation de PAs décrit pour la première génération (Figure 45). De multiples configurations ont été générées avec des variations sur la longueur des blocs PEG, leur densité en surface et des

II. NANOMEDECINE

formulations combinant des molécules PEGylées ou non-PEGylées (Blanco et al., 2015; D'Addio et al., 2012; Gustafson et al., 2015).

Comme pour les nanovecteurs de première génération, des nanovecteurs PEGylés ont été produits pour des applications cliniques (Anselmo & Mitragotri, 2021) en oncologie, avec les exemples du Caelyx[®], une formulation liposomale PEGylée de doxorubicine pour le traitement des cancers de l'ovaire, du sarcome de Kaposi et de certains myélomes, et l'Onivyde[®] encapsulant de l'irinotécan pour le traitement des adénocarcinomes du pancréas métastatiques. Dans cette catégorie de nanovecteurs PEGylés, on trouve également les vaccins à ARNm (Aldosari et al., 2021) qui seront détaillées dans le paragraphe « *e-Vaccins* ».

L'utilisation de lipides ou de copolymères amphiphiles incorporant un bloc neutre, comme le PEG, réduit non seulement la reconnaissance des nano-objets arborant en surface le PEG par le système phagocytaire mononucléaire mais également leur endocytose par d'autres types cellulaires tels que les cellules d'hépatome comme nous l'avons montré dans l'équipe (Casajus et al., 2018). Cette internalisation réduite des nanoformulations PEGylées est le déterminant d'une circulation systémique prolongée. Ce type d'objets permettait alors d'envisager l'adjonction en surface de ligands de ciblage qui, en théorie, doivent guider le nanovecteur vers une cible tissulaire ou cellulaire à condition que le ligand reconnaisse une protéine préférentiellement exprimée à la surface de la cible sélectionnée. Les nanovecteurs de troisième génération (Figure 43) sont donc furtifs et dotés sur leur surface d'un ligand (anticorps, peptides, sucres...) capable de reconnaître « sélectivement » des marqueurs spécifiques exprimés en surface de cellules cibles. Pour cette troisième génération de nanovecteurs, le ciblage est dit « actif » car il permettrait de délivrer le PA de façon plus ciblée vers un type cellulaire donné *via* des interactions ligand-récepteur ou antigène-anticorps (Blanco et al., 2015). Certains auteurs proposent une quatrième génération de nanovecteurs dont les structures seraient composées des éléments précédemment cités (cœur, couronne à base de PEG et élément de ciblage) mais incorporant un composé structurant sensible à un stimulus. Sous exposition au stimulus, la dégradation du nanovecteur serait facilitée, libérant le PA uniquement au niveau du site pathologique. Parmi les stimuli, on peut citer des irradiations « externes » de diverses natures (rayons ionisants et infrarouges), créant par exemple une hyperthermie, ou des conditions du microenvironnement tumoral comme l'hypoxie et l'acidose déstabilisant la structure des nano-objets (Qiao et al., 2019; Thakkar et al., 2020).

L'objectif principal de ces nanovecteurs fonctionnalisés par un agent de ciblage est d'aboutir à des systèmes permettant de délivrer et concentrer un PA spécifiquement au niveau de sa cible cellulaire sans affecter les cellules saines. Parmi les agents de ciblage les plus étudiés, nous pouvons citer les: 1) protéines et peptides (Jing et al., 2018; Reubi, 2003; Turato et al., 2017; D. Zhu et al., 2016), 2) anticorps monoclonaux, 3) lectines et sucres (Turato et al., 2017), ou encore 4) vitamines telles que la biotine ou l'acide folique (Ibrahim et al., 2023; Kue et al., 2016).

Cette stratégie est particulièrement étudiée en oncologie, notamment dans le contexte de la controverse sur l'effet *Enhanced Permeability and Retention* (EPR) qui est défini comme l'accumulation « passive » de nanovecteurs dans les tumeurs. Cet effet, bien argumenté chez la souris mais controversé chez l'Homme, résulte d'une perméabilité des néovaisseaux sanguins intra-tumoraux et d'un plus faible drainage lymphatique (Maeda et al., 2013, 2016). Ces notions seront également plus développées dans le chapitre II.2 « Nanomédecines et Cancer ».

Malgré les difficultés à transférer des nanovecteurs, en particulier de 3^{ème} et 4^{ème} génération, en applications thérapeutiques au regard du nombre d'études précliniques et cliniques actuellement en cours (Ezike et al., 2023; Wicki et al., 2015), il n'en demeure pas moins que de nombreuses NPs ont obtenu une autorisation de mise sur le marché (Anselmo & Mitragotri, 2021; Park et al., 2019). Ainsi,

II. NANOMEDECINE

année après année, les NPs entrent dans l'arsenal thérapeutique et de prévention (Figure 44), l'exemple le plus récent des vaccins à ARNm étant emblématique de cette progression des nanomédecines (Polack et al., 2020). De plus, le nombre croissant d'essais cliniques sur les applications possibles en thérapie de diverses NPs est sans doute une indication suggérant que d'autres nanoformulations démontreront leur efficacité et qu'elles obtiendront les agréments réglementaires pour leur utilisation thérapeutique (Ezike et al., 2023).

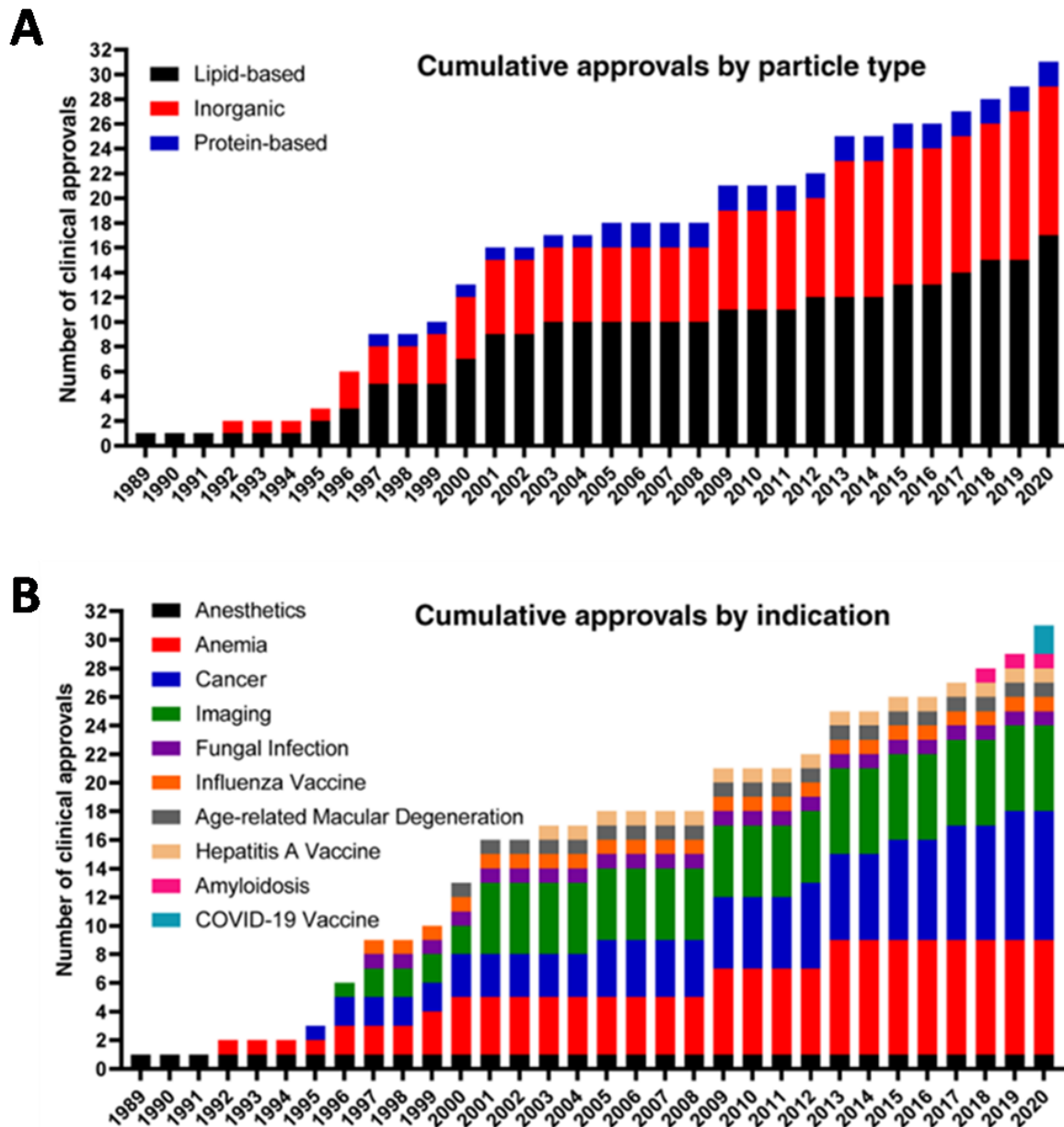


Figure 44 : Obtention d'autorisation de mise sur le marché de nanoformulations entre 1989 et 2020

Nombre cumulé de nanoformulations approuvées par l'EMA (*European Medicine Agency*) et/ou la FDA (*Food and Drug Administration*) en fonction de leur type (lipidique, protéique ou inorganique) (A) et en fonction de leur application en médecine (B). D'après (Anselmo & Mitragotri, 2021).

Nanovecteurs de thérapie génique

Le transfert de gènes constitue également un très grand domaine de recherche aux applications multiples en médecine et biotechnologie (J. Chen et al., 2016). En médecine, le transfert de gènes, ou plus largement d'acides nucléiques, est une stratégie prometteuse pour un traitement spécifique de nombreuses pathologies monogéniques liées à un dysfonctionnement génétique. Cette thérapie vise donc à corriger une expression génétique altérée dans les cellules pathologiques. La réussite de la thérapie génique dépend largement de l'efficacité des systèmes de transfert de gènes puisque les acides nucléiques (ADN, ARN, siARN) non complexés ne peuvent atteindre leur(s) cible(s) cellulaire(s). En effet, ces molécules sont : 1) anioniques et hydrophiles et ne peuvent franchir les membranes cellulaires, 2) dégradées dans le sang par des nucléases sériques, 3) éliminées de l'organisme en raison d'une clairance rénale rapide, et 4) phagocytées par les cellules immunitaires.

De nombreuses stratégies ont été développées pour permettre de disposer d'outils faciles à utiliser pour le transfert de gènes en recherche et en applications biotechnologiques et cliniques. On peut classer ces différentes approches en 3 grands « groupes » de technologies (Figure 45): 1) la transduction virale utilisant des formes modifiées de virus à pathogénicité réduite, par élimination de leur capacité de réplication, incluant des adénovirus, virus adéno-associés (AAV) et des rétrovirus dont les lentivirus, 2) des méthodes « physiques » dont l'électroporation beaucoup utilisée en laboratoire de recherche, 3) les nanoparticules lipidiques et polymères permettant, respectivement, la lipofection et la polyfection.

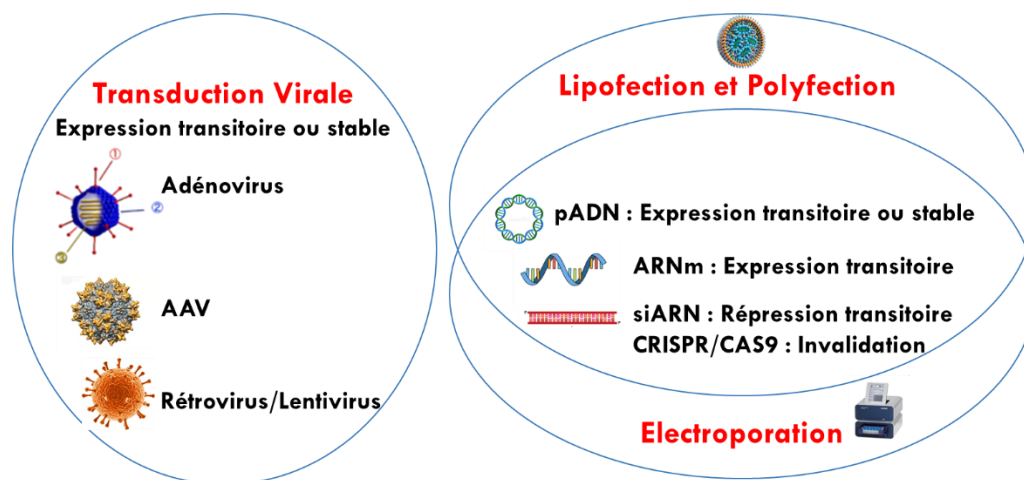


Figure 45 : Différentes stratégies de transfert de gènes

Les stratégies du transfert de gène peuvent être arbitrairement classées en 3 grandes approches méthodologiques basées sur l'utilisation de 1) virus modifiées dépourvus de capacité répliquative incluant les rétrovirus, notamment les lentivirus dérivés du VIH, les adénovirus et les virus adéno-associés (AAV), 2) méthodes physiques en particulier l'électroporation, et 3) la lipofection et la polyfection utilisant des nanovecteurs polycationiques permettant de complexer les acides nucléiques tels que l'ADN plasmidique (pADN) et les ARNm et d'exprimer une protéine de façon transitoire ou les ARN interférants (siARN) pour une perte de fonction.

Parmi les exemples de nanovecteurs utilisés en thérapie génique, plusieurs formulations ont été récemment développées pour lutter contre une forme particulièrement d'amylose. L'amylose est un groupe de maladies rares caractérisées par la présence de dépôts de protéines insolubles dans différents tissus et organes entraînant une dysfonction organique pouvant aller jusqu'à la destruction des organes touchés. La classification des amyloses est basée sur les signes cliniques et la nature des

II. NANOMEDECINE

protéines altérées impliquées dans les dépôts. En 2014, on recensait une trentaine de maladies liées à autant de protéines susceptibles de former des dépôts amyloïdes (Sipe et al., 2014). Parmi les amyloses, les formes les plus fréquentes sont l'amylose AL (immunoglobulinique), l'amylose AA (inflammatoire) et l'amylose ATTR (à transthyrétine).

L'amylose ATTR peut être de forme spontanée ou héréditaire. La forme héréditaire de l'amylose ATTR, aussi appelée neuropathie amyloïde familiale, est due à une anomalie d'un gène qui entraîne la fabrication d'une protéine transthyrétine modifiée. La transthyrétine ou TTR, autrefois appelée pré-albumine, est produite par le foie et transporte la thyroxine et le rétinol dans le sang. La modification génétique correspond à une substitution d'acides aminés prédisposant à la synthèse par le foie d'une TTR anormale ayant une structure de type amyloïde β -plissée. Cette protéine amyloïde va s'accumuler dans les nerfs périphériques et le cœur. Les options thérapeutiques pour les amyloses ATTR étaient relativement limitées jusqu'à très récemment. La transplantation hépatique pouvait être proposée, ce qui supprimait la principale source de production de protéine TTR anormale. En 2013, une nouvelle approche thérapeutique basée sur l'utilisation de nanoparticules lipidiques capables de complexer un petit ARN interférent (siARN) a été proposée. Deux équipes ont développé ces siARN anti-transthyrétine qui ont été encapsulés dans plusieurs formulations distinctes de nanoparticules lipidiques de première et deuxième génération, générant respectivement les produits ALN-TTR01, ALN-TTR02 (Coelho et al., 2013) et Patisiran (Onpattro®) (Kristen et al., 2019) pour lesquelles des autorisations de mise sur le marché ont été émises. Ces formulations, rentrant dans la classe des thérapies géniques, ont prouvé leur efficacité pour réduire considérablement et de façon durable le taux de transthyrétine, et améliorent les signes cliniques (Adams et al., 2021). Dans la continuité de la stratégie siARN, l'édition de génome, qui permettrait une correction « définitive » sans réinjection itérées de siARN, est évalué en essais cliniques (Ioannou et al., 2023).

Cet exemple constitue l'une des premières applications de nanoparticules vectorisant des acides nucléiques franchissant le cap de l'essai clinique pour proposer une solution thérapeutique innovante à une pathologie complexe et difficile à traiter. Le Patisiran (Onpattro®) a été le premier médicament à base de siARN approuvé en 2018 par la FDA. Pour atteindre l'efficacité clinique, tous les aspects de la synthèse des constituants et de la formulation de la NP lipidique ont dû être optimisés. Ainsi, plus de 300 lipides ionisables ont été criblés. Toutes les étapes du parcours des NPs lipidiques dans l'organisme, depuis le site d'administration jusqu'à la libération des siRNA dans le cytoplasme des hépatocytes, ont également été évaluées avant les essais cliniques. Des critères de tailles des NPs (<100 nm), d'efficacité d'encapsulation, de faible charge de surface, ainsi que les processus de fabrication et de stabilité ont été définis pour le développement de cette thérapeutique. Cette connaissance a largement contribué au développement rapide de vaccins à ARNm contre la COVID-19 (voir paragraphe « *e-Vaccins* »).

d. Nanothéranostique

Le terme « théranostique », défini par Warner et collaborateurs (Warner, 2004), est un néologisme dérivé de la contraction des termes « thérapeutique » et « diagnostic ». La théranostique est donc une approche combinant la thérapie et le diagnostic. Le but de la théranostique n'est pas d'établir un diagnostic au sens strict du terme puisque son objectif n'est pas d'identifier la maladie et/ou de définir son stade de développement. La théranostique est une approche de médecine personnalisée et ciblée. En cancérologie, la théranostique doit permettre de visualiser la biodistribution et l'accumulation des PAs afin de prédire la réponse au traitement et donc de présélectionner les patients potentiellement répondeurs, d'identifier les patients à risque de développer des effets indésirables, de suivre la

II. NANOMEDECINE

réponse au traitement et d'ajuster éventuellement les doses à administrer (Lammers et al., 2011; Rizzo et al., 2013).

Cette stratégie est notamment utilisée en médecine nucléaire. Par exemple, l'utilisation du gallium-68 (^{68}Ga), un émetteur β^+ , complexé avec un chélateur et couplé à un analogue de la somatostatine (^{68}Ga DOTA-TOC) permet, dans un premier temps, de visualiser les tumeurs neuroendocrines par TEP (Henrich & Benešová, 2020). Dans un deuxième temps, le ^{68}Ga est remplacé par un radionucléide émetteur β^- tels que l'Yttrium-90 (^{90}Y) ou le Lutétium-177 (^{177}Lu) pour détruire ces tumeurs par radiothérapie interne (Carrese et al., 2022).

La nanothéranostique associe l'utilisation d'un PA à visée thérapeutique et d'une molécule à visée diagnostic (c'est-à-dire détectable en imagerie) administrés de manière simultanée au sein d'un même nanovecteur (Figure 46). Les agents d'imagerie utilisés pour visualiser les tumeurs peuvent notamment être des radionucléides détectés par TEP, des agents de contraste et des NPs inorganiques détectés par IRM ou des colorants organiques et des *quantum dot* détectés par imagerie de fluorescence (Boopathy et al., 2023). Parmi les différentes approches d'imagerie, l'IRM est la technique la plus étudiée en particulier avec l'utilisation de particules magnétiques comme agents de contraste (Ahmed et al., 2012). Des particules de gadolinium, d'oxyde de fer, d'or, d'argent et d'autres métaux sont à l'étude dans le but de trouver celle qui convient avec le moins d'effets toxiques secondaires. L'utilisation de ces particules en IRM a pour but de mettre en évidence des tissus et/ou des cellules malades par opposition aux tissus et/ou cellules sains. Les agents thérapeutiques utilisés peuvent être des chimiothérapies, des radionucléides pour la radiothérapie, des photosensibilisants pour la thérapie photodynamique ou encore des nanoparticules magnétiques pour l'hyperthermie par exemple. Les nano-objets développés pour la théranostique sont de plus en plus de véritables nanoplateformes multimodales pouvant être composées d'un agent de ciblage, d'un ou plusieurs agents thérapeutiques et d'un agent d'imagerie.

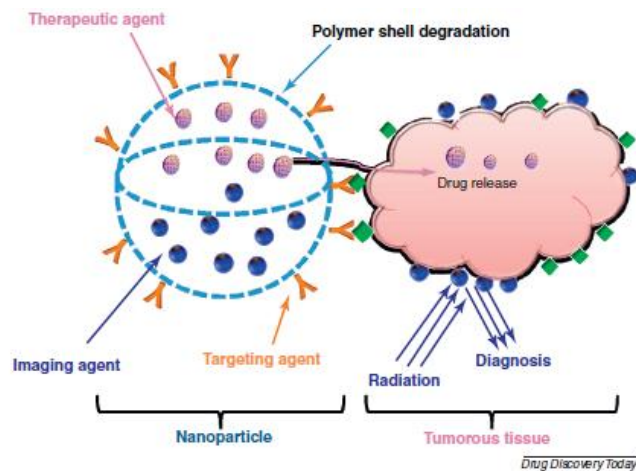


Figure 46 : Représentation d'une nanoparticule fonctionnalisée par un agent de ciblage incorporant une molécule dédiée à la détection tumorale et un principe actif
D'après (Ahmed et al., 2012).

II. NANOMEDECINE

e. Vaccins

La production de vaccins constitue une application très importante des nanotechnologies avec plusieurs approches technologiques utilisant des virus atténués, des nanoparticules arborant des protéines virales, des virosomes et des liposomes cationiques complexant des séquences nucléotidiques virales (Mellid-Carballal et al., 2023a, 2023b). Jusque dans les années 80, les vaccins étaient classiquement produits à partir de virus vivants atténués ou de virus inactivés (Figure 47) qui, bien qu'étant de très bonnes formulations immunostimulantes, posaient des problèmes de sécurité et de production à grande échelle (Mohsen et al., 2020). Depuis, les progrès dans les domaines de la production de protéines recombinantes et de la synthèse peptidique ont également permis le développement de stratégies vaccinales utilisant ces antigènes « simples » (Figure 47) bien que leur capacité d'immunostimulation soit plus faible (Sarfaraz et al., 2023).

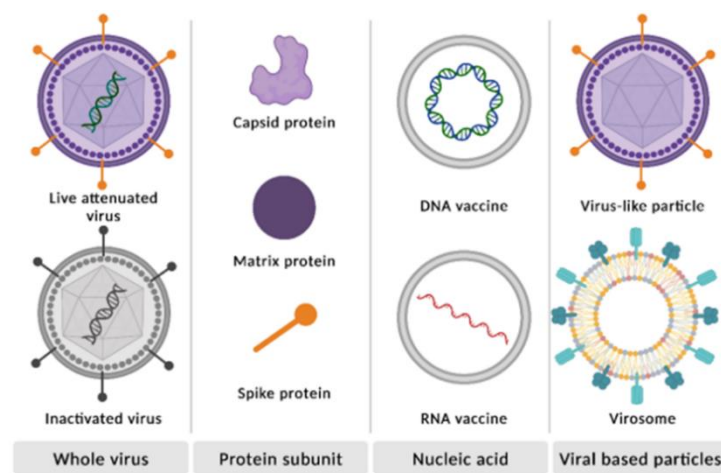


Figure 47 : Structure des différents antigènes ou particules utilisés en vaccinologie

La protection vaccinale peut être obtenue par injection de virus inactivés ou de virus vivants atténués, de protéines recombinantes ou peptides issus des protéines virales, de nanoparticules véhiculant de l'ADN ou de l'ARNm codant des protéines virales, de pseudoparticules virales ou de virosomes correspondant à des nanoparticules de synthèse immunostimulantes formulées à partir de vésicules lipidiques comme des liposomes auxquels sont associées des protéines virales ou acides nucléiques. D'après (Mellid-Carballal et al., 2023b).

La découverte dans les années 70 de l'existence chez des patients porteurs du virus de l'hépatite B de capsides virales « incomplètes » ne comportant pas de matériel génétique (Blumberg, 1977) a ouvert la voie à la production de pseudo-particules virales non répliquantes et de NPs « artificielles » ou virosomes (Jennings & Bachmann, 2008). Les pseudo particules virales peuvent être produites en systèmes cellulaires ou acellulaires consistant en la transcription d'une partie du génome viral à partir de séquences clonées dans un ou plusieurs plasmides. La traduction des ARN en protéines puis leur assemblage en pseudo-particules virales (Figure 48) permettent de produire des capsides enveloppées ou non, exprimant une partie des antigènes viraux mais sans matériel génétique (Mellid-Carballal et al., 2023a, 2023b). Les virosomes correspondent à des édifices supramoléculaires associant des protéines virales, des lipides et divers agents structurant et adjuvants immunostimulants (Figure 48). Les pseudo-particules virales et les virosomes peuvent être également modifiés par voies chimiques ou complexés à des acides nucléiques (Mellid-Carballal et al., 2023a, 2023b).

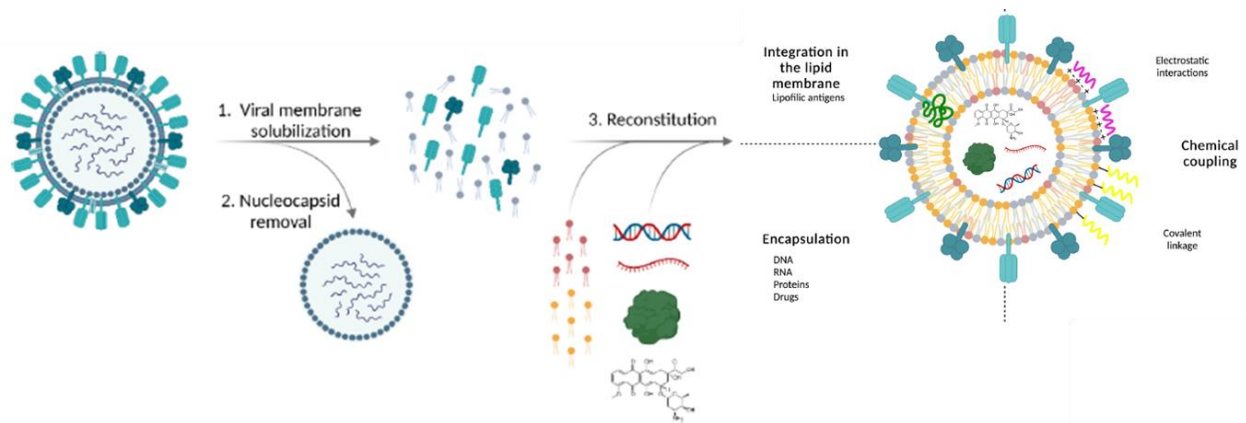


Figure 48 : Synthèse et modifications des virosomes

La production peut se faire à partir d'extraits protéiques issus de virus sauvages et l'intégration de protéines virales dans des macrostructures incluant des lipides et divers composants facilitant la formulation, la stabilité ou l'immunostimulation. D'après (Mellid-Carballal et al., 2023a, 2023b).

La dernière classe de vaccins repose sur l'utilisation de NPs cationiques complexant de l'ADN ou de l'ARNm. Alors que plusieurs vaccins à ADN sont utilisés en médecine vétérinaire, aucun vaccin à ADN n'est, à notre connaissance, utilisé en médecine humaine (Ho et al., 2021). A l'inverse, les vaccins à ARNm ont émergé en médecine humaine à l'échelle mondiale avec la récente pandémie de SARS-CoV-2 (Dolgin, 2021). Les vaccins à base d'acides nucléiques sont plus faciles à produire que les vaccins conventionnels, mais la contrainte de l'optimisation d'un système nanoparticulaire pour leur administration a longtemps limité leur développement (Ho et al., 2021; M. A. Liu, 2019). Les vaccins à base de NPs induisent d'excellentes réponses immunitaires en raison de leurs surfaces polyvalentes et fonctionnalisables (Mellid-Carballal et al., 2023a, 2023b). De plus, leur taille nanométrique leur permet d'atteindre le système lymphatique, où ils sont absorbés par les cellules présentatrices d'antigènes (APC) (Manolova et al., 2008). Bien que les NPs aient un effet adjuvant par elles-mêmes, elles peuvent également être combinées ou conjuguées à des adjuvants améliorant encore leur pouvoir immunogène. Aujourd'hui, malgré un rejet de ces technologies par une partie de la population, les vaccins à ARNm sont considérés comme sûrs et faciles à produire (Gomes et al., 2017).

Ces différents modes de vaccination, et plus particulièrement les pseudo-particules virales et les virosomes, ont conduit à de multiples autorisations de mise sur le marché pour les vaccins contre les hépatites virales, les papillomavirus, les virus influenza et même plus récemment le *Plasmodium falciparum* (Mellid-Carballal et al., 2023b). Dans le contexte de ce paragraphe, un choix a été fait de développer plus largement la technologie de vectorisation d'acides nucléiques utilisant des NPs de synthèse considérant les avancées très récentes en médecine humaine avec les vaccins à ARNm utilisés lors de la pandémie de SARS-CoV-2.

Les NPs lipidiques utilisées dans ces nouveaux vaccins contiennent plusieurs constituants (Figure 49) aux rôles différents incluant au moins un lipide ionisable pour la complexation des acides nucléiques, un lipide neutre pour favoriser la stabilité de l'édifice et la liaison cellulaire, du cholestérol pour combler les lacunes entre les lipides et pour son pouvoir fusogène avec les membranes cellulaires, et un PEG pour réduire l'opsonisation par les protéines sériques et la reconnaissance par le système phagocytaire mononucléaire. Les quantités relatives de lipides ionisables, lipides auxiliaires, cholestérol et PEG affectent l'efficacité des NPs lipidiques et ont été optimisées pour une application et une administration chez l'Homme (X. Cheng & Lee, 2016; Reichmuth et al., 2016; Semple et al., 2010).

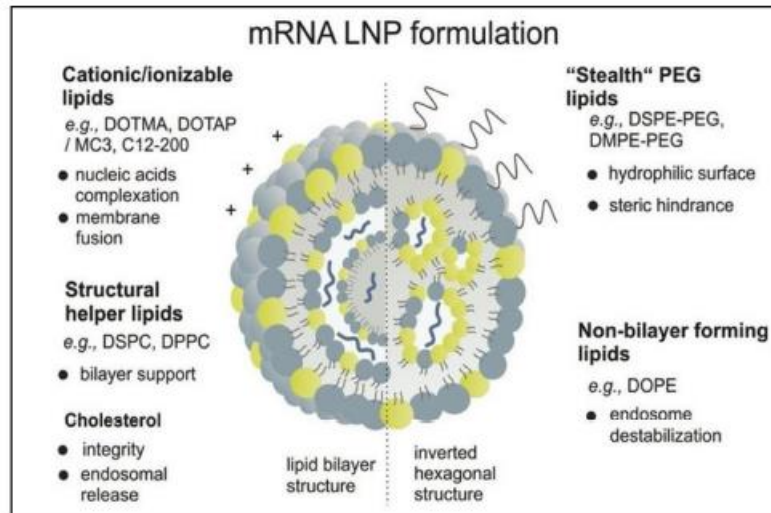


Figure 49 : Représentation schématique de la structure d’une nanoparticule lipidique pour la vectorisation d’ARNm en vaccinologie

Dans les formulations utilisées pour le vaccin contre la COVID-19, plusieurs molécules entrent dans l’assemblage macromoléculaire incluant un lipide cationique, des lipides « accessoires » de stabilisation, le DOTMA (1,2-di-O-octadecenyl-3-triméthylammonium propane), le DOTAP (1,2-dioleoyl-3-triméthylammonium-propane), le MC3 (D-Lin-MC3-DMA), le DSPC (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), le DPPC (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), le DSPE-PEG (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-poly(éthylène glycol)), le DMPE-PEG (1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine poly(éthylène glycol)), le DOPE (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine). D’après (Aldosari et al., 2021).

Ces différentes optimisations de NPs vectorisant des acides nucléiques dans un objectif thérapeutique ont été réalisées sur une longue période de plus de 10 ans. La vision fréquemment répandue est que la mise au point des vaccins à ARNm est très récente, concomitante à la pandémie du SARS-CoV-2 en 2020 (<https://sante.journaldesfemmes.fr/fiches-sante-du-quotidien/2684285-vaccin-arn-covid-definition-simple-liste-covid-effets-secondaires/>). S’il est vrai que les premières autorisations de mise sur le marché de tels produits correspondent aux vaccins Pfizer et Moderna ciblant la COVID-19, leur mise au point est bien la résultante de multiples recherches pré-cliniques et d’essais cliniques sur les 20 dernières années. Parmi ces nombreux travaux de recherche, la vectorisation des ARN interférents anti-transthyréline, mise au point plusieurs années auparavant (Coelho et al., 2013) et ayant abouti à la mise sur le marché du Patisiran (Onpattro®) (Kristen et al., 2019), a fortement aidé à l’émergence de ces vaccins à ARNm. Cependant, le développement remarquable à l’échelle mondiale entre 2020 et 2021 des vaccins à ARNm positionne cette approche thérapeutique, de façon sans doute définitive, dans l’arsenal de médecine préventive.

Dans ce contexte, il peut être fait mention d’un aspect particulièrement important dans la production de ces vaccins à ARNm qui est la formulation des « lipoplexes ». En effet, depuis de nombreuses années, des protocoles de formulation/complexation des acides nucléiques avaient été mis au point, consistant à produire des liposomes ou micelles contenant des lipides cationiques par hydratation d’un film lipide « sec » soit dans de l’eau soit dans un tampon comme du PBS (Phosphate Buffer Saline). L’hydratation était souvent accompagnée d’une sonication produisant des objets de taille nanométrique qui étaient ensuite complexés aux acides nucléiques (ADN, ARN) par interaction électrostatique (Figure 50). L’application la plus répandue est la simple transfection en laboratoire de recherche avec l’incubation de ces complexes dans les milieux de cultures cellulaires. Pour la production de vaccins thérapeutiques ou de tout autre application en nanomédecine, cette méthode n’est pas compatible avec les critères d’exigence d’un produit pharmaceutique. Un axe de recherche

II. NANOMEDECINE

important a consisté à mettre au point des équipements de microfluidique capables de produire des nano-objets, notamment des NPs lipidiques complexant des ARNm, permettant une production à très grande échelle, de façon reproductible et de qualité clinique selon des normes fixées par les agences de sécurité du médicament. Le principe repose sur le mélange sous pression dans une puce adaptée des solutions de lipides et d'acides nucléiques préparées respectivement dans de l'éthanol et de l'eau. En phase aqueuse, les lipides s'auto-organisent en NPs en encapsulant les acides nucléiques par interaction électrostatique comme pour la méthode d'hydratation de film lipidique. Après élimination de l'alcool, une suspension liposomale relativement stable est obtenue dont les paramètres physicochimiques peuvent être caractérisés.

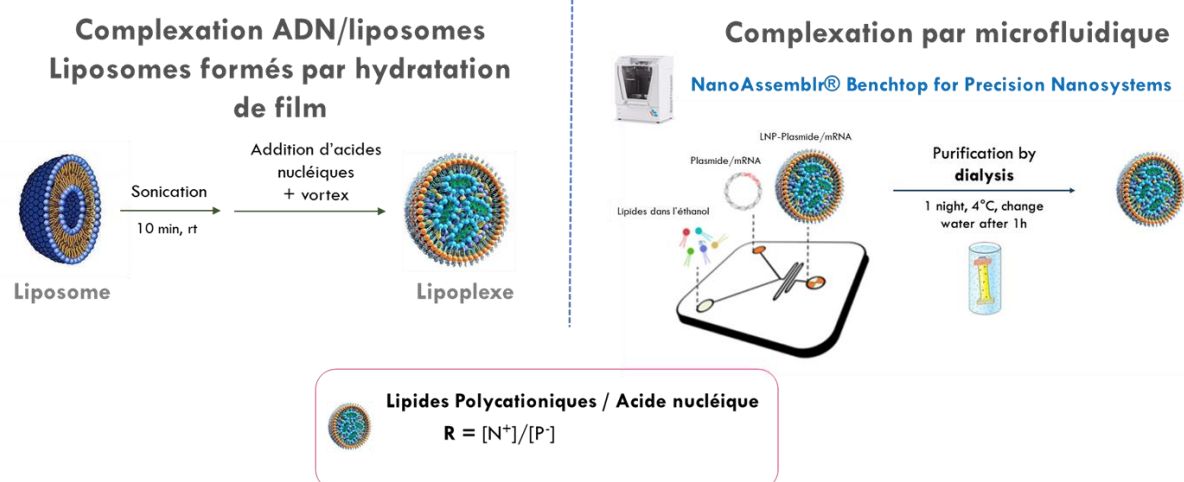


Figure 50 : Les méthodes de formulations des nanoparticules lipidiques complexant des acides nucléiques

Classiquement, les liposomes étaient formulés par hydratation d'un film lipidique en solution aqueuse (schéma de gauche), généralement de l'eau, et sonication. Cette méthode « artisanale » mais efficace à l'échelle de petites productions est remplacée par la formulation en microfluidique reposant sur l'utilisation de puces mélangeant les constituants lipidiques dissous dans l'éthanol et les acides nucléiques en solution dans l'eau. Dans ces 2 préparations, le ratio de charge R correspondant au rapport des quantités de charges positives et négatives apportées respectivement par les lipides cationiques et les acides nucléiques, est une donnée essentielle dont dépend l'efficacité de transfert de gènes et la cytotoxicité du complexe. Schéma adapté d'une figure réalisée par M. Bravo, Institut de Chimie de Rennes, CNRSUMR6226.

Le succès des vaccins à base d'ARNm et de NPs lipidiques est fondamental, car il souligne la valeur de la science des matériaux pour les progrès médicaux et motive d'autres recherches fondamentales et appliquées sur les NPs, qui, espérons-le, se traduiront par des plans de financement sur les nanomédecines et la mise au point de nouveaux traitements pour le bénéfice des patients (Verbeke et al., 2019).

II.2. Nanomédecine et cancer

II.2.1. Place de la nanomédecine en oncologie

Dès l'émergence du concept de vectorisation, l'oncologie a occupé une place centrale dans les objectifs d'applications des nanotechnologies en médecine et dans les essais cliniques qui en découlent (Figure 51).

II. NANOMEDECINE

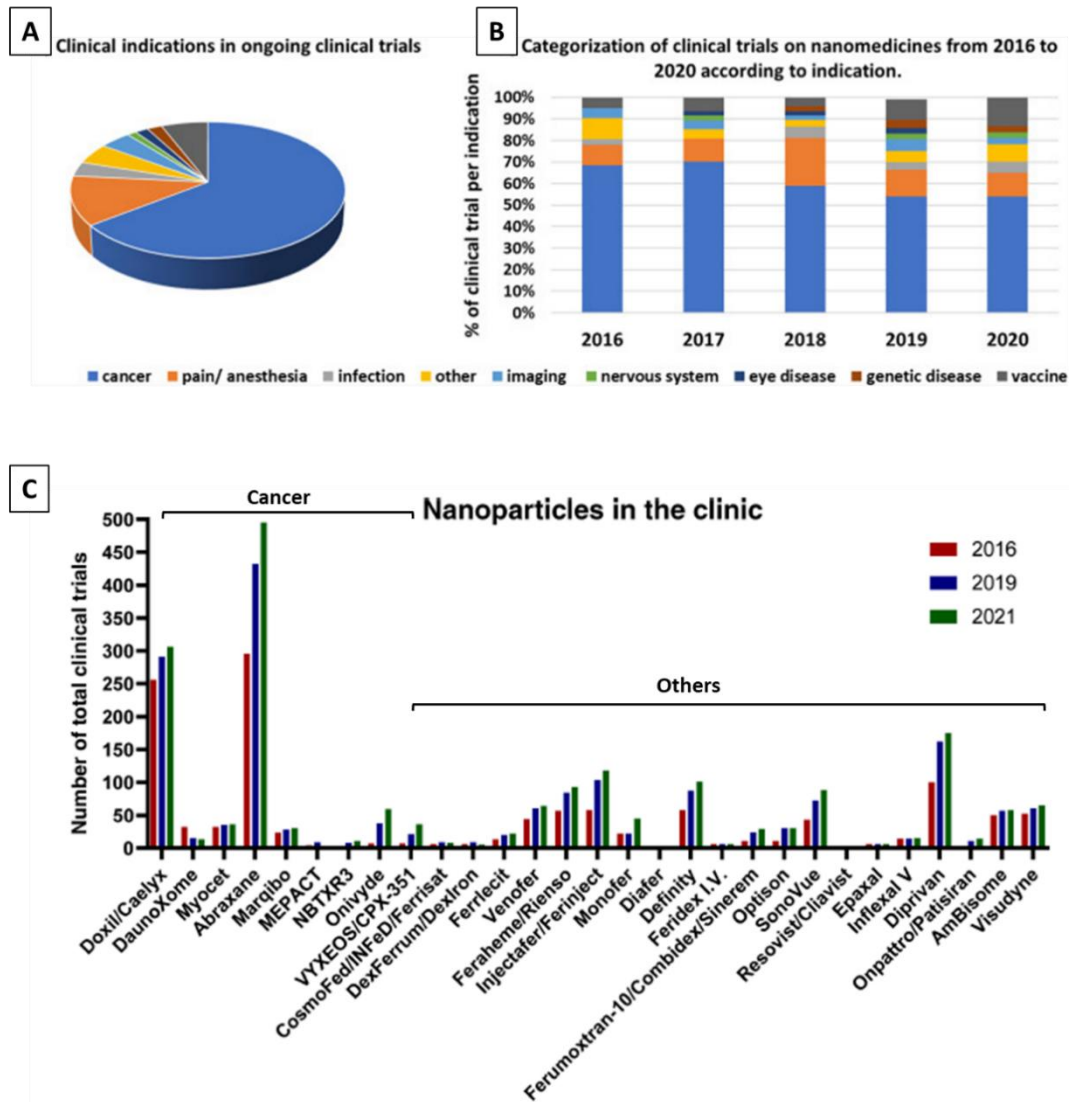


Figure 51 : Les études cliniques des nanoparticules en oncologie

Indications médicales des essais cliniques utilisant des nanoformulation : (A) Analyse sur un ensemble des 409 essais cliniques (clinicaltrials.gov) et (B) répartition par an sur la période 2016-2020 (333 des 409 essais cliniques présentés en A). La recherche est limitée aux essais cliniques identifiés avec les mots-clés suivants : nanoparticule, liposome, vaccin, micelle, nanocristaux, nanoparticules pseudo-virales, particule de silice, nanoparticule d'oxyde de fer, vésicule extracellulaire, dendrimère, nanobulle, lipoplexes, nanoparticule d'or. Ces mots-clés ont été utilisés seuls ou en association avec d'autres mots-clés spécifiques à d'autres maladies ou technologies tels que COVID-19, ARNm, acide nucléique, cancer. Seuls les essais utilisant des nanoparticules ont été sélectionnés. D'après (Germain et al., 2020). (C) Chronologie (2016-2021) du nombre d'essais cliniques (clinicaltrials.gov) pour les nanoparticules ayant reçu une autorisation de mise sur le marché. D'après (Anselmo & Mitragotri, 2021).

En 2013, près de 60% des produits de nanomédecine en développements pré-cliniques ou cliniques étaient destinés à l'oncologie selon l'association des entreprises du médicaments (LEEM, <https://www.leem.org/la-nanomedecine>). Depuis, cette proportion reste très haute (>50%) mais a fléchi entre 2016 et 2020 (Figure 51A-B) avec une augmentation des essais cliniques en anesthésie, dans la prise en charge de la douleur et la vaccination à ARNm. Les essais cliniques de NPs pour l'oncologie restent tout de même prédominants et, si l'on prend l'exemple de formulations ayant reçu une autorisation de mise sur le marché (Figure 51C), le nombre d'essais augmentait entre 2016 et 2021 avec près de 500 essais pour l'Abraxane® (Anselmo & Mitragotri, 2021).

II. NANOMEDECINE

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

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

Généralement, le manque de sélectivité des agents de chimiothérapie entraîne une exposition systémique importante. Ceci occasionne souvent des effets toxiques secondaires conduisant à l'utilisation de doses réduites d'anticancéreux ou à des arrêts temporaires ou permanents du traitement au détriment de l'efficacité thérapeutique. Comme indiqué précédemment dans le paragraphe sur les applications thérapeutiques des NPs, la capacité des nanovecteurs à encapsuler des PAs utilisés en chimiothérapie et/ou en radiothérapie, puis à délivrer au sein même de la tumeur ou de l'organe atteint ces agents, permettrait de réduire les effets indésirables des traitements et d'améliorer leur efficacité en augmentant les concentrations intratumorales de ces PAs. Cela permettrait donc, en théorie, d'améliorer l'index thérapeutique, c'est-à-dire la marge entre la dose efficace et la dose toxique, et le rapport bénéfice-risque des médicaments (Figure 52).

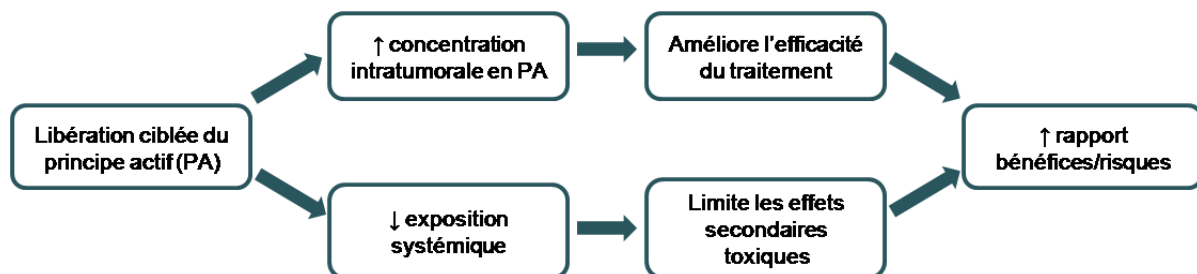


Figure 52 : Intérêt des nanoparticules en oncologie

Le principe d'utilisation des nanovecteurs en oncologie est à la fois l'encapsulation des principes actifs (au sens large du terme), leur accumulation intratumorale et la diminution de l'exposition systémique dans l'objectif d'améliorer le rapport bénéfice risque sachant que les principes actifs en cancérologie sont des agents cytotoxiques.

De plus, le développement des nanovecteurs en oncologie pourrait offrir de nouvelles opportunités dans le traitement de cancers pour lesquels l'arsenal thérapeutique est encore limité en permettant l'utilisation de PAs jusqu'alors non-administrables du fait de leur faible solubilité et/ou d'effets indésirables trop importants (Gabizon et al., 2014). Beaucoup d'espoirs ont donc été placés dans ces nanovecteurs pour concevoir de nouvelles approches diagnostiques et thérapeutiques en oncologie.

Par ailleurs, le concept d'accumulation intratumorale de NPs repose sur plusieurs observations, en particulier, la perméabilité vasculaire et la rétention intratumorale de nanovecteurs ou effet EPR, l'infiltration de cellules immunitaires à forte activités de phagocytose au sein des tumeurs et la capacité

II. NANOMEDECINE

des cellules, notamment tumorales, à internaliser des NPs par endocytose. Ces particularités conduisent à la notion de ciblage « passif » des tumeurs par opposition à l'utilisation de NPs de 3^{ème} et 4^{ème} génération qui possédant un ligand de ciblage permettent un ciblage « actif » des cellules tumorales. Ces différents aspects sont développés dans les paragraphes suivants.

II.2.2. Nanovecteurs et mécanismes de ciblage des tumeurs

a. Encapsulation de principes actifs

Un des intérêts majeurs des nanovecteurs est leur capacité à « encapsuler » des PAs dans leur structure macromoléculaire. Le terme d'encapsulation est en fait un abus de langage car il peut être utilisé pour les objets tels que les liposomes, nanocapsules ou NPs polymères, dans lesquels un PA sera « piégé » dans l'échafaudage moléculaire. Cependant, pour des agrégats d'albumine ou des NPs métalliques, les PAs seront plus généralement greffés à leur surface. Pour les NPs métalliques une fonctionnalisation chimique de la surface sera donc nécessaire pour permettre l'ajout d'un PA (Figure 53).

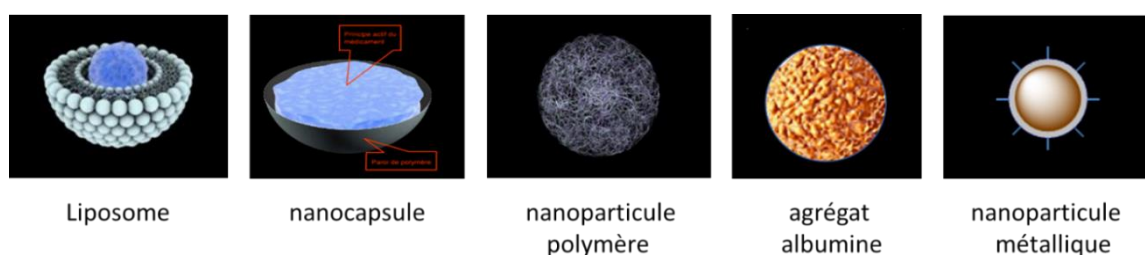


Figure 53 : Quelques exemples de nano-objets utilisés en oncologie

Le liposome et la nanocapsule sont des structures présentant une phase interne aqueuse ou lipidique permettant l'encapsulation d'un principe actif. Les nanoparticules polymères, produites à partir d'homopolymères ou de copolymères amphiphiles présentent un cœur hydrophobe dans lequel un principe actif peut être encapsulé. Les molécules d'albumine peuvent lier des principes actifs et former des agrégats fonctionnels. Les nanoparticules métalliques doivent être fonctionnalisées par des molécules organiques permettant un greffage chimique soit directement d'un médicament soit d'un revêtement lui-même accepteur de principes actifs.

L'association d'un PA avec des nanovecteurs est donc avant tout liée à une méthodologie de greffage chimique covalent du PA avec un constituant du vecteur ou d'interactions électrostatiques ou hydrophobes du PA avec des constituants de l'objet lors de l'autoassemblage. Pour les NPs lipidiques, la microfluidique décrite en Figure 50 pour les acides nucléiques s'applique également à des molécules de chimiothérapie.

Au cours de mon travail expérimental utilisant des homopolymères et copolymères dérivés du poly(malate de benzyle) (PMLABe), nous avons utilisé la technique de nanoprécipitation (Thioune et al., 1997), une méthode classique facile à mettre en œuvre (Figure 54) qui permet d'obtenir des NPs polymères avec une très bonne reproductibilité quant aux caractéristiques de taille, potentiel zéta (ζ) et indice de polydispersité (Huang et al., 2012; Loyer & Cammas-Marion, 2014). Cependant, la formulation par microfluidique est également possible avec ce type de (co)polymères.

II. NANOMEDECINE

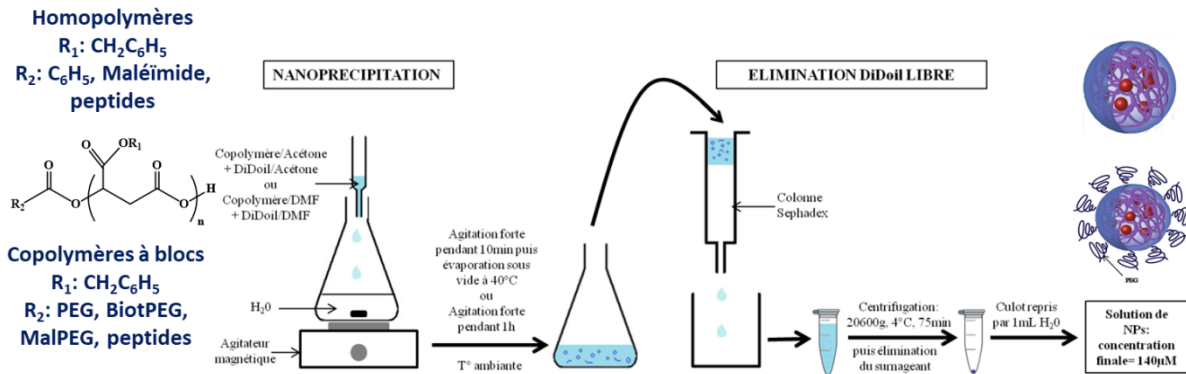


Figure 54 : Technique de formulation de nanoparticules polymère par nanoprécipitation avec l'exemple des polymères dérivés du poly(malate de benzyle)

Les (co)polymères et éventuellement un composé à encapsuler [ici l'exemple du fluorochrome lipophile, le DiDoil (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetraméthylindodicarbocyanine perchlorate)], sont solubilisés dans un solvant organique miscible à l'eau tel que l'acétone ou le diméthyle formamide (DMF). Cette phase organique est ajoutée rapidement dans un volume d'eau sous forte agitation permettant l'auto-assemblage des polymères et du DiDoil et la formation de nanoparticules (NPs). La suspension de NPs est filtrée sur une colonne séphadex PD10 afin d'éliminer les molécules de DiDoil libres. Il est possible de centrifuger l'éluât et de concentrer la suspension de NPs.

Pour les études de la captation de NPs par différents types cellulaires *in vitro*, nous avons encapsulé des composés lipophiles fluorescents comme le DiDoil (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetraméthylindodicarbocyanine perchlorate) permettant de « marquer » les NPs et de les détecter dans les cellules après internalisation, soit par microscopie soit par cytométrie en flux. Les polymères dérivés du poly(malate de benzyle) permettent d'encapsuler très efficacement ces molécules lipophiles fluorescentes sans qu'elles ne soient libérées au cours du temps dans le milieu extérieur (Figure 55A). Ces polymères peuvent également permettre l'encapsulation de molécules amphiphiles telles que la doxorubicine pour laquelle une libération partielle est observée dans les minutes qui suivent la formulation des NPs (*burst effect*). Ce phénomène de libération précoce de la doxorubicine est dû au fait qu'une certaine proportion de cette molécule amphiphile va s'intégrer dans la couronne de PEG des NPs PEGylées au cours de la formulation et va ensuite rapidement diffuser vers le soluté de la suspension de NPs (Figure 55B).

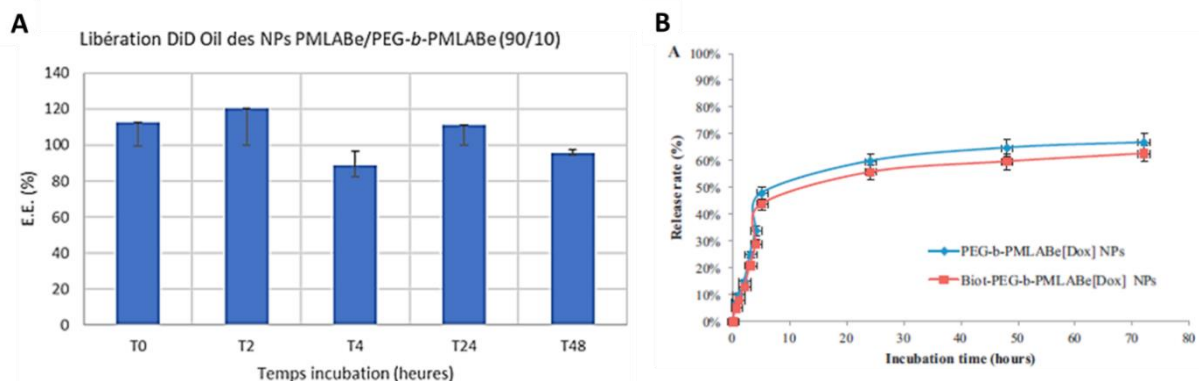


Figure 55 : Encapsulation du fluorochrome DiDoil et de la doxorubicine dans les nanoparticules polymères préparées à partir du copolymère poly(éthylène glycol)₄₂-*b*-poly(malate de benzyle)₇₃

Les deux formulations ont été préparées par nanoprécipitation : (A) Absence de libération du composé lipophile DiDoil encapsulé dans le cœur hydrophobe des NPs. (B) Libération partielle de la doxorubicine pendant les 10 heures post-formulation objectivant un effet « burst ». D'après (Loyer et al., 2013).

L'efficacité d'encapsulation des médicaments constitue encore un challenge dans le domaine de la nanomédecine. En effet, atteindre une très grande efficacité d'encapsulation réduit les pertes de PA. Dans le cas des liposomes, l'approche d'encapsulation d'un PA hydrophile ou amphiphile, par un chargement « passif » lors de la formulation des liposomes par réhydratation d'un film lipidique dans un tampon contenant le PA, conduit à des concentrations internes et externes du médicament statistiquement similaires, et donc à un taux d'encapsulation limité. Pour pallier à ce problème, l'encapsulation « active » sous un gradient de pH transmembranaire a permis avec succès l'encapsulation de grandes quantités de PAs. Ainsi le Doxil[®], la première formulation liposomale approuvée par la FDA en 1995, est un exemple emblématique de cette méthode avec environ 10 000 molécules de doxorubicine par liposome (Wei et al., 2018; Wibroe et al., 2016). Le mécanisme d'encapsulation repose sur un gradient de pH transmembranaire couplé à la précipitation du composé utilisé sous forme d'un sel d'ammonium au cœur du liposome. Cette méthodologie a été appliquée à quelques autres PAs, notamment la ciprofloxacine, la vincristine, le topotécan et l'irinotécan (T. Li et al., 2018). Malgré ces succès indéniables, la méthode d'encapsulation « active » reste complexe à mettre en œuvre. De plus, elle est limitée à un nombre relativement faible de PAs amphiphiles et acides (ou basiques), et ne peut s'appliquer aux PAs hydrophobes.

Pour les composés hydrophobes, l'encapsulation dans des NPs polymères par nanopréciipitation ou par microfluidique est efficace. Cependant, ce type de formulations peut présenter, pour certaines NPs, une grande quantité d'excipients par rapport au PA. L'aspect de biocompatibilité du polymère est donc primordial afin de pouvoir administrer une quantité suffisante de PA sans générer de toxicité liée au polymère constituant les NPs. Dans ce contexte, une méthode de formulation basée sur l'effet « Ouzo » a été mise au point afin d'accroître la quantité de PA encapsulée dans des NPs (Lepeltier et al., 2014). L'effet Ouzo, du nom de la turbidité observée dans la célèbre boisson grecque, se produit dans des systèmes ternaires constitués d'un solvant miscible à l'eau, d'eau et d'une faible quantité d'huile. Au-delà d'une certaine quantité d'eau, des gouttelettes riches en huile se séparent de la phase continue. Récemment, l'équipe Rennaise dirigée par F. Gauffre a rapporté l'utilisation de l'effet Ouzo pour former des capsules hybrides inorganiques-NP/polymère, appelées hybridosomes[®] (Goubault et al., 2020). La procédure d'élaboration des hybridosomes[®] via l'effet Ouzo est résumée dans la Figure 56. Les NPs hydrophobes sont d'abord mises en suspension dans du tétrahydrofurane (THF, en tant que solvant miscible à l'eau) contenant un conservateur (hydroxytoluène butylé, BHT, en tant que composé lipophile). Ensuite, une grande quantité d'eau est ajoutée pour générer une sursaturation de l'huile et la nucléation des gouttelettes. Simultanément à la formation des gouttelettes, les NPs, qui sont également hydrophobes, deviennent incompatibles avec le solvant riche en eau, et précipitent à l'interface des gouttelettes d'Ouzo. Ensuite, les NPs sont réticulées par un copolymère à bloc, tel que le poly(éthylène glycol)-*bloc*-poly(acide acrylique) (PEG-*b*-PAA). Grâce à ce système, cette équipe a démontré qu'il était possible d'encapsuler une concentration exceptionnellement élevée d'un colorant modèle hydrophobe (BODIPY) dans les hybridosomes[®], jusqu'à 0,35 mol.L⁻¹ (170 g.L⁻¹) soit 450 000 molécules/capsule (Goubault et al., 2020).

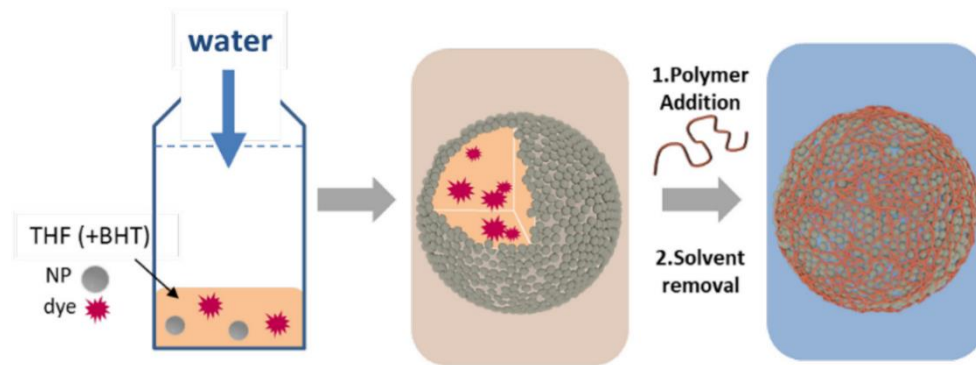


Figure 56 : Représentation schématique du processus d'élaboration des Hybridosomes® via la nanoprécipitation de NPs hydrophobes à la surface de gouttelettes d'Ouzo

De l'eau est rapidement ajoutée à une solution de THF contenant des NPs hydrophobes (exemple des NPs d'oxyde de fer superparamagnétiques enrobées d'octylamine) et du BHT (ici THF 25 %/eau 75 %/BHT < 0,01 %). Des gouttelettes d'Ouzo se forment et les NPs recouvrent leur surface. Ensuite, un polymère (PEG-*b*-PAA) est ajouté pour réticuler les NPs. Après élimination du solvant (évaporation ou dialyse), le noyau est remplacé par de l'eau

Ces travaux démontrent l'importance des études en cours dans les optimisations et standardisations qui restent à apporter pour la formulation de NPs et les applications en médecine que ce soit en vaccination (paragraphe II.1.4.e-*Vaccins*) ou vectorisation de PAs incluant les chimiothérapies.

b. Ciblage passif et effet EPR

Le phénomène d'accumulation spontanée des nanovecteurs au niveau tumoral est souvent appelé « ciblage passif » (Figure 57). Il est dû à l'effet de perméabilité vasculaire et de rétention tissulaire connu sous le nom d'effet EPR (*Enhanced Permeation and Retention*) qui a été découvert par Matsumura et Maeda dans des modèles murins de cancers (Matsumura & Maeda, 1986). Cette équipe avait initialement démontré qu'un copolymère de styrène et d'acide maléique conjugué à la protéine antitumorale néocarzinostatine formant un complexe macromoléculaire s'accumulait de façon privilégiée au niveau du site tumoral dans un modèle de sarcome chez la souris (Maeda et al., 1984). Pour étudier le mécanisme de cette accumulation tumorale de macromolécules, l'équipe de Maeda a ensuite utilisé des protéines radiomarquées de différentes masses molaires ainsi que des colorants complexés à l'albumine sérique pour visualiser l'accumulation dans les tumeurs chez souris. Ces auteurs ont montré que de nombreuses protéines se sont progressivement accumulées dans les tissus tumoraux des souris (Figure 57-1) avec un rapport entre la concentration en protéines dans la tumeur et la concentration sérique ≥ 5 mesuré entre 24 et 72 h après administration (Matsumura & Maeda, 1986). Depuis ces travaux, de très nombreux articles ont confirmé l'accumulation de nanovecteurs aux sites tumoraux en utilisant de nouvelles technologies d'imagerie sur animal entier, en particulier en fluorescence et luminescence (Figure 57-2/3).

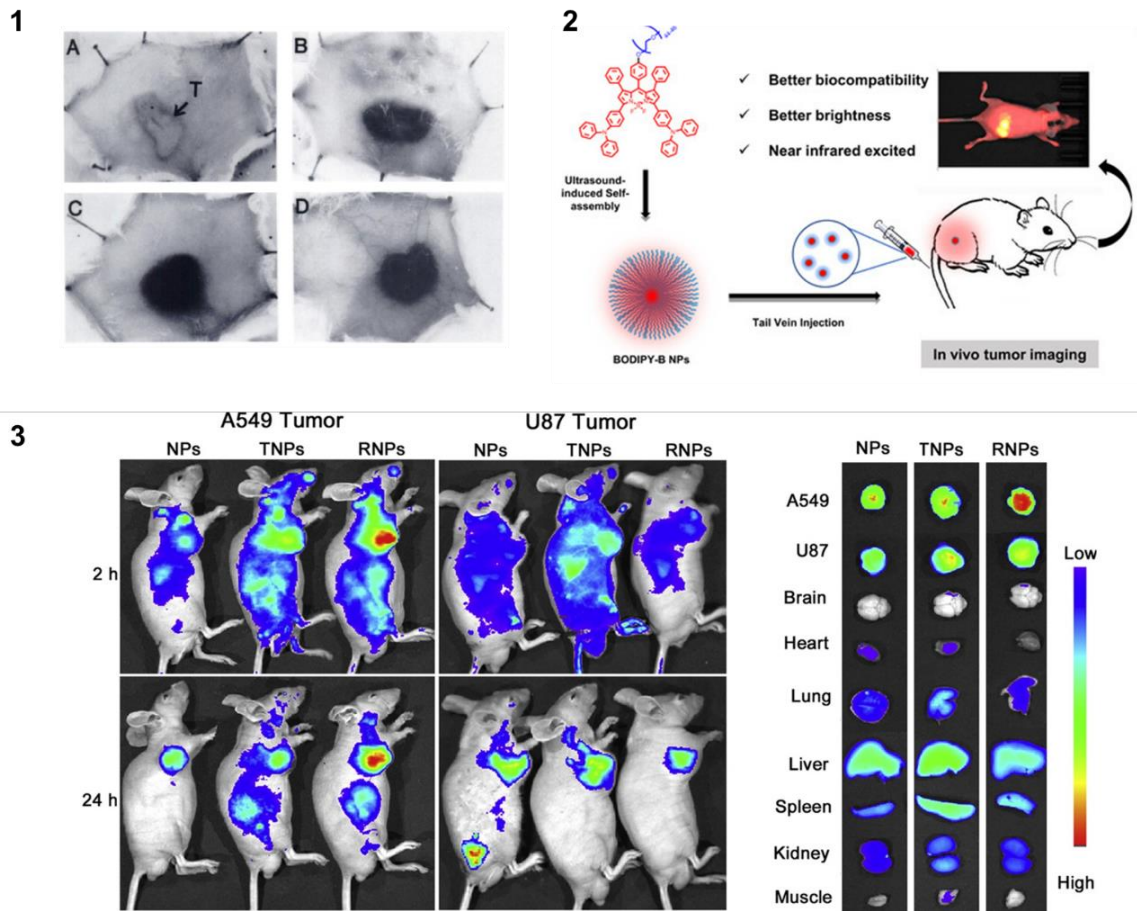


Figure 57 : L'effet Enhanced Permeation and Retention (EPR)

(1) Observation initiale de l'accumulation d'albumine marquée au bleu d'Evans dans une xénogreffe de sarcome implantée en sous-cutané chez la souris. Après développement tumoral, l'albumine marquée au bleu d'Evans est injectée par voie systémique aux animaux. Les souris sont sacrifiées à différents temps après injection et la peau comprenant la zone tumorale est disséquée : (A) Tumeur contrôle sans injection d'albumine marquée. Accumulation de l'albumine marquée à (B) 6 heures, (C) 24 heures, et (D) 72 heures après injection (Matsumura and Maeda, Cancer Research, 46, 6387-6392, 1986). (2) Visualisation de l'effet EPR dans un modèle murin. Accumulation de nanoparticules formulées à partir de deux molécules de bore-dipyrométhène (BODIPY), BDP-A et BDP-B, modifiées avec un poly(éthylène glycol), PEG, émettant dans le proche infrarouge, NIR (J. Wang et al., 2023). (3) Détection de nanoparticules fluorescentes dans des tumeurs xénogreffes de cellules cancéreuses pulmonaires (A549) et de glioblastome (U87) chez la souris nue. Les nanoparticules utilisées sont soit des nanoparticules contrôles non fonctionnalisées (NPs) soit des nanoparticules fonctionnalisées par des peptides de pénétration cellulaire (CPPs : *Cell Penetrating Peptides*) : les nanoparticules TNPs fonctionnalisées par le peptide R8 (CPP utilisé ici comme contrôle) et les nanoparticules RNPs fonctionnalisées par le peptide RLW ciblant les cellules cancéreuses A549. L'imagerie *in vivo* corps entier démontre que les RNPs ciblent mieux les xénogreffes A549 que les xénogreffes U87. La dissection des organes, à droite, démontre que l'ensemble des nanoparticules (fonctionnalisées ou non) s'accumulent fortement dans le foie et la rate. Il est important de noter que la distribution des RNPs dans les organes sains était approximativement la même que celle des nanoparticules non modifiées (NPs) (Gao et al., 2015).

Dans la circulation sanguine, les nanovecteurs doivent traverser la paroi des vaisseaux pour atteindre leur(s) cible(s). Dans les tissus normaux, les jonctions serrées entre les cellules limitent le passage des nanovecteurs. À l'inverse, dans les tissus tumoraux et sur les sites infectieux ou inflammatoires, l'endothélium vasculaire est plus perméable car il est partiellement disjoint ménageant des pores entre les cellules endothéliales (Figure 58). De plus, les cellules tumorales produisent différents facteurs tels que le monoxyde d'azote (NO) et les prostaglandines qui vont augmenter la perméabilité vasculaire (Islam et al., 2022; Prabhakar et al., 2013). Cela permet aux nanovecteurs ayant une taille de 10 à 500 nm de quitter le compartiment vasculaire *via* les pores de l'endothélium pour s'accumuler dans l'espace interstitiel. Par ailleurs, les vaisseaux lymphatiques sont généralement absents ou non-

II. NANOMEDECINE

fonctionnels au niveau tumoral. L'accumulation des nanovecteurs est donc d'autant plus importante qu'ils vont difficilement sortir de la tumeur du fait d'un faible drainage lymphatique. Cela ne s'applique pas aux nanovecteurs de trop petite taille qui ne sont pas retenus au niveau du tissu tumoral car ils sont éliminés par diffusion hors de l'espace interstitiel. Par ailleurs, au moins dans certaines tumeurs, l'hétérogénéité cellulaire, la présence de matrice extracellulaire et des conditions physicochimiques particulières, comme l'acidose ou l'hypoxie, peuvent également contribuer à l'accumulation de NPs dans la tumeur solide et à leur lente clairance (Song et al., 2014).

Le foie et la rate possédant, eux aussi, un endothélium vasculaire fenêtré, il peut donc y avoir une extravasation « spontanée » des nanovecteurs au niveau de ces organes normaux (Figure 57-3). Dans le foie, les nanovecteurs peuvent donc s'accumuler dans l'espace de Disse où ils seront au contact des cellules de Küpffer qui sont capables de les éliminer par phagocytose.

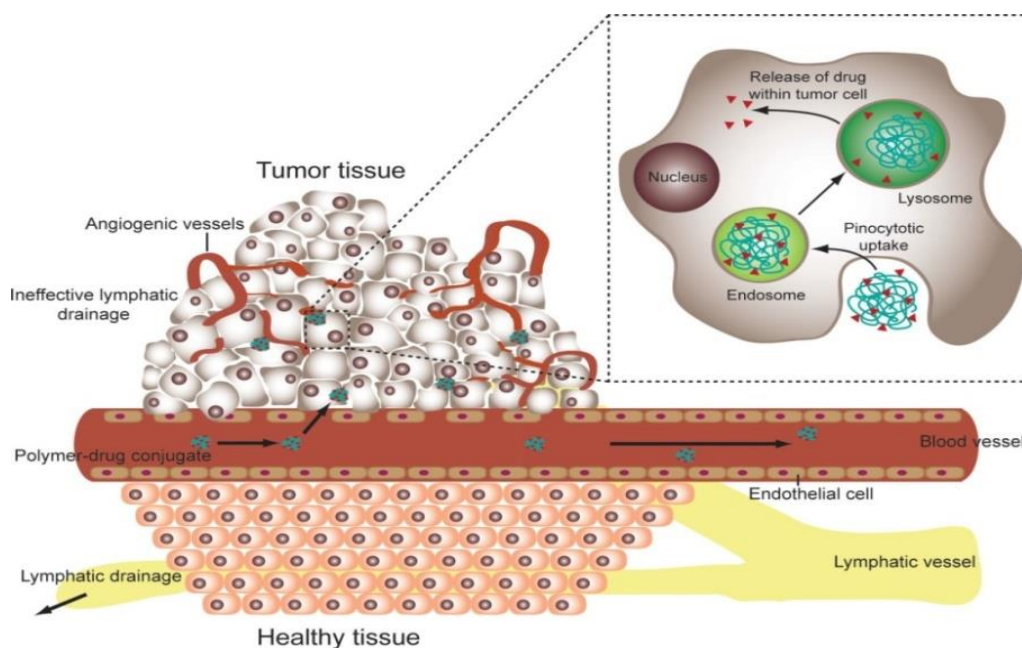


Figure 58 : Représentation schématique de l'effet EPR

L'effet EPR repose sur l'extravasation de nanoparticules de taille $\approx 100-500$ nm dans les zones vasculaire où l'endothélium des vaisseaux sanguins est disjoint et/ou fenêtré. L'accumulation des NPs dans la zone tumorale est également due à un faible drainage lymphatique. Par ailleurs, la présence d'éléments matriciels et l'infiltration de cellules immunitaires à activité phagocytaire peuvent concourir à l'effet EPR. (Fox et al., 2009).

Alors que l'effet EPR est bien documenté dans la majorité des modèles murins de cancers et largement accepté par la communauté scientifique, l'effet EPR chez l'Homme est très controversé, alors qu'il est un des piliers conceptuels de l'utilisation des nanovecteurs en cancérologie (Bertrand & Leroux, 2012; Youden et al., 2022). Par ailleurs, même pour les modèles murins de tumeurs xéno greffées pour lesquelles un effet EPR est attesté, certaines études ont conclu que seulement moins de 1% des doses de NPs injectées atteignent les sites tumoraux (Dai et al., 2018; Penn et al., 2018; Wilhelm et al., 2016), remettant en cause la stratégie des nanomédecines en oncologie. Cependant, les mesures réalisées dans ces études représentent la quantité de NPs détectée dans les tumeurs à chaque temps d'évaluation tout au long de la période de mesure (Dai et al., 2018; Penn et al., 2018; Wilhelm et al., 2016). Après une étude pharmacocinétique établie à partir des mêmes mesures ponctuelles, Price et collaborateurs concluent que l'exposition globale de la tumeur aux NPs était de 76,12% de la quantité présente dans le sang (Price et al., 2020). Ces deux analyses contradictoires obtenues à partir du même

II. NANOMEDECINE

ensemble de données présentent une différence potentielle d'accumulation de NPs dans la tumeur d'environ 113 fois, soulignant surtout la méconnaissance de la pharmacocinétique et de la distribution des NPs, et le manque de pertinence des paramètres d'évaluation de l'adressage tumoral (McNeil, 2016).

Il existe de nombreux paramètres liés à l'effet EPR qui peuvent varier selon les types de tumeurs (Figure 59), entraînant probablement de grandes différences dans l'extravasation et la rétention des NPs aux sites tumoraux (Cabral et al., 2011; Stylianopoulos & Jain, 2013). Par exemple, les dimensions des fenestrations vasculaires peuvent être différentes d'une tumeur à l'autre et cette différence est d'autant plus marquée entre les tumeurs primaires et métastatiques (Carmeliet & Jain, 2011; Maeda, 2015; Maeda et al., 2013; Prabhakar et al., 2013). Les tumeurs présentent aussi des degrés variables de drainage lymphatique et d'infiltration de macrophages qui affectent très certainement l'absorption des NPs (Dai et al., 2018; Penn et al., 2018). Ces paramètres modulant l'effet EPR peuvent, en outre, varier en fonction des patients, potentiellement selon leur âge, leur sexe, leur composition corporelle, le sous-type de cancer dont ils sont atteints (avec l'exemple du CHC décrit en chapitre I), leur(s) pathologie(s) sous-jacente(s) et leur(s) comorbidité(s), c'est-à-dire un ensemble de facteurs extrinsèques aux NPs. Ceci conduit différents auteurs à proposer des phénotypes tumoraux insensibles ou sensibles à l'effet EPR prenant en compte la micro-architecture tumorale et la complexité du micro-environnement notamment l'importance de l'infiltrat macrophagique (Dhaliwal & Zheng, 2019; Youden et al., 2022).

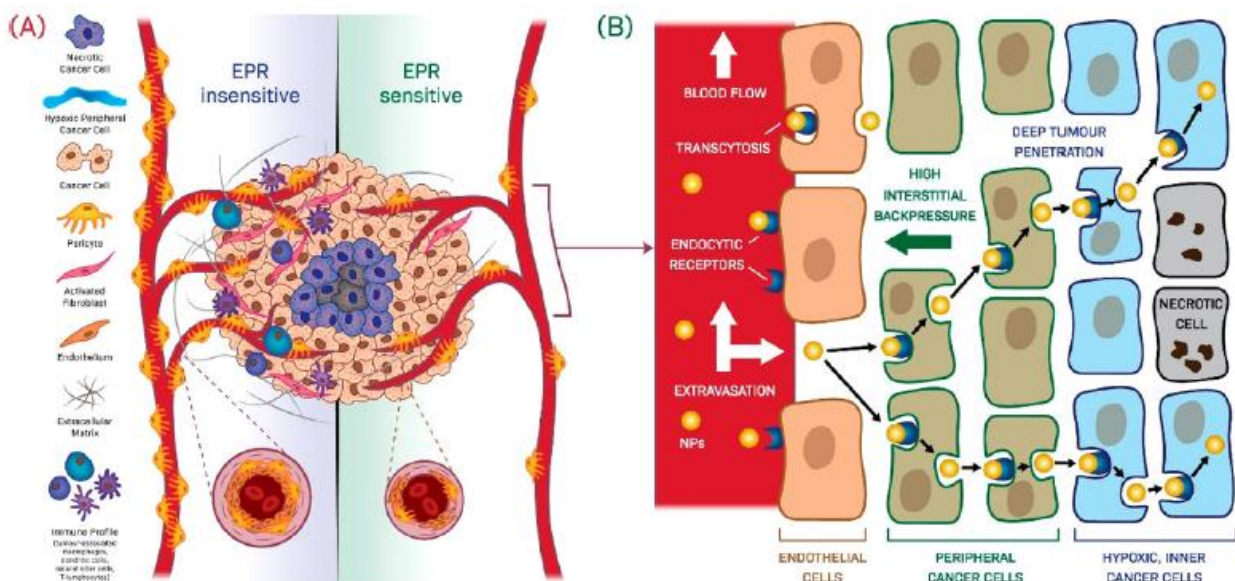


Figure 59 : Degrés variables de l'effet EPR en fonction des tumeurs

(A) Représentation schématique d'une tumeur solide et des barrières pouvant affecter l'effet EPR. De multiples facteurs intrinsèques aux sous-types tumoraux influencent le degré d'accumulation des NPs aux sites tumoraux définissant des tumeurs sensibles ou insensibles à l'effet EPR. (B) Mécanisme du ciblage passif et actif des cellules tumorales par les NPs. D'après (Dhaliwal & Zheng, 2019; Youden et al., 2022).

Il n'en demeure pas moins que plusieurs études cliniques chez l'Homme démontrent bien l'accumulation de NPs dans certaines tumeurs solides, notamment par l'utilisation de la tomographie par émission de positons (TEP) détectant des nanovecteurs radiomarqués avec l'exemple, décrit dans la Figure 60, des micelles ^{89}Zr -CPC634 (Hu et al., 2016) formulées à partir de méthoxy poly(éthylène

II. NANOMEDECINE

glycol)-*b*-poly[N-(2-hydroxypropyle) méthacrylamide-lactate]) radiomarquées au Zirconium-89 (^{89}Zr) qui s'accumulent dans les sites tumoraux visualisés par le 2-désoxy-2-(^{18}F)fluoro-D-glucose ou fluorodésoxyglucose radiomarké au fluor-18 (^{18}F -FDG) confirmant un effet EPR (Miedema et al., 2022).

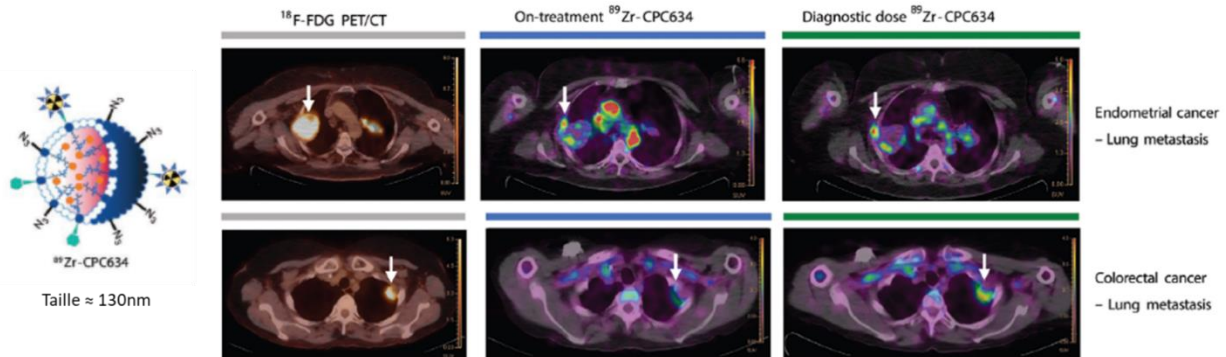


Figure 60 : Visualisation et quantification de l'accumulation tumorale de ^{89}Zr -CPC634 objectivant un effet EPR chez l'Homme

Deux exemples représentatifs d'accumulation tumorale des micelles ^{89}Zr -CPC634, 96 h après administration, les flèches indiquent les lésions tumorales également visualisées par le ^{18}F -FDG. D'après (Miedema et al., 2022).

c. Ciblage actif et nanovecteurs de 3^{ème} génération

Le ciblage actif peut venir s'ajouter au ciblage passif pour augmenter l'accumulation des nanovecteurs de 3^{ème} génération sur le site d'intérêt et améliorer la spécificité de la délivrance du PA (Blanco et al., 2015). Il implique la présence d'un ou plusieurs ligands à la surface des nanovecteurs leur permettant de se lier à leur(s) cible(s). Le ligand utilisé doit être, en théorie, capable de reconnaître un récepteur surexprimé par les cellules tumorales ou par les cellules des vaisseaux de la tumeur (Figure 59B). De plus, ce récepteur doit être peu ou pas exprimé par les cellules saines afin de minimiser l'impact du traitement sur les tissus sains. Les interactions spécifiques qui ont lieu entre les ligands présents à la surface du nanovecteur et les récepteurs surexprimés présents à la surface de la cellule ciblée définissent théoriquement un « tropisme » et facilitent l'internalisation du complexe ligand-récepteur *via* un mécanisme d'endocytose médié par le récepteur ciblé et un transport vésiculaire par des endosomes (paragraphe « d- Internalisation cellulaire des nanoparticules ») (Wicki et al., 2015; Yoo et al., 2019).

Une large gamme de ligands est utilisée et/ou évaluée dans le contexte du ciblage actif (Figure 61). Ces ligands peuvent être soit de petites molécules comme l'acide folique (Ibrahim et al., 2023) et certains glucides, soit des macromolécules comme des peptides, des protéines, des anticorps, des aptamères et des oligonucléotides (Qin et al., 2017; Wicki et al., 2015; Youden et al., 2022; Y. Zhu et al., 2018).

Dans le cas des NPs conjuguées à des anticorps monoclonaux, ces derniers sont capables de se lier sur un antigène préférentiellement présent à la surface des cellules cancéreuses. L'anticorps du récepteur de facteur de croissance épidermique (epidermal growth factor receptor, EGFR), l'anti-EGFR, et celui du récepteur du facteur de croissance vasculaire endothélial VEGFR, l'anti-VEGFR, ont été les plus étudiés dans les systèmes de vectorisations conçus pour le ciblage actif (H. Chen et al., 2013; Ku et al., 2014).

II. NANOMEDECINE

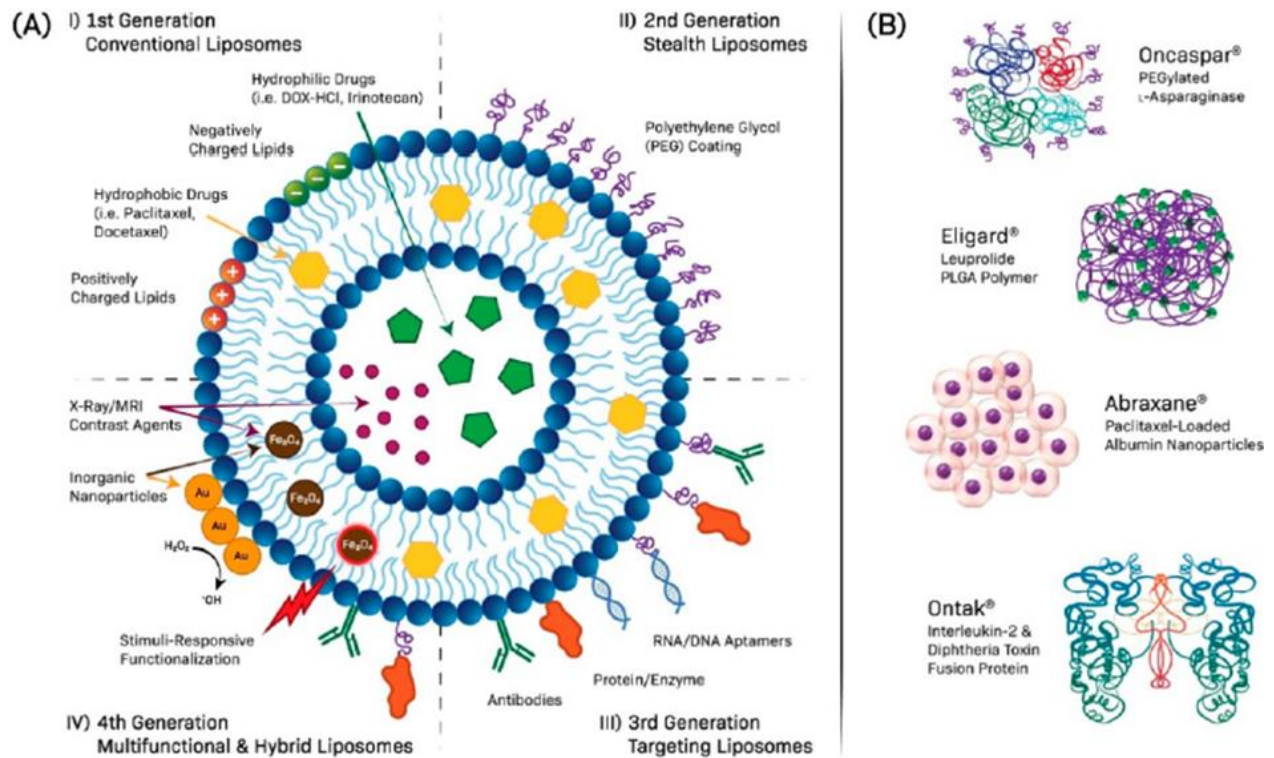


Figure 61 : Nanoparticules organiques utilisées dans les stratégies de traitement anticancéreux présentant des fonctionnalisations possibles pour les 3^{ème} et 4^{ème} générations

(A) Les liposomes, formulations les plus largement utilisées, et les NPs sont classés en quatre générations distinctes en fonction de développements progressifs, déjà présentés en partie II.1.3. Les liposomes dits « ciblant » (3^{ème} génération) arborent en surface des ligands spécifiques pour cibler la tumeur. Les liposomes multifonctionnels (4^{ème} génération), tels que des composites hybrides organiques-inorganiques, peuvent être utilisés à la fois pour le diagnostic et le traitement des tumeurs solides. (B) Exemples de nanoparticules organiques non liposomales cliniquement approuvées. D'après (Youden et al., 2022).

Le ciblage actif est un domaine de recherche en fort développement portant sur la modification de surface des NPs. L'adjonction de PEG à la surface des NPs réduit grandement leur captation par tous les types cellulaires, macrophages inclus (Verhoef & Anchordoquy, 2013). Des données obtenues avec nos NPs formulées à partir de dérivés de PMLABe₇₃ et PEG_{42-b}-PMLABe₇₃ allant dans ce sens seront présentées en chapitre I des résultats. La fonctionnalisation par un ligand de ciblage doit donc, en théorie, maintenir le caractère de furtivité vis-à-vis du système immunitaire (Moghimi et al., 2001; Owens & Peppas, 2006; Tenzer et al., 2013), pour peu que le ligand ne soit pas fortement reconnu par les opsonines et/ou le système phagocytaire mononucléaire, mais également apporter la reconnaissance des cellules cibles.

Dans ce contexte de ciblage, il est important de considérer la formation de la couronne protéique (protein corona) par le phénomène d'opsonisation en surface des NPs, phénomène brièvement décrit dans le paragraphe II.1.3. Il est, par contre, important de noter que parmi les protéines s'associant aux NPs, l'albumine est toujours fortement représentée dans les analyses protéomiques des NPs opsonisées. Bien que n'ayant pas de rôle direct dans la réponse immunitaire, la présence de quantités variables d'albumine peut conditionner la reconnaissance par des cellules immunitaires ou l'interaction avec des cellules normales ou cancéreuses. Par ailleurs, il a également été démontré que

II. NANOMEDECINE

la fixation de l'albumine à des NPs à base de magnétite (NPs de Fe_3O_4) était réduite par leur fonctionnalisation successive par l'argent ou un « revêtement » argent et chitosan (Pieretti et al., 2021)

Les protéines interagissent avec les NPs par différents mécanismes, principalement électrostatiques, hydrophobes et par liaisons hydrogène. Les lipoprotéines sont particulièrement enrichies dans la couronne protéique des NPs, probablement par interaction directe avec les lipides dans le cas des liposomes et des NPs lipidiques (H. Lee, 2021; Sebastiani et al., 2021), et du noyau hydrophobe des NPs polymères. Fait intéressant, des rapports ont récemment montré que les protéines de la couronne, y compris l'ApoE, induisent des réarrangements structurels des NPs qui peuvent avoir un impact sur leur internalisation cellulaire et leur biodistribution globale *in vivo* (H. Li et al., 2021). Le phénomène d'opsonisation étant qualitativement et quantitativement un changement majeur dans les paramètres physicochimiques des NPs, il a été proposé que cette couronne protéique puisse être un déterminant du tropisme et de la pharmacocinétique des NPs, et que sa modulation puisse contribuer à améliorer le tropisme tissulaire, notamment vers les sites tumoraux (Aliyandi et al., 2020; Khedri et al., 2022; Lazarovits et al., 2019).

Dans un travail publié en 2016 utilisant des copolymères à blocs poly(acide β -malique)-*b*-poly(β -hydroxybutyrate) (PMLA-*b*-PHB) et poly(acide β -malique)-*b*-poly(triméthylène carbonate) (PMLA-*b*-PTMC), nous avons montré que l'opsonisation des NPs non fonctionnalisées formulées à partir de ces copolymères était très rapide (quelques minutes) et que l'adsorption protéique variait en fonction de la nature du polymère et de la longueur des chaînes des deux copolymères (Vene et al., 2016) (Figure 62). De plus, nous avons observé que la captation de ces NPs par les macrophages ne variait que très peu en absence ou présence de sérum de veau fœtal dans le milieu de culture (Figure 62). De façon intéressante, l'internalisation des NPs par des cellules d'hépatome HepaRG était impactée par la présence de sérum, soit à la baisse soit à la hausse en fonction de la nature du copolymère. Ces résultats, bien qu'ayant été observés avec des NPs non fonctionnalisées, confirme l'hypothèse d'une influence primordiale de la nature du (co)polymère sur le degré d'opsonisation et d'internalisation des NPs par des cellules en culture.

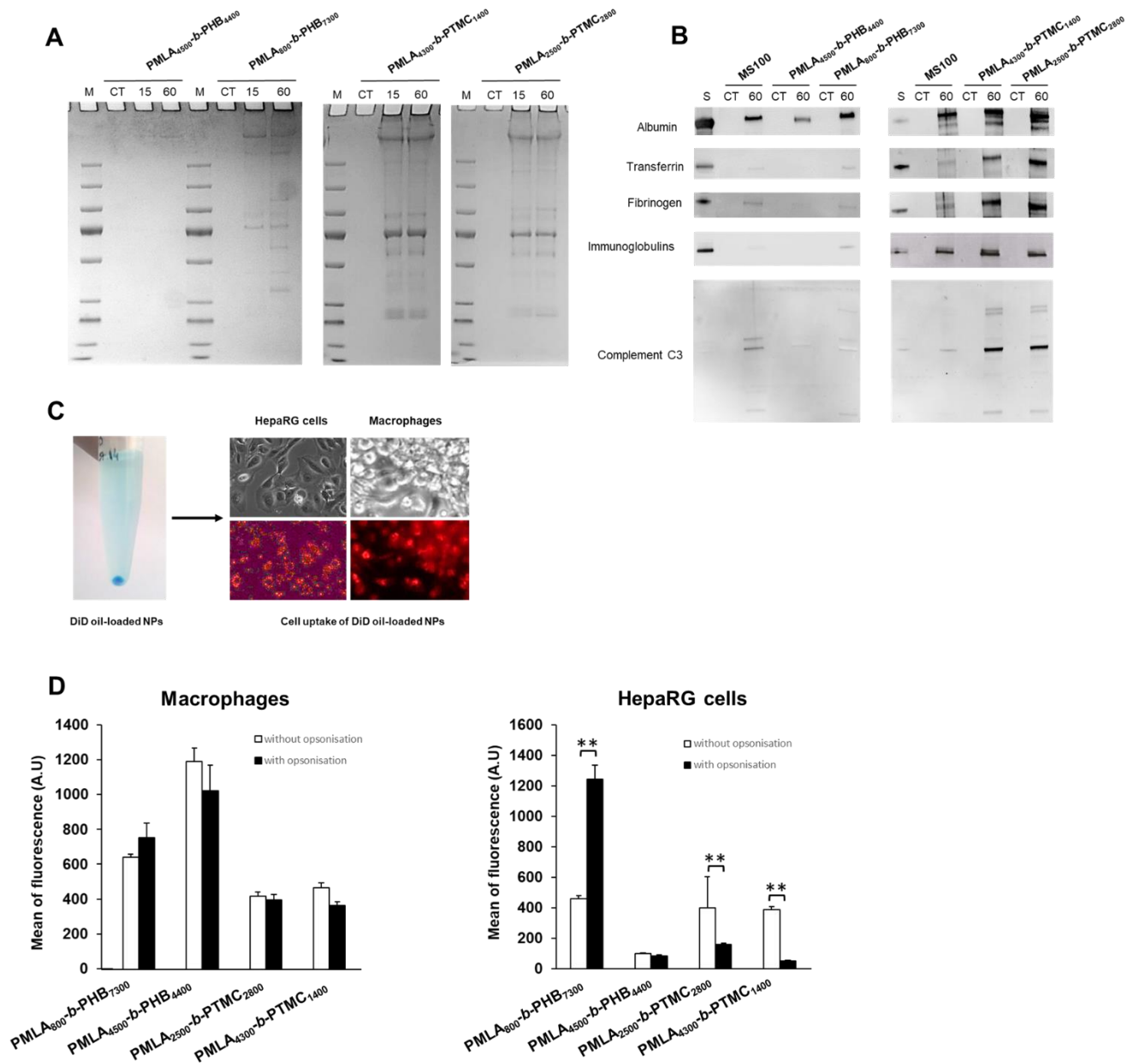


Figure 62 : Influence de la nature de copolymères sur l'opsonisation et la captation de NPs

(A) Des NP formulées à partir de copolymères à blocs poly(acide β -malique)-*b*-poly(β -hydroxybutyrate) (PMLA-*b*-PHB) et poly(acide β -malique)-*b*-poly(triméthylène carbonate) (PMLA-*b*-PTMC) ont été incubées en présence de sérum humain pendant 15 et 60 minutes. Après élimination du sérum et lavages des NPs, les protéines fixées sur le NPs ont été réduites et dénaturées. Des volumes équivalents de « lysats » ont été déposés sur gel de polyacrylamide et les protéines ont été détectées par coloration au bleu de Coomassie. (B) Les mêmes lysats ont été également analysés par western blot en utilisant des anticorps dirigés contre l'albumine, la transferrine, le fibrinogène, les immunoglobulines (chaines lourdes) et la protéine C3 du complément (précurseur et forme clivée). En parallèle, l'internalisation de ces NPs, encapsulant le fluorochrome DiDiol, par : (C) des macrophages humains en culture primaires et (D) des cellules d'hépatome humain HepaRG, a été étudiée en cytométrie de flux. Le degré d'internalisation est exprimé par l'intensité de fluorescence (mean, unité arbitraire).

Les effets des protéines sériques et de l'opsonisation sur l'endocytose, en particulier pour des cellules cancéreuses, suscitent un débat parmi les chercheurs (Carnovale et al., 2019; Lesniak et al., 2013). L'endocytose médiée par les récepteurs est largement acceptée comme une voie principale

d'internalisation des NPs. Par contre, pour que celle-ci se produise via un ligand de ciblage, la formation de la couronne protéique ne doit pas masquer le ligand. Une absorption accrue de NPs par les cellules cancéreuses *in vitro* a été souvent observée dans les milieux contenant du sérum. Cependant, d'autres études récentes ont également montré une absorption accrue dans les milieux sans sérum (Guarnieri et al., 2011; Jiang et al., 2015; Salvati et al., 2013; Smith et al., 2012). Ainsi, certains chercheurs pensent que la couronne protéique pourrait limiter l'absorption des NPs en inhibant les interactions membranaires spécifiques entre le ligand et son récepteur ciblé (Brun & Sicard-Roselli, 2014; Salvati et al., 2013). Il est donc crucial de mieux caractériser les effets positifs du ciblage tumoral et le rôle de la couronne protéique dans la modulation du ciblage. Ce sujet, en partie abordé au cours de la thèse, sera plus particulièrement décrit dans le chapitre II des résultats puisque nous avons recherché des peptides de ciblage des cellules d'hépatome.

A notre connaissance, en excluant les anticorps conjugués, il n'y a pas de liposomes ou NPs polymères fonctionnalisés ayant reçu une autorisation de mise sur le marché en oncologie, mais de multiples essais cliniques sont en cours (Youden et al., 2022). La difficulté à faire aboutir des nanoparticules fonctionnalisées par des agents de ciblage aux applications cliniques en oncologie peut s'expliquer par une efficacité négligeable du ciblage en raison de la diffusion réduite des NPs dans les tumeurs solides à partir d'une administration systémique, de leur internalisation par les macrophages au sein des tumeurs (Dai et al., 2018; Penn et al., 2018) et par le système phagocytaire mononucléaire dans le foie et la rate, rejoignant la controverse autour de l'efficacité du ciblage passif décrit précédemment (Dai et al., 2018; Penn et al., 2018; Qin et al., 2017; Wicki et al., 2015; Y. Zhu et al., 2018). Ceci conduit également à proposer une administration locale en oncologie, par exemple une injection intratumorale lorsque celle-ci est possible (Marques et al., 2021).

De plus, le manque de données en nanotoxicologie contribue également à la difficulté de mener des formulations de NPs vers l'utilisation clinique en routine. Il existe peu d'études ayant abordé l'impact dans des modèles animaux après une exposition chronique à des NPs (He et al., 2019; Najahi-Missaoui et al., 2020). L'écart entre les observations précliniques et cliniques s'explique également par les tumeurs artificielles de rongeurs (tumeurs modèles) qui ne parviennent pas à imiter les tumeurs humaines sur de nombreux aspects. Le développement de modèles *in vivo* qui reflètent étroitement la biologie du cancer humain améliorerait sans doute leur pouvoir prédictif. Outre les différences physiopathologiques entre les espèces modèles animaux et les humains, l'hétérogénéité entre les patients et les types de tumeurs, en termes de caractéristiques moléculaires et phénotypiques et de l'effet EPR, peut également limiter le succès clinique des nanomédicaments. Il pourrait être imaginé de quantifier l'effet EPR sur les tumeurs des patients pour identifier ceux qui bénéficieraient le plus du traitement avec des NPs thérapeutiques. Malgré des progrès lents, le ciblage actif des NPs reste un sujet de recherche crucial pour le traitement du cancer, sous la forme de NPs, lipidiques ou polymères, conjuguées à des ligands spécifiques et intégrant de nouvelles classes de PAs tels que les inhibiteurs de protéines kinases. En regardant vers l'avenir, on peut s'attendre à ce que davantage de collaborations de recherche interdisciplinaires ouvrent de nouvelles voies pour le développement de systèmes de NPs ciblant les tumeurs et, ainsi, accélérer leur validation clinique.

d. Internalisation cellulaire des nanoparticules

A côté de l'effet EPR, la capacité des cellules de mammifères à internaliser des NPs constituait une autre raison de développer les nano-objets pour la vectorisation de PAs, notamment en oncologie. Des travaux fondateurs montraient, dès les années 70, la possibilité de formuler des NPs, d'y encapsuler les PAs, d'obtenir leur endocytose par des cellules en culture et de générer un effet cytotoxique (Brasseur et al., 1980; Couvreur et al., 1977). Il est bien établi aujourd'hui que l'internalisation dans les

II. NANOMEDECINE

cellules s'opère via différentes voies d'endocytose en fonction de la nature des NPs (Figure 63), à l'exception des macrophages et cellules dendritiques, notamment dans le foie et la rate, qui internalisent les NPs grâce à leur forte activité phagocytaire (Youden et al., 2022).

Même s'il est difficile de trouver des études comparant la capacité d'internalisation de NPs entre des cellules saines et des cellules cancéreuses pour un même tissu, nos données obtenues pendant la thèse semblent indiquer une plus forte endocytose de NPs par les cellules d'hépatome que des hépatocytes sains en culture primaire.

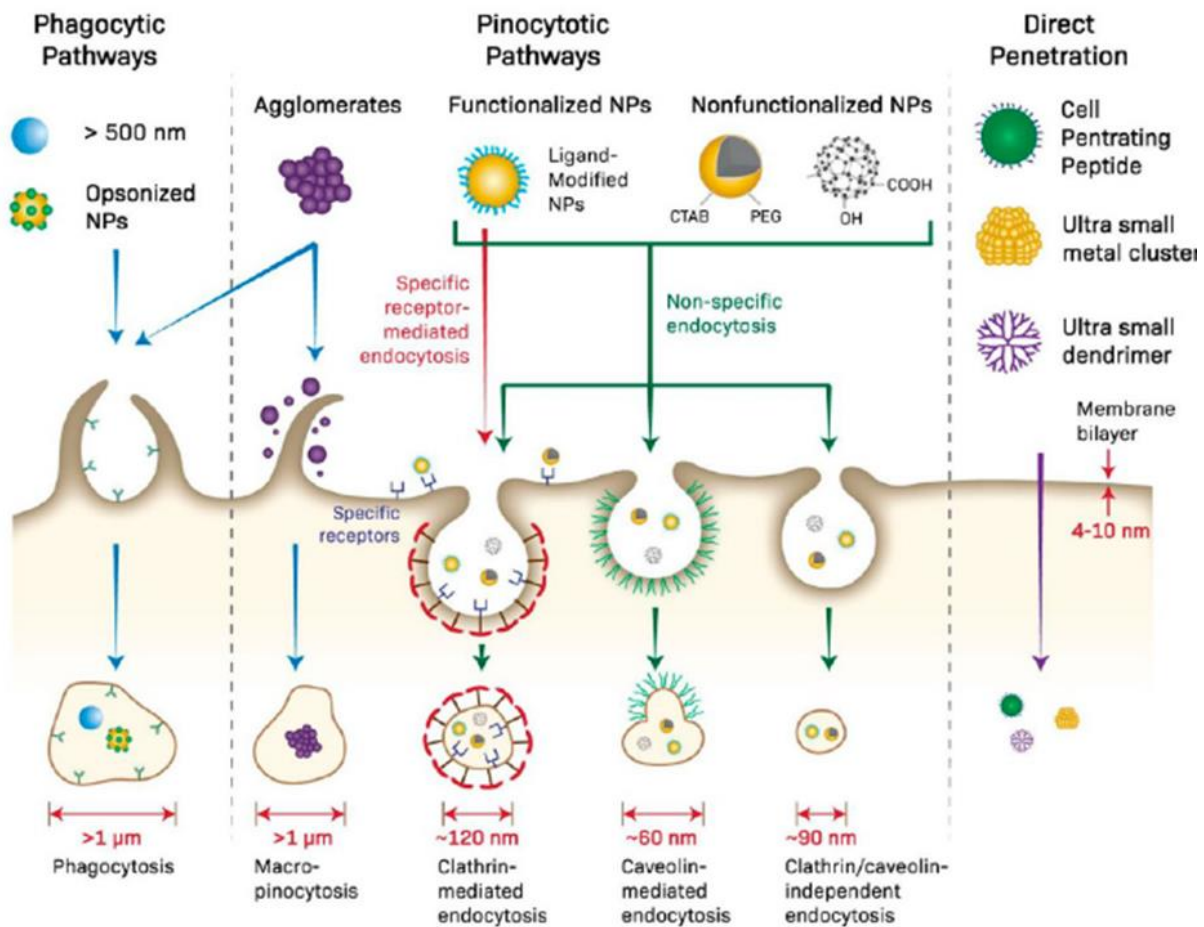


Figure 63 : Mécanismes d'internalisation cellulaires pour différents types de NPs

La phagocytose est la voie préférentielle pour les grandes NPs (>500 nm) et agrégées, et pour la plupart des NPs dans les macrophages. Les NPs de petites tailles peuvent diffuser ou fusionner directement à travers les membranes lipidiques. Cependant, la plupart des NPs lipidiques ou polymères sont internalisées par l'une des voies d'endocytose en fonction de leur mode d'interaction avec les cellules et de leurs propriétés physicochimiques. D'après (Youden et al., 2022).

«

Après internalisation ou fusion des liposomes ou NPs avec la membrane plasmique, les nanovecteurs progressent dans le système endosomal ou lysosomal. Alors que les mécanismes d'internalisation sont relativement bien connus, le trafic intracellulaire des NPs, leur déstabilisation et la libération de leur contenu, acides nucléiques (Juliano, 2018) ou chimiothérapies (B. Chen et al., 2017), restent mal cernés. Dans ce domaine, de nombreuses recherches sont menées pour optimiser des formulations sensibles au pH, à l'hypoxie, au stress oxydant ou des stimuli appliqués aux cellules qui faciliteraient la libération des principes actifs.

e. Nanoparticules et thérapies anticancéreuses

Les recherches conduites dans les 20 dernières pour le développement de nanovecteurs à visée diagnostique et/ou thérapeutique en oncologie proposent de multiples stratégies qui sont schématisées en Figure 64 (Youden et al., 2022).

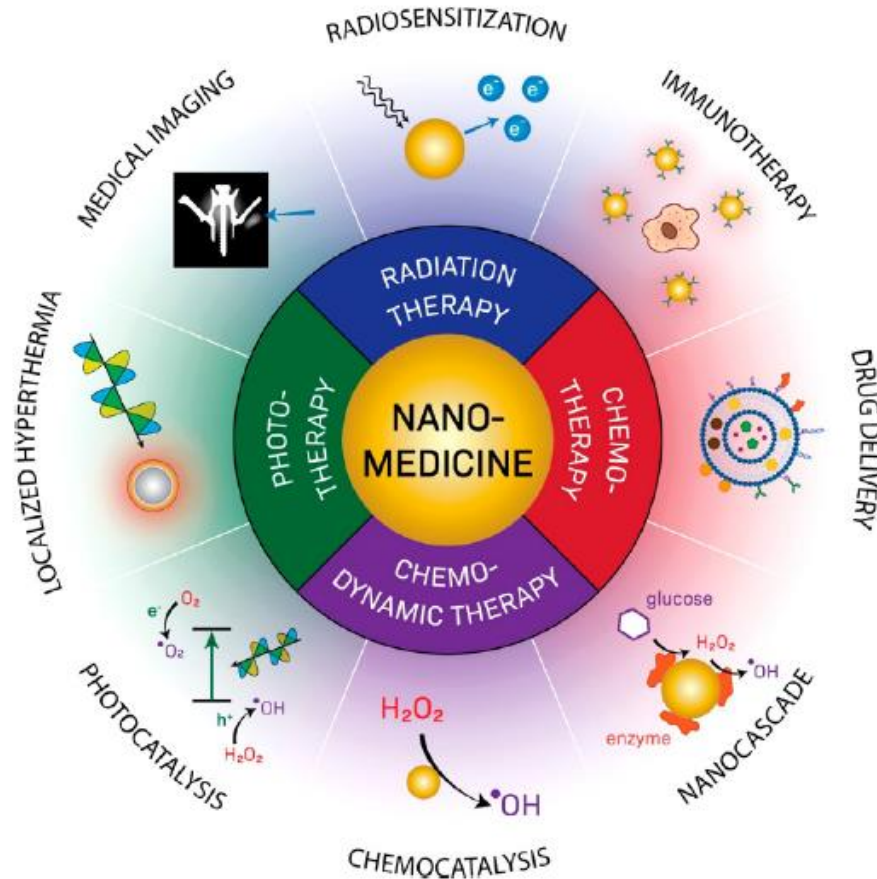


Figure 64 : Stratégies anticancéreuses basées sur la nanomédecine

Les structures des NPs ainsi que les PAs encapsulés ont été largement diversifiés dans les dernières années pour donner un ensemble d'options thérapeutiques incluant la photothérapie, les thérapies chimiodynamiques, la radiothérapie sensibilisée et l'administration de PAs. D'après (Youden et al., 2022).

A côté de l'encapsulation de chimiothérapies anticancéreuses (PAs cytotoxiques ou thérapies ciblées comme les inhibiteurs de tyrosine kinase), l'association d'un nanovecteur avec des immunothérapies, des radionucléides ou des agents permettant d'induire une hyperthermie, une photoréaction ou la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont autant de pistes en développement et/ou en cours d'évaluation pré-cliniques et cliniques (Youden et al., 2022).

Aujourd'hui, un nombre limité de formulations a été transféré en pratique clinique (Figure 65), essentiellement des liposomes de 1^{ère} et 2nd génération.

II. NANOMEDECINE

Doxil Caelyx (Janssen)	PEGylated liposome	Doxorubicin	Ovarian cancer, HIV-associated Kaposi's sarcoma, Multiple myeloma	FDA (1995) EMA (1996)
DaunoXome (Galen)	Liposome (non-PEGylated)	Daunorubicin	HIV-associated Kaposi's sarcoma	FDA (1996)
Myocet (Teva UK)	Liposome (non-PEGylated)	Doxorubicin	Breast cancer	EMA (2000)
Abraxane (Celgene)	Albumin-particle	Paclitaxel	Advanced non-small cell lung cancer, Metastatic pancreatic cancer, Metastatic breast cancer	FDA (2005) EMA (2008)
Marqibo (Spectrum)	Liposome (non-PEGylated)	Vincristine	Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia	FDA (2012)
MEPACT (Millennium)	Liposome (non-PEGylated)	Mifamurtide	Osteosarcoma	EMA (2009)
NBTXR3 Hensify (Nanobiotix)	Hafnium oxide nanoparticles	Stimulated with external radiation to enhance tumor cell death via electron production	Squamous cell carcinoma	CE Mark (2019)
Onivyde MM-398 (Merrimack)	PEGylated liposome	Irinotecan	Metastatic pancreatic cancer	FDA (2015)
VYXEOS CPX-351 (Jazz Pharmaceuticals)	Liposome	Cytarabine:daunorubicin (5:1 molar ratio)	Acute myeloid leukemia	FDA (2017) EMA (2018)

Figure 65 : Exemples de nanoparticules ayant reçu une autorisation de mise sur le marché pour des applications en oncologie

Les liposomes de 1^{ère} génération et des liposomes PEGylés sont les exemples les plus connus, auxquels viennent s'ajouter les agrégats d'albumine et les nanoparticules d'oxyde d'hafnium. D'après (Youden et al., 2022).

Les liposomes sont des systèmes vésiculaires constitués d'une ou plusieurs bicouches de phospholipides organisés en phases lamellaires encapsulant un ou plusieurs compartiments aqueux (Figure 66). Ces nanovecteurs sont non toxiques et biocompatibles, ce qui en fait des systèmes intéressants pour les applications en nanomédecine. Utilisés depuis de nombreuses années, les liposomes sont les premiers nanovecteurs à avoir obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM). En effet, depuis 1996, le Caelyx (doxorubicine liposomale PEGylée) est commercialisée en Europe pour le traitement du cancer du sein métastatique, du cancer ovarien, du myélome multiple et de la maladie de Kaposi. Aux Etats-Unis, ce médicament est commercialisé sous le nom Doxil[®]. Plusieurs autres formulations comme le DaunoXome[®] et le Myocet[®], deux liposomes non PEGylés encapsulant respectivement la daunorubicine et la doxorubicine, sont utilisés en clinique.

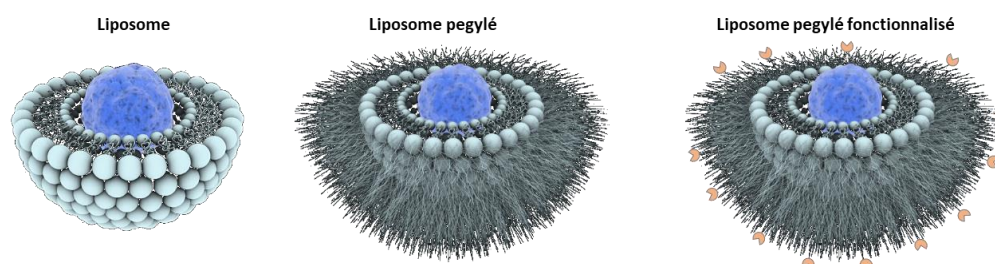


Figure 66 : Représentation de la structure de liposomes conventionnels ou PEGylés

Ces structures peuvent encapsuler des principes actifs dans leur compartiment intérieur, en phase aqueuse, ou dans la bicouche lipidique dans le cas d'une molécule lipophile.

II. NANOMEDECINE

L'abraxane® est une nanoparticule formée par l'agrégation d'albumine humaine conjuguée avec du paclitaxel, un agent de chimiothérapie (Lopez-Trabada Ataz et al., 2015). Ce système de transport de PA est appelé nab™-technologie, nab signifiant « *nanoparticle albumin-bound* ». En 2007, l'Abraxane® (nab™-paclitaxel) a obtenu l'AMM pour le traitement du cancer du sein, de l'adénocarcinome du pancréas et du cancer bronchique non à petites cellules (Figure 67). Ce nanovecteur permet de s'affranchir de la présence du crémophor pour solubiliser le paclitaxel en milieu aqueux et donc de diminuer la toxicité associée à l'utilisation de ce solvant. De plus, le nab™-paclitaxel augmente la pénétration du cytotoxique dans les tissus tumoraux en traversant la barrière de cellules endothéliales par transcytose et effet EPR (Yardley, 2013).

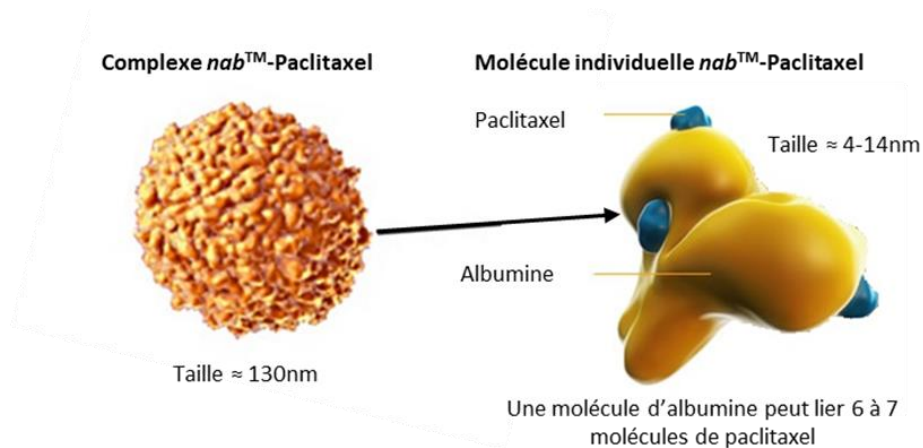


Figure 67 : La technologie « Nanoparticle albumin-bound (nab™) »

La formulation d'agrégats d'albumine fixant le paclitaxel ou Abraxane® (nab™-paclitaxel) est formée de monomères d'albumine complexant plusieurs molécules de paclitaxel. Source : <https://www.abraxane.com>

Une nanoparticule d'oxyde d'hafnium (NBTXR3) a récemment obtenu le marquage CE dans une application en radiothérapie. La société française Nanobiotix a ainsi conçu une nanoparticule baptisée NanoXray, constituée d'oxyde d'hafnium. La formulation NBTXR3 (Hensify®) est une solution aqueuse de NPs cristallines métalliques d'un diamètre d'environ 50 nm. Le produit est injecté directement dans les tumeurs malignes et est activé par une certaine dose de rayons ionisants. Ce composé est capable d'émettre de nombreux électrons puis des radicaux libres lorsqu'il reçoit des rayons X. Cela provoque un échauffement et amplifie ainsi de façon importante l'efficacité de la radiothérapie sur une tumeur, dans le but de réduire la dose nécessaire de radiations conduisant à la mort des cellules tumorales. Cette amplification de l'action des rayons X apporte, en outre, une réponse à un problème commun en radiologie, à savoir la diminution de la radiosensibilité consécutive à des chimiothérapies et à l'hypoxie. En 2018 et 2019, des essais de phase I-II sont lancés contre plusieurs types de cancers, notamment les cancers de la tête et du cou, des poumons et de l'appareil digestif (pancréas, œsophage, foie, rectum) et les sarcomes des tissus mous (Bonvalot et al., 2019) démontrant des améliorations dans la réponse des patients (Bonvalot et al., 2022) et conduisant à l'obtention du marquage CE pour les sarcomes des tissus mous (Figure 65). En 2020, la FDA octroie à NBTXR3 la procédure *Fast Track* pour le cancer de la tête et du cou localement avancé. La même société propose également des NPs à base de gadolinium pour potentialiser l'effet de la radiothérapie. Ces petites NPs (< 5 nm) injectées par voie intraveineuse et visibles par IRM, sont extrêmement prometteuses avec un fort potentiel pour l'imagerie de la fonction rénale.

Dans le même type de stratégie, la société NH TherAguix développe notamment une NP pour la radiosensibilisation appelées AGuIX®. Les NPs AGuIX® ont fait l'objet d'une étude clinique de phase 1

II. NANOMEDECINE

(NANO-RAD) (Verry et al., 2021) et sont actuellement à l'étude dans plusieurs essais cliniques, incluant un essai de phase 2 (NANORAD-2) chez des patients présentant des métastases cérébrales multiples dues à une tumeur solide. L'AGuIX® (Activation et Guidage de l'Irradiation par Rayons X) est une NP de 5 nm comprenant un réseau de polysiloxane entouré par les chélates de gadolinium (Lux et al., 2011). Cette NP est un agent théranostique qui fonctionne comme un agent de contraste par l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et un radiosensibilisateur.

Ces quelques exemples démontrent combien l'enjeu des nanomédecines en oncologie et les moyens mis en jeu sont importants. De multiples autres liposomes, nanocapsules, NPs métalliques et NPs polymères fonctionnalisés par des anticorps (Marques et al., 2023), des peptides, des protéines (Libutti et al., 2010) et des vitamines (Ibrahim et al., 2023) sont évalués dans des modèles pré-cliniques, dont certains font actuellement l'objet d'études cliniques ou pré-cliniques (Anselmo & Mitragotri, 2021). Il est donc probable que dans les années à venir de nouvelles formulations de NPs fonctionnalisées puissent émerger en pratique clinique.

CONTEXTE ET OBJECTIFS

Mon travail de thèse s'inscrit dans un des thèmes du laboratoire dédié au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques du carcinome hépatocellulaire (Figure 68). L'équipe poursuit à la fois des recherches sur un volet clinique et des recherches précliniques. Au niveau clinique, le Pr E. Garin (médecin nucléaire) optimise des radiothérapies vectorisées (microsphères, lipiodol) pour la radioembolisation transartérielle de tumeurs hépatiques. Ces approches, en essais cliniques à différents stades d'évaluation, sont utilisées chez un nombre encore restreint de patients, mais constituent une voie prometteuse de thérapie des tumeurs primitives du foie avec des optimisations originales liées à une dosimétrie personnalisée à chaque patient (voir paragraphe « *perspectives thérapeutiques du CHC* »). Au niveau préclinique, notre projet vise à développer et fonctionnaliser de nouveaux copolymères à base de polyesters biocompatibles et biodégradables dérivés du poly(malate de benzyle)₇₃ (PMLABe₇₃) pour formuler des NPs innovantes. Ces NPs peuvent être décorées ou non de peptides reconnaissant préférentiellement les cellules d'hépatome et pourront être évaluées en tant que systèmes d'administration de PAs pour cibler le CHC (Figure 68). Par ailleurs, l'étude de peptides à tropisme hépatique, ou peptides hépatotropes, permettra également de produire des peptides modifiés par greffage d'un chélate dans l'objectif d'un radiomarquage à visée diagnostique ou thérapeutique en fonction du radionucléide utilisé. Mon travail de thèse s'inscrivait l'axe préclinique de l'équipe et a consisté à étudier la biocompatibilité et la captation par des cellules en culture des NPs à base de dérivés du PMLABe₇₃.

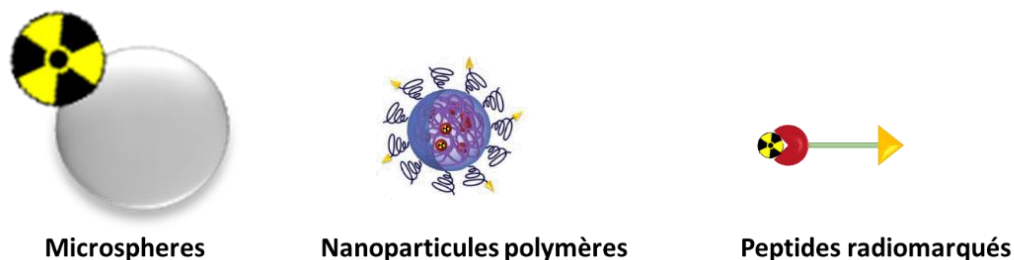


Figure 68 : Vectorisations développées dans l'équipe Métaux, Pathologies et Thérapies Vectorisées (METHER) au sein de l'Institut Nutrition, Métabolismes et Cancer (NuMeCan, Inserm UMR1317, INRAe UMR1341)

Les formes de vecteurs développées sont le Lipiodol radiomarqué, des microsphères, des nanoparticules polymères et des peptides modifiés radiomarqués dans le contexte du traitement du CHC.

Les polyesters aliphatiques, comme le poly(acide malique) (PMLA) et ses dérivés, sont des polymères aux propriétés de biocompatibilité et de biodégradabilité remarquables qui en font des candidats de choix pour l'élaboration de systèmes de vectorisation de PA (Loyer & Cammas-Marion, 2014; Ulery et al., 2011). La synthèse de ce type de polyesters est généralement réalisée par polymérisation anionique par ouverture de cycle (aROP) d'esters cycliques correspondants (les β -lactones). Cette méthode permet de préparer des polymères de structures bien définies et de masses molaires bien contrôlées (Jérôme & Lecomte, 2008; Nuyken & Pask, 2013). Une alternative intéressante à l'emploi d'amorceurs chimiques est l'utilisation d'enzymes, et plus spécifiquement des lipases, en tant qu'amorceurs « écologiques ». Les lipases sont des enzymes appartenant à la famille des hydrolases, qui ont la particularité d'être activées en présence d'une interface phase aqueuse (eau ou tampon)/phase organique (substrat hydrophobe ou solvant organique). Ces enzymes jouent un rôle essentiel dans la synthèse et la dégradation des lipides. Pourtant, elles sont aussi capables de catalyser des réactions d'estérification et de transestérification dans la catalyse de réactions de polymérisation

par ouverture de cycle de lactone non substituées, comme les ϵ -caprolactones, propriété qui a été utilisée par l'équipe pour produire du poly(malate de benzyle) par catalyse enzymatique (Casajus et al., 2018).

Synthèse de (co)polymères par aROP : stratégies de fonctionnalisation par des peptides

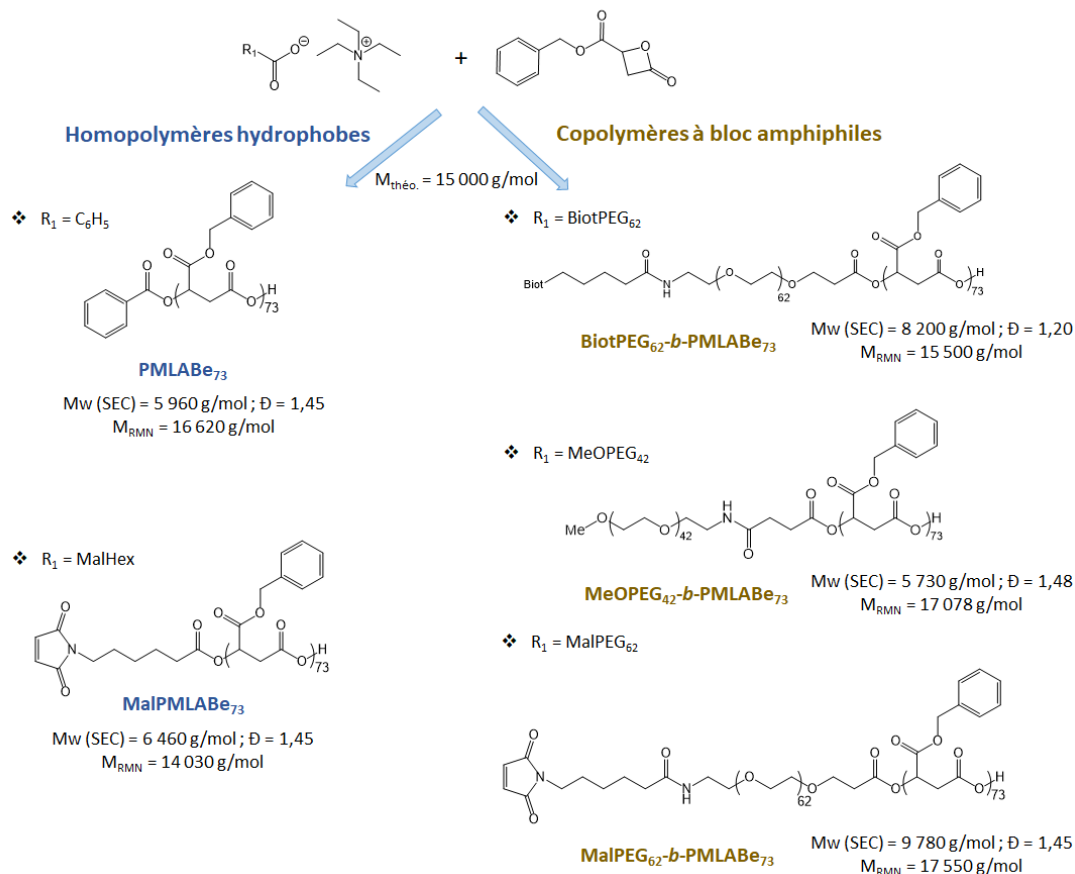


Figure 69 : Les différents (co)polymères utilisés durant le travail de thèse ou dans la suite du projet d'équipe en continuité avec la thèse

La synthèse des homopolymères hydrophobes de PMLABe₇₃ et de ses copolymères dérivés a été réalisée par polymérisation anionique par ouverture de cycle (aROP) d'esters cycliques correspondants (les β -lactones β -substituées). La fonctionnalisation la plus importante pour la thèse a été l'ajout d'une biotine sur l'extrémité PEG du copolymère PEG₆₂-b-PMLABe₇₃. Après formulation par nanopréciipitation, la biotine en surface des NPs a permis la fixation d'un peptide via la streptavidine.

Nous avons mené notre travail de recherche en collaboration avec l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes (ENSCR) pour évaluer, plus en détails, la biocompatibilité de NPs préparées à partir de dérivés du PMLABe₇₃ synthétisés par polymérisation chimique. Nous avons également étudié leur captation par les cellules d'hépatome humain HepaRG et des macrophages humains en culture primaire. Dans cet objectif, nous avons utilisé des NPs formulées à partir d'homopolymère hydrophobe PMLABe₇₃, de copolymères à di-bloc amphiphiles PEG₄₂-b-PMLABe₇₃, et de dérivés fonctionnalisés du PEG₆₂-b-PMLABe₇₃ par la biotine dans un premier temps (Figure 69), puis plus récemment par le maléimide (Brossard et al., 2021).

Durant cette thèse, une première étude a porté sur une évaluation de la biocompatibilité et la captation de NPs formulées à partir de PMLABe₇₃ et de PEG₄₂-*b*-PMLABe₇₃ dans des cellules d'hépatome HepaRG, travail qui a fait l'objet d'une première publication :

Vène E, Jarnouen K, Huang ZH, Bedhouche W, Montier T, Cammas-Marion S and Loyer P. *In vitro* Toxicity Evaluation and *in vivo* Biodistribution of Polymeric Micelles Derived from Poly(ethylene glycol)-*b*-poly(benzyl malate) Copolymers. *Pharmaceutical Nanotechnology*, 2016, 4, 24-37.

Cette publication constitue le premier chapitre des résultats de ma thèse, auquel des résultats non publiés ont été ajoutés.

Toutefois quel que soit le degré de biocompatibilité des NPs préparées à partir du PMLABe₇₃ et de ses copolymères, des barrières biologiques reste à franchir pour obtenir un ciblage thérapeutique anticancéreux efficace. Ces barrières sont liées notamment au système immunitaire et à la présence de divers types cellulaires comme les macrophages associés à la tumeur qui limitent la captation des NPs par les cellules tumorales, réduisant ainsi leur efficacité thérapeutique (Penn et al., 2018). De plus, l'opsonisation des NPs par les protéines sériques facilite la phagocytose des NPs par les macrophages déviant ainsi leur accumulation vers les organes du système phagocytaire mononucléaire (Wicki et al., 2015). Afin de pouvoir adresser plus spécifiquement des NPs aux cellules d'hépatome, nous avons recherché des peptides présentant un tropisme pour ces cellules dans la perspective de fonctionnaliser des NPs et de pouvoir produire des dérivés modifiés permettant un radiomarquage.

J'ai initié un criblage de peptides, choisis à partir de données de la littérature, afin de sélectionner quelques peptides qui permettraient une fonctionnalisation de NPs polymères. Ces travaux ont permis l'identification de 2 peptides de forte affinité pour les cellules d'hépatome, les peptides GBVA10-9 et CPB. Ce travail a abouti à une seconde publication qui correspond au second chapitre des résultats :

Vène E, Jarnouen K, Ribault C, Vlach M, Verres Y, Bourgeois M, Lepareur N, Cammas-Marion S, Loyer P. Circumsporozoite Protein of *Plasmodium berghei*- and George Baker Virus A-Derived Peptides Trigger Efficient Cell Internalization of Bioconjugates and Functionalized Poly(ethylene glycol)-*b*-poly(benzyl malate)-Based Nanoparticles in Human Hepatoma Cells. *Pharmaceutics*. 2022 Apr 6; 14(4):804.

Dans la suite de mes travaux, l'équipe a synthétisé de nouveaux copolymères sur lesquels les peptides ont été greffés de façon covalente, contrairement aux NPs initiales sur lesquelles les peptides étaient greffés via un pontage biotine-streptavidine. Ce travail a fait l'objet d'une publication parue en 2021 (Brossard et al., 2021). L'équipe de l'ENSCR a ensuite mis au point une seconde méthode de fonctionnalisation des NPs par une approche de greffage direct des peptides sur les NPs déjà formulées (Brossard et al., 2022). Quelques données sur ces publications seront présentées et discutées dans ce second chapitre.

Parallèlement à ces travaux de fonctionnalisation des NPs, j'ai cherché à encapsuler de nouvelles molécules à potentiel anticancéreux, en particulier une nouvelle classe de composés organométalliques cytotoxiques lipophiles synthétisés par l'équipe de M. Mauduit et C. Crévisy (Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes, Equipe OMC - ISCR). Ces composés ont été encapsulés dans les NPs et les effets sur la prolifération et la survie des cellules en culture ont été évalués. Les résultats, encore non publiés, démontrent que ces composés ont un potentiel cytotoxique et que leur encapsulation permet à ces molécules lipophiles, difficilement administrables sous forme native, d'être évaluées. Ces données encourageantes nous incitent à évaluer plus en détails les mécanismes d'actions de ces composés et le potentiel anticancéreux des couples NPs/composés organométalliques.

RESULTATS

CHAPITRE I : Évaluation de la biocompatibilité *in vitro* et
biodistribution *in vivo* des nanoparticules polymères à base de
dérivés du poly(malate de benzyle)₇₃

I. CONTEXTE DE L'ETUDE

Dans le cadre du traitement de patients atteints de cancers hépatiques à des stades avancés, l'application de la nanomédecine pourrait être une approche prometteuse pour améliorer le résultat thérapeutique de principes actifs (PAs). L'encapsulation de ces derniers dans des nanovecteurs, notamment des nanoparticules (NPs) polymères, pourrait améliorer leur biodisponibilité, leur biodistribution, leur pharmacocinétique et donc leur efficacité en favorisant leur accumulation, de façon passive ou active, au niveau des cellules tumorales.

Les polymères biodégradables les plus étudiés pour la formulation de NPs sont le poly(acide lactique) (PLA), le poly(acide glycolique), le copolymère poly(acide lactique-co-glycolique) et le poly(cyanoacrylate) (Singh & Lillard, 2009). Le développement de différentes familles de polymères a permis la formulation de NPs variées dont certaines font actuellement l'objet d'études cliniques ou pré-cliniques.

Parmi les polyesters aliphatiques, le PMLA est un polymère naturel produit par certains champignons et myxomycètes. Il est biocompatible et biodégradable en acide malique dans des conditions physiologiques. Ces propriétés présentent un véritable intérêt pour des applications en médecine et ont été mises à profit notamment pour le développement d'un conjugué macromoléculaire multifonctionnel appelé Polycefin™ (Ljubimova et al., 2008). Comme mentionné dans les objectifs, notre équipe utilise des dérivés du PMLA, le poly(malate de benzyle)₇₃ (PMLABe₇₃), pour développer une nouvelle famille de NPs macromoléculaires. Différents homopolymères et copolymères ont été synthétisés (Figure 69). La synthèse de ce type de polyesters est également réalisée par polymérisation anionique par ouverture de cycle (*anionic ring opening polymerization*, aROP) d'esters cycliques correspondants (les β -lactones).

Les nanovecteurs doivent répondre à un cahier des charges très strict pour être appliqués en médecine. Ils doivent être en particulier biocompatibles et (bio)dégradables, facile à produire et capable d'encapsuler des quantités importantes de principes actifs. Concernant le PMLABe₇₃ et ses dérivés, ces différents aspects ont été étudiés dans notre équipe au travers de plusieurs publications (Casajus et al., 2018; Loyer & Cammas-Marion, 2014; Huang et al., 2012) et de travaux encore non publiés.

Dans cette partie de mon manuscrit de thèse, je présenterai une étude publiée et des résultats qui seront intégrés dans une publication en cours de finalisation abordant des éléments de biocompatibilité, captation par des cellules hépatiques et macrophages et des premiers essais de fonctionnalisation.

II. METHODOLOGIE

II.1. Les polymères et la formulation des nanoparticules

Le PMLABe₇₃ a été synthétisé comme décrit précédemment (Cammass et al., 1999; Huang et al., 2012) par aROP du malolactonate de benzyle (MLABe) racémique en présence de benzoate de tétraéthylammonium comme amorceur. La masse molaire théorique est déterminée par le rapport monomère/amorceur ; la valeur sélectionnée pour ce rapport dans le cadre de nos études est de 73 (cela représente le nombre d'unités monomères constituant le polymère), c'est-à-dire une masse molaire théorique de 15 000 g/mol. Le polymère a été purifié par précipitation dans l'éthanol. Après

séchage sous vide, le PMLABe₇₃ a été analysé par RMN ¹H (structure) et chromatographie d'exclusion stérique (SEC, masse molaire moyenne en poids (Mw) et dispersité (Đ)).

Les PEG₄₂-*b*-PMLABe₇₃ et Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ ont été synthétisés comme décrit précédemment (Huang et al., 2012) par aROP du MLABe racémique en présence du tétraéthylammonium d' α -méthoxy, ω -carboxylate PEG₄₂ (PEG₄₂-COOH) ou d' α -biotine, ω -carboxylate PEG₆₂ (Biot-PEG₆₂COOH) comme amorces, respectivement, dans du THF anhydre. Dans ce cas également, la masse molaire du PMLABe₇₃ a été fixée par le rapport monomère/amorceur (rapport choisi à 73) sur la valeur de 15 000 g/mol. Ces copolymères à bloc résultants ont été également purifiés par précipitation dans l'éthanol. Après séchage sous vide, les copolymères à bloc ont été analysés par RMN ¹H (Structure et masse molaire du bloc PMLABe) et SEC (Mw et Đ).

La formulation des NPs, décrite dans l'introduction (Figure 54) repose sur la technique de nanoprecipitation (Thioune et al., 1997), une méthode classique qui permet d'obtenir des NPs polymères avec une très bonne reproductibilité quant aux caractéristiques de taille (diamètre hydrodynamique, Dh), indice de polydispersité (PDI) et potentiel zéta (ζ) (Huang et al., 2012; Loyer & Cammas-Marion, 2014).

Les NPs ont été « chargées » avec deux sondes fluorescentes, le 1,1'-dioctadécyl-3,3',3',3'-tetraméthylindodicarbocyanine perchlorate (DiDoil) ou le 1,1'-dioctadécyl-3,3',3',3'-tétraméthylindotricarbocyanine (DiR). Le DiDoil et le DiR sont des sondes de fluorescence hydrophobes de type carbocyanine émettant dans le proche infrarouge (665 nm pour le DiDoil et 780 nm pour le DiR). Cinq mg du (co)polymère sélectionné ont été dissous dans 100 μ L de diméthyle formamide (DMF), puis 50 μ L de la solution de DiDoil ou de DiR dans du DMF à 1 mg/ml, correspondant à 1% en poids du (co)polymère, ont été ajoutés. Dans certaines expériences, la quantité de sonde fluorescente a été réduite à 0,1% en poids du fait de la très forte captation des NPs par les cellules *in vitro* et la saturation du signal mesuré par cytométrie en flux. La solution de polymère et de sonde fluorescente a été rapidement ajoutée dans 1 mL d'eau distillée sous agitation vigoureuse. Les NPs se forment instantanément en raison de la nature hydrophobe ou amphiphile des (co)polymères. La suspension a été laissée sous agitation pendant 1 h. Ensuite, les NPs chargées en DiDoil ou en DiR ont été purifiées en utilisant des colonnes d'exclusion stérique Séphadex G25 (colonne PD-10) pour éliminer la sonde non-encapsulée, puis caractérisées par DLS. La concentration/quantité en sonde fluorescente encapsulée a été mesurée par UV dans une solution préparée en mélangeant 80 μ L de NPs chargées de DiDoil ou en DiR avec 320 μ L de DMF, et en utilisant une courbe d'étalonnage de la solution de sonde correspondante dans un mélange de DMF/H₂O (80/20 v%). L'absorbance des solutions a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à microplaques powerwase XS / XS2 (Biotek, Winooski, VT, USA), équipé d'un logiciel d'analyse de données Gen5 (Biotek, Winooski, VT, USA). Les NPs ont été caractérisées par une diffusion dynamique de la lumière (DLS) dans l'eau à température ambiante avec une concentration en polymère de 2,5 mg/mL.

II.2. Les modèles cellulaires

Deux principaux modèles cellulaires ont été utilisés dans ces études : les cellules de la lignée hépatocellulaire humaine HepaRG et des macrophages humains en culture primaire.

La lignée de cellules HepaRG a été décrite dans l'introduction (Chapitre I.2.3). Les cellules proliférantes peu différenciées ont été principalement utilisées, en particulier pour mimer un modèle de cellules très proliférantes de CHC agressif. Cependant, dans plusieurs expériences, des cellules différenciées

quiescentes ont été utilisées dans le but d'évaluer la toxicité vis-à-vis des hépatocytes différenciés quiescents.

Les macrophages humains, impliqués dans la réponse immunitaire innée, phagocytent des corps étrangers circulant dans notre sang. Ils sont donc en partie responsables de l'élimination des NPs de l'organisme. Ce type cellulaire est également présent dans le foie (cellules de Küpffer). Bien qu'ils ne représentent que 5% de la population cellulaire totale du foie, ils jouent un rôle majeur dans la physiopathologie hépatique (Tavares et al., 2017) et ils sont responsables de la captation de nano-objets par le foie (Ngo et al., 2022). A défaut de disposer de cellules de Küpffer, nous avons intégré, dans notre étude, des macrophages humains différenciés à partir de monocytes circulants considérant que ces cellules présentaient une forte capacité de phagocytose qui mimerait celle des macrophages hépatiques résidents.

Nous avons obtenu des cellules mononucléaires du sang périphérique à partir d'une fraction leucocytaire (Etablissement Français du Sang, Rennes, France), en appliquant la technique de centrifugation différentielle sur des tubes UNI-SEP maxi U10 (Novamed). Puis, à partir de ces cellules sanguines mononucléaires, nous avons isolé les monocytes CD14+ qui sont ensuite différenciés en macrophages (Figure 70). Nous avons utilisé un kit de séparation CD14 humain pour enrichir le surnageant obtenu en monocytes (Microbeads ; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Allemagne). Les cellules obtenues sont ensuite ensemencées à une densité de $0,5 \times 10^6$ cellules par puits dans des plaques à 24 puits et cultivées à 37°C avec 5% de CO₂ humidifié et dans du milieu RPMI 1640 complété avec 100 UI/mL de pénicilline – 100 mg/mL de streptomycine, 2 mM de L-glutamine et 10% de serum de veau fœtal (SVF) BioWhittaker®. Les macrophages ont été obtenus après différenciation des monocytes par incubation avec 50 ng/ml de rhGM-CSF dans du milieu RPMI 1640 pendant 7 jours (Figure 70).

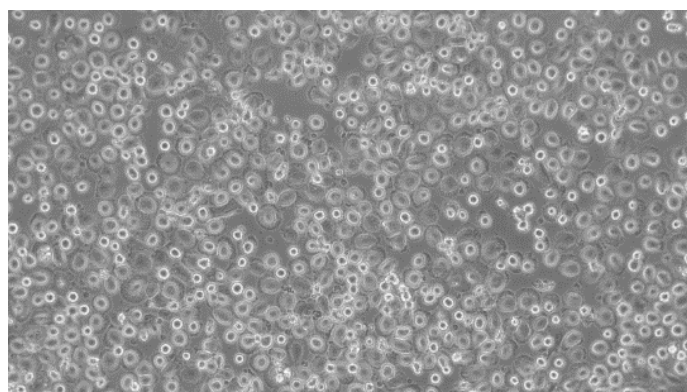


Figure 70 : Microscopie à contraste de phase de macrophages humains en culture primaire

Les macrophages ont été obtenus à partir de monocytes circulants différenciés en culture par addition de rhGM-CSF au milieu de culture.

II.3. Mesure de la viabilité cellulaire

La toxicité des NPs vis-à-vis de différents types cellulaires, dont les cellules HepaRG et les macrophages, a été évaluée par deux tests de viabilité cellulaire : le test de MTT et la mesure du contenu relatif en ATP.

Le test MTT, est un essai classique de mesure de viabilité cellulaire utilisant comme réactif principal le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium). L'anneau de tétrazolium qu'il

contient est réduit par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives, en formazan. Celui-ci forme un précipité dans la mitochondrie de couleur violette. La quantité de précipité formé est proportionnelle à la quantité de cellules vivantes. Dans un premier temps, ce test été utilisé puis remplacé peu à peu par la mesure du contenu en ATP, car de grandes différences dans l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale ont été notées entre les types cellulaires et, pour les cellules HepaRG en fonction du stade de différenciation, rendant parfois difficile l'interprétation des résultats.

Pour le test ATP, le milieu de culture des cellules est éliminé et remplacé par le même milieu exempt de rouge de phénol. Un volume de CellTiter-Glo® Reagent (Luciférine coléoptère + tampon de lyse) équivalent au volume de milieu de culture cellulaire présent dans chaque puits (100 µL) est ajouté. Les plaques sont placées sur un agitateur orbital pendant 2 minutes, puis l'intégralité du contenu des plaques est transférée dans des plaques multi-puits à parois opaques. Les valeurs de luminescence sont mesurées en utilisant un luminomètre Omega Polarstar (BMG Labtech).

Pour ces deux tests, les résultats sont présentés en pourcentages des valeurs obtenues dans la condition contrôle non exposées aux NPs.

II.4. Mesure de la captation de nanoparticules par les cellules

La captation de NPs fluorescentes a été évaluée par cytométrie en flux et microscopie à fluorescence.

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques de 24 ou 48 puits. Les cellules ont été incubées avec des milieux contenant des NPs (en quantités variables) pendant des temps allant de 24 à 48 heures, en fonction des expériences. Dans le cas d'expositions aiguës, une seule incubation était réalisée. Dans certaines expériences, le milieu était renouvelé et l'incubation se poursuivait avec des NPs ajoutées extemporanément à ce milieu frais permettant des traitements réitérés.

Après l'incubation, le milieu est éliminé et les cellules sont « rincées » par du PBS pour éliminer les NPs et le SVF présent dans le milieu de culture. Ensuite, les cellules ont été décollées en utilisant de la trypsine (0,05% pour les cellules HepaRG ou 0,25% pour les macrophages). La fluorescence moyenne ainsi que le pourcentage de cellules fluorescentes ont été évalués par cytométrie en flux (Becton Dickinson le LSRFortessa™ X-20, Franklin Lakes, NJ, USA) à la plateforme Biosit - Biologie, Santé, Innovation technologique - UMS Inserm 18/ CNRS 3480 – Rennes-France.

Des nuages de points bi-paramétriques représentant la taille relative des cellules (forward scatter) [FSC: axe des x, taille des événements] et la structure/granularité (side scatter) [SSC: axe des y, structure des événements] ont permis de localiser les cellules viables avant de détecter la fluorescence émise par les NPs en utilisant des canaux variables en fonction de la sonde utilisée, canal BV786-1A pour les NPs chargées en DiR et le canal APC-A pour les NPs chargées en DiDoil. Deux paramètres ont été analysés : le pourcentage de cellules positives qui internalisaient les NPs et l'intensité de la fluorescence (moyenne de fluorescence) reflétant l'accumulation de NPs fluorescentes dans les cellules (Figure 71).

Concernant les macrophages, un protocole de fixation des cellules a été adopté pour éviter la formations d'aggrégats cellulaires qui gênent l'analyse en cytométrie. Après incubation des cellules avec les NPs, les cellules sont décollées par la trypsine puis transférées dans des tubes Eppendorf avant d'être centrifugées à la vitesse de 2800 tours/min. Après centrifugation, le surnageant a été éliminé et 300 µL de paraformaldéhyde (PFA) 4% ont été transférés dans les tubes qui ont été placés à 4°C pendant 15 minutes. Ensuite, les tubes sont centrifugés (2 800 tours/min), le PFA en excès est éliminé et remplacé par 400 µL de PBS. Après, fixation, l'ensemble des tubes a été stocké à 4°C avant d'être analysé en cytométrie.

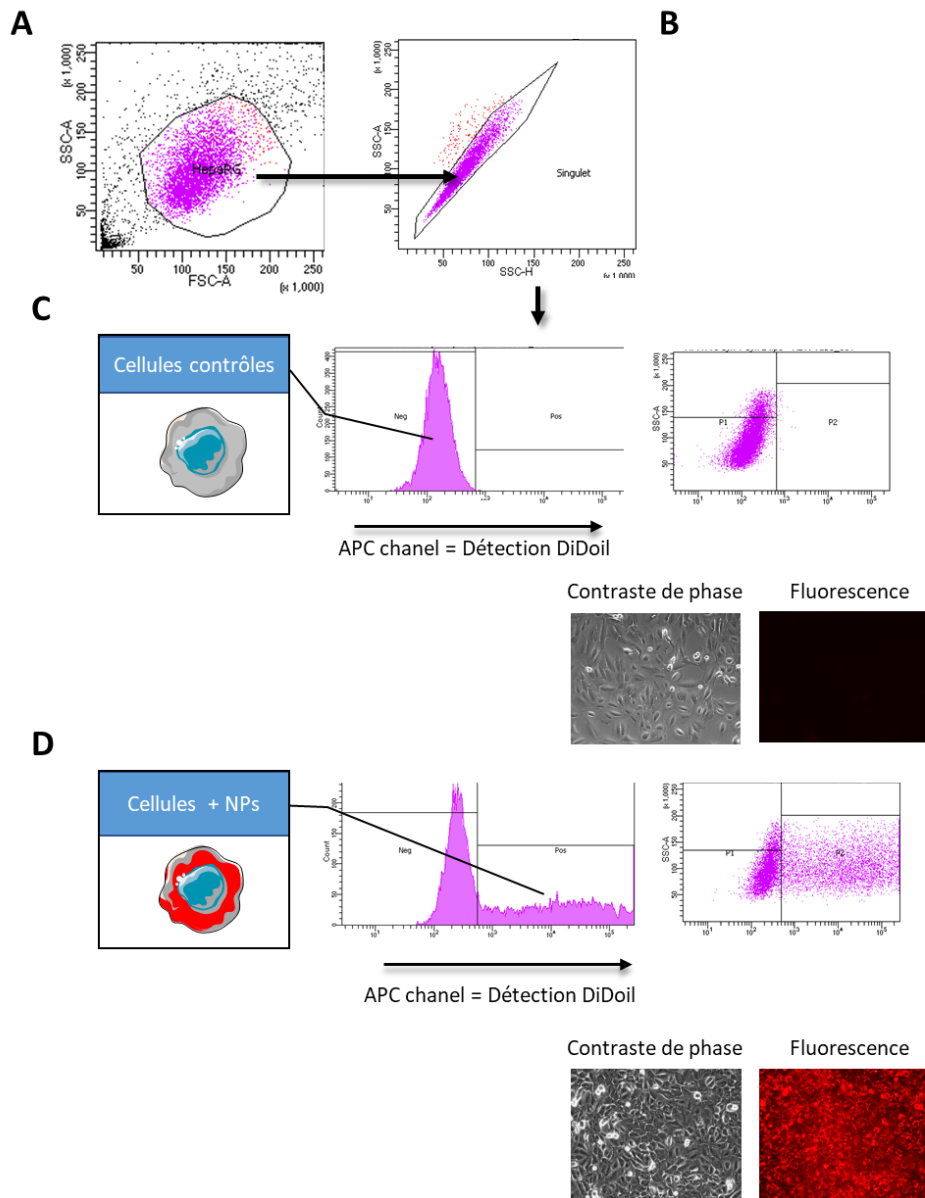


Figure 71 : Schéma d'analyse de la captation de NPs par des cellules HepaRG

Les cellules sont analysées par cytométrie en flux. Dans un premier temps, les nuages de points (événements) obtenus avec les paramètres Side Scatter (SSC, granularité sur l'axe y) et Forward Scatter (FSC, taille sur l'axe x) permettent d'isoler les cellules viables (comprises dans le polygone) des débris cellulaires et des agrégats (**A**). Ensuite, les événements de cette première population cellulaire ont été analysés à l'aide du nuage de points SSC-Height versus SSC-Area pour isoler les cellules individuelles (single) (**B**). À partir de la population unicellulaire, les intensités de fluorescence ont été analysées (histogramme : fluorescence sur l'axe x par rapport au nombre de cellules sur l'axe y ; dot plot : fluorescence sur l'axe x par rapport à la structure SSC sur l'axe y) dans les cellules qui n'ont pas été incubées avec des NPs pour définir le « bruit de fond » aussi appelée auto-fluorescence des cellules négatives (Neg) (**C**). Dans les cellules témoins non incubées, la valeur d'autofluorescence maximale a été arbitrairement fixée en unités arbitraires (<600 U.A., gate Neg). Ensuite, les cellules incubées en présence de NPs fluorescents ont été analysées (**D**), ce qui a défini les cellules positives pour les NPs (NPs+ ou Pos, moyenne de fluorescence >600 U.A.). Les moyennes de fluorescence (MFI) présentées dans ce travail représentent la fluorescence globale de toutes les cellules positives (Pos). Après avoir acquis les signaux de fluorescence d'environ 10^4 cellules, le pourcentage de cellules NPs+, les intensités de fluorescence des populations cellulaires ont été obtenues à partir des logiciels FACSDiva et flowLogic. Avant détachement des cellules du support de culture et analyse par cytométrie en flux, les cellules ayant internalisées des NPs peuvent être visualisées par microscopie à fluorescence.

II.5. Evaluation de l'opsonisation

L'interaction des protéines plasmatiques avec les NPs, ou opsonisation, a été étudiée en incubant des NPs avec du sérum humain avant la détection des protéines liées aux NPs par électrophorèse sur gel d'acrylamide. Les NPs formulées (250 µg de copolymères), diluées dans 0,5 mL de solution saline tamponnée au phosphate (PBS), ont été incubées avec 0,5 mL de sérum humain pendant 5, 15, 30, 60 ou 120 minutes à température ambiante. Les NPs étaient ensuite collectées par centrifugation à 11000g pendant 30 minutes. Le culot a été lavé deux fois avec 1 mL de PBS avant la dénaturation des NPs et des protéines associées par 100 µL de tampon réducteur et dénaturant (Tris-HCl 100 mM, pH 6,8, bleu de bromophénol 0,2 %, sodium sulfate de dodécyle 8 %, glycérol 20 % et bêta mercaptoéthanol 5 %). Les échantillons ont été bouillis pendant 10 min, puis les protéines ont été déposées sur gels de polyacrylamide à 10% et séparées par électrophorèse. Les protéines totales ont été détectées par coloration du gel au bleu de Coomassie ou par Western blot en utilisant des anticorps spécifiques dirigés contre l'albumine, les immunoglobulines et le complément C3.

II.6. Mesure des cytokines pro-inflammatoires

Pour déterminer si les NPs activaient l'inflammasome, La production de cytokines pro-inflammatoires a été évaluée par quantification de plusieurs interleukines (IL) : IL-1 β , IL- 1 α et IL-6 dans les surnageants de culture des cellules HepaRG et des macrophages. Deux conditions de culture ont été considérées : des cellules non pré-stimulées ou des cellules « initiées » par ajout de lipopolysaccharides (LPS) aux milieux de culture. Les macrophages et les HepaRG progéniteurs sont incubés pendant 24 heures avec 0,1 µg/mL de LPS ultrapurs issus d'*Escherichia coli* O111:B4 (InvivoGen) pour stimuler la production de cytokines inflammatoires. Après incubation, les cellules sont mises en présence de milieu de culture seul ou supplémenté par des NPs ou par 250 µg/mL de cristaux d'acide urique (MSU : contrôles positifs d'activation de l'inflammasome) pendant une nuit. La production de cytokines est évaluée par quantification des IL-1 β , IL- 1 α et IL-6 dans les surnageants de culture. Le dosage est effectué par la méthode immunoenzymatique sandwich (ELISA) grâce à des Kits DuoSet® ELISA (R&D System). L'intensité de coloration est détectée par spectrophotométrie (iEMS Reader MF, Labsystems).

III. RESULTATS

III.1. Nanoparticules produites et caractéristiques physicochimiques

Dans notre étude, trois (co)polymères (PMLABe₇₃, PEG₄₂-b-PMLABe₇₃ et Biot-PEG₆₂-b-PMLABe₇₃) ont été synthétisés et ont permis de préparer trois formulations différentes de NPs, en se basant sur les travaux antérieurs (Huang et al., 2012), et dont les caractéristiques sont données dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Caractéristiques physicochimiques des (co)polymères et NPs utilisés

Polymères	Mw (g/mol) mesurée par SEC	Đ (SEC)	M _{RMN} (g/mol) du bloc PMLABe ₇₃
PMLABe ₇₃	14 000	1,33	/
PEG ₄₂ -b-PMLABe ₇₃	9 550	1,30	14 000
Biot-PEG ₆₂ -b-PMLABe ₇₃	8 230	1,20	15 500
NPs	Size (nm)	PDI	Potential Zéta (mV)
PMLABe ₇₃	130	0,1	-50
PEG ₄₂ -b-PMLABe ₇₃	70	0,1	-8
Biot-PEG ₆₂ -b-PMLABe ₇₃	100	0,2	-6

Les masses molaires ont été mesurées par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) et RMN proton. Les NPs présentent des diamètres hydrodynamiques variant de 70 à 130 nm avec un potentiel zéta de ≈ -50 mV pour les NPs de PMLABe₇₃ alors que les NPs PEGylées sont proches de la neutralité (Huang et al., 2012).

III.2. Captation des nanoparticules formulées à partir de PMLABe₇₃ et PEG₄₂-b-PMLABe₇₃ par des cellules d'hépatome et des macrophages en culture

Dans un premier temps, nous avons voulu comparer le niveau de captation de NPs formulées par nanopréciipitation à partir de l'homopolymère PMLABe₇₃ et du copolymère PEG₄₂-b-PMLABe₇₃ par des cellules HepaRG et des macrophages en culture primaire.

Des expériences réalisées parallèlement à mes travaux par d'autres membres de l'équipe ont permis de montrer que le nombre de NPs internalisées augmentait avec la quantité de NPs ajoutées au milieu (Casajus et al., 2018). Dans nos conditions, nous avons choisi d'incuber les cellules avec une concentration en (co)polymères de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (soit $\approx 1,7 \mu\text{M}$). A cette concentration en (co)polymère, aucune cytotoxicité n'avait été observée dans des cultures de cellules d'hépatome (Huang et al., 2012). Nous avons également utilisé des microsphères fluorescentes (505/515 nm) de polystyrène FluoSphere™ (ThermoFisher Scientific, Invitrogen) de deux calibres de 20 et 100 nm.

L'observation des nuages de points et histogrammes de cytométrie obtenus après 24 heures d'incubation de cellules HepaRG proliférantes avec les NPs formulées à partir de l'homopolymère PMLABe₇₃, du copolymère PEG₄₂-b-PMLABe₇₃ et des deux microsphères de polystyrène indique que les nano-objets les mieux captés sont les NPs de PMLABe₇₃ (Figure 72).

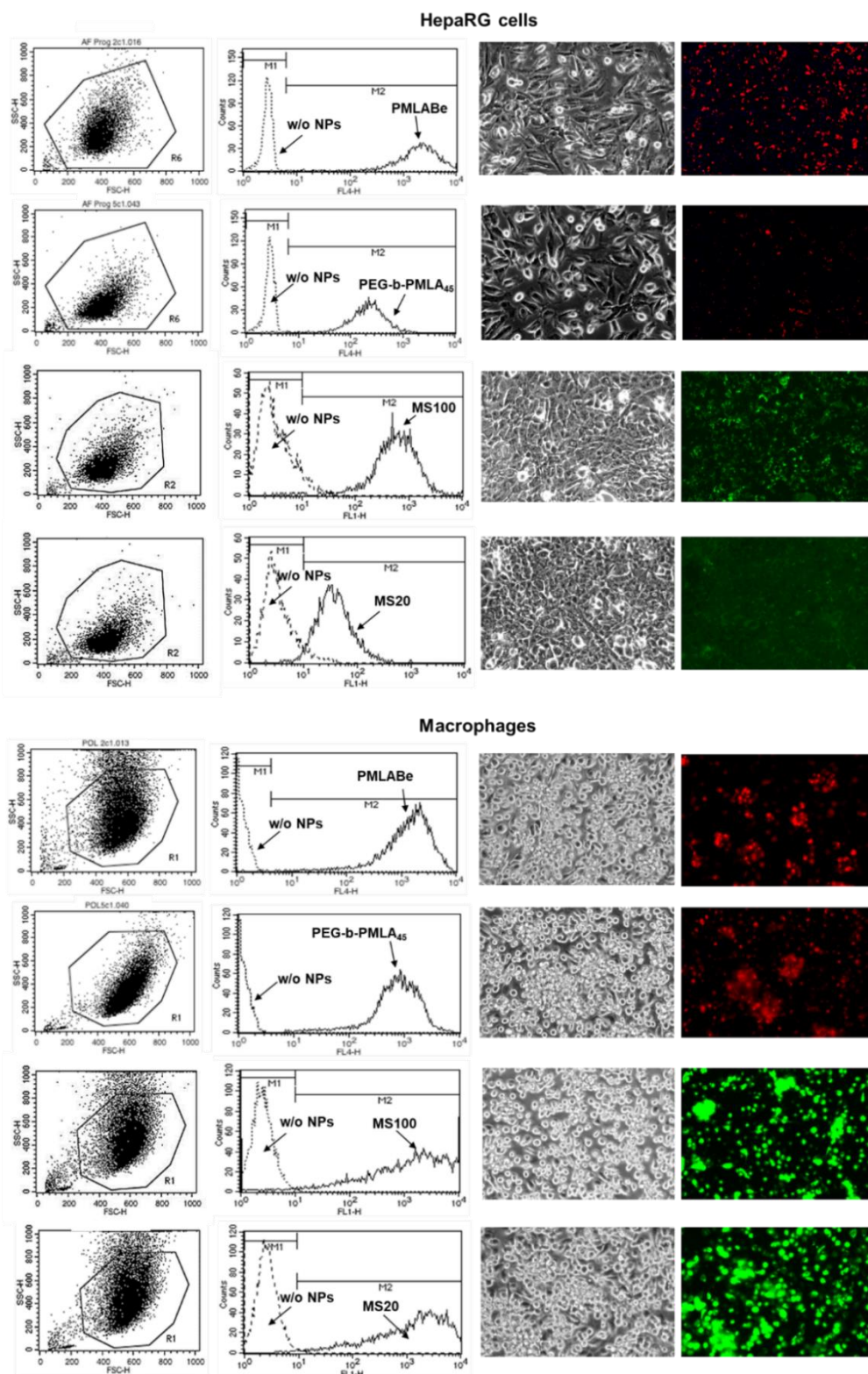


Figure 72 : Captation de NPs par des cellules HepaRG et les macrophages en culture primaire

Les cellules viables analysées par cytométrie en flux sont visualisées par le nuage de points SSC vs FCS et sont sélectionnées *via* le positionnement de la fenêtre notée « R ». La fluorescence émise par les NPs (FL4 pour les NPs DiDoil et FL1 pour les NPs de polystyrène) est visualisée sur les histogrammes dans l'intervalle M2. L'histogramme en pointillés correspond à l'auto fluorescence des cellules non-incubées (intervalle M1). MS20 : Microsphère de polystyrène de 20 nm de diamètre. MS100 : Microsphère de polystyrène de 100 nm de diamètre. A droite, cellules en contraste de phase et microscopie à fluorescence détectant les NPs.

A 24h, toutes les cellules ont capté les NPs à base de PMLABe₇₃. Cependant, la présence du bloc PEG du copolymère PEG₄₂-*b*-PMLABe₇₃ réduit fortement la captation des NPs par ces cellules. Les NPs de polystyrène sont également bien captées par les cellules HepaRG mais avec une différence quantitative importante entre les NPs de 20 et 100 nm. En effet, les microsphères de 100 nm sont beaucoup mieux internalisées que celles de 20 nm indiquant que le paramètre de diamètre influence la captation et que des objets de l'ordre de 100 nm sont mieux captés que des NPs de petite taille par ces cellules d'hépatome.

L'expérience de captation présentée pour les macrophages en culture primaire montre à nouveau que les nano-objets les mieux captés sont les NPs à base de PMLABe₇₃ (Figure 72). Deux différences importantes sont cependant visibles : 1) l'ajout de PEG réduit la captation par les macrophages mais dans une moindre mesure que pour les cellules HepaRG, 2) les NPs de polystyrène de 20 nm sont pratiquement aussi bien captés que celles de 100 nm, contrairement à ce qui avait été observé pour les cellules HepaRG. Par ailleurs, le signal de fluorescence, mesuré dans ces conditions expérimentales à 24 heures, atteint un seuil de saturation ce qui nous a conduit à établir une cinétique sur des temps plus courts.

L'analyse des résultats de plusieurs expériences indépendantes, notamment pour les macrophages avec quatre donneurs sains différents, permet de mieux quantifier la captation. Par ailleurs, nous avons évalué la captation sur une cinétique de temps à 2, 4 et 8 heures pour les macrophages et 2, 4, 8 et 24 heures pour les cellules HepaRG (Figure 73).

Le ratio des signaux ou « *Fold change* » de la moyenne de fluorescence des cellules a été calculé en utilisant la formule suivante :

$$\text{Fluorescence Fold change} = \frac{\text{moyenne de fluorescence à un temps donné}}{\text{moyenne de fluorescence au temps 0}}$$

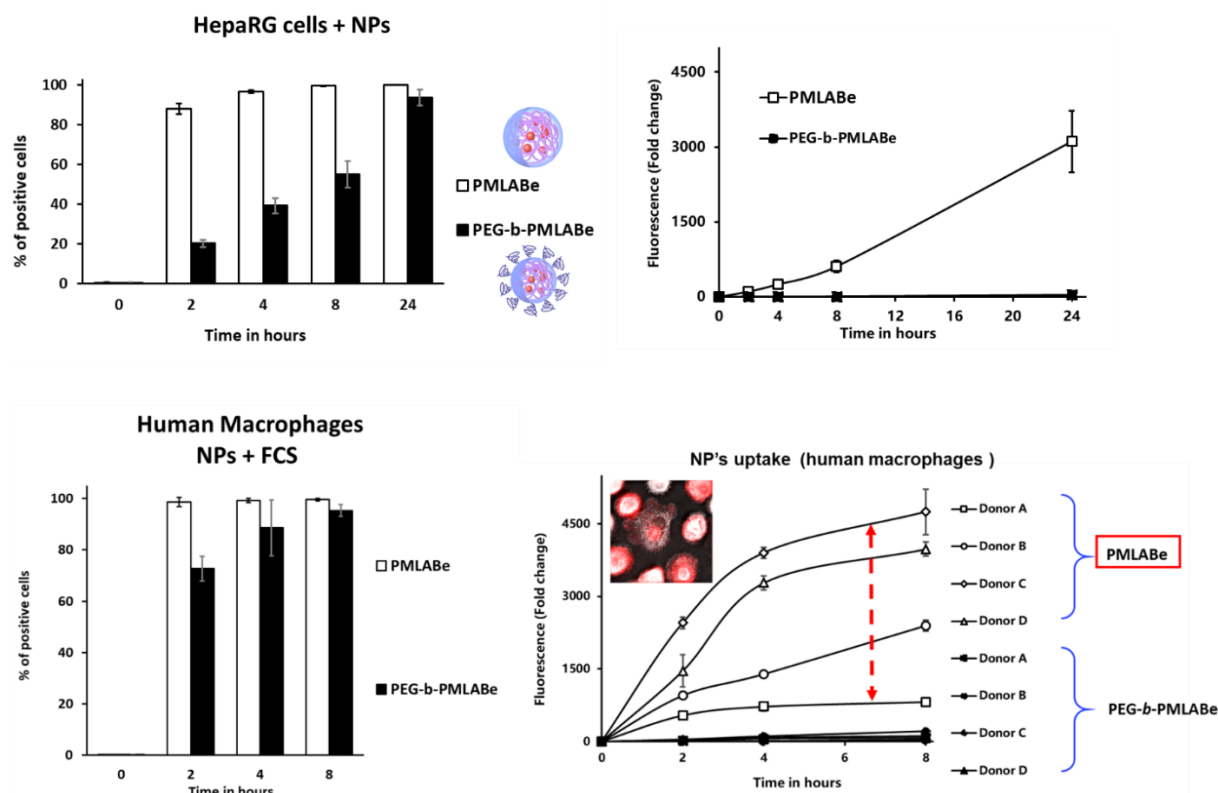


Figure 73 : Analyse de la captation de NPs par des cellules HepaRG et les macrophages humains en culture primaire
 Une cinétique de captation a été réalisée de 2 à 24 heures pour les 2 types cellulaires. Pour les macrophages, quatre donneurs sains de monocytes ont été utilisés (donor A-D). FCS : sérum de veau foetal (*foetal calf serum*)

Les graphes concernant les cellules HepaRG représentent une compilation de plusieurs expériences indépendantes ($n=4$). Par contre, il était difficile de combiner les données concernant la moyenne de fluorescence des macrophages obtenue à partir des quatre manipulations réalisées en raison de la grande différence observée entre les donneurs de sang (Figure 73). Ces résultats sont une compilation de données acquises par Saad SABA (doctorant dans l'équipe) et moi-même.

Les données obtenues concernant la moyenne de fluorescence et le pourcentage des cellules positives montrent bien que la captation des NPs par les cellules suite à une incubation unique augmente en fonction du temps. De plus, la captation des NPs à base de PMLABE₇₃ est beaucoup plus importante que celle des NPs à base de PEG₄₂-*b*-PMLABE₇₃ pour les deux modèles cellulaires utilisés, indiquant que la présence d'une couronne de PEG à la surface des NPs réduit très fortement la captation. Ces mêmes données indiquent que, pour la majorité des donneurs de monocytes, les macrophages qui en sont issus captent largement plus les deux types de NPs par rapport aux cellules HepaRG avec des cinétiques très différentes qui sont pratiquement linéaires pour les cellules HepaRG et exponentielles pour les macrophages. Ces résultats illustrent l'hétérogénéité fonctionnelle des macrophages en culture primaire.

III.3. Opsonisation des nanoparticules à base du PMLABe₇₃ et influence sur la captation

Dans un second temps, nous avons voulu vérifier si la présence de PEG en surface des NPs formées à partir du copolymère PEG₄₂-*b*-PMLABe₇₃ modifiait la fixation de protéines sériques et la formation d'une couronne protéique à la surface des NPs. Les NPs de PMLABe₇₃ et PEG₄₂-*b*-PMLABe₇₃ ont été incubées en présence de sérum humain pendant différentes durées et l'adsorption de protéines sériques a été évaluée par détection directe des protéines fixées aux NPs et par western-blot (Figure 74), pour un nombre limité de protéines connues pour être associées aux NPs (Abbina et al., 2020; Tenzer et al., 2013).

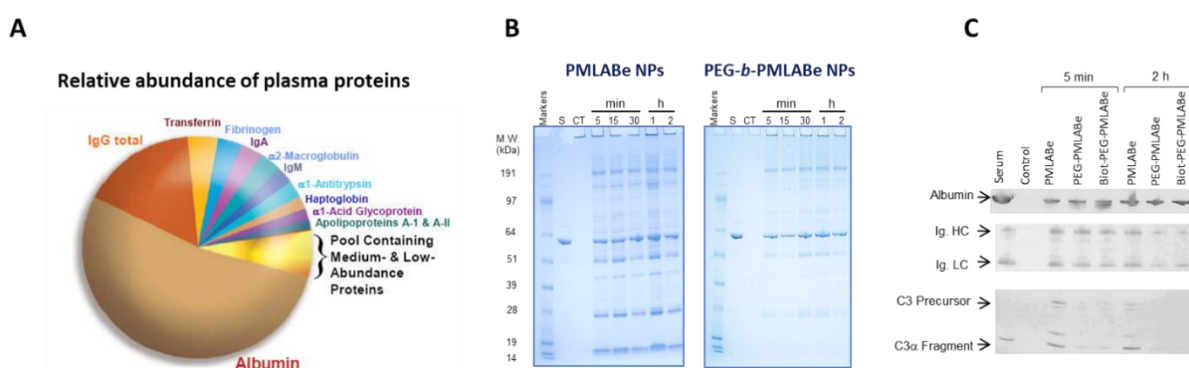


Figure 74 : Test d'opsonisation in vitro

(A) Abondance relative des protéines plasmatiques. (B) Coloration Coomassie de gels de polyacrylamide chargés de protéines sériques humaines liées aux NPs formulées à partir de l'homopolymère PMLABe₇₃ et du copolymère PEG₄₂-*b*-PMLABe₇₃. Des marqueurs protéiques de poids moléculaire (MW) précolorés ont été utilisés. S : sérum humain, CT : NPs témoins non incubés avec du sérum humain. (C) Immunoblot de l'albumine, des chaînes lourdes (HC) et légères (LC) des immunoglobulines (Ig.) et de la protéine du complément C3 dans des échantillons de NPs incubés pendant 5 minutes (5 min) ou 2 heures (2 h) avec du sérum humain.

La détection des protéines les plus abondantes par électrophorèse sur gels d'acrylamide et coloration au Coomassie indique que, pour les deux formulations, l'opsonisation se produit dans les 5 minutes après incubation avec du sérum. Cependant, le nombre et l'intensité des bandes protéiques étaient significativement plus élevés avec les NPs à base de PMLABe₇₃ par rapport aux bandes observées avec les NPs formulées à partir de PEG₄₂-*b*-PMLABe₇₃. La bande la plus intense, visible pour les deux formulations, avec une mobilité apparente à \approx 64 kDa était probablement l'albumine, qui est la protéine plasmatique la plus abondante. Nous avons ensuite détecté par immunoblot trois protéines : l'albumine et deux protéines majeures du système des opsonines, les immunoglobulines et le complément C3 (Figure 74C). Les quantités d'albumine liées aux NPs n'apparaissaient pas différentes entre les trois formulations. En revanche, les quantités d'immunoglobulines et du précurseur C3 et du C3 α actif étaient beaucoup plus faibles sur les NPs de PEG₄₂-*b*-PMLABe₇₃ que sur les NPs de PMLABe₇₃.

Ces données ont démontré que les NPs formées à partir des copolymères PEG₄₂-*b*-PMLABe₇₃ présentent une opsonisation beaucoup plus faible comparativement à celle observée avec les NPs formulées avec l'homopolymère PMLABe₇₃, en conformité avec des données antérieures obtenues avec d'autres (co)polymères (Owens & Peppas, 2006; Tenzer et al., 2013).

Il est généralement admis que l'opsonisation de NPs, et plus généralement de tous les antigènes, par les protéines sériques et la formation d'une couronne protéique accroît leur reconnaissance et leur captation par les macrophages (Moghimi et al., 2012; Mortimer et al., 2014; Ren et al., 2019). Par

conséquent, nous avons postulé que l'opsonisation des NPs à base de PMLABe₇₃ par les protéines du SVF présent dans le milieu de culture favorisait leur captation par les macrophages et pourrait également affecter l'internalisation par les cellules HepaRG. Dans une première expérience, nous avons réalisé des captations de NPs formulées à partir de PMLABe₇₃ et PEG₄₂-b-PMLABe₇₃ ainsi que des microsphères de polystyrènes fluorescentes, en présence ou en absence de SVF dans le milieu de culture pendant 24 heures (Figure 75).

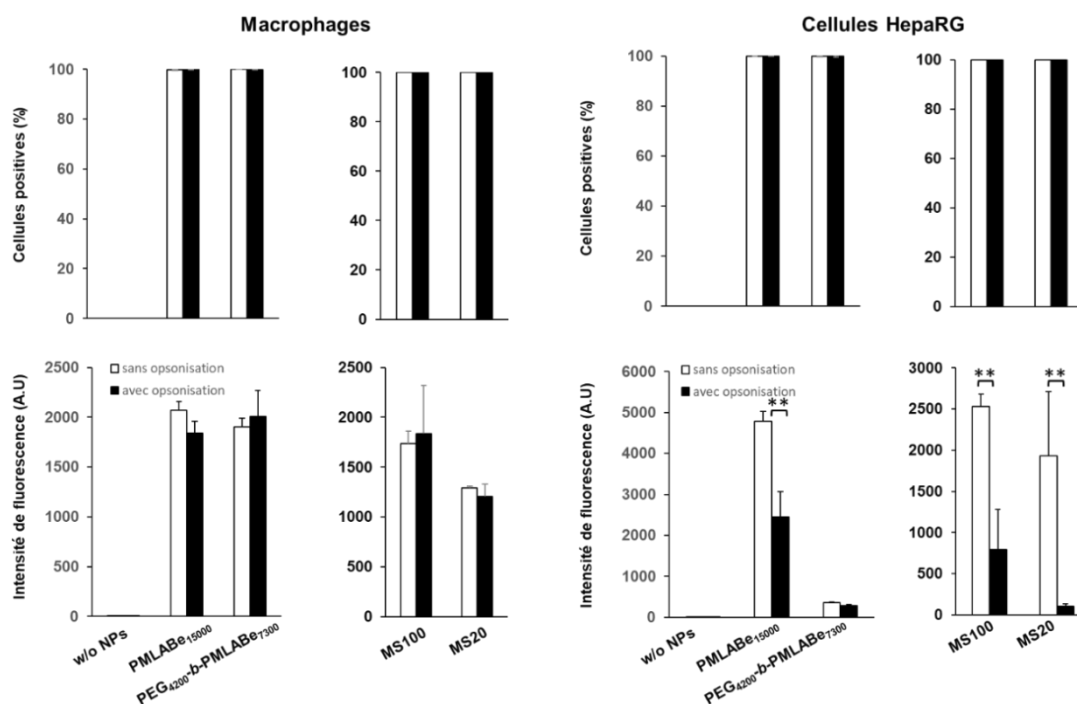


Figure 75 : Impact de la présence de sérum de veau fœtal sur la captation de NPs par les cellules HepaRG et les macrophages humains

La captation de NPs PMLABe₇₃ et PEG₄₂-b-PMLABe₇₃ et NPs polystyrènes fluorescentes de 20 (MS20) et 100 (MS100) nm a été mesurée par cytométrie en flux après 24h d'incubation. Les pourcentages de cellules positives et les intensités de fluorescence ont été quantifiés dans les macrophages humains et les cellules HepaRG en absence (histogrammes blancs) et en présence (histogrammes noirs) de SVF. Statistiques : * $p < 0.01$.

Nos résultats ont montré que l'absence ou la présence de SVF n'affectait pas le pourcentage de cellules ayant capté des NPs à base de PMLABe₇₃ ou de polystyrène. De plus, l'intensité de fluorescence, reflétant l'accumulation de NPs, n'était pas non plus modifiée dans les macrophages. Par contre, la présence de SVF dans les milieux de culture des cellules HepaRG réduit très fortement l'internalisation de NPs de PMLABe₇₃ et de polystyrène.

Ces données suggéraient que l'opsonisation influençait fortement l'internalisation de NPs par les cellules d'hépatome mais n'affectait pas ou peu la captation de NPs par les macrophages.

Cependant, ces expériences d'internalisation de NPs par les macrophages avaient été réalisées avec des incubations de 24h, correspondant à un temps proche de la saturation du signal en cytométrie de flux. Par ailleurs, les données de seulement deux donneurs de monocytes avaient été compilées. Afin de compléter ces résultats, des membres de l'équipe, incluant Saad SABA, ont utilisé des monocytes de quatre donneurs puis réalisé des cinétiques de captation de NPs formulées à partir de PMLABe₇₃

(100%), PEG₄₂-*b*-PMLABe₇₃ (100%) ou d'un mélange de l'homopolymère et du copolymère PEGylé dans des proportions de 75/25 et 50/50, respectivement, en absence ou présence de SVF (Figure 76).

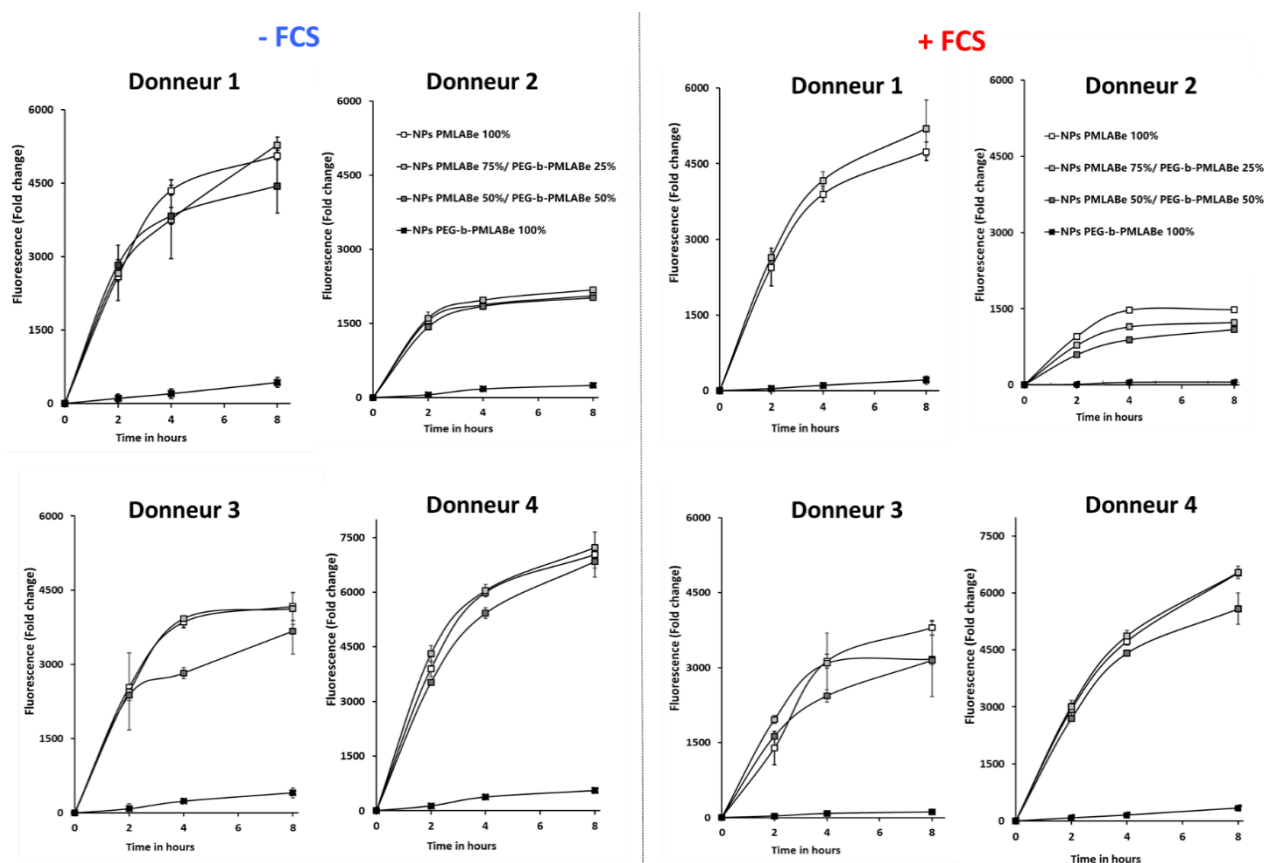


Figure 76 : Impact de la présence de sérum de veau fœtal sur la captation de NPs à base de PMLABe₇₃ et PEG₄₂-*b*-PMLABe₇₃ par les macrophages en culture primaire issus de 4 donneurs

La captation de NPs PMLABe₇₃ et PEG₄₂-*b*-PMLABe₇₃ a été mesurée par cytométrie en flux et les intensités de fluorescence sont représentées en unités arbitraires. Quatre compositions différentes de NPs ont été utilisées : NPs formulées à partir de PMLABe₇₃ (100%), PMLABe₇₃ 75%/PEG₄₂-*b*-PMLABe₇₃ 25%, PMLABe₇₃ 50%/PEG₄₂-*b*-PMLABe₇₃ 50% et PEG₄₂-*b*-PMLABe₇₃ (100%). Les incubations des NPs avec les cultures de macrophages ont été réalisées sur des cinétiques de 2, 4, 6 et 8 heures, en absence (-FCS) ou présence (+FCS) de sérum de veau fœtal.

Ces résultats montraient que seule une PEGylation complète, c'est-à-dire la formulation des NPs seulement à partir de copolymères PEG₄₂-*b*-PMLABe₇₃, entraînait une réduction significative de l'internalisation des NPs par les macrophages alors que les autres NPs sans PEG et avec 25 ou 50% de copolymères étaient captées de façon quasi-semblable. Bien que les captations avec ou sans sérum restaient assez comparables à 8h, sur les temps de 2 à 6 heures, les intensités de fluorescence étaient systématiquement plus faibles en présence de sérum indiquant que le sérum et/ou l'opsonisation des NPs ne constitue(nt) pas des facteurs favorisant l'internalisation des NPs à base de PMLABe₇₃.

Pour déterminer si ces différences d'internalisation de NPs par les macrophages, liées à la présence de sérum, sont dues à une opsonisation des NPs ou un effet indirect du sérum sur le fonctionnement cellulaire, nous poursuivons des expériences visant à comparer l'internalisation des NPs de PMLABe₇₃ « natives » (non traitées) avec des NPs qui sont pré-opsonisées par mélange avec du SVF ou du sérum humain, puis ajoutées au milieu de culture des macrophages en absence de sérum afin de mesurer

l'internalisation par cytométrie en flux (Figure 77). Nos premiers résultats semblent indiquer que les macrophages incubés avec des NPs pré-opsonisées internalisent ces nanovecteurs de façon équivalente aux cultures incubées en présence de 10% de SVF, alors que les macrophages incubés en absence de SVF ou en présence de 0,5% de SVF sans pré-opsonisation, captent significativement moins les NPs. Des expériences complémentaires sont en cours avec des NPs pré-opsonisées et pour lesquels de SVF résiduel est éliminé par dialyse ou centrifugation, sur des temps d'incubation plus courts, et en utilisant des macrophages et des cellules HepaRG.

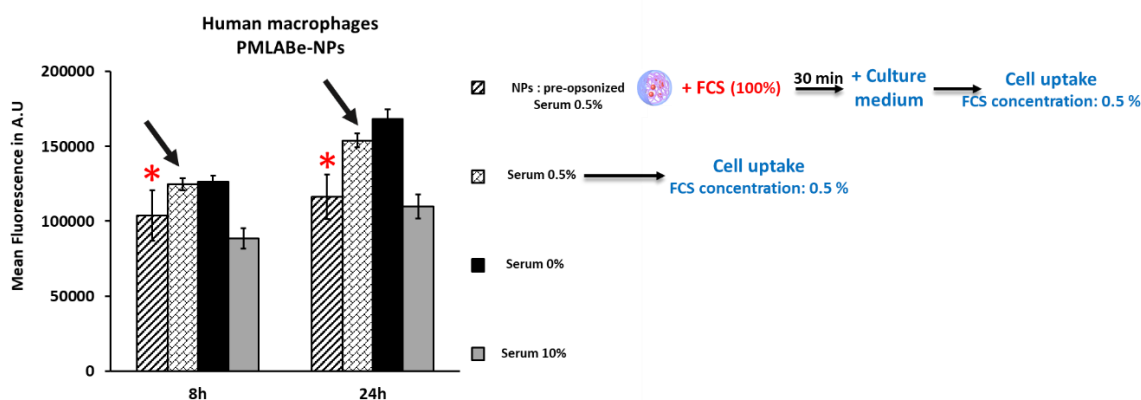


Figure 77 : Impact d'une pré-opsonisation des NPs de PMLABe₇₃ sur la captation par les macrophages humains

Des NPs formulées à partir du PMLABe₇₃ sont pré-opsonisées par mélange avec un faible volume de SVF (10 µL de suspension de NPs dans l'eau mélangée à 5 µL de SVF), l'incubation est réalisée pendant 30 minutes, puis les NPs sont ajoutées au milieu de culture (1 mL) aboutissant à une concentration finale en SVF de 0,5%. La captation des NPs dans cette condition est comparée à celle de NPs ajoutées dans des cultures de macrophages en absence de SVF, et en présence de 0,5 et 10% de SVF. Statistiques : *p<0.05. FCS et serum = serum de veau fœtal (SVF)

Dans la continuité de ces expériences sur la captation des NPs formulées à partir de PMLABe₇₃ et de PEG₄₂-b-PMLABe₇₃ par les macrophages et cellules HepaRG, nous avons recherché si leur internalisation pouvait induire une réaction inflammatoire en étudiant la sécrétion de cytokines.

Des macrophages et des HepaRG progéniteurs ont été cultivés en absence ou en présence de LPS pour stimuler la production de cytokines pro-inflammatoires. Le contrôle positif de l'activation de l'inflammasome est réalisé par introduction de cristaux d'acide urique (MSU) dans le milieu de culture (Gicquel et al., 2015). Le niveau d'activation de l'inflammasome a été évalué en mesurant les concentrations de cytokines pro-inflammatoires interleukine IL-6, IL-1α et IL-1β dans les surnageants de culture (Figure 78).

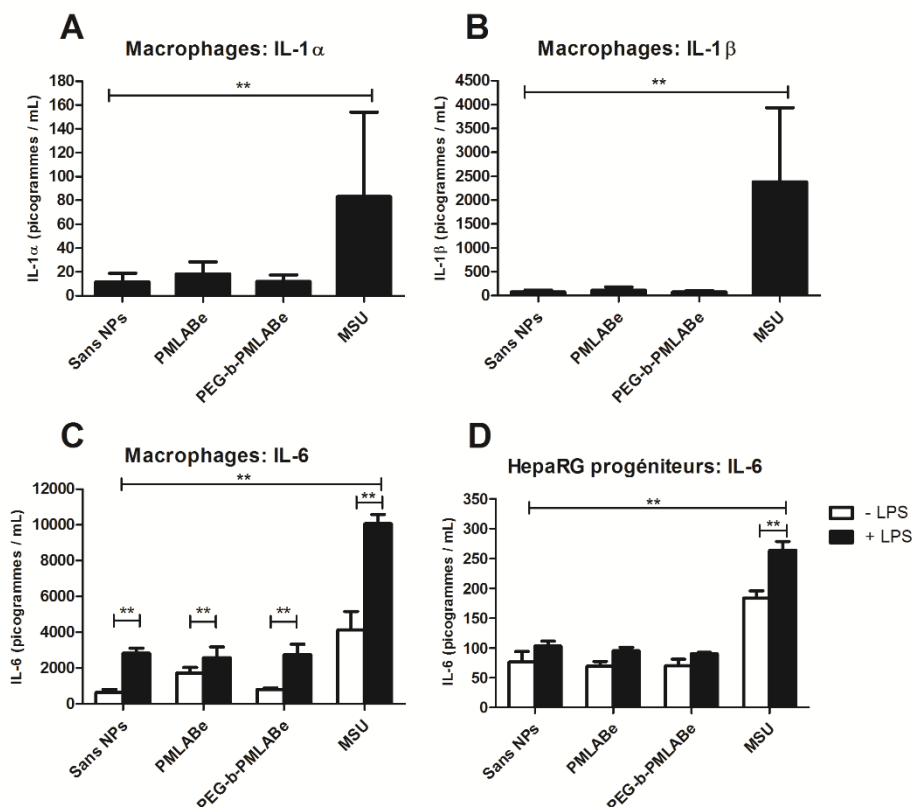


Figure 78 : Concentrations en cytokines pro-inflammatoires dans les milieux de culture des macrophages et cellules HepaRG progéniteurs

Dosages des IL-1 α (A), IL-1 β (B) et IL-6 (C) dans les surnageants de cultures des macrophages et de l'IL-6 dans les surnageants de culture des cellules HepaRG (D) exposées ou non aux NPs PMLABe₇₃, PEG₄₂-b-PMLABe₇₃ et cristaux d'acide urique (MSU : 500 μ g/mL). Le LPS (0,1 μ g/mL) a été utilisé pour pré-activer la réaction inflammatoire. Statistiques : **p<0,01 ; Comparaisons par le test de Mann et Whitney.

En absence de pré-traitement des cellules par le LPS, seule l'IL-6 est détectable dans les surnageants des macrophages. Après stimulation par le LPS, la sécrétion des trois cytokines augmente de manière importante mais l'incubation avec les NPs ne potentialise pas significativement cette production de cytokines pro-inflammatoires. Cela démontre donc que ces nano-objets n'activent pas l'inflammasome dans notre modèle de macrophages primaires. A l'inverse, l'incubation avec le MSU induit une forte augmentation des concentrations en cytokines confirmant l'activation de l'inflammasome (Gicquel et al., 2015).

Les cellules HepaRG produisent beaucoup moins de médiateurs de l'inflammation et l'IL-6 est la seule cytokine détectable dans le milieu de culture de ces cellules. De la même manière que pour les macrophages, le pré-traitement par le LPS augmente la sécrétion d'IL-6 et l'incubation avec les NPs n'induit pas une augmentation significative de cette production cytokinique. Par conséquent, les NPs à base de PMLABe₇₃ et de PEG₄₂-b-PMLABe₇₃ n'activent pas l'inflammasome dans notre modèle de cellules hépatiques.

III.4. Fonctionnalisation des nanoparticules Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ par greffage non-covalent de peptides

Dans la perspective de développer des NPs à base de PMLABe₇₃ fonctionnalisées pour le ciblage du CHC, nous avons pris le parti d'utiliser le copolymère PEGylé qui réduit partiellement l'opsonisation et la captation par des macrophages et de tenter sa fonctionnalisation pour lui faire acquérir un tropisme vis-à-vis des cellules dérivées d'hépatocarcinomes.

Différentes stratégies impliquant l'ajout de ligands spécifiques à la surface de nanovecteurs ont été mises en œuvre et évaluées dans différents modèles pré-cliniques pour améliorer le ciblage du CHC (Y. Du et al., 2022; Fernandes et al., 2015). Le Tableau 4 répertorie des études pré-cliniques réalisées en utilisant différents nanosystèmes fonctionnalisés pour cibler les cellules de CHC.

Tableau 4 : Nanovecteurs fonctionnalisés évalués pour leur capacité de ciblage de cellules hépatiques cancéreuses

No.	Ligands	Receptors	Cell lines	Nanoplatform
1	N-acetylgalactosamine (NacGal)	Asialoglycoprotein receptor (ASGPR)	HepG2, Hep3B, SK-Hep1	NACGal-siRNA/Cholesterol-antimicrobial peptide DP7
2	Fucoidan	P-selectin	HepG2	Fucoidan conjugated liposomal/DOX NPs
3	Pullulan	ASGPR	MHCC-97H	Pullulan coated paclitaxel-loaded DOPE/Pluronic F68 NPs
4	Glycyrrhetic acid (GA)	GA receptor	SMMC-7721, HepG2	GA-DOX/peanut agglutinin liposomes
5	Lactobionic acid (LA)	ASGPR	HepG2	Etoposide-loaded TPGS-LA NPs
6	Hyaluronic Acid (HA)	CD44	Huh-7	Nanographene oxide HA-Au nanorods-DOX
7	Folic acid (FA)	FA receptor	Hepa1-6	Folate-chitosan/interferon-inducible protein-10
8	Sialic acid (SA)	E-selectin	HepG2	SA-polydopamine@SPIO/DOX/Fe ³⁺ NPs
9	SP94	GRP78	HepG2, Hepa1-6	SP94-Prussian blue-sorafenib Cy5.5 NPs
10	A54	N/A	BEL-7402, HepG2	A54-PEG-CSO-ss-SA/DOX
11	Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) aptamer	EpCAM	BEL-7404	Anti-EpCAM-UCNPs-mitoxantrone micelles
12	SMS-1	A membrane protein	LM3	SMS-1-SFU-PLA NPs
13	Laminin	Epigallocatechin gallate (EGCG)	SMMC-7721	EGCG-ruthenium (Ru) NPs
14	RGD	Integrin receptor	HepG2	Magnetic NPs-dendrigrift PLL-RGD-GX1-DOX
15	Transferrin (Tf)	Tf receptor	HepG2	Tf-DOX/cisplatin NPs
16	T7	Tf receptor	BEL-7402	PAMAM-PEG-T7/DOX NPs
17	AFP	AFP receptor	HepG2, H22	AFP-Gd/Paditaxel loaded micelles
18	Epidermal growth factor receptor (EGFR) antibody	EGFR	SMMC-7721	DOX-loaded polymer-lipid hybrid NPs-Mal-EGFR
19	CD147 antibody	CD147	LM3, MHCC97H	Anti-CD147 liposomes-DOX
20	Anti-vascular endothelial growth factors (VEGF) antibody	VEGF receptor	H22, HepG2	Anti-VEGF PLA-PEG-PLL-Gd NPs

Différents ligands de ciblage sont proposés pour établir un tropisme vers les cellules issues de carcinomes hépatocellulaires. D'après (Y. Du et al., 2022)

Les récepteurs aux asialoglycoprotéines (ASGP-R1 et 2) sont abondamment et uniquement exprimés par les cellules du parenchyme hépatique. De plus, bien qu'ils ne soient pas spécifiques des cellules tumorales, ces récepteurs sont significativement surexprimés dans les tumeurs hépatiques. Ces caractéristiques, qui en font de bons candidats pour le ciblage actif, ont été mises à profit par de nombreuses équipes pour le développement de ligands spécifiques de type polysaccharides. Les ligands les plus étudiés, notamment en phase pré-clinique, sont le galactose, la galactosamine et le lactose. Cependant, le taux d'ASGP-R diminue dans les stades avancés de la maladie. Cette stratégie de ciblage n'aurait donc d'intérêts que pour les CHC à un stade précoce (Fernandes et al., 2015).

D'autres ligands, comme l'acide folique ou l'acide glycyrrhétinique, sont utilisés comme agents de ciblage pour le CHC (Y.-J. Li et al., 2015; Mezghrani et al., 2015). L'acide folique se fixe sur le récepteur aux folates surexprimé dans de nombreuses tumeurs humaines. L'acide glycyrrhétinique est un triterpène naturel présentant une forte affinité pour le foie bien que les récepteurs hépatocytaires impliqués n'aient pas été identifiés.

Une autre approche possible consiste à fixer des anticorps monoclonaux ou fragments d'anticorps à la surface des nanovecteurs. Cette approche passant par la reconnaissance des cellules tumorales hépatiques CD44+ pourrait permettre de cibler des sous-populations de cellules souches du CHC responsables des rechutes et de la dissémination tumorale (Fernandes et al., 2015).

Différentes équipes recherchent également des peptides courts pour fonctionnaliser la surface de nanovecteurs. Le peptide HIYPRH (T7) présente une forte affinité pour les récepteurs à la transferrine TRF1 et TRF2 surexprimés dans le CHC. Le peptide AGKGTSPLETT (A54) se fixe de manière spécifique sur les cellules de CHC humain. Il a été identifié grâce à la technique du phage display (Y.-Z. Du et al., 2012). Dans la stratégie de ciblage par peptide, le plus utilisé est le RGD constitué de trois acides aminés (AA) : Arginine-Glycine-Acide aspartique. Découverte par Erkki Ruoslahti et al, cette séquence peptidique est un motif essentiel pour l'adhésion cellulaire. En effet, la séquence RGD est présente dans de nombreuses protéines de la matrice extracellulaire et leur permet de se fixer aux intégrines exprimées à la surface des cellules (Arap et al., 1998; Ruoslahti, 2003). Parmi ces récepteurs d'adhésion cellulaires, les intégrines $\alpha_v\beta_3$ sont fortement exprimées par les cellules endothéliales des néovaisseaux et par la plupart des cellules tumorales. A l'inverse, elles sont peu retrouvées au niveau des cellules endothéliales normales et des tissus sains. Par conséquent, les intégrines $\alpha_v\beta_3$ sont des biomarqueurs de l'angiogénèse et constituent une cible intéressante pour le développement de traitements anticancéreux (Loyer et al., 2013; Zhan et al., 2010). Des peptides courts contenant la séquence RGD ont donc été développés pour se fixer préférentiellement aux intégrines $\alpha_v\beta_3$. Les nanovecteurs portant ces peptides sont donc des outils intéressants pour cibler le réseau vasculaire tumoral notamment dans un contexte de CHC (Y. Du et al., 2022; Fernandes et al., 2015).

Notre équipe s'intéresse, elle aussi, à cette stratégie de ciblage des cellules hépatiques tumorales par des peptides. Dans la première partie de ma thèse, nous avons cherché à développer une stratégie permettant d'évaluer rapidement la capacité d'un peptide à promouvoir le tropisme de NPs vers les cellules de CHC sans avoir à greffer de façon covalente le peptide. Nous disposions déjà à cette période du copolymère Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ (Huang et al., 2012). Nous avons alors imaginé le greffage des peptides à la surface des NPs par l'intermédiaire de la streptavidine (Figure 79).

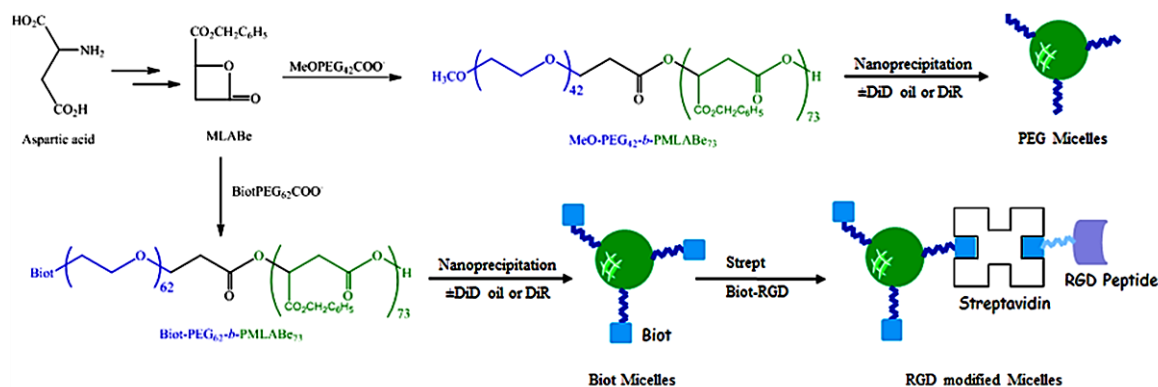


Figure 79 : Schéma résumant le greffage de peptides biotinylés à la surface de NPs Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ via la streptavidine

Il a été nécessaire de déterminer les concentrations optimales de streptavidine, peptide et copolymère à utiliser lors de cette étape de couplage pour obtenir une captation cellulaire efficace. Pour cela, nous avons fait varier les concentrations des trois composés et évalué la captation par les cellules HepaRG en mesurant l'intensité de fluorescence émise par ces cellules en cytométrie en flux. Quatre concentrations différentes de copolymère ont été testées, 1, 2, 4 et 8 μM , toujours sur la base des travaux antérieurs de l'équipe (Loyer et al., 2013).

La streptavidine présentant quatre sites d'interaction avec la biotine, des variations de la saturation par la biotine peuvent avoir des conséquences sur la captation cellulaire. Un des quatre sites doit être utilisé pour la fixation sur les NPs biotinylées. En théorie, il est donc possible de faire varier le peptide biotinylé dans un ratio molaire de 1 à 3 avec la streptavidine. Ainsi, pour chacune des quatre concentrations en copolymère, nous avons fait varier les concentrations en streptavidine et en peptide RGD, utilisé comme peptide d'essai (Tableau 5).

Tableau 5 : Combinaisons de streptavidine, peptide et copolymère utilisées pour déterminer les quantités et ratio des différents constituants des NPs pour un criblage de peptides hépatotropes

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

L'intensité de fluorescence augmente avec les concentrations croissantes en copolymère de 1 à 4 μM (Figure 80). L'utilisation du copolymère à forte concentration (8 μM) n'apporte pas d'avantages en termes de captation cellulaire mais, au contraire, l'intensité de fluorescence est plus faible (Figure 80D) que pour les concentrations de 2 et 4 μM . De plus, des agrégats des NPs en suspension dans le milieu de culture ont été observés en microscopie à fluorescence pour les cellules incubées en présence de 8 μM de copolymère (données non présentées). A la concentration de 1 μM en copolymère, les quantités variables en streptavidine et RGD n'affectent pas la captation. Pour les concentrations en copolymère de 2, 4 et 8 μM , l'utilisation d'un échafaudage copolymère/streptavidine/RGD selon le ratio 2/1/3 (histogrammes noirs Figure 80B-D) inhibe fortement la captation.

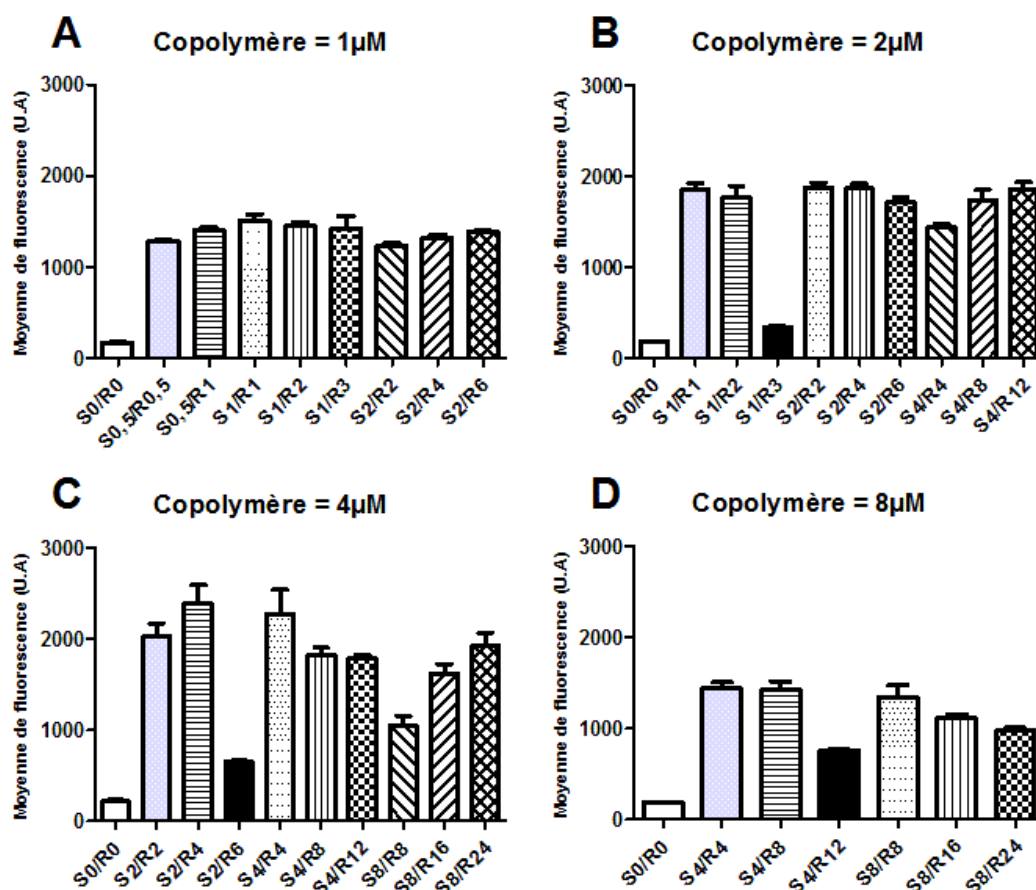


Figure 80 : Evaluation de l'incidence des concentrations en copolymère Biot-PEG₆₂-b-PMLABe₇₃, streptavidine et peptide sur la captation de NPs par des cellules HepaRG

S : concentration en streptavidine ; R : concentration en peptide, en μM.

A partir de ces données, nous avons décidé d'utiliser les concentrations suivantes pour les essais de captation : copolymère = 1 μM, streptavidine = 1 μM et peptide = 2 μM (ratio 1/1/2). Ces concentrations ne correspondent pas aux intensités de fluorescence maximales observées avec le peptide RGD pour la captation cellulaire. Cependant, ce choix a été fait pour éviter une saturation de la captation et permettre d'observer d'éventuelles différences entre les peptides à tester.

Pour illustrer les différences d'internalisation des NPs formulées à partir du Biot-PEG₆₂-b-PMLABe₇₃ ou du PEG₄₂-b-PMLABe₇₃ fonctionnalisées ou non, une analyse comparative des intensités de fluorescence de cellules HepaRG incubées avec ces différentes NPs est présentée en (Figure 81). L'absorption cellulaire des NPs formulées à partir du PEG₄₂-b-PMLABe₇₃ par les cellules HepaRG était efficace puisque pratiquement toutes les cellules se sont révélées positives par cytométrie en flux et microscopie à fluorescence (Figure 81B). Cependant, l'internalisation cellulaire a été fortement améliorée en utilisant des NPs formulées à partir du copolymère Biot-PEG₆₂-b-PMLABe₇₃ (Figure 81C) par rapport celle observée en l'absence de biotine. Nous avons également mesuré la captation cellulaire en utilisant des NPs streptavidine-Biot-PEG₆₂-b-PMLABe₇₃ saturé de 2 molécules de biotine libres (biotine finale/rapport moléculaire de la streptavidine = 3) pour évaluer l'effet possible de la streptavidine sur l'absorption cellulaire (Figure 81D). Dans ces conditions expérimentales, la captation

était légèrement diminuée par rapport à celle observée avec les NPs Biot-PEG₆₂-b-PMLABe₇₃ (sans streptavidine). Nous avons ensuite observé que l'ajout du peptide RGD biotinylé sur les NPs streptavidine-Biot-PEG₆₂-b-PMLABe₇₃ améliorait l'internalisation des NPs comparativement à celle observée avec les NPs de Biot-streptavidine-Biot-PEG₆₂-b-PMLABe₇₃ (Figure 81E). La microscopie à fluorescence confirmait une forte accumulation de DiDoil dans les cellules avec une fluorescence en forme d'anneau délimitant le noyau des cellules (Figure 81E).

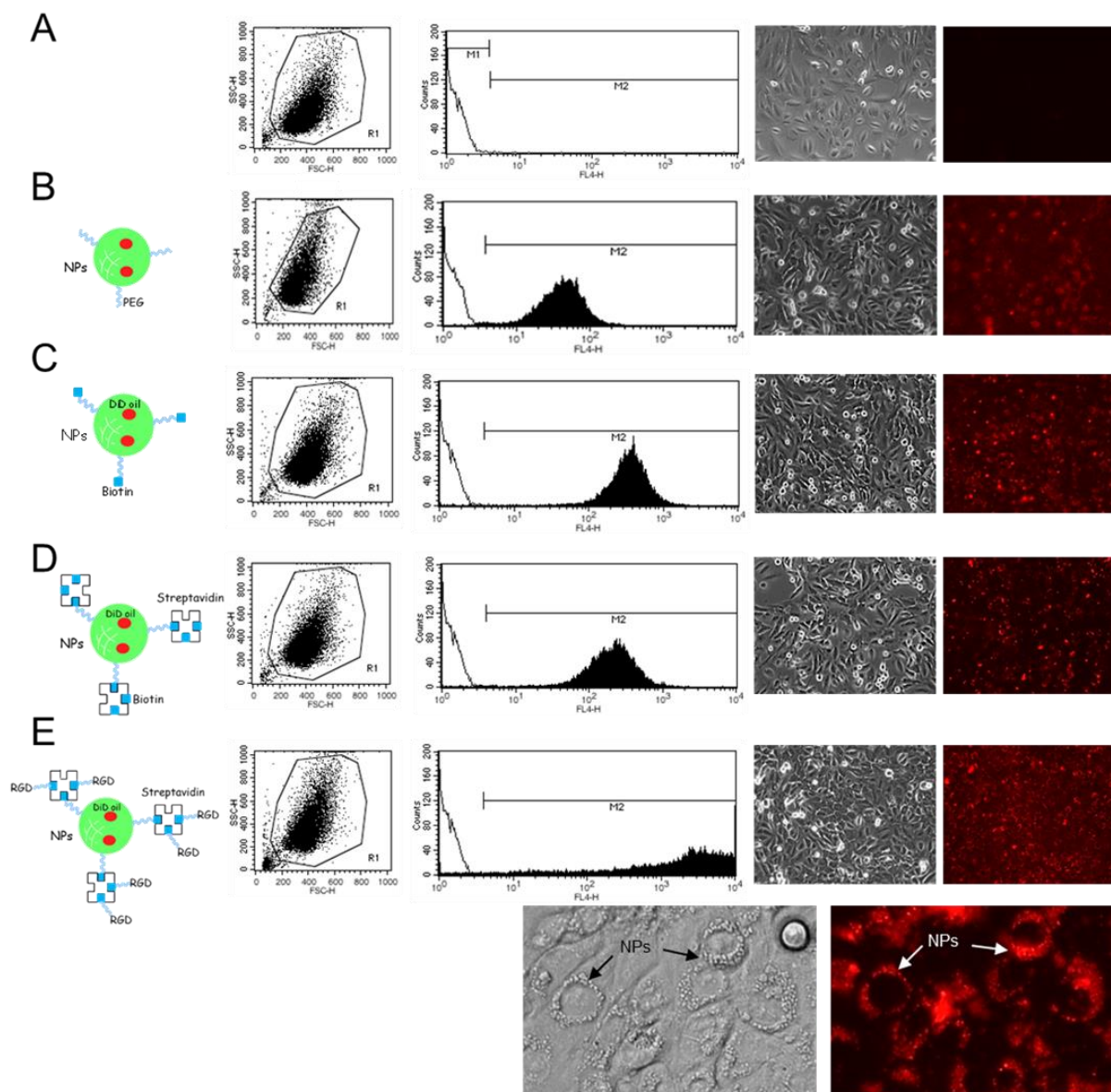


Figure 81 : Captation par les cellules progénitrices HepaRG de NPs fluorescentes mesurée par cytométrie en flux et microscopie

La taille des cellules (FSC) et la granularité (SSC) ont été représentées sur des nuages de points pour permettre l'identification des cellules viables (fenêtre R1). La fluorescence était représentée sur des histogrammes (axe x : fluorescence, axe y : nombre de cellules). Les cellules HepaRG témoins (A) ou cellules incubées avec des NPs de PEG₄₂-b-PMLABe₇₃ (B), Biot-PEG₆₂-b-PMLABe₇₃ (C), Biot-Streptavidine-Biot-PEG₆₂-b-PMLABe₇₃ (D), RGD-Biot-Streptavidine-Biot-PEG₆₂-b-PMLABe₇₃ (E). Microscopie à contraste de phase et à fluorescence mettant en évidence les NPs fluorescentes.

Dans une expérience préliminaire d'évaluation de la biodistribution des NPs dérivées du PEG-*b*-PMLABe₇₃ *in vivo*, une injection systémique de NPs de Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ chargées ou non par la sonde fluorescente DiR a été réalisée chez des souris (Figure 82). Le premier groupe de souris a reçu une injection de NPs sans DiR pour quantifier le bruit de fond. Les deux d'autres groupes de souris ont reçu une injection de NPs Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ et RGD-Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃. Les NPs chargées en DiR ont permis de déterminer la biodistribution des NPs sur 48h post injection.

Nous n'avons pas observé de modification du comportement des souris injectées et aucune perte dans les groupes n'est survenue pendant le déroulement de l'expérience fournissant une première évidence que les NPs à base de dérivés du Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ ne déclenchent pas de toxicité aigüe *in vivo*. La quantification de la fluorescence indiquait une accumulation du DiR dans la zone péritonéale/foie avec une fluorescence plus élevée chez les souris ayant reçu une injection de NPs portant le peptide RGD.

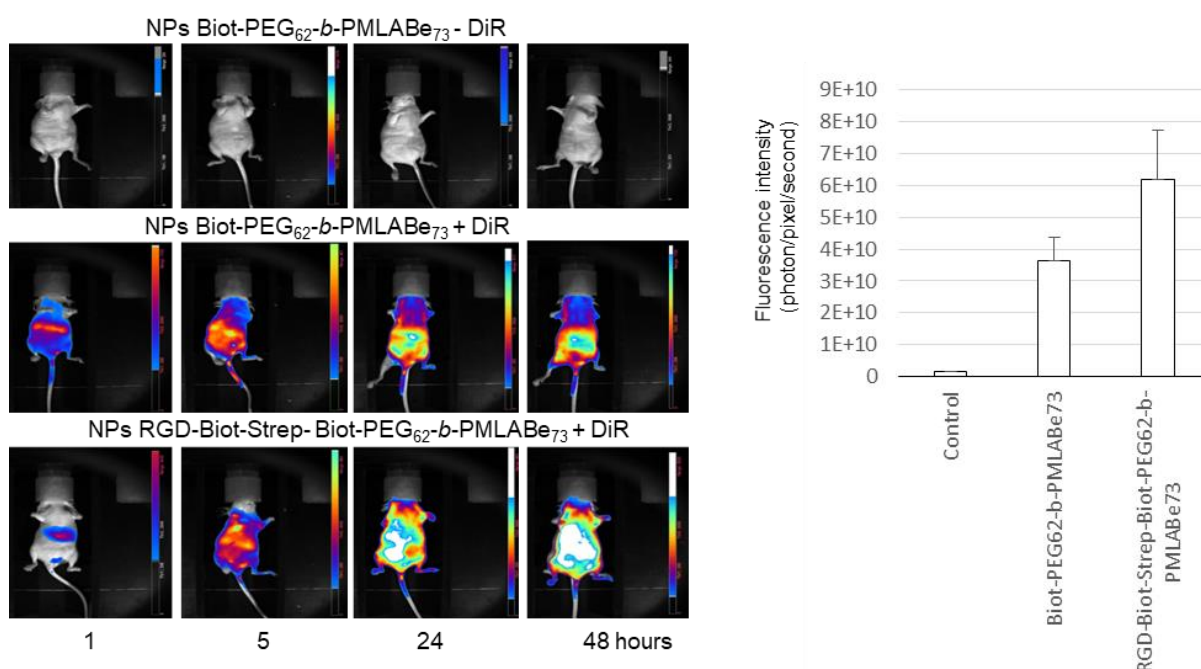


Figure 82 : Biodistribution *in vivo* des NPs de PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ chez la souris nude

Trois groupes de souris ont reçu une injection (veine de la queue) de NPs formulées à partir de Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ sans incorporation de DiR (ligne du haut), de Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ chargées en DiR (ligne du milieu) ou de RGD-streptavidine-Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ chargées DiR (ligne du bas). La fluorescence sur souris entière était mesurée à 1, 5, 24 et 48 heures après l'injection. Des images de fluorescence représentatives de chaque groupe sont présentées. Graphiques représentent la quantification de la fluorescence dans la zone abdominale pour tous les animaux à 48 heures.

III.5. Biocompatibilité des nanoparticules à base de dérivés du PMLABe₇₃

Dans des expériences antérieures, la biocompatibilité des NPs produites à partir de PMLABe₇₃ a été étudiée en réalisant des expositions aigües avec une large gamme de doses de NPs et une exposition unique de différents types cellulaires, notamment les cellules de carcinome hépatocellulaire Huh7 (Huang et al., 2012). Dans ces conditions, seules de très fortes quantités de NPs réduisent légèrement la viabilité cellulaire.

Dans cette étude, la viabilité cellulaire a été testée après 7 jours d'exposition de cellules HepaRG proliférantes ou différenciées aux NPs formulées à partir de Biot-PEG₆₂-*b*-PMLA_{Be73} fonctionnalisées ou non par le peptide RGD. Ce temps d'une semaine permettait de traiter les cellules 4 fois avec les NPs et d'évaluer les effets d'une exposition chronique et une éventuelle hépatotoxicité exercée par les NPs à la fois sur la prolifération des cellules HepaRG progénitrices et des hépatocytes différenciés (Figure 83).

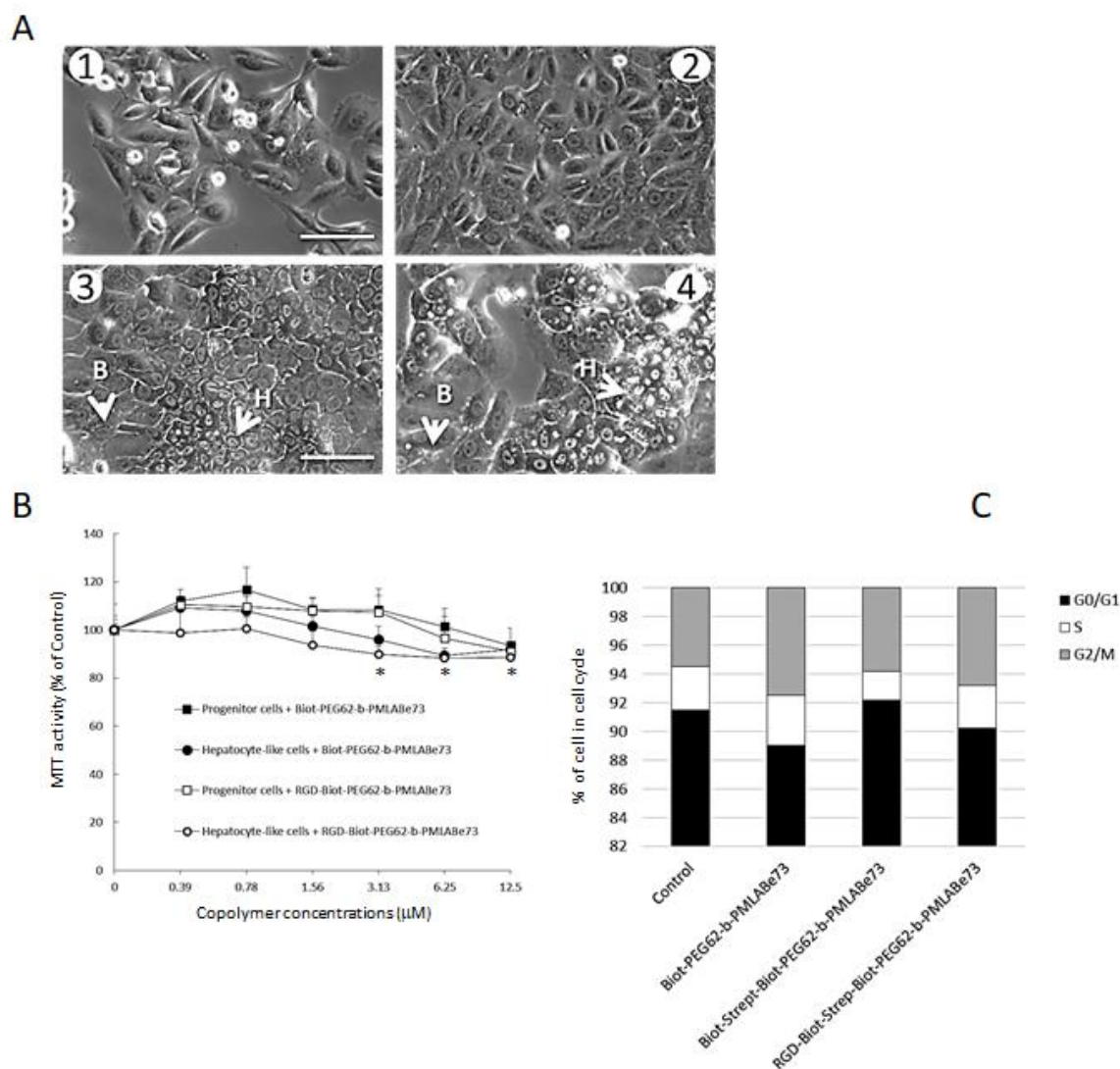


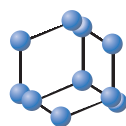
Figure 83 : Evaluation de la biocompatibilité des NPs à base de Biot-PEG₆₂-*b*-PMLA_{Be73} fonctionnalisées ou non par le peptide RGD

(A) Morphologie en contraste de phase des cellules HepaRG à différents stades de différenciation. (1) Progéniteurs bipotents à faible densité, jour 1 après l'ensemencement, (2) cellules HepaRG au jour 7 après l'adhésion, (3) cellules HepaRG de type hépatocyttaire « H » et biliaires « B » au jour 14, (4) coculture de cellules HepaRG hépatocyttaires et les cellules biliaires au jour 30 après ensemencement. Barre : 100 μm. (B) Viabilité cellulaire mesurée à l'aide du test MTT. Cellules progéniteurs et cellules différenciées ont été exposées à une gamme de concentrations de copolymères (0,39 à 12,5 μM) pendant 7 jours avant de mesurer les activités MTT. (C) Contenus en ADN des cellules HepaRG progénitrices mesurés par cytométrie en flux discriminant les cellules en phases G0/G1, S et G2/M du cycle cellulaire après 2 jours d'incubation avec des NPs et un seul traitement.

Nous avons observé une augmentation légère mais significative de l'activité MTT dans les cultures de cellules progénitrices incubées avec la faible concentration en copolymère de 0,78 μM alors qu'une diminution modérée était observée dans toutes les conditions de culture pour les concentrations

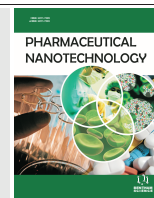
élevées en copolymères allant de 3,13 à 12,5 μM . Dans les cellules présentant une diminution de l'activité du MTT, la détection de la mort cellulaire par apoptose a été réalisée en mesurant l'activité de caspases (clivage du substrat peptidique DEVD-AMC) mais aucun changement significatif entre le contrôle et cultures incubées par des NPs n'a été détecté (données non présentées). Ces données suggèrent que la mort cellulaire/cytotoxicité était soit inférieure au niveau de détection des tests d'activités caspases et/ou que la légère diminution du MTT puisse s'expliquer par un ralentissement la prolifération des cellules progénitrices HepaRG et un effet cytotatique, sans induction de la mort cellulaire, aux concentrations élevées de copolymère. Cependant, l'effet cytotatique est une explication possible seulement pour la prolifération des cellules progénitrices puisque les cellules différenciées ne prolifèrent pas dans nos conditions de culture.

IV. ARTICLE 1



**BENTHAM
SCIENCE**

In vitro Toxicity Evaluation and *in vivo* Biodistribution of Polymeric Micelles Derived from Poly(ethylene glycol)-*b*-poly(benzyl malate) Copolymers

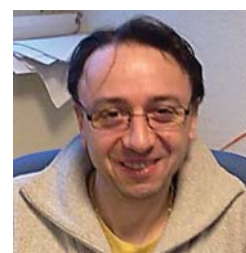


Elise Vene¹, Kathleen Jarnouen¹, Zhi Wei Huang[§], Bedhouche Wahib¹,
Tristan Montier², Sandrine Cammas-Marion³ and Pascal Loyer^{1*}



S. Cammas-Marion

¹INSERM UMR S-991, Foie, Métabolismes et Cancer; Université de Rennes 1; CHU Pontchaillou Rennes, 35033 Rennes, France; ²Unité INSERM 1078, Faculté de Médecine, Université de Bretagne Occidentale, Université Européenne de Bretagne, 22 avenue Camille Desmoulins, 29238 Brest Cedex 3, France; ³UMR 6226 CNRS; Institute of Chemical Sciences of Rennes; Université de Rennes 1; Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes, 11 allée de Beaulieu, CS 50837, 35708 Rennes Cedex



P. Loyer

7, France; [§]Current address: UMR 6270 CNRS; Laboratoire Polymères Biopolymères Surfaces; Université de Rouen, 76821 Mont Saint Aignan, France

Abstract: Background: The development of polymeric micelles for site-specific drug delivery is an exponentially growing field of research. In this context, we have designed two degradable amphiphilic copolymers, the poly(ethylene glycol)-*b*-poly(benzyl malate) (PEG₄₂-*b*-PMLABe₇₃) and the biotin-poly(ethylene glycol)-*b*-poly(benzyl malate) (Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃). The copolymer bearing biotin residue was synthesized in order to formulate micelles for grafting biotinylated cyclic RGD peptide onto their surface via the bridging streptavidin.

Objective: Our study aimed at investigating the *in vitro* and *in vivo* toxicity of such micelles and to evaluate the potential of these nanovectors for hepatocyte-targeted drug delivery. Methods: The toxicity of micelles obtained by the nanoprecipitation method and characterized by dynamic light scattering and zeta potential measurement was evaluated *in vitro* using the differentiated hepatocyte-like HepaRG cells and *in vivo* in mice.

Results: The micelles derived from PEG₄₂-*b*-PMLABe₇₃, Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ and RGD-Biot-Strept-Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ did not affect the cell proliferation and apoptotic indexes in HepaRG hepatoma cells and were well tolerated in mice following systemic injection. The hydrophobic fluorescent probes DiD oil and DiR were efficiently encapsulated in PEG-*b*-PMLABe-derived micelles allowing the visualization of their uptake into HepaRG cells. Furthermore, the addition of RGD peptide onto micelles strongly enhanced the cell uptake *in vitro* and liver targeting *in vivo*.

Conclusion: These data demonstrate the low toxicity of poly(benzyl malate) derived copolymers towards hepatocyte-like cells and emphasize their potential use for the design of liver targeting nanovectors.

Keywords: Biocompatible copolymer, biodistribution, biotin, cyclic RGD peptide, HepaRG cells, Poly(benzyl malate) derivatives, polymeric micelles.

INTRODUCTION

The generic term of drug delivery nanovectors refers to engineered molecular systems for transporting

pharmaceutical compounds in order to reduce the drug degradation and clearance while improving the therapeutic index by limiting the side effects of chemotherapies [1]. Drug delivery is thus a general concept that integrates the interaction between the drug and transport system, the dosage and the route of administration. The current developments

*Address correspondence to this author at the INSERM UMR S-991, Foie, Métabolismes et Cancer; Université de Rennes 1; CHU Pontchaillou Rennes, 35033 Rennes, France; Tel: (33) 2-23-23-38-73; Fax: (33)-2-99-54-01-37; E-mail: pascal.loyer@univ-rennes1.fr

in the field of drug delivery include the design of nanocarriers capable of cell/tissue targeted delivery that will allow the sustained release of pharmaceutical compounds in a controlled manner from the nanoparticles (NPs) and in specific areas of the body [2, 3].

Although the use of nanovectors in clinical protocols is far from being a generalized routine, an impressive literature resulting from basic research on NPs has led to numerous preclinical/clinical trials and the approval of several nanovectors by the Food and Drug Administration for diagnosis and therapeutics especially for the treatment of solid tumors [4-9]. These breakthroughs result from a better understanding of cancer biology, the synthesis of macromolecules and the formulation of NPs with features such as size, porosity, shape and surface properties that play an important role in drug encapsulation and delivery [7, 8, 10].

The design of efficient nanovectors thus requires the elaboration of synthetic materials that self-assemble in aqueous solution to form nanovectors with complex architecture. These nanocarriers must address several requirements: (a). The efficient encapsulation of pharmaceutical compounds protecting them from any degradation, (b). A reduced recognition by the immune system following systemic administration allowing a prolonged circulation time of drugs in the organism, (c). A preferential accumulation into tumor cells as a result of the enhanced permeation and retention (EPR) effect and/or the active targeting of cancer cells [11, 12], (d). A lack of any acute or chronic toxicity.

Amphiphilic block copolymers are promising compounds for drug delivery since they form nanoparticles or micelles in aqueous solutions with a hydrophobic inner-core surrounded by a hydrophilic corona. In order to decrease the recognition by the immune system and confer a prolonged circulation time, block copolymers are often composed of poly(ethylene glycol) (PEG), a biocompatible and FDA approved hydrophilic polymer [7-11, 13, 14]. However, the presence of such a hydrophilic neutral corona usually significantly reduces the cell uptake of the corresponding nanocarriers. To overcome this drawback and to improve a specific cell targeting, cell ligands are grafted at the surface of the nanocarriers, which

enhance the cell/nanovector interaction and the cell uptake [9, 10, 12]. Various targeting molecules are currently evaluated, including specific antibodies, sugars and polysaccharides [15] and peptides [9, 12, 16, 17].

Another crucial parameter to consider when designing drug nanocarriers is the biocompatibility of both the (co)polymers and the derived nanocarriers. Indeed, even if the molecular weight of the polymeric materials used to prepare the nanovectors is lower than the renal threshold (around 40,000 g/mol) [18], both nanocarriers and (co)polymers must not induce any toxicity towards blood components as well as healthy cells and tissues during their presence in the body from their injection until their complete elimination. Many block copolymers constituted by the hydrophilic biocompatible PEG and a hydrophobic degradable and biocompatible block, often a poly(ester), have been synthesized such as the PEG-*b*-poly(ϵ -caprolactone) [19, 20] or the PEG-*b*-poly(L-lactide) [21]. However, commonly used poly(esters) lack of functional groups thus limiting the modulation of their physico-chemical properties and/or the grafting of biologically active molecules. Therefore, more complex functional and/or functionalizable (co)polymers have been elaborated that bear specific molecules (i.e.; drug, targeting agent, fluorescence probes) covalently bound to either the main polymer chain or the end of the macromolecule, in order to formulate polymeric nanoparticles or micelles for biomedical applications [14].

The hepatocellular carcinoma (HCC), the most common form of primary liver tumors, is an aggressive cancer with rising incidence, poor prognosis and limited therapeutic options placing HCC at the 2nd rank among the most deadly cancers in the world [22]. Despite improvements in the HCC treatments, the therapeutic arsenal is limited mainly because of chemoresistance of liver tumors to conventional anti-tumor agents and a poor distribution of these agents at the tumor site [22]. Patients with HCC at advanced stages receive palliative treatments such as transarterial chemoembolization, radioembolization and, recently, chemotherapies using an inhibitor of tyrosine kinase, the Sorafenib (Nexavar[®]) [22]. In this context, the drug delivery using nanocarriers that would increase the intra-hepatic drug concentration while

limiting the exposure of healthy tissue may represent a promising strategy for the treatment of HCC [23]. Our laboratory has developed poly(malic acid) (PMLA) derivatives for liver targeting drug delivery systems [24, 25]. Amphiphilic derivatives of PMLA constituted by a PEG hydrophilic block and a poly(benzyl malate) (PMLABe) hydrophobic segment self-assemble to form PEG₄₂-*b*-PMLABe₇₃ micelles that show very low cytotoxicity levels towards various cell lines [26]. In a previous report, we also grafted a biotin molecule at the free end of the PEG block to derive the Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ providing an anchoring biotin residue to graft onto micelles the cell targeting cyclic RGD peptide via the streptavidin bridging factor resulting in a significantly improved cell uptake [27].

In the present report, the PEG-*b*-PMLABe and the biotin- and/or RGD-modified NPs were used *in vitro* and *in vivo* to further assess their features and toxicity. Here, we briefly describe the preparation and characterization of the PEG-*b*-PMLABe based micelles and demonstrate that both the biotin and RGD peptide strongly enhance the micelle uptakes by HepaRG hepatoma cells without significant effects on viability and proliferation. In addition, we provide the first *in vivo* biodistribution study of PEG-*b*-PMLABe micelles in mice following intravenous injections.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of PEG₄₂-*b*-PMLABe₇₃ and Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ based Micelles

The PEG₄₂-*b*-PMLABe₇₃ and the Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ were synthesized by anionic ring opening polymerization (ROP) of benzyl malolactonate (MLABe) using the carboxylate end-group of ω -methoxy, α -carboxylate-PEG₄₂ (Mw=2,015 g/mol) and ω -biotin, α -carboxylate-PEG₆₂ (Mw=3,270 g/mol), respectively, as described earlier [26]. Block copolymers were characterized by Fourier Transform Infra-Red (FTIR), proton Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and by Size Exclusion Chromatography (SEC in THF, polystyrenes as standards) as already presented [26].

The corresponding empty macromolecular micelles were prepared by the nanoprecipitation method [28] as following: 5 mg of block copolymers were dissolved in 1 mL of acetone ; this solu-

tion was rapidly added to 2 mL of distilled water under vigorous stirring for 10 min at room temperature. Then, the acetone was evaporated under vacuum leading to an aqueous solution of micelles based on either the PEG₄₂-*b*-PMLABe₇₃ or the BiotPEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ at a concentration of 2.5 mg/mL. The empty micelles were analyzed by dynamic light scattering (DLS with a Delsa™ Nano Beckman Coulter apparatus, 25°C, CONTIN method) for hydrodynamic diameter and polydispersity. Their zeta potential measurements were performed on a Delsa™ Nano Beckman Coulter apparatus at 25°C and the measured electrophoretic mobility (μ) was converted to zeta potential (ζ) using the Smoluchowski approximation. In order to follow the *in vitro* cell uptake and *in vivo* biodistribution of the PEG-*b*-PMLABe based NPs, we have encapsulated two different fluorescence probes, the 1,1'-dioctadecyl3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine perchlorate (DiD oil) and the 1,1'-dioctadecyl3,3',3'-tetramethylindotricarbocyanine iodide (DiR), inside the hydrophobic inner core of the NPs. The DiD oil or DiR loaded micelles were prepared using the nanoprecipitation procedure described above. Ten % (wt/wt) of the selected fluorescent probe (DiDoil or DiR solution in acetone at the concentration of 2 mg/mL) were added to the solution of block copolymers (5 mg) in acetone with a final acetone volume of 1 mL. The mixture was nanoprecipitated into 2 mL of distilled water under vigorous stirring. After organic solvent evaporation, the unloaded fluorescent probe was removed by ultracentrifugation at 15,000 x g at 15°C for 7 min using filter with an exclusion limit 10,000 Da. The filters were returned and centrifuged for 1 min at 1000 x g at 15°C. The volume of the recovered solutions was completed to 2 mL with distilled water in order to obtain a final concentration in NPs of 2.5 mg/mL. The concentration of loaded DiD oil or DiR was evaluated by UV at 660 nm using a calibration curve of DiD oil or DiR solution in a mixture of dimethylformamide (DMF)/H₂O (80/20). Eighty μ L of the DiD oilloaded micelles or DiR-loaded micelles were mixed with 320 μ L of DMF and the resulting solution was analyzed by UV at 660 nm, giving access to the encapsulation efficiency (E.E.).

The encapsulation efficiency was calculated using the following equation:

$$E.E. \% = \frac{[\text{DiD oil or DiR}]_{\text{encapsulated}}}{[\text{DiD oil or DiR}]_{\text{initial}}} * 100$$

In vitro Opsonisation of Micelles

The interaction of plasma proteins was investigated by incubating micelles with human serum prior to the detection of micelle-bound proteins using electrophoresis on acrylamide gels. Briefly, 250 µg of copolymers (micelles) diluted in 0.5 mL of phosphate buffer saline (PBS) were incubated with 0.5 mL of human serum for 5, 15, 30, 60 or 120 minutes at room temperature. Micelles were then collected by centrifugation at 11.000 g for 30 minutes. The pellet was washed twice with 1 mL of PBS prior to denaturation of micelles and bound proteins with 100 µL of loading buffer (Tris-HCl 100 mM, pH 6.8, bromophenol blue 0.2%, sodium dodecyl sulfate 8%, glycerol 20 %, and beta-mercaptoethanol 5%). Samples were boiled in water bath for 10 min, then proteins were loaded on 10% polyacrylamide gels and separated by electrophoresis (Invitrogen). Total proteins were detected by coomassie gel staining or by western blot using albumin, immunoglobulin and complement C3 specific antibodies.

Preparation of c-RGD Grafted Micelles

The cyclic Biot-RGD peptide (Eurogentec, Belgium) was grafted onto the biotinylated nanoparticles via the streptavidin protein (Strept, AnaSpect, Eurogentec, Belgium). Aqueous solutions of Biot-RGD peptide and streptavidin were prepared at final concentrations of 2.9 mM and 178 mM, respectively. The Biot-RGD peptide (0.7 µL) and the streptavidin (5 µL) were mixed in a final volume of 50 µL (H₂O qsp) and incubated for 1 h at 4°C. Then, 9.7 µL of Biot-PEG₆₂-b-PMLABe₇₃ based NP's solution were added to the Biot-RGD and streptavidin mix in a final volume of 100 µL (H₂O qsp), incubated for 1 h at 4°C and diluted into a final volume of 1 mL of culture medium for final concentrations of the BiotRGD peptide at 2 µM, the streptavidin at 1 µM and copolymer at 1 µM. For cell viability and cell uptake assays, controls included micelles of Biot-PEG₆₂-b-PMLABe₇₃ and the same micelles saturated with streptavidin on which 2 binding sites were saturated with biotin.

In vitro Assays

HepaRG cells were cultured as previously described [29] in William's E medium (Lonza) supplemented with 2 mM of glutamine (Gibco),

5 mg/L of insulin (Sigma), 10⁻⁵M hydrocortisone hemisuccinate and 10% of fetal calf serum (Lonza).

The cytotoxicity was assessed using the Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) assay. Briefly, 10⁴ cells plated in 96 well plates were incubated for 7 days with micelles prior to the addition of MTT (0.25 mg/mL) in William's E medium without fetal calf serum for 2 h at 37°C. During the 7 days, the medium was renewed 4 times with fresh micelles added each time to assess the cytotoxicity upon a chronic exposure to NPs. The formazan crystals thus formed were dissolved in DMSO at room temperature for 5 min, and the absorbance was measured at 490 nm with a microplate reader (Polarstar Omega, BMG Labtech). The MTT values reflecting mitochondrial enzymatic activities which are directly correlated to the number of viable cells were expressed in percentage relative to the absorbance determined in control cultures. Apoptosis was measured using a caspase 3 assay. After cell lysis in caspase activity buffer [30], 50 µg of total proteins were incubated with 80 µM of acetyl Asp-Glu-Val-Asp 7amido-4-methylcoumarin (Ac-DEVD-AMC) caspase 3 substrate and caspase-mediated cleavage of Ac-DEVD-AMC was measured by spectrofluorimetry (Septra Max Gemini, Molecular Devices) at excitation/emission wavelengths of 380/440 nm.

Cell proliferation was assessed using the Cycle test plus DNA reagent kit (Becton Dickinson, France) allowing DNA staining with propidium iodide. Cells (5.10⁵) incubated for 2 days with micelles were detached by trypsin treatment and re-suspended in 5 mL PBS to disperse cell aggregates. The cells were collected by centrifugation at 4,000 × g and room temperature for 1 min and the pellet washed twice with 1 mL of the buffer provided with the kit. Then, the pellet was dispersed in 125 µL of solution A and incubated 10 min at room temperature. Hundred µL of solution B was added and incubated 10 min at room temperature prior to the addition of 100 µL of solution C containing propidium iodide. DNA content was measured (Channel FL2A) by flow cytometry using FACScalibur equipped with an argon/blue laser at 488 nm (Becton Dickinson, France).

For the cell uptake assays, 24 wells culture plates were seeded with 10⁵ HepaRG cells per well. The nanoparticles loaded with DiD oil or

negative control micelles (without DiD oil) were added to the wells for 24 h. After incubation, the culture medium was removed and the cell monolayers were washed twice with PBS before the observation by fluorescence microscopy (Zeiss Inverted Microscope, Analysis Software AxioVision). Then, the cells were detached with trypsin and analyzed by flow cytometry (FACSCalibur Becton Dickinson): dot plots of forward scatter (FSC: x axis), the side scatter (SSC: y axis) allowed to gate the viable cells prior detecting the fluorescence (Channel FL4-H: x axis, counts: y axis of histograms) emitted by the DiD oil-loaded NPs present in cells. For the binding of biotin, Atto488 fluorescent biotin purchased from Sigma Aldrich was incubated with cells overnight at the concentration of 1.7 μM . Cytometry data were analyzed using CellQuest software (Becton Dickinson).

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

***In vivo* Studies**

The *in vivo* biodistribution assays of DiR-loaded micelles were conducted with female BALB/c nude mice of 6 weeks (JANVIER Rodent research models & associated services LABS, Saint Berthevin, France). This project was performed prior to the current federal validation requirements by the national French ethic committee but all experiments complied with ethical laws, and experimental procedures were approved by local ethical committee. Mice were housed and maintained at the animal facility; they were processed in accordance with the Laboratory Animal Care Guidelines and with the agreement of the regional veterinary service. Three groups of mice (3 mice per group) were injected in tail vein with 100 μL of micelle suspension corresponding to 200 μg of copolymers: group 1 injected with BiotPEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ derived micelles without DiR, group 2 injected with Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ derived micelles loaded with DiR, and group 3 injected with biotinylated RGD peptide-streptavidin-Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ derived micelles also loaded with DiR. Noninvasive bioflu-

orescence (BFI) imaging was performed successively at 1, 3, 5, 24 and 48 h post injection, using the BFI Nightowl II system (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany). This system is equipped with a cooled slow-scan CCD camera and driven with the Winlight32 software (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany). Considering the fluorescent characteristics of the DiR, we selected the 750 nm excitation and 780 nm emission filters. BFI images were taken onto different positions to obtain general view of fluorescence distribution. The animals were previously anesthetized with a 4% air-isoflurane blend maintained anesthetized in the dark chamber during the image acquisition. The fluorescent acquisition time was 1 second and the fluorescent signal was then overlaid on a picture of corresponding mouse.

Results were expressed as photon/pixel/second.

RESULTS AND DISCUSSION

Micelles Preparation and Characterization

In order to synthesize biocompatible functional (co)polymers able to form HCC targeting micelles, we designed amphiphilic block copolymers (Fig. 1) constituted by the FDA approved hydrophilic PEG, bearing or not a biotin (Biot) molecule at one end, and the biocompatible and degradable hydrophobic poly(benzyl malate) (PMLABe) belonging to the poly(malic acid) (PMLA) family [26].

As described previously [26], the anionic ring opening polymerization of benzyl malolactonate (MLABe) was performed using either α -methoxy, ω -carboxylate PEG₄₂ or α biotin, ω -carboxylate PEG₆₂ as initiator, and followed by FTIR (disappearance of the bond corresponding to the carbonyl group of the lactone's ring at 1850cm^{-1}). Once this band disappeared from the FTIR spectrum, the PEG₄₂-*b*-PMLABe₇₃ and BiotPEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ block copolymers were purified and characterized by proton NMR (structure and molecular weight determination of the PMLABe blocks) and by size exclusion chromatography (molecular weight of the block copolymers and polymolecularity index) [26]. Using these methods we have previously reported that the molecular weights of PMLABe copolymers were in good agreement with the theoretical ones fixed by the ratio MLABe/PEG initiator [26].

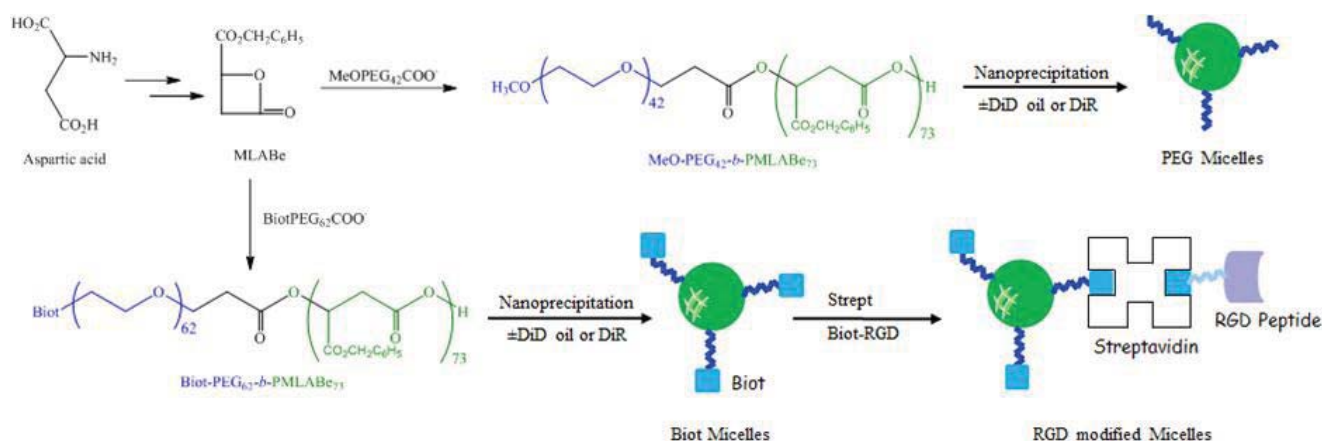


Fig. (1). Synthetic route to PEG-*b*-PMLABe based micelles. Both PEG₄₂-*b*-PMLABe₇₃ and Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ amphiphilic block copolymers were synthesized by anionic ring opening polymerization of MLABe using the carboxylate end group of MeOPEG₄₂-COOH and Biot-PEG₆₂-COOH, respectively [26].

Table 1. Characteristics of the PEG-*b*-PMLABe based micelles: diameter (nm), polydispersity index (PI), Zeta potential (ζ in millivolts) and encapsulation efficiency (E.E in wt%) of the fluorescent probes DiD oil and DiR. Diameters were determined for micelle suspensions prepared in water (H₂O), phosphate buffer saline (PBS) and culture medium supplemented with 10% Fetal Calf Serum (FCS).

	Diameter (nm) ^a	PI	ζ (mV)
PEG ₄₂ - <i>b</i> -PMLABe ₇₃ (H ₂ O)	55	0.14	- 8
PEG ₄₂ - <i>b</i> -PMLABe ₇₃ (PBS)	63	0.36	nd
PEG ₄₂ - <i>b</i> -PMLABe ₇₃ (Medium + FCS)	180	0.14	nd
Biot-PEG ₆₂ - <i>b</i> -PMLABe ₇₃ (H ₂ O)	70	0.12	- 6
Biot-PEG ₆₂ - <i>b</i> -PMLABe ₇₃ (PBS)	79	0.37	nd
Biot-PEG ₆₂ - <i>b</i> -PMLABe ₇₃ (Medium + FCS)	106	0.15	nd
	Diameter (nm) ^a	PI ^a	E.E. (%) ^b
PEG ₄₂ - <i>b</i> -PMLABe ₇₃ [DiD oil]	nd ^c	nd ^c	77
Biot-PEG ₆₂ - <i>b</i> -PMLABe ₇₃ [DiD oil]	nd ^c	nd ^c	76
PEG ₄₂ - <i>b</i> -PMLABe ₇₃ [DiR]	60	0.20	60
Biot-PEG ₆₂ - <i>b</i> -PMLABe ₇₃ [DiR]	50	0.20	70

a. Measured by DLS; B. Measured by UV at 660nm; c. nd: not determined.

Moreover, we have shown that the amphiphilic block copolymers PEG₄₂-*b*-PMLABe₇₃ and Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ self-assembled in aqueous solutions to form well-defined macromolecular micelles with hydrodynamic diameters of 55 nm and 70 nm (Table 1), respectively [26, 27, 31] while polydispersity indexes of ~0.1 evidenced homogenous micelle formulations. The hydrodynamic diameters of the PEG-*b*-PMLABe-based

micelles are very similar with those found with other micelles formulated from amphiphilic block copolymers [32]. The zeta potentials of both types of micelles are close to neutrality (Table 1) in agreement with the presence of the neutral hydrophilic PEG chains in the corona of the micelles.

To further investigate the features of PMLABe-based micelles, we measured the hydrodynamic diameter and polydispersity index of micelles in

phosphate buffer saline (PBS) and cell culture medium supplemented with fetal calf serum (Table 1). The preparation of micelle suspension in PBS slightly increased the diameter of the micelles but significantly enhanced the polydispersity index of both PEG₄₂-*b*-PMLABe₇₃ and BiotPEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ micelles. Conversely, a 3-fold increase in the diameter of PEG₄₂-*b*-PMLABe₇₃-derived micelles was observed in culture medium while the diameter of micelles formulated with the PEG₄₂-*b*-PMLABe₇₃ copolymer increased by 30% only.

The fluorescence probe encapsulation was very efficient ranging from 60 to 77 wt% (Table 1). The DLS analysis of DiR-loaded NPs has highlighted that the diameters of the loaded NPs were not affected but the encapsulation although slight increases in the polydispersity indexes were observed. It is important to note that DLS analysis could not be performed with the DiD oil-loaded micelles because the fluorescent probe absorbed the laser beam and no specific light scattering can be detected.

In order to investigate the interaction of micelles with plasma proteins and the effect of engrafting the PEG and biotin residue on the overall opsonisation, micelles formulated from the PMLABe₁₅₀₀₀ [26], PEG₄₂-*b*-PMLABe₇₃ and Biot-

PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ were incubated for 5, 10, 30 minutes, 1 and 2 hours with human serum and the binding of plasma proteins was compared (Fig. 2A). The overall binding of the most abundant proteins was visualized by electrophoresis on acrylamide gels and coomassie staining. For the three formulations, the opsonisation occurs within 5 minutes of incubation with serum, however, the number and the intensity of the protein bands was significantly higher with the PMLABe₁₅₀₀₀-derived micelles compared to those of the two others formulations. The most intense bands visible for all three formulation with an apparent migration mobility at ~64 kDa was likely to be the albumin, which is a very abundant plasma protein. We next detected by immunoblotting three proteins, the albumin and two major proteins of the opsonine system, the immunoglobulins and the complement C3 (Fig. 2B). The albumin amounts bound to micelles did not appear different between the three formulations. In contrast, the amounts of immunoglobulins and both complement C3 precursor and active C3 α fragment were much weaker on PEG₄₂-*b*-PMLABe₇₃ and BiotPEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ micelles.

Together, these data demonstrated that the micelles formed from the PEG-PMLABe copolymers showed much weaker opsonisation compared to that of the PMLABe homopolymer and that the

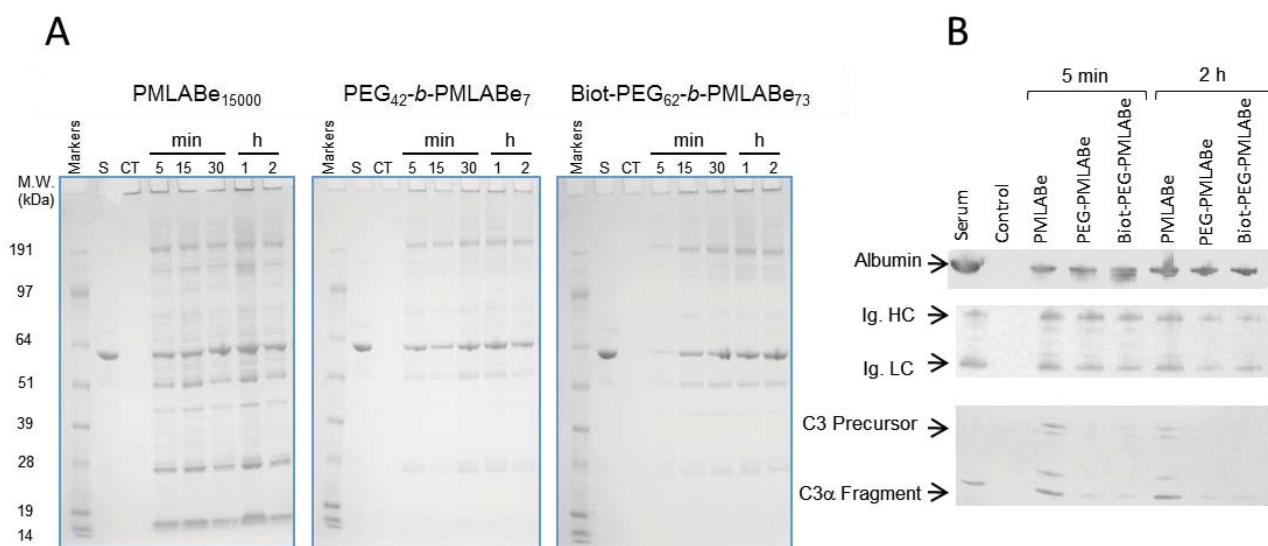


Fig. (2). *In vitro* assay of opsonisation. **A)** Coomassie staining of polyacrylamide gels loaded with human serum proteins bound to micelles formulated from the PMLABe₁₅₀₀₀ homopolymer and the PEG₄₂-*b*-PMLABe₇₃ and Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ copolymers. Prestained molecular weight (M.W.) protein markers were used. S: human serum, CT: control micelles not incubated with human serum. **B)** Immunoblotting of albumin, heavy (HC) and light chains (LC) of immunoglobulins (Ig.) and C3 complement protein in samples of micelles incubated for 5 minutes (5 min) or 2 hours (2 h) with human serum.

addition of the biotin residue did not affect the plasma protein binding.

In vitro Toxicity of PEG-*b*-PMLABe Micelles Towards Hepatocyte-like Cells

We previously reported that the PEG-*b*-PMLABe micelles did not show any significant toxicity *in vitro* towards human cancer cell lines including the colon Caco2, colorectal HCT116, lung NCI-H727, hepatoma Huh7, prostate PC3 and breast MDA cells and normal foreskin fibroblasts [26].

To further assess the biocompatibility towards differentiated human hepatocytes, we used the patented HepaRG hepatoma cell line established in our laboratory [33], which is used worldwide as an alternative *in vitro* model to primary hepatocytes for studying metabolism and toxicity of xenobiotics [34, 35]. The human HepaRG cells are bipotent hepatic proliferating progenitors following trypsinization that differentiate into biliary and hepatocyte-like cells when cells enter quiescence in confluent monolayers two weeks after trypsinization (Fig. 3A). The expression of the liver specific functions in hepatocyte-like HepaRG cells is further enhanced by culturing the cells in presence of 2% dimethyl sulfoxide (Fig. 3A). These differentiated hepatocyte-like cells are considered as the most differentiated hepatoma cells and the overall expression of liver specific functions has been shown to be very similar to primary human hepatocytes [36]. In addition, these metabolically competent cells can be kept confluent and quiescent over several weeks while retaining a long-term expression of liver specific functions, which is a useful feature for chronic toxicity and genotoxicity studies [37].

The cell viability was assayed after 7 days, a time long enough to reveal any possible hepatotoxicity exerted by the nanoparticles on both proliferating progenitor and hepatocyte-like HepaRG cells treated 4 times with micelles derived from Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ decorated or not with the RGD peptide via the streptavidin bridging factor (Fig. 3B). Cells incubated with nanoparticles prepared from Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ coated or not with Streptavidin and RGD peptide showed very moderate changes in the MTT activities. We found a slight but significant increase in MTT activity in

progenitor cells incubated with the low concentration of 0.78 μ M while a moderate decrease was observed in all culture conditions for high copolymer concentrations ranging from 3.13 to 12.5 μ M. In cells showing a decrease in MTT activity, the detection of cell death by apoptosis was performed by measuring the caspase-dependent cleavage of the DEVD-AMC peptide substrate but did not show any significant changes between control and micelle-incubated cultures (data not shown). These data suggested that the cell death/cytotoxicity was either below the detection level of the caspase assay and/or that the slight decrease in MTT may rely on a cytostatic effect slowing down the proliferation of progenitor HepaRG cells at high concentrations of copolymer without induction of cell death. However, the cytostatic effect is a possible explanation only for the proliferating progenitor cells since differentiated hepatocyte-like cells do not proliferate in our culture conditions.

Concerning the unexpected increase in MTT observed in progenitor incubated with 0.78 μ M of copolymer, we measured the DNA content in these cells incubated with micelles of BiotPEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ coated or not with streptavidin and RGD peptide (Fig. 3C). A moderate but significant increase in proliferation demonstrated by the highest percentages of cells in S and G2/M phases, was observed in cells incubated with Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ derived nanoparticles correlating with the highest MTT activity. These data suggested that low concentrations of PEG-*b*-PMLABe micelles may exert cytoprotective and/or positive proliferative effects on progenitor HepaRG cells although the exact mechanisms remain to be investigated.

Together these data, in agreement with previous observations on other cell models, demonstrated that chronic treatments by Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ derived micelles do not trigger significant delayed cytotoxicity in hepatic progenitor and metabolically competent HepaRG cells.

In vitro Cell Uptake of PEG-*b*-PMLABe Micelles

In a previous report, to evidence the cell uptake of micelles derived from PEG-*b*-PMLABe, we synthesized the Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ copolymer

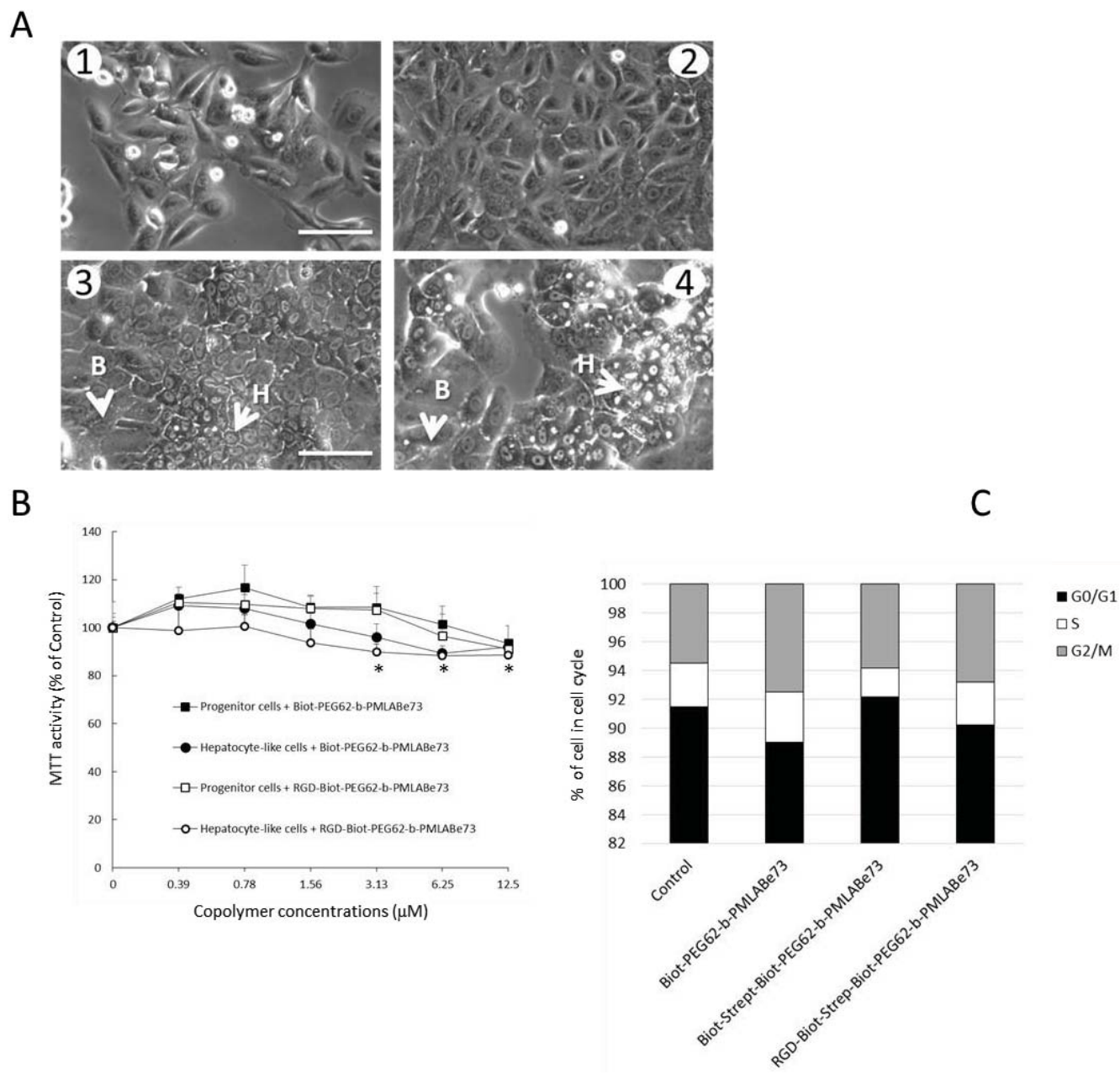


Fig. (3). **A** Morphology in phase contrast of HepaRG cells at different stages of differentiation. (1) Bipotent progenitors at low density, day 1 post-trypsination, (2) HepaRG cells at day 7 post-trypsination, (3) committed HepaRG hepatocyte-like (H) and biliary (B) cells at day 14 posttrypsination, (4) coculture hepatocyte-like HepaRG and biliary cells at day 30 posttrypsination, including the last 2 weeks with 2% DMSO treatment (enhancement of liverspecific function levels). Bar: 100 μ m. **B** Cell viability measured using the MTT assay. Progenitor and Hepatocyte-like HepaRG cells were exposed to a range of copolymer concentrations (0.39 to 12.5 μ M) for 7 days prior measuring the MTT activities. **C** DNA content measured by flow cytometry discriminating progenitor HepaRG cells in G0/G1, S and G2/M phases of the cell cycle after 2 days of incubation with micelles.

labeled with fluorescein amine [27]. In order to study the loading of compounds in PEG-*b*-PMLABe derived nanoparticles, we measured the encapsulation of two fluorescent dyes, the 1,1'-

dioctadecyl3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine perchlorate (DiD oil) and 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindotricarbocyanine iodide (DiR) in micelles formulated with both the PEG₄₂-

b PMLABe₇₃ and Biot-PEG₆₂- b -PMLABe₇₃ copolymers (Table 1).

The loading of the fluorescent probes, DiD oil or DiR, was realized during the nanoprecipitation procedure leading to high encapsulation efficiency of these two hydrophobic molecules (76-77% for DiD oil in both PEG- b -PMLABe derived micelles, 60 and 70% for DiR in Biot-PEG₆₂- b -PMLABe₇₃ and PEG₄₂- b -PMLABe₇₃ derived micelles, respectively).

The results of the DLS analysis of the DiR-loaded micelles showed that both the diameters and the polydispersity indexes were not significantly affected by the presence of the fluorescent probe inside the hydrophobic inner core of the micelles, even for high encapsulation efficiencies. The hydrophobic nature of the DiR and DiD oil molecules seemed to promote the formation of macromolecular micelles probably by increasing the hydrophobic interactions required for the formation of the micelles [32]. DLS analysis cannot be realized on the DiD oil loaded micelles because the DiD oil molecule absorbed the laser beam and no light scattering could be detected. However, we assumed that the size and polydispersity of these micelles are not affected by the presence of the DiD oil molecule like for the DiR-loaded micelles due to the very similar structures and hydrophobicity of these two fluorescent probes.

We have previously evidenced an efficient uptake by HepaRG cells of micelles formulated from the Biot-PEG₆₂- b -PMLABe₇₃ fluorescein amine-labeled copolymer [27]. This efficient loading of the DiD oil into PEG- b -PMLABe derived micelles prompted us to study the DiD oil delivery in progenitor HepaRG cells (Fig. 4). In this *in vitro* assay, we also compared the cell uptake of micelles derived from PEG₄₂- b -PMLABe₇₃ and Biot-PEG₆₂- b -PMLABe₇₃ on which the biotinylated cyclic RGD peptide was grafted using the tetrameric protein streptavidin in order to determine whether the addition of biotin and/or RGD enhanced the cell uptake of micelles.

The cell uptake of micelles formulated from PEG₄₂- b -PMLABe₇₃ by HepaRG cells was efficient since virtually all cells were found positive for the presence of micelles by flow cytometry and fluorescence microscopy (Fig. 4B). However, the cell uptake was strongly enhanced using Biot-

PEG₆₂- b -PMLABe₇₃ derived micelles since we observed a 10-fold increase (one log unit) in the overall fluorescence (Fig. 4C) compared to the cell uptake in absence of biotin.

We next evaluate the cell uptake of Biot-PEG₆₂- b -PMLABe₇₃-micelles bearing the RGD peptide. We previously demonstrated that the Biot-PEG₆₂- b -PMLABe₇₃ derived nanoparticles were able to efficiently bind biotinylated cyclic RGD peptide using the streptavidin as bridging factor [27]. The grafting of the RGD peptide was indirectly evidenced using an excess of free RGD peptide added to the culture medium that prevented the increase in cell uptake mediated by the RGD peptide bound onto micelles [27].

As control for the addition of the RGD peptide via the streptavidin bridging factor between the biotinylated peptide and the Biot-PEG₆₂- b -PMLABe₇₃, we studied the cell uptake using streptavidin-Biot-PEG₆₂- b -PMLABe₇₃ derived micelles saturated with 2 free biotin molecules (final biotin/streptavidin molecular ratio = 3) to evaluate the possible effect of the streptavidin on cell uptake (Fig. 4D). In this experimental condition, the cell uptake was slightly decreased compared to the cell uptake with Biot-PEG₆₂- b -PMLABe₇₃ derived nanoparticles (without streptavidin) demonstrating that the addition of the streptavidin did not further enhance cell uptake and suggesting that the streptavidin reduced the binding of the Biot-PEG₆₂- b -PMLABe₇₃ copolymer onto cells. To demonstrate that the HepaRG cells expressed significant levels of biotin receptors, cells were incubated with Atto488-fluorescent biotin and analyzed by flow cytometry (Fig. 4F). As expected, the HepaRG hepatoma cells also expressed plasma membrane receptors efficiently binding the biotin.

We then demonstrated that the addition of the biotinylated RGD peptide onto streptavidin-Biot-PEG₆₂- b -PMLABe₇₃ derived micelles further enhanced cell uptake and DiD oil delivery in HepaRG cells (Fig. 4E) with a 10-fold increase (one log unit) compared to that observed with streptavidin-Biot-PEG₆₂- b -PMLABe₇₃ derived micelles. The fluorescence microscopy at high magnification indicated a strong accumulation of DiD oil within the cells with a ring-shape fluorescence signal delineating the nucleus of the cells (Fig. 4E).

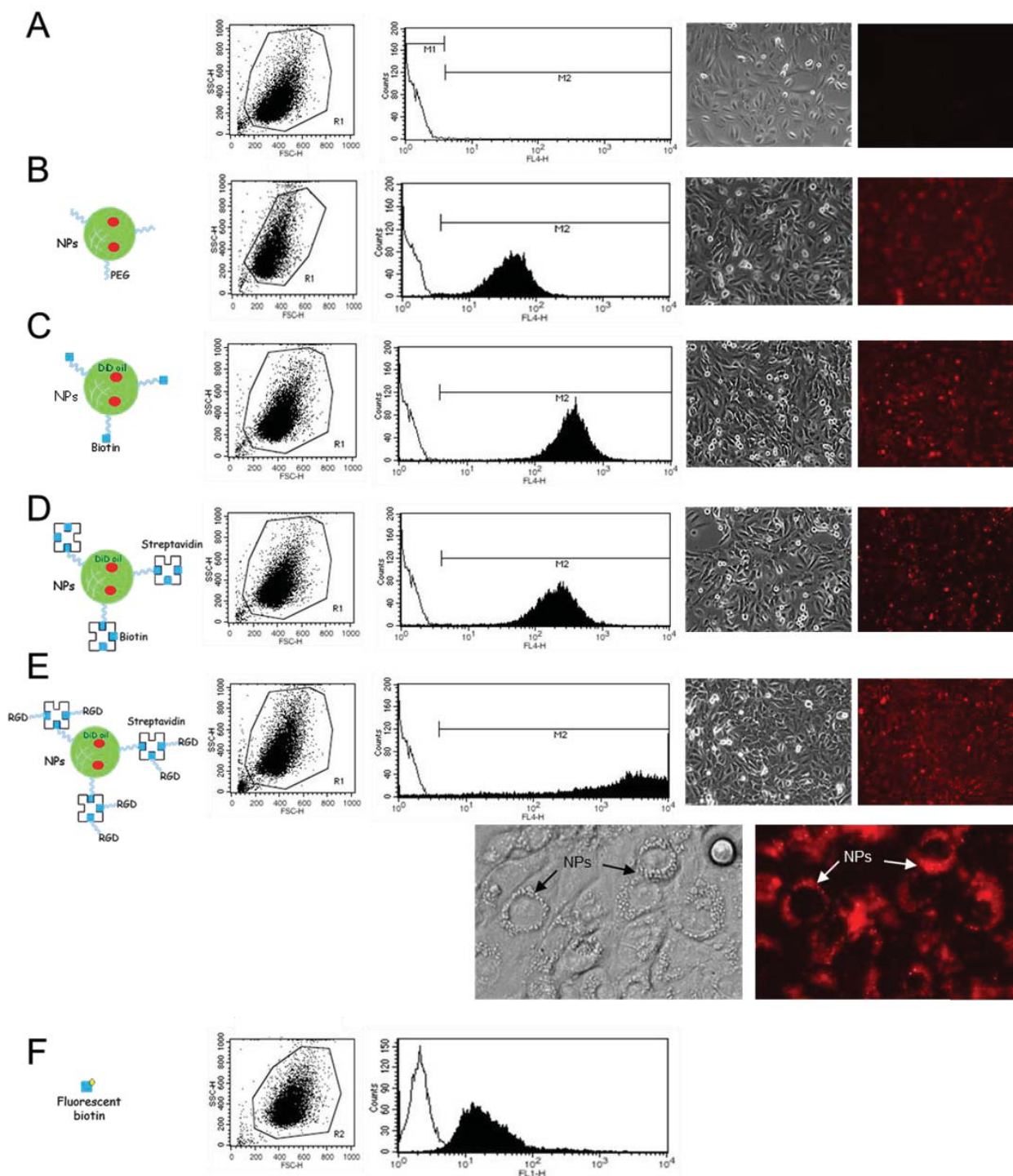


Fig. (4). Progenitor HepaRG cell uptake of DID oil-loaded micelles measured by flow cytometry and microscopy. Cell size (FSC) and granularity (SSC) were represented on dot plots to allow the gating of viable cells (gate R1). The fluorescence were represented on histograms (x axis: counts, y axis: FL4-H fluorescence) for non-incubated control HepaRG cells (A) or cells incubated with micelles derived from PEG₄₂-*b*-PMLABe₇₃ (B), Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ (C), Biot-Streptavidin-Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ (D), RGD-Biot-Streptavidin-Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ (E), and cells incubated with fluorescent biotin (F, measured on FL1-H channel). The cell autofluorescence was established in panel A (gate M1, unfilled histograms) while DiD oil positive cells (dark histograms) were detected in the gate M2. Photographs of phase contrast and fluorescence microscopy are presented on the right side (NPs: nanoparticles).

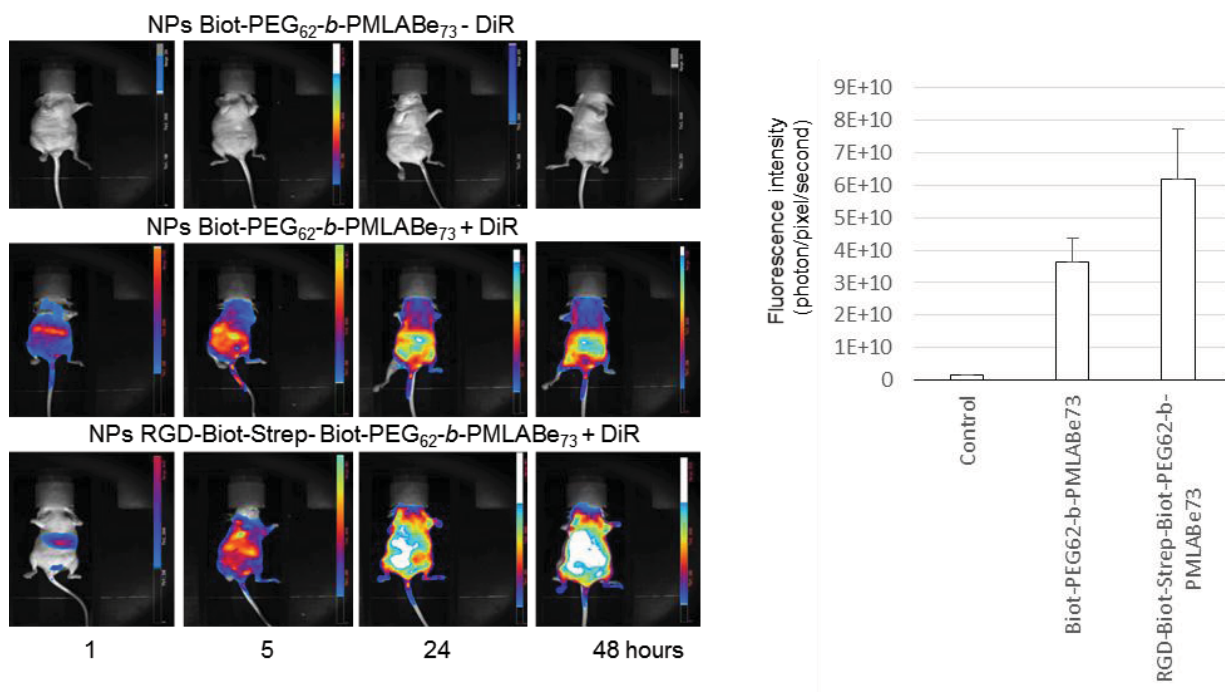


Fig. (5). *In vivo* biodistribution of PEG-*b*-PMLABe micelles in nude mice. Three groups of mice were injected with Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ (upper lane), Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ DiR loaded (middle lane) or RGD biotinylated peptide-streptavidine-Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ DiR loaded (bottom lane) derived micelles. The fluorescence was monitored at 1, 5, 24 and 48 hours after injection. Typical fluorescence images for each group are presented. Charts represent the quantification of the fluorescence in the abdominal area for all animals at 48 hours.

***In vivo* Biodistribution of PEG-*b*-PMLABe Micelles**

In a first attempt to evaluate the biodistribution of the PEG-*b*-PMLABe derived micelles *in vivo*, systemic injection of Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ derived micelles loaded or not with the DiR fluorescent probe were performed in mice (Fig. 5). The first group of mice was injected with Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ derived micelles without DiR to set the background fluorescence. The two other groups of mice injected with Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ and RGD biotinylated peptide-streptavidine-Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ derived micelles loaded with DiR allowed to determine the biodistribution of the micelles over 48 h post-injection. None of the nine injected mice died during the course of the experiment providing a first evidence that PEG-*b*-PMLABe derived nanoparticles do not trigger a major *in vivo* toxicity. In addition, the quantification of the fluorescence indicated a time-dependent accumulation of the DiR probe in the peritoneal/liver area with a significantly higher fluorescence in mice injected with the PEG-*b*-PMLABe derived micelles carrying the

RGD peptide suggesting that the RGD motif may represent a putative ligand for liver targeting.

CONCLUSION

In the present report, in agreement with short-term cytotoxicity assays previously performed on various cell models, we demonstrated that chronic treatments with PEG-*b*-PMLABe derived micelles do not trigger significant delayed cytotoxicity in metabolically competent HepaRG cells. We also established a procedure for loading the two fluorescent probes DiD oil and DiR into PEG-*b*-PMLABe derived micelles during the nanoprecipitation procedure leading to high encapsulation efficiency of these two hydrophobic molecules. Using DiD oil loaded micelles, we showed that the addition of the biotin residue and the RGD peptide onto PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ derived micelles enhanced the cell uptake and DiD oil delivery in HepaRG cells. In addition, the accumulation of the DiR probe in the peritoneal/liver area was significantly higher in mice injected with the PEG-*b*-PMLABe derived micelles carrying the RGD peptide

suggesting that the RGD motif may represent a putative ligand for liver targeting.

CONFLICT OF INTEREST

The author(s) confirm that this article content has no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

Declared none.

REFERENCES

- [1] Gref R, Minamitake Y, Peracchia MT, Trubetskoy V, Torchilin V, Langer R. Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science* 1994; 263: 1600-3.
- [2] Torchilin VP. Multifunctional nanocarriers. *Adv Drug Deliv Rev* 2006; 58: 1532-55.
- [3] Hoffman AS. The origins and evolution of “controlled” drug delivery systems. *J Control Rel* 2008; 132: 153-63.
- [4] Liu S, Maheshwari R, Kiick KL. Polymer-based therapeutics. *Macromolecules* 2009; 42: 3-13.
- [5] Malam Y, Loizidou M, Seifalian AM. Liposomes and nanoparticles: Nano-sized vehicles for drug delivery in cancer. *Trends Pharmacol Sci* 2009; 30: 592-9.
- [6] Misra R, Acharya S, Sahoo SK. Cancer nanotechnology: Application of nano-technology in cancer therapy. *Drug Discov Today* 2010; 15: 842-50.
- [7] Editorial. Time to deliver. *Nature Biotechnol* 2014; 32: 961.
- [8] Raemdonck K, De Smedt SC. Lessons in simplicity that should shape the future of drug delivery. *Nature Biotechnol* 2015; 33: 1026-7.
- [9] Topete A, Barbosa S, Taboada P. Intelligent micellar polymeric nanocarriers for therapeutics and diagnosis. *J Appl Polym Sci* 2015; 132.
- [10] Stylianopoulos T, Jain RK. Design considerations for nanotherapeutics in oncology. *Nanomed: Nanotechnol Biol Med* 2015; 11: 1893-907.
- [11] Maeda H, Tsukigawa K, Fang J. A retrospective 30 years after discovery of the enhanced permeability and retention effect to solid tumors: next-generation chemotherapeutics and photodynamic therapy-problems, solutions, and prospects. *Microcirculation* 2015 [Epub 2015 Aug 3].
- [12] Mahon E, Salvati A, Baldelli Bombelli F, Lynch I, Dawson KA. Designing the nanoparticles-biomolecule interface for “targeting and therapeutic delivery”. *J Control Rel* 2012; 161: 164-74.
- [13] Davis FF. The origin of peganology. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; 54: 457-8.
- [14] Elsabahy M, Wooley KL. Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications. *Chem Soc Rev* 2012; 41: 2545-61.
- [15] Babiuch K, Dag A, Zhao J, Lu H, Stenzel MH. Carbohydrate-specific uptake of fucosylated polymeric micelles by different cancer cell lines. *Biomacromolecules* 2015; 16: 1948-57.
- [16] Pearce TR, Shroff K, Kokkoli E. Peptide targeted lipid nanoparticles for anticancer drug delivery. *Adv Mater* 2012; 24: 3803-22.
- [17] Ruoslahti E, Bhatia SN, Sailor MJ. Targeting of drugs and nanoparticles to tumors. *J Cell Biol* 2010; 188: 759-68.
- [18] Fox ME, Szoka FC, Fréchet JMJ. Soluble polymer carriers for the treatment of cancer: The importance of molecular architecture. *Acc Chem Res* 2009; 42: 1141-51.
- [19] Garg SM, Vakili MR, Lavasanifar A. Polymeric micelles based on poly(ethylene oxide) and α -carbon substituted poly(ϵ -caprolactone): an *in vitro* study on the effect of core forming block on polymeric micellar stability, biocompatibility, and immunogenicity. *Colloids Surf B Biointerf* 2015; 132: 161-70.
- [20] Gao H, Zhang Q, Yang Y, Jiang X, He Q. Tumor homing cell penetrating peptide decorated nanoparticles used for enhancing tumor targeting delivery and therapy. *Int J Pharm* 2015; 478: 240-50.
- [21] Buwalda SJ, Amgoune A, Bourissou D. PEG-PLA copolymers bearing carboxylated side chains: Novel hydrogels with enhanced crosslinking *via* ionic interactions. *J Polym Sci A: Polym Chem* 2015.
- [22] EASL and EORTC. EASL-EORTC clinical practice guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *Eur J Cancer* 2012; 48: 599-641.
- [23] Reddy LH, Couvreur P. Nanotechnology for therapy and imaging of liver diseases. *J Hepatol* 2011; 55: 1461-6.
- [24] Cammas S, Béar MM, Harada A, Guérin P, Kataoka K. New macromolecular micelles based on degradable amphiphilic block copolymers. *Macromol Chem Phys* 2000; 201: 355-64.
- [25] Cammas-Marion S, Guérin P. Design of malolactonic acid esters with a large spectrum of specified pendant groups in the engineering of biofunctional and hydrolyzable polyesters. *Macromol Symp* 2000; 153: 167-86.
- [26] Huang ZW, Laurent V, Chetouani G, *et al.* New functional degradable and bio-compatible nanoparticles based on poly(malic acid) derivatives for site-specific anti-cancer drug delivery. *Int J Pharm* 2012; 423: 84-92.
- [27] Loyer P, Bedhouche W, Huang ZW, Cammas-Marion S. Degradable and biocompatible nanoparticles decorated with cyclic RGD peptide for efficient drug delivery to hepatoma cells *in vitro*. *Int J Pharm* 2013; 454: 727-37.
- [28] Thioune O, Fessi H, Devissaguet JP, Puisieux F. Preparation of pseudolatex by nanoprecipitation: Influence of the solvent nature on intrinsic viscosity and interaction constant. *Int J Pharm* 1997; 146: 233-8.
- [29] Laurent V, Glaise D, Nübel T, Gilot D, Corlu A, Loyer P. Highly efficient siRNA and gene transfer into hepatocyte-like HepaRG cells and primary human hepatocytes: New means for drug metabolism and toxicity studies. *Met Mol Biol* 2013; 987: 295-314.
- [30] Gilot D, Loyer P, Corlu A, *et al.* Liver protection from apoptosis requires both blockage of initiator

- caspace activities and inhibition of ASK-1/JNK pathway via glutathione S-transferase regulation. *J Biol Chem* 2002; 277: 49220-9.
- [31] Loyer P, Cammas-Marion S. Natural and synthetic poly(malic acid)-based derivates: A family of versatile biopolymers for the design of drug nanocarriers. *J Drug Target* 2014; 22: 556-75.
- [32] Webber SE, Munk P, Tuzar Z. Solvents and Self-organization of polymers. NATO ASI Series, Series E, Applied Sciences 1996; 27.
- [33] Gripon P, Rumin S, Urban S, *et al.* Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 15655-60.
- [34] Jossé R, Aninat C, Glaise D, *et al.* Long-term functional stability of HepaRG hepatocytes and use for chronic toxicity and genotoxicity studies. *Drug Metab Dispos* 2008; 36: 1111-8.
- [35] Kanebratt KP, Andersson TB. Evaluation of HepaRG cells as an *in vitro* model for human drug metabolism studies. *Drug Metab Dispos* 2008; 36: 1444-52.
- [36] Rogue A, Lambert C, Jossé R, *et al.* Comparative gene expression profiles induced by PPAR α and PPAR γ agonists in human hepatocytes. *PLoS One* 2011; 6: e18816.
- [37] Quesnot N, Rondel K, Martinais S, *et al.* Evaluation of genotoxicity using automated detection of gammaH2AX in metabolically competent HepaRG cells. *Mutagenesis* 2016; 31(1): 43-50.

Received: January 07, 2016

Revised: March 05, 2016

Accepted: March 09, 2016

V. DISCUSSION ET PERSPECTIVES EXPERIMENTALES

Dans cette partie de mon travail de thèse, j'ai évalué la cinétique d'accumulation intracellulaire de NPs à base de dérivés du PMLABe₇₃ incubées avec les cellules HepaRG et les macrophages humains à la concentration de 25 µg/mL dans le but de déterminer l'impact de la présence d'une couronne de PEG à la surface des NPs sur leur captation.

Nos résultats montrent que la captation des NPs formulées à partir de l'homopolymère PMLABe₇₃ par les macrophages est très rapide, dès les premières heures qui suivent le début de l'incubation, avec une efficacité d'internalisation très supérieure à celle observée dans les cellules HepaRG. L'incubation des macrophages issus de différents donneurs de sang a abouti à des résultats relativement hétérogènes en termes de captation, indiquant une importante variabilité inter-individuelle. Par ailleurs, la captation des NPs PEGylées (NPs PEG_{42-b}-PMLABe₇₃) était largement inférieure à celle des NPs non PEGylées (NPs PMLABe₇₃) dans les deux modèles cellulaires. Cette observation confirme l'effet inhibiteur de la couronne de PEG à la surface des NPs PMLABe sur leur captation par les deux modèles cellulaires. Cette conclusion est en accord avec un ensemble de données obtenues concernant l'effet de la couronne de PEG sur la réduction de la captation de NPs *in vitro* (Daou et al., 2009; Xie et al., 2007) et *in vivo* (Lipka et al., 2010) par divers lignées et types cellulaires.

Nous avons également préparé deux lots additionnels de NPs : un lot de NPs préparées à partir d'un mélange de 75 wt% de PMLABe₇₃ et de 25 wt% de PEG_{42-b}-PMLABe₇₃ (NPs 25% PEG) et un second lot de NPs préparées à partir d'un mélange de 50 wt% de PMLABe₇₃ et de 50 wt% de PEG_{42-b}-PMLABe₇₃ (NPs 50% PEG).

L'incubation des macrophages avec des NPs 0%, 25 % et 50% PEG conduit à des taux de captation très proches (différences négligeables de niveaux de fluorescence), tandis-que l'incubation de ces cellules avec les NPs 100% PEG conduit à une captation significativement moins importante par rapport à celle observée avec le reste des NPs. Ces observations indiquent l'absence de relation dose-effet entre le pourcentage de PEG présent à la surface des NPs et la captation de ces NPs par les macrophages humains et démontre que l'effet de furtivité recherché pour les NPs PMLABe₇₃ PEGylées ne s'obtient qu'avec une forte densité de PEG.

Le même type d'expérience a été réalisé avec des cellules HepaRG par Saad SABA dans l'équipe. Il a montré que l'incubation de ces NPs à degrés variables de PEGylation avec les cellules HepaRG progénitrices pendant 24h réduit la captation des NPs PMLABe₇₃ en fonction du pourcentage de PEG présent sur leur surface. Cette observation indique qu'il existe, pour ce modèle de cellules hépatiques, une relation dose-effet entre le pourcentage de PEG présent à la surface des NPs et la captation de ces NPs par ces cellules. Ces résultats sont en accord avec ceux démontrant l'effet de la densité de PEG sur la captation de NPs de FePt (Fer/Platine) par des fibroblastes 3T3 (Pelaz et al., 2015).

Nous avons également abordé l'étude de l'opsonisation des NPs à base de dérivés du PMLABe₇₃ et démontré que la fixation des protéines sériques était fortement réduite par une couronne de PEG. Ceci nous a conduit à étudier le rôle de cette opsonisation dans la captation des NPs par les macrophages. Le profil des courbes de captation des NPs par les macrophages humains est peu affecté par l'absence ou la présence de SVF. Cependant, nous avons observé une diminution partielle de l'internalisation des NPs par les macrophages en présence de sérum sans qu'il y ait de corrélation entre la densité en PEG et le degré de captation. Cette diminution de captation semble plus significative lorsque nous avons utilisé des NPs totalement PEGylées, suggérant qu'une partie de l'effet protecteur du PEG vis-à-vis de la reconnaissance par les macrophages serait médié par l'opsonisation, même faible, des NPs à base de PEG_{42-b}-PMLABe₇₃. Une couronne de PEG dense en surface des NPs semble donc interagir avec les protéines du SVF pour contribuer à limiter la captation des NPs PMLABe₇₃ par les macrophages

humains, ce qui constitue une conclusion en contradiction avec le dogme proposant que l'opsonisation constitue une étape importante de reconnaissance par les cellules à activités phagocytaire (Hoffman, 2008).

Dans le but de vérifier l'internalisation des NPs marquées par le DiDoil ou le DiR, des membres de l'équipe ont utilisé différentes techniques de microscopie pour aborder cette question. Les données de microscopie apportent des arguments concordant pour conclure à une internalisation des NPs dans nos deux modèles cellulaires. De plus, nous avons utilisé l'inhibiteur de phagocytose « latrunculine » et les deux inhibiteurs d'endocytose « chlorpromazine » et « genisteine » pour caractériser le mécanisme de captation mis en jeu par les cellules. Les résultats montrent que l'internalisation des NPs PMLABe₇₃ par les macrophages se fait à la fois par phagocytose et pinocytose, tandis que la pinocytose, par des voies dépendantes des clatherines (inhibée par la chlorpromazine) et indépendantes des cavéolines (inhibée par la génistéine), est le mécanisme principal mis en jeu par les HepaRG progénitrices (SABA et collaborateurs, données non publiées). Ces données expliquent les grandes différences observées entre les deux modèles cellulaires en termes de vitesse de captation et de taux d'accumulation intracellulaire de NPs.

Nous avons montré que les NPs Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ n'induisent pas la production de cytokines pro-inflammatoires dans un modèle de macrophages humains primaires et qu'elles sont faiblement cytotoxiques pour la lignée cellulaire hépatique HepaRG. Ces résultats sont en faveur d'une excellente biocompatibilité de ces NPs à base de dérivés du PMLABe₇₃, comme cela avait déjà été mis en évidence dans des travaux antérieurs de l'équipe.

L'objectif principal du travail de thèse était d'étudier l'influence de peptides, considérés comme hépatotropes et sélectionnés à partir de données bibliographiques (chapitre 2), sur la captation cellulaire des NPs Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃. Afin d'exposer des peptides à la surface des NPs, nous avons utilisé la streptavidine comme intermédiaire de couplage entre les NPs Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ et le peptide biotinylé RGD. Cet échafaudage moléculaire a nécessité des adaptations pour formuler nos NPs encapsulant un fluorochrome, ce qui nous a conduit à utiliser les concentrations suivantes lors de l'étape de greffage des peptides : [Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃] = 1 µM, [streptavidine] = 1 µM et [peptide] = 2 µM. Ces conditions ont ensuite été conservées pour la seconde partie du projet de thèse visant à rechercher des peptides avec un fort tropisme pour les cellules issues de CHC.

CHAPITRE II : Des peptides dérivés de la protéine circumsporozoïte de *Plasmodium berghei* et du virus A George Baker potentialisent l'internalisation de bioconjugués et de nanoparticules polymères à base de poly(éthylène glycol)₄₂-*b*-poly(malate de benzyle)₇₃ dans les cellules d'hépatome humain

I. CONTEXTE DE L'ETUDE

Dans la continuité de la première partie des résultats, l'objectif de ce travail présenté dans ce second chapitre était d'évaluer l'influence de peptides, considérés comme hépatotropes, sur la captation des NPs Biot-PEG₆₂-b-PMLABE₇₃ par des cellules hépatiques ou non hépatiques en culture. Dans ce travail, nous n'avons donc pas cherché à identifier de nouveaux peptides mais nous avons comparé des peptides déjà répertoriés dans la littérature. Parallèlement, dans l'équipe, un projet de criblage d'une banque de phage par la technique de phage display a été réalisé afin découvrir de nouveaux peptides ciblant les cholangiocytes et des cellules souches cancéreuses (Metlej, 2019).

A partir de données bibliographiques, nous avons sélectionné 11 peptides (Tableau 6) d'origines variées : (i) le peptide RGD, qui constitue notre référence (ii) le peptide CPB issu de la protéine circumsporozoïte (CSP) de *Plasmodium berghei* impliquée dans l'infection hépatocytaire par le parasite (Longmuir et al., 2006) ; (iii) des peptides issus des domaines fonctionnels de ligands naturels de récepteurs membranaires : L5-2, ligand de la protéine glypican 3, et SRIF-14, forme courte de la somatostatine (Vale, 1978); (iv) des peptides-ligands : HCBP1 et 4, A54, DKN, CGK, SP94 et CP15 identifiés lors de criblages par la technique de « phage-display » par affinité d'interaction pour des cellules en culture (Y.-Z. Du et al., 2012; Jung et al., 2012; A. Lo et al., 2008; B. Zhang et al., 2007; Y. Zhang et al., 2007); (v) le peptide GBVA10-9, un dérivé de synthèse du peptide GBVA, connu pour inhiber l'infection hépatocytaire par le virus de l'hépatite C en culture cellulaire (X. Liu et al., 2013). Différents peptides contrôles positifs et négatifs ont également été synthétisés (Tableau 6).

La stratégie d'évaluation du tropisme de ces peptides, synthétisés sous forme biotinylée, vers les cellules hépatiques était double : 1) Reprendre les NPs formulées à partir du copolymère biotine-PEG-*b*-PMLABe et greffer les peptides via le pontage par la streptavidine décrit dans le chapitre 1, 2) Evaluer l'internalisation des complexes formés entre une streptavidine fluorescente et les peptides biotinylés sans utilisation de NPs afin de la comparer avec la captation de NPs fonctionnalisées par les mêmes peptides. Pour cette dernière approche, une simple complexation des peptides biotinylés a été réalisée avec une streptavidine fluorescente commerciale (Figure 84) en utilisant un ratio théorique de 3 molécules de peptide pour une molécule de streptavidine.

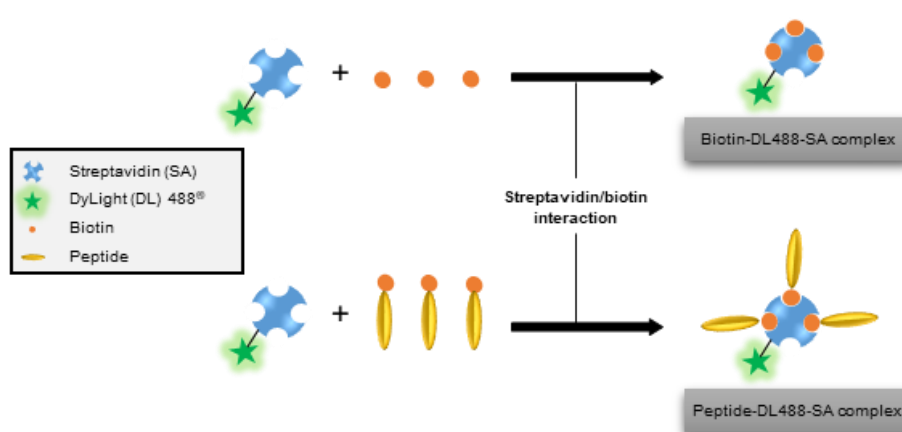


Figure 84 : Complexe streptavidine et peptides biotinylés

La streptavidine DyLight 488® (DL488-SA) a été conjuguée à de la biotine ou à des peptides biotinylés pour générer des complexes contrôle et peptide-streptavidine. L'absorption cellulaire de DL488-SA a été quantifiée après 24 heures d'incubation par cytométrie en flux.

Tableau 6: Peptides et peptides contrôles négatifs

Name	Sequence N-Term → C-Term	Target (receptor / cells or tissue)	Length (amino acid)	Molecular weight (g.mol ⁻¹)	Reference
RGD	Cyclo(RGDYK)(Biotin)	A _v β ₃ integrins	5	846	(Alipour et al., 2020)
L5-2	YFLTTRQK(Biotin)	Glypican-3	8	1282	(Y. L. Lee et al., 2011)
SRIF-14	AGC(S-)KNFFWKTFTSC(S-)K(Biotin)	Somatostatin receptor	15	1991	(Eychenne et al., 2020)
HCBP1	FQHPSFIK(Biotin)	ND / HepG2	8	1230	(B. Zhang et al., 2007)
HCBP4	PLPTLPLK(Biotin)	ND / HepG2	8	1103	(B. Zhang et al., 2007)
A54	AGKGTSPLETPK(Biotin)	ND / BEL-7402	13	1512	(B. Du et al., 2010)
DKN	DKNLQLHK(Biotin)	ND / Rat liver	8	1220	(Jung et al., 2012)
CGK	CGKRK(Biotin)	Protein p32/gC1qR/HABP1 / Tumor stroma and angiogenic endothelial cells	5	816	(Mäkelä et al., 2006)
SP94	SFSIIHTPILPLK(Biotin)	ND/Malhavu (+59T, Hep3B, HepG2, NTUBL, SKHep1)	13	1691	(A. Lo et al., 2008)
CPB	Acetyl- CKNEKKNKIERNKLNKQPPK(Biotin)	Heparan sulfate proteoglycan	20	2705	(Longmuir et al., 2006)
GBVA10-9	CWVRLGRYLLRRLKTLFTK(Biotin)	ND. Anti-HCV activity	19	2649	(X. Liu et al., 2013)
CP15	VHLGYATK(Biotin)	ND / HT29 and SW480	8	1113	(Y. Zhang et al., 2007)
ATW	ATWLPVPPK(Biotin)	Neuropilin-1 / Endothelial cells	8	1137	(Tirand et al., 2006)
RAD	Cyclo(RADYK)(Biotin)	Negative control of RGD	5	860	(Y. Zhu et al., 2018)
CPBscr	EKIPNKEKPNKNKERQKK(Biotin)	Negative control for CPB	19	2577	This study
GBVA10-13	KWVRLGRKLLRRLKPPFKK(Biotin)	Negative control for GBVA10-9	19	2677	(X. Liu et al., 2013)
GBVA10-9scr	LTCLKGRLVRWRLRITYFLK(Biotin)	Negative control for GBVA10-9	19	2649	This study

Onze peptides ont été sélectionnés pour étudier leur tropisme vers les cellules d'hépatome humain *in vitro* : RGD, L5-2, SRIF-14, HCBP1 et HCBP4, A54, DKN, CGK, SP94, CPB et GBVA10-9. Les peptides CP15 et ATW, initialement découverts pour leur liaison respectivement au cancer du côlon humain et aux cellules endothéliales, ont été sélectionnés comme contrôles de peptides non hépatotropes. Les peptides RAD, CPBscr, GBVA10-13 et GBVA10-9scr sont des peptides mutés utilisés comme contrôles négatifs dans les tests de captation cellulaire *in vitro*. Pour chaque peptide, les séquences d'acides aminés, les cibles cellulaires et/ou moléculaires, la longueur et la masse moléculaire sont indiquées. Les références décrivant le tropisme cellulaire/moléculaire de ces peptides sont indiquées en colonne de droite

Les complexes peptides-streptavidine et NPs fonctionnalisées ont été utilisées avec différents modèles de cellules hépatiques et non-hépatiques. L'ensemble des travaux avait pour but final de sélectionner les peptides les plus affins et les plus spécifiques des hépatocytes transformés afin de les greffer directement sur l'extrémité libre du PEG au niveau du copolymère Maléimide-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃. L'objectif final était de disposer ainsi de NPs présentant des peptides à leur surface sans utilisation de la streptavidine comme intermédiaire de couplage.

II. METHODOLOGIE

Les méthodologies employées dans ce travail sont très similaires à celles utilisées dans le premier chapitre concernant le type de (co)polymères, la formulation des NPs, les expériences de captation et d'analyse en cytométrie de flux. Cependant, un plus grand nombre de modèles cellulaires a été utilisé et la mise au point d'un modèle de coculture de cellules d'hépatome et de macrophages humain a été adaptée pour étudier la captation « compétitive » de NPs par les deux types cellulaires. Quelques éléments de méthodologie sont détaillés dans ce paragraphe.

II.1. Les types cellulaires

Plusieurs types cellulaires ont été utilisés dans cette partie du travail en plus des cellules HepaRG et des macrophages du premier chapitre. Les plus importants sont les cellules cancéreuses hépatiques Huh7 et HepG2, les hépatocytes humains en culture primaire, et les cellules cancéreuses pulmonaires NCI-H727, cultivées dans les conditions données dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Compositions des milieux de culture des types cellulaires utilisés

Cellules	Origine	Milieu de culture
Huh7	Hépatome	DMEM contenant 4,5 g/L de D-Glucose (Gibco) + 10% de SVF + 1% de pénicilline/streptomycine + 1% de L-glutamine + 1% de pyruvate
HepG2	Hépatoblastome	MEM alpha (Gibco) + 10% de SVF + 1% de pénicilline/streptomycine + 1% de L-glutamine + 1% d'une solution d'AA non essentiels (MEM NEAA, Gibco)
Hépatocytes humains	Foies humains	Williams'E (Gibco) + 10% de SVF + 1% de pénicilline/streptomycine + 1% de L-glutamine + hémisuccinate d'hydrocortisone 10 ⁻⁵ M + insuline 5 µg/mL
NCI-H727	Carcinome pulmonaire non à petites cellules	RPMI 1640 (Gibco) + 10% de SVF + 1% de pénicilline/streptomycine + 1% de L-glutamine

Le modèle de coculture associe cellules d'hépatome Huh7 exprimant de façon constitutive la Green Fluorescent Protein (GFP) et des macrophages humains différenciés. Il est préparé à partir de monocytes isolés d'une poche de sang humain, ensemencés à faible densité cellulaire puis différenciés pendant une semaine par le GM-CSF (50 ng/mL). Ensuite, les cellules Huh7 GFP+ sont ajoutées et elles colonisent les espaces libres entre les macrophages (Figure 85). Un à deux jours après l'ensemencement des cellules d'hépatome, l'incubation avec les complexes peptide-streptavidine ou les NPs peut être réalisée.

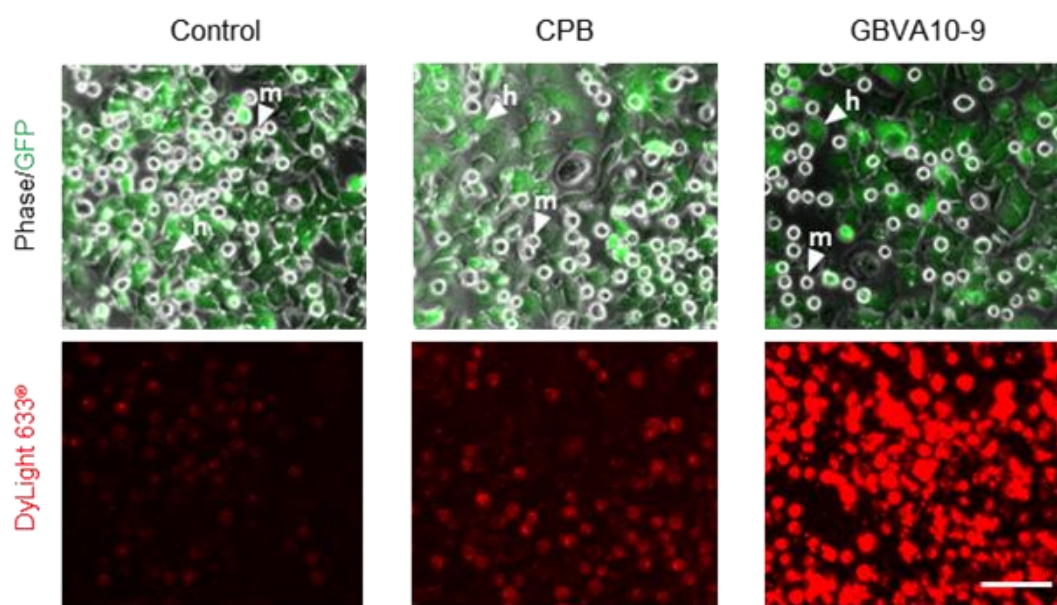


Figure 85 : Coculture de cellules d'hépatome Huh7 et macrophages humains

Les cellules Huh7 exprimant la GFP ont été produites par transduction lentivirale à l'aide de particules virales commerciales (Vectalys/FlashTherapeutics, Toulouse). L'incubation de NPs fluorescentes encapsulant le DiDoil met en évidence, sur un temps court d'incubation, la forte fluorescence rouge des macrophages (m) comparativement aux cellules Huh7(h).

II.2. Couplage des peptides biotinylés à la streptavidine fluorescente

Deux streptavidines fluorescentes ont été utilisées : DyLight™ 488 et DyLight™ 633 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). La biotine et les peptides biotinylés ont été conjugués à la streptavidine DyLight™ 488 ou 633 pendant 1h à 4 ° C, avant l'incubation avec les cellules. Ensuite, les complexes de streptavidine ont été ajoutés à 180 µL de milieu de culture à des concentrations finales de 0,4 µM de streptavidine et 1,2 µM de biotine ou de peptides biotinylés.

II.3. Incubation des complexes streptavidine-peptides et nanoparticules fonctionnalisées

Le milieu de culture est ajouté aux mélanges de NPs Biot-PEG₄₂-b-PMLABe₇₃ fonctionnalisées par les peptides via la streptavidine (voir préparation détaillée dans le chapitre I) ou aux mélanges de complexes streptavidine-peptide (paragraphe II.2), tous préparés extemporanément. Ce mélange est transféré sur les cellules à raison de 500 µL par puits dans une plaque 24 puits. Après 20 heures

d'incubation, le milieu de culture est éliminé et les monocouches cellulaires sont lavées par 500 μL de PBS. Les cellules sont observées en microscopie à fluorescence à 590 nm (Microscope inversé Zeiss, Logiciel d'analyse d'images AxioVision) avant d'être détachées par 100 μL de trypsine et reprises dans 400 μL de milieu de culture. La suspension cellulaire est analysée par cytométrie en flux (FACSCalibur, Logiciel CellQuest, Becton Dickinson) pour quantifier la fluorescence (canal FL4-H) émise par le DiDoil présent dans les NPs captées par les cellules.

II.4. Observation en microscopie confocale

Les cellules HepaRG progénitrices sont ensemencées dans des chambres de culture sur lame de verre (Chamber slide system, 8 puits, NUNC) à la densité de $4,5 \cdot 10^3$ cellules par puits et, après 24 heures de culture, 300 μL du mélange NPs/streptavidine/peptide sont transférés dans les puits. Au bout de 20 heures d'incubation, les monocouches cellulaires sont lavées deux fois au PBS puis fixées avec 100 μL de PFA 4% pendant 15 minutes à 4°C. Après deux lavages au PBS, les noyaux sont colorés au Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) : la solution mère de Hoechst à 5 mg/mL est diluée au 1/5000 dans du PBS et 100 μL de cette préparation sont transférés dans les puits. Après 10 minutes d'incubation à température ambiante, deux lavages au PBS sont effectués et les chambres de culture sont décollées de la lame support. Une goutte de liquide de montage (Ultramount, Dako) est déposée et une lamelle est fixée sur la lame. Les cellules sont observées en microscopie confocale (SP8, Leica. Plateforme MRic photonics Biosit-Biogenouest).

II.5. Analyses statistiques

Les analyses statistiques et graphiques ont été effectuées avec le logiciel Prism 5.0[®] (GraphPad Software, La Jolla, Californie). Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm écart-types. Les tests statistiques ne sont réalisés que lorsque le nombre d'échantillons est supérieur ou égal à 6. Les différences entre les groupes ont été calculées soit par le test de Mann et Whitney soit par le test de Kruskal-Wallis suivi d'un post-test Dunn's. Une différence est considérée comme statistiquement significative avec une $p_{\text{value}} < 0,05$ (* ou \$: $p < 0,05$; ** ou \$\$: $p < 0,01$; *** ou \$\$\$: $p < 0,001$).

III. RESULTATS ET DISCUSSION

L'objectif principal du travail était d'étudier l'influence de peptides, considérés comme hépatotropes et sélectionnés à partir de données bibliographiques, sur la captation cellulaire des NPs biot-PEG₆₂-b-PMLABe₇₃. Le tropisme de ces peptides courts biotinylés a été étudié par deux approches différentes : soit en les associant à de la streptavidine fluorescente (complexe peptide-streptavidine), soit en les greffant de façon non covalente à la surface des NPs *via* un « pontage » par la streptavidine sur le copolymère Biot-PEG₆₂-b-PMLABe₇₃. Ces « édifices » ont été testés sur différents types cellulaires hépatiques et non-hépatiques.

Dans cette partie, notre objectif n'est pas de présenter l'intégralité des résultats qui sont décrits dans l'article inséré en fin de chapitre auquel le lecteur peut se référer, mais de présenter des résultats clefs et faits marquants qui sont discutés.

Concernant les pourcentages de cellules positives pour les incubations avec les complexes peptide-streptavidine fluorescente ou les NPs fonctionnalisées (données non présentées dans l'article), les cellules sont pratiquement toutes positives avec les complexes de streptavidine si l'on compare les niveaux de fluorescence après incubation avec l'auto fluorescence des cellules. Cependant, les intensités de fluorescence sont différentes entre les complexes. Concernant les NPs, des différences sont observées sur les pourcentages de cellules positives (Figure 86). Pour les cellules hépatiques tumorales, une captation très efficace des NPs, avec ou sans peptide en surface, est observée. En effet, près de 100 % des cellules Huh7 (et SNU387) sont positives après incubation avec les NPs. Il en est de même pour les cellules HepaRG avec des pourcentages de cellules positives d'environ 70 et 90 % pour les cellules HepaRG différenciées et progénitrices, respectivement. Pour les cellules HepG2, le pourcentage de cellules positives est compris entre 53 et 87 %. A l'inverse, moins de 50 % des hépatocytes humains primaires sont fluorescents après incubation avec les NPs. En absence de peptide à la surface des NPs, le pourcentage de cellules positives n'est que de $4,2 \pm 3,5$ %. L'addition de peptides augmente significativement la captation, avec des pourcentages de cellules positives compris entre 19,8 et 41,4 %. Cependant ces valeurs restent inférieures à celles obtenues avec les lignées cellulaires de CHC.

Dans ces expériences, pour les populations cellulaires ne captant pas à 100% les NPs, il est observé que certains peptides améliorent la captation de NPs, dans des proportions variables en fonction des types cellulaires.

A partir de ces mêmes expériences, nous avons focalisé nos analyses sur les intensités de fluorescence en tenant compte des cellules positives et négatives pour les captations, dans tous les types cellulaires. La Figure 87 présente les principales données des moyennes de fluorescence obtenues en cytométrie en flux pour la captation de complexes peptide-streptavidine et les NPs fonctionnalisées par les cellules hépatiques cancéreuses, les hépatocytes humains en culture primaires et les cellules NCI-H27. La moyenne de l'intensité de fluorescence est le reflet de la quantité de NPs captées par les cellules.

Afin de visualiser l'effet des peptides sur la captation de la streptavidine fluorescente et des NPs, pour chaque expérience, nous avons calculé le rapport entre les valeurs d'intensité de fluorescence en condition avec peptide et celles en condition sans peptide. Ainsi le calcul permet d'avoir une intensité de fluorescence égale à 1 pour les cellules incubées avec de la streptavidine fluorescente ou des NPs sans peptide et de déterminer par quel coefficient est multipliée l'intensité de fluorescence lors de l'ajout d'un peptide.

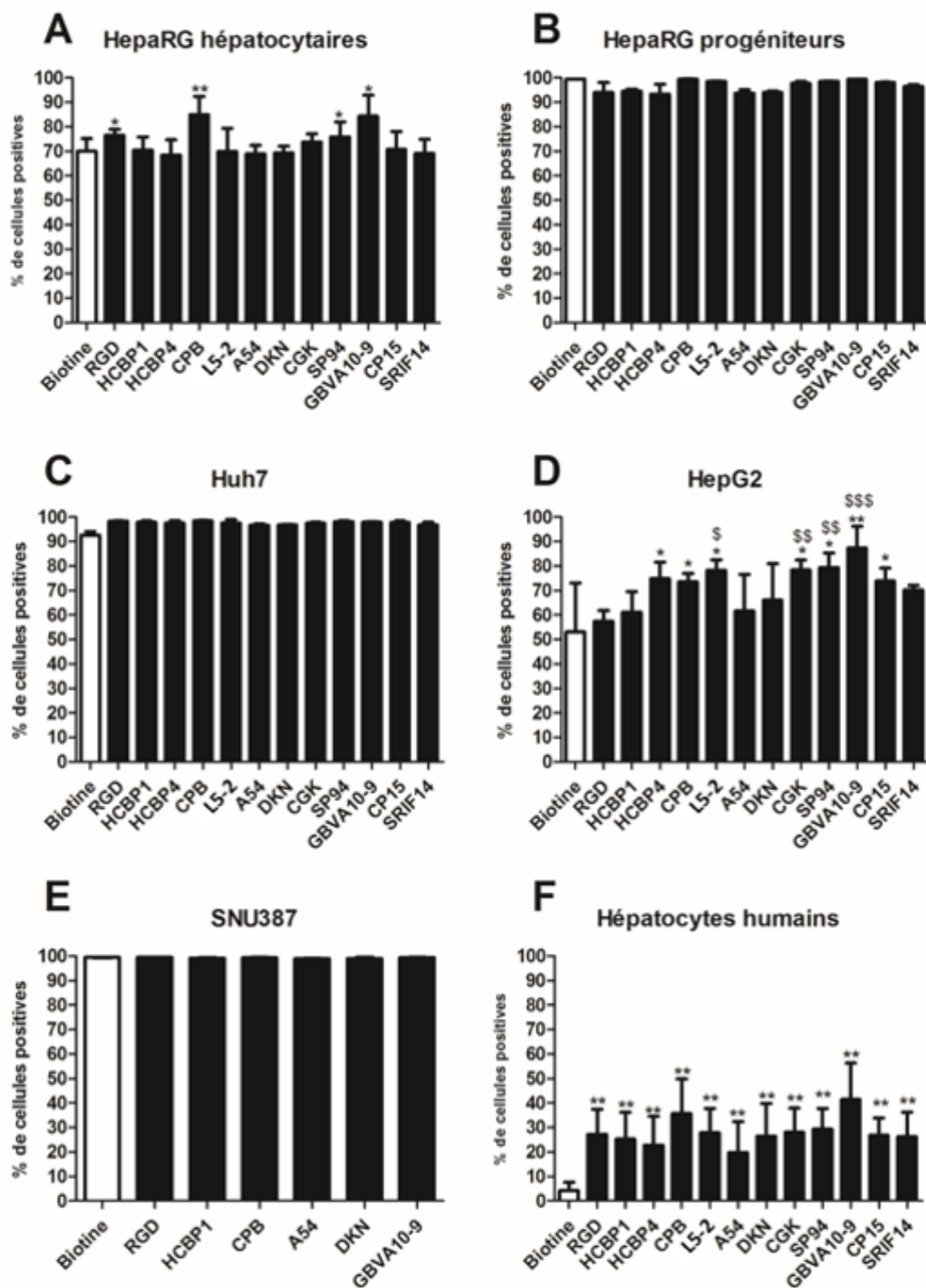


Figure 86 : Pourcentages de cellules hépatiques positives en cytométrie en flux après incubation avec les NPs fluorescentes
 Ces résultats ne présentent qu’une partie des données obtenues avec les NPs fonctionnalisées. * p<0,05 ; **p<0,01 ; Test de Mann et Whitney – comparaison par rapport à la condition biotine (sans peptide). \$ p<0,05 ; \$\$ p<0,01 ; \$\$\$ p<0,001 ; Test de Kruskal-Wallis et post-test de Dunn’s – comparaison par rapport à la condition RGD.

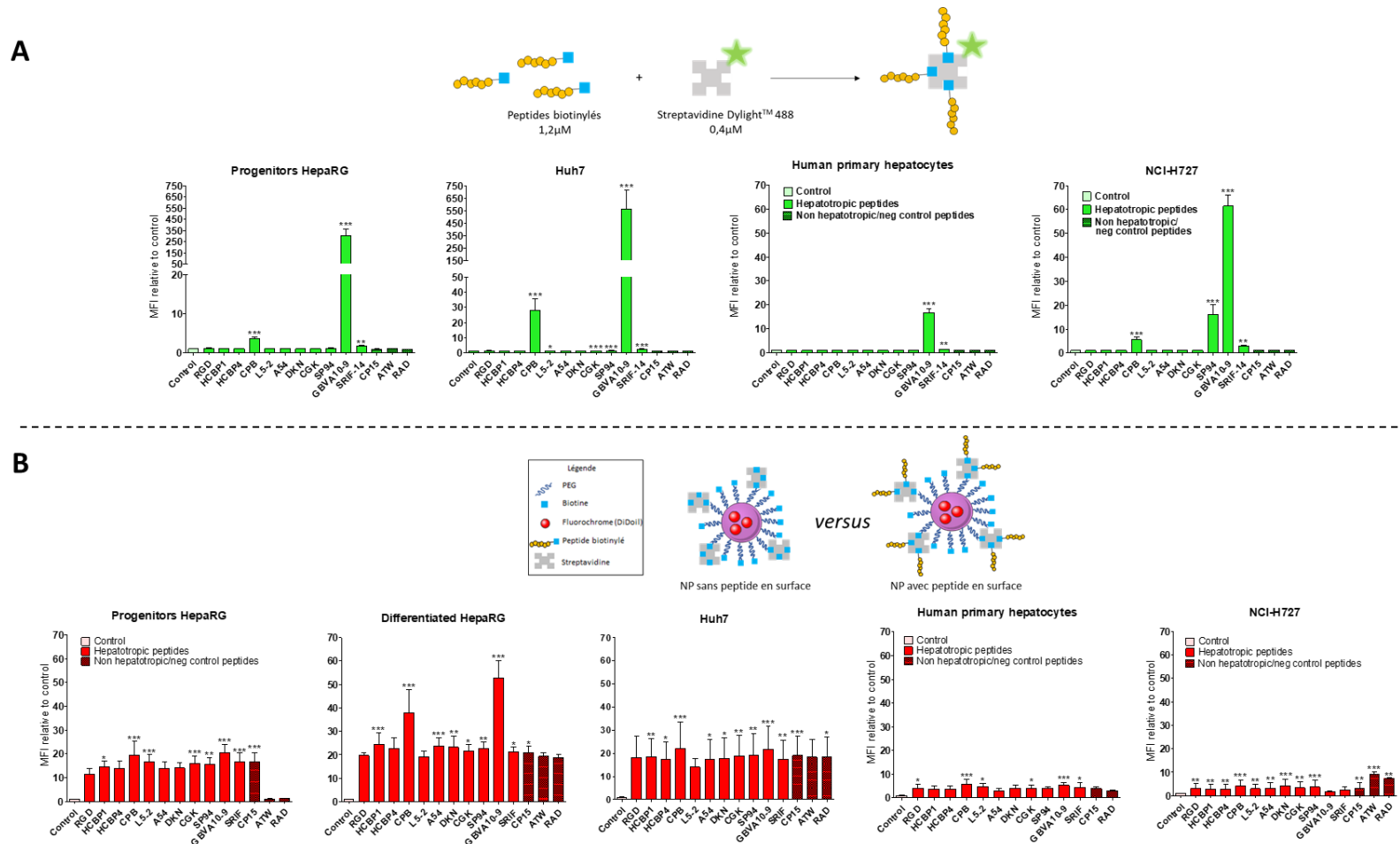


Figure 87 : Evaluation du tropisme hépatique des peptides

(A) La streptavidine DyLight™ 488 (DL488-SA) a été conjuguée à de la biotine ou à des peptides biotinylés pour générer respectivement le contrôle et les complexes peptide-streptavidine. L'internalisation cellulaire a été quantifiée après 24 h d'incubation par cytométrie en flux avec le canal FITC (DL488). L'analyse par cytométrie en flux a permis d'établir la moyenne relative de l'intensité de fluorescence (MFI) des cellules des lignées de cancer hépatique (HepaRG, HepG2 et Huh7), des hépatocytes primaires humains (HH) et des cellules bronchiques (NCI-H727) après captation des complexes peptide-DL488-SA *versus* du conjugué contrôle biotine-DL488-SA. (B) La sonde fluorescente DiDoI a été encapsulée dans des NPs (copolymère Biot-PEG₆₂-b-PMLABe₇₃) contrôle biotine-streptavidine-Biot-PEG₆₂-b-PMLABe₇₃ ou fonctionnalisées par des peptides. La captation a été mesurée après 24 h d'incubation par cytométrie en flux, sur canal APC, dans les mêmes cellules.

La Figure 87 met en parallèle deux figures présentées de façon séparée dans l'article. Cette comparaison a pour objet de mettre en lumière les différences et similitudes observées avec nos deux stratégies d'évaluation du tropisme des peptides vers les cellules hépatiques cancéreuses.

La première observation est la très importante captation des complexes formés entre les peptides CPB et GBVA10-9 et la streptavidine fluorescente, visible pour tous les types cellulaires mais particulièrement orientée vers les cellules cancéreuses hépatiques (Figure 87A). A l'inverse, nous avons été surpris par le fait que le greffage des peptides en surface des NPs augmentait de façon considérable l'internalisation, en particulier vis-à-vis des cellules hépatiques cancéreuses, mais avec très peu de différence entre les peptides (Figure 87B). Cependant, on observait une plus forte captation avec les peptides CPB et GBVA10-9 dans les cellules HepaRG différenciées. De plus, la fonctionnalisation par les peptides contrôles considérés comme « négatifs », CP15, ATW et RAD, n'étaient pas systématiquement associée avec une plus faible internalisation par les cellules hépatiques. Néanmoins, l'effet positif des peptides « hépatotropes » sur la captation était généralement moins fort lorsque les NPs fonctionnalisées étaient incubées avec les hépatocytes humains normaux et les cellules pulmonaires.

D'autres lignées cellulaires ont été testées durant ce travail pour lesquelles les résultats, parfois incomplets (n'incluant pas tous les peptides) n'ont pas été présentés (Figure 88). De façon générale, les cellules hépatiques cancéreuses HepG2 et SNU387 captent mieux les NPs fonctionnalisées par les peptides considérés comme hépatotropes, en particulier les peptides CPB et GBVA10-9. Pour les cellules non-hépatiques HCT116, CaCo2, HUVEC et RC21, la présence de peptides à la surface des NPs augmente significativement l'intensité de fluorescence mesurée par cytométrie en flux comparativement aux NPs sans peptides (Figure 88). Par conséquent, comme pour les cellules d'hépatome, les NPs sont captées en plus grande quantité par les cellules tumorales non hépatiques lorsqu'elles portent des peptides en surface. Cependant, l'augmentation de l'efficacité de captation induite par la présence de ces peptides n'est pas aussi importante que celle observée pour les cellules de CHC. En effet, l'intensité de fluorescence est augmentée d'un facteur d'environ 6 pour les NCI-H727 et les HUVEC et inférieure à 5 pour les trois autres lignées alors que pour les cellules HepaRG l'augmentation de captation est comprise entre 11 et 45 fois.

Les résultats des études de tropisme des peptides vis-à-vis des cellules hépatiques cancéreuses nous ont interpellé sur la spécificité du ciblage des cellules hépatiques, en particulier lorsque des NPs sont fonctionnalisées. Afin de mieux caractériser la spécificité, nous avons utilisé des peptides modifiés pour les peptides CPB et GBVA10-9 qui semblaient donner les meilleurs résultats de captation quand ils étaient associés à la streptavidine fluorescente ou greffés en surface des NPs. Un peptide CPB modifié (CPB *scramble* ou CPBscr) et deux peptides GBVA10-9 modifiés (GBVA10-13 et GBVA10-9scr) ont été produits (Tableau 6) puis utilisés dans des expériences de captation similaires à celles réalisées précédemment (Figure 89).

Ainsi, la comparaison de l'internalisation de la streptavidine et des NPs fonctionnalisées soit par les peptides natifs soit par les peptides modifiés, à priori perdant leur capacité de reconnaissance d'une structure cellulaire impliquée dans l'internalisation, devait permettre de déterminer si les peptides natifs favorisaient l'internalisation *via* une reconnaissance spécifique dépendante de leur séquence en acides aminés.

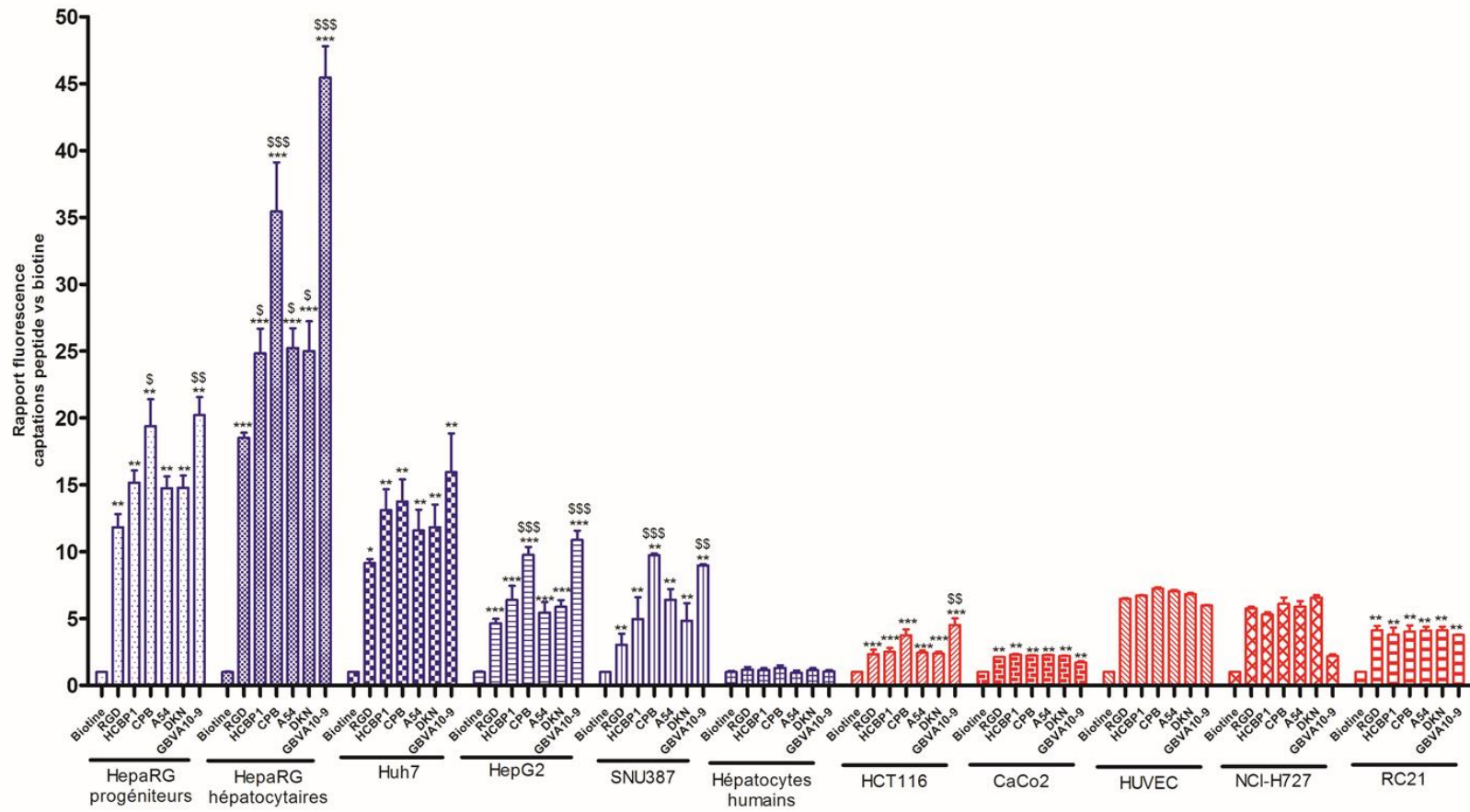


Figure 88 : Rapports d'intensité de fluorescence après captation des NPs fonctionnalisées pour l'ensemble des types cellulaires étudiés

Les résultats sont exprimés en rapport d'intensité entre les fluorescences mesurées après captation des NPs non fonctionnalisées (streptavidine saturée en biotine) et les fluorescences mesurées pour les NPs fonctionnalisées par des peptides. L'auto fluorescence des cellules non-incubées avec des NPs (en unités arbitraires) est ajustée à la même valeur pour tous les types cellulaires. Cellules hépatiques à gauche (en bleu) et non-hépatiques à droite (en rouge).

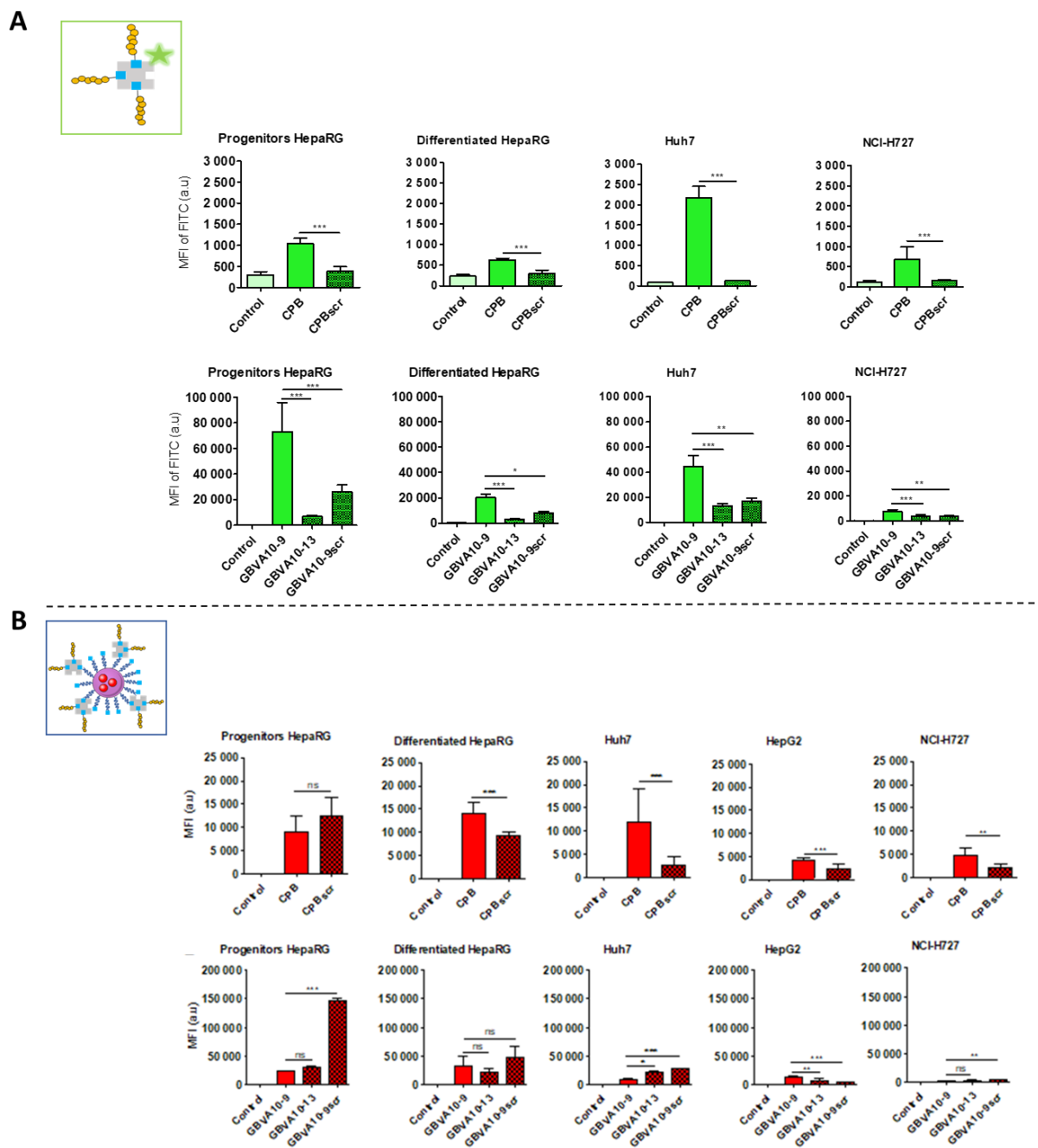


Figure 89 : Moyennes d'intensité de fluorescence après captation des complexes peptides-streptavidine et NPs fonctionnalisées avec les peptides CPB et GBVA10-9 et leurs contrôles

Les résultats sont exprimés en valeurs absolues d'intensité de fluorescences (en unités arbitraires) mesurées après captation des complexes peptide-streptavidine et NPs fonctionnalisées. Les effets sur la captation des complexes (A) et NPs (B) par les peptides CPB et le contrôle CPBscr sont comparés d'un côté et l'effet des peptides GBVA10-9 et les contrôles GBVA10-13 et GBVA10-9scr est présenté séparément. La condition notée « control » correspond au complexe streptavidine-biotine (A) ou aux NPs-streptavidine fonctionnalisées avec la biotine (B).

Dans ces expériences, nous avons présenté les résultats en valeurs absolues des moyennes de fluorescence afin de comparer plus directement la réelle captation des complexes peptide-streptavidine et des NPs fonctionnalisées (Figure 89).

Les résultats ont d'abord mis en évidence que l'internalisation du conjugué GBVA10-9-streptavidine était bien supérieure à celle mesurée avec le complexe CPB-streptavidine, puisque des différences de niveaux de fluorescence de 2 à 10 fois ont été observées entre les deux conjugués. Les données ont

également confirmé que les peptides CPB et GBVA10-9 amélioraient fortement l'internalisation de la streptavidine, par rapport à celle du complexe témoin biotinylé, pour tous les types cellulaires. De plus, la captation était plus élevée dans les cellules d'hépatome que dans les cellules NCI-H727, à l'exception des cellules HepaRG différenciées. Concernant la question cruciale de la spécificité de reconnaissance d'une structure cellulaire (récepteur membranaire, composant de surface), les cellules incubées avec le complexe CPBscr-streptavidine présentaient des moyennes de fluorescence équivalentes à celles mesurées dans les cellules incubées avec un bioconjugué témoin sans peptide, ce qui indiquait que les modifications de la séquence d'acides aminés du peptide CPB induisaient une perte complète de reconnaissance cellulaire (Figure 89A).

De même, les intensités de fluorescences mesurées pour les cellules exposées aux conjugués GBVA10-9scr- et GBVA10-13-streptavidine étaient fortement réduites, par rapport à celles des cellules incubées avec le conjugué GBVA10-9-streptavidine, bien que ces valeurs soient restées significativement plus élevées que celles des cellules contrôles exposées au complexe biotine-streptavidine. Ces données suggéraient fortement que les séquences spécifiques en acides aminés des peptides CPB et GBVA10-9 étaient le principal déterminant de l'internalisation des conjugués de streptavidine par les cellules d'hépatome.

De la même façon, le rôle de la séquence en acides aminés des peptides CPB et GBVA10-9 dans l'absorption des NPs par les cellules d'hépatome et NCI-H727 a été étudié en comparant les intensités de fluorescence des cellules exposées aux NPs fonctionnalisées par les peptides « natifs » et les peptides modifiés CPBscr, GBVA10-9scr et GBVA10-13 (Figure 89B). Nos données ont montré que les intensités de fluorescence étaient beaucoup plus élevées dans les cellules d'hépatome que dans les cellules NCI-H727, confirmant la plus grande captation de NPs par les cellules hépatiques. Nous avons également constaté que l'ajout de CPBscr sur les NPs réduisait l'internalisation cellulaire, par rapport à celle observée avec les NPs fonctionnalisées avec le CPB, sauf dans les cellules progénitrices. Cependant, les intensités de fluorescence pour les cellules incubées avec les CPBscr-NPs restaient beaucoup plus élevées que celles mesurées pour les cellules exposées aux NPs sans peptides. A l'inverse, les fluorescences mesurées dans les cellules HepaRG, Huh7 et NCI-H727 incubées avec des NPs fonctionnalisées par les peptides GBVA10-9scr et GBVA10-13 n'étaient soit pas significativement différentes, soit même supérieures aux valeurs mesurées dans les cellules exposées aux GBVA10-9-NPs. Ces données suggéraient fortement que la séquence spécifique en acides aminés du peptide CPB contribuait, au moins en partie et pour certains types cellulaires, à une interaction spécifique NP-cellule et à l'internalisation des NPs. Nos résultats indiquaient également que l'internalisation des GBVA10-9-NPs ne reposait pas strictement sur la reconnaissance de sites de liaison sur les cellules d'hépatome dépendante de la séquence spécifique de GBVA10-9, puisque les deux peptides modifiés n'ont eu aucun effet réducteur sur l'internalisation cellulaire de ces NPs voire l'améliorait.

Nous avons montré que les NPs à base de PMLABe₇₃ étaient fortement opsonisées, alors que celles formulées à partir du copolymère PEG₄₂-*b*-PMLABe₇₃ l'étaient beaucoup moins (Chapitre I). Nous avons émis l'hypothèse que les peptides, bien que courts, puissent affecter l'opsonisation des NPs formulées à partir du copolymère Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ et fonctionnalisées par la streptavidine et les peptides biotinylés, et leur reconnaissance cellulaire (Figure 90A). Pour déterminer si la nature des peptides CPB, GBVA10-9 et leurs formes modifiées pouvait affecter la composition de la couronne protéique, nous avons étudié, par western-blot, la présence d'opsonines sur des NPs fonctionnalisées par ces peptides (Figure 90B).

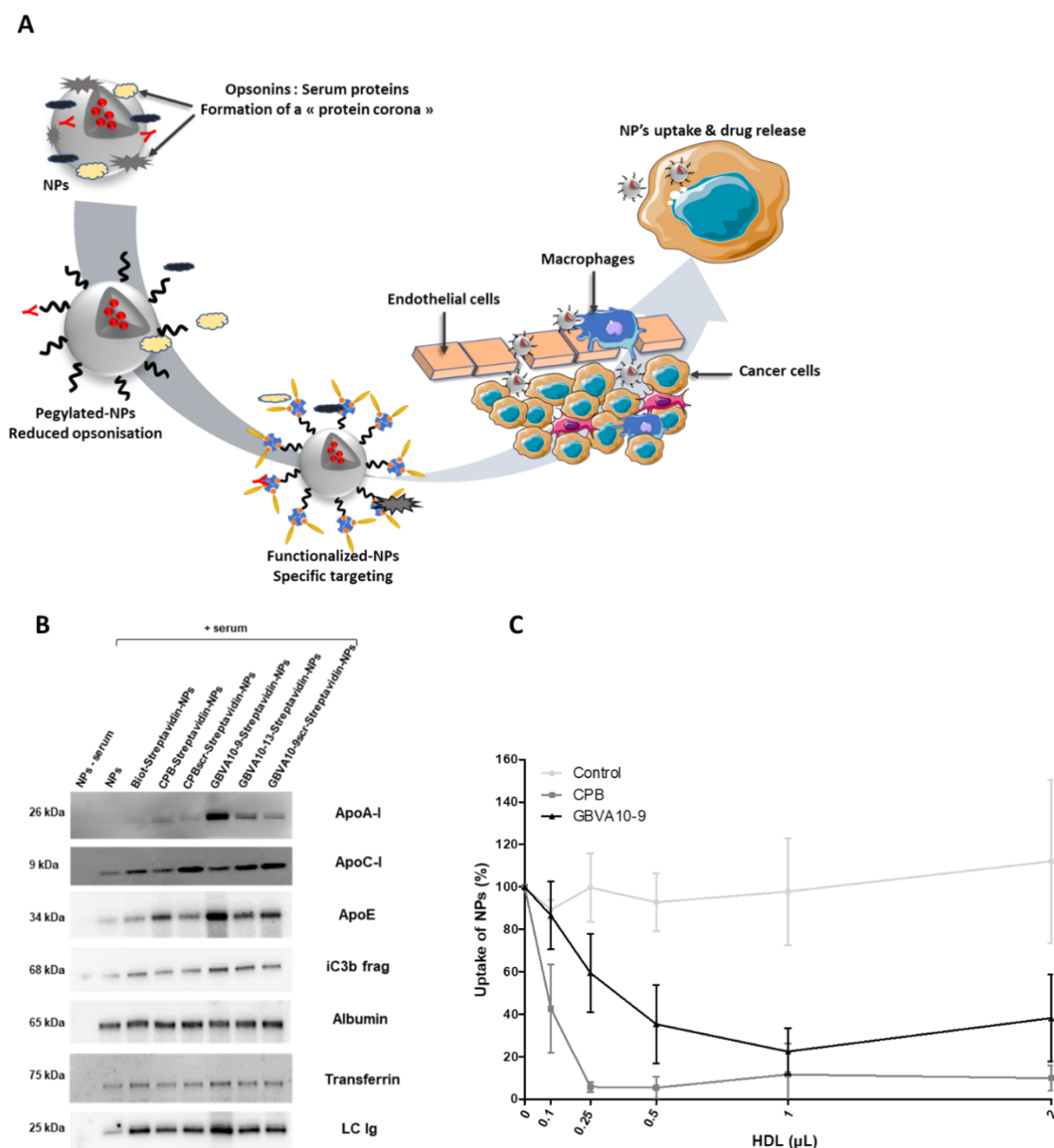


Figure 90 : Opsonisation des NPs fonctionnalisées avec les peptides CPB et GBVA10-9 et leurs contrôles modifiés

(A) hypothèse d'une opsonisation accrue des NPs fonctionnalisées par les peptides CPB et GBVA10-9. (B) Détection par western blot de protéines associées aux NPs formulées à partir du copolymère Biot-PEG₆₂-*b*-PMLA_{Be73} sans ou avec fonctionnalisation par les peptides CPB et GBVA10-9 et leurs contrôles modifiés. (C) Effet de quantités croissantes de HDL purifiés sur la captation de NPs contrôles sans peptides et de NPs fonctionnalisées par les peptides CPB et GBVA10-9.

Par cette approche, nous avons détecté l'albumine et la transferrine, deux protéines plasmatiques très abondantes connues pour se lier aux NPs polymères. Leurs niveaux relatifs ne variaient pas significativement entre les NPs fonctionnalisées par les différents peptides. En revanche, nous avons mis en évidence des variations quantitatives importantes pour la protéine du complément iC3b, les apolipoprotéines (ApoA-I, ApoC-I et ApoE) et les immunoglobulines (Figure 90B). Les ApoA-I et ApoE étaient beaucoup plus abondantes sur les NPs fonctionnalisées par le GBVA10-9 et ses peptides contrôle et, dans une moindre mesure, sur les NPs fonctionnalisées par le CPB, comparativement à leurs niveaux relatifs sur les autres NPs.

Le peptide GBVA10-9 est dérivé du domaine peptidique C5A de la protéine NS5A du virus A des Flaviviridae GB (GBV-A). Ce peptide présente une activité inhibitrice de l'entrée du virus de l'hépatite C (VHC) dans les cellules hépatiques (G. Cheng et al., 2008; X. Liu et al., 2013). L'entrée du VHC dans les hépatocytes est un processus complexe en plusieurs étapes impliquant l'attachement viral, la liaison à différents récepteurs et l'endocytose. Il a été démontré que l'ApoE jouait un rôle clé dans cette internalisation *via* son interaction spécifique avec le domaine C-terminal de NS5A (Lindenbach & Rice, 2013). Les particules du VHC interagissent de manière transitoire avec des particules de lipoprotéines de faible (LDL) et de forte (HDL) densités pour former des particules lipovirales qui s'attachent aux hépatocytes *via* la liaison aux récepteurs de apolipoprotéines (Lindenbach & Rice, 2013). Ces données combinées à nos résultats, montrant que des quantités plus élevées d'ApoA-I et d'ApoE étaient associées aux NPs présentant les peptides GBVA10-9 et ses peptides modifiés, nous ont incité à étudier si les apolipoprotéines pouvaient affecter l'internalisation de NPs fonctionnalisées par ces peptides

Afin d'étudier l'influence des HDL sur l'internalisation cellulaire des NPs fonctionnalisées par les peptides, nous avons incubé des cellules HepaRG avec des NPs contrôle fonctionnalisées par la streptavidine seule et les CPB- et -GBVA10-9-NPs, en absence ou présence de quantités croissantes d'HDL purifié (Figure 90C). Nous avons analysé les intensités de fluorescence des cellules par cytométrie en flux. Alors que les fluorescences des cellules incubées avec des NPs témoins sans peptide n'ont pas été affectées par l'ajout de HDL, les fluorescences des cellules HepaRG incubées avec des NPs fonctionnalisées par les peptides CPB et GBVA10-9 étaient fortement diminuées par les HDL de manière dose-dépendante, suggérant une compétition entre les NPs et les HDL pour l'internalisation cellulaire.

Ces données ont démontré que l'internalisation de NPs à base de Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ par des cellules d'hépatome est fortement améliorée par la fonctionnalisation des NPs par les peptides CPB et GBVA10-9, par un mécanisme qui implique, au moins en partie, la liaison des NPs à des apolipoprotéines et aux HDL *via* ces deux peptides, ce qui pourrait favoriser l'interaction des NPs avec les récepteurs membranaires cellulaires.

Dans une dernière étape du travail, nous avons utilisé des conjugués peptides CPB et GBVA10-9-streptavidine, qui ont tous deux montrés un fort tropisme pour les cellules d'hépatome dépendant de leur séquence d'acides aminés pour déterminer si ces conjugués amélioreraient le ciblage *in vitro* de cellules d'hépatome par rapport à la forte activité phagocytaire des macrophages. Nous avons mis en place un système de coculture, associant les cellules d'hépatome humain Huh7 et des macrophages humains (HPM), afin d'évaluer la compétition cellulaire pour l'internalisation de ces complexes peptide-streptavidine. Pour discriminer les deux types de cellules par cytométrie en flux, nous avons utilisé des cellules Huh7 qui expriment de manière stable la protéine GFP (Figure 91A-B). Les cocultures ont été exposées aux conjugués peptide-streptavidine émettant une fluorescence rouge qui a été mesurée dans les cellules Huh7 positives pour la GFP et les macrophages humains (Figure 91B).

A nouveau, deux « comportements » différents sont observés pour les peptides CPB et GBVA10-9 (Figure 91B-D). Le rapport de la fluorescence rouge émise par la streptavidine sans peptide entre les macrophages et les cellules Huh7 est de 20 (Figure 91C). En présence de CPB, la fluorescence dans les macrophages est peu modifiée alors qu'elle augmente de presque 10 fois dans les cellules Huh7 aboutissant à un rapport macrophages/Huh7 de 3,2, démontrant ainsi que le peptide CPB réduit significativement la différence dans l'internalisation de la streptavidine entre les deux types cellulaires.

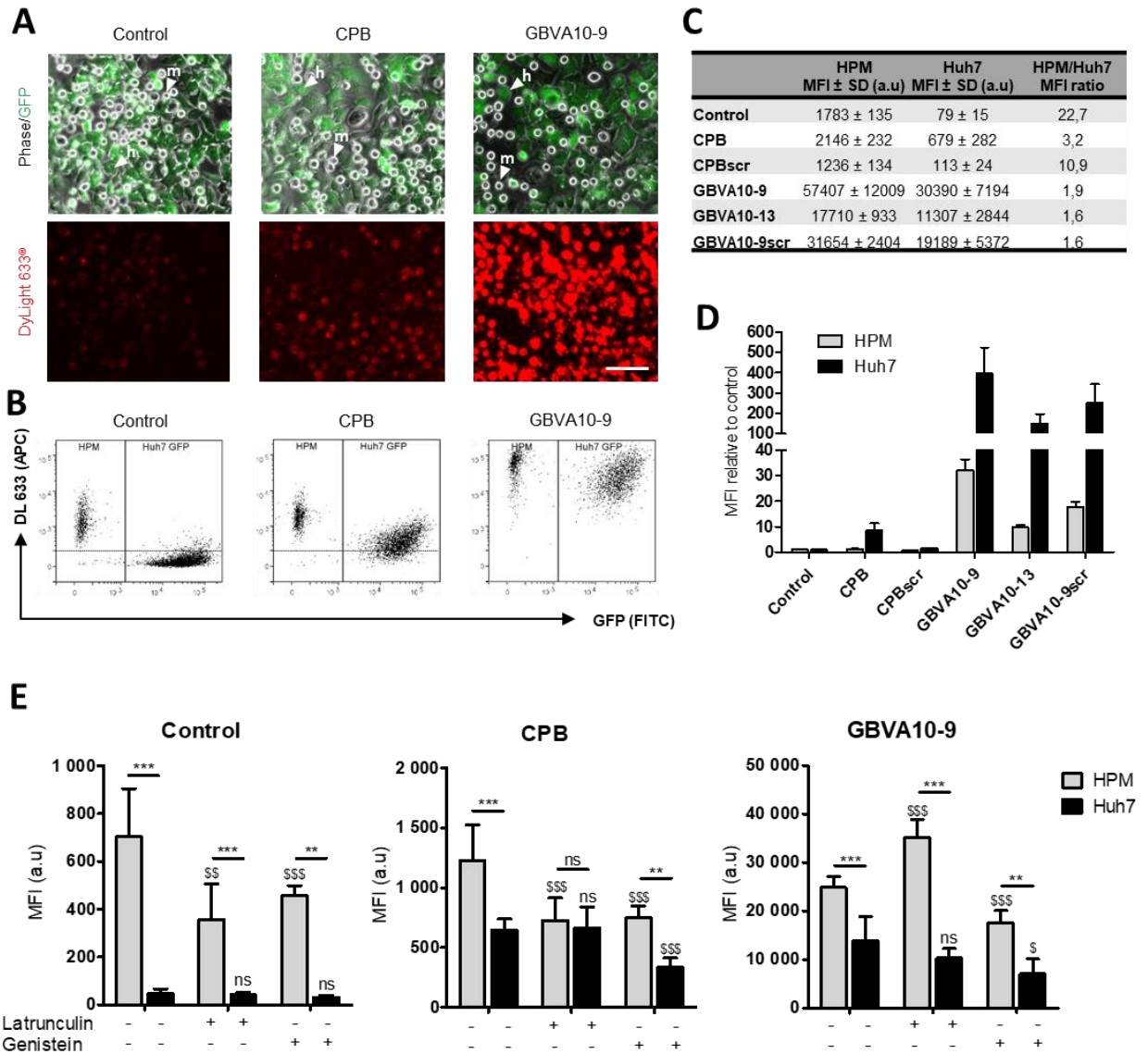


Figure 91 : Captation de la streptavidine fonctionnalisée par les peptides CPB et GBVA10-9 et leurs peptides modifiés dans un modèle de coculture de cellules Huh7 GFP+ et de macrophages humains

(A) Morphologie de la coculture : Les macrophages restent sous une forme sphérique en contact étroit avec les cellules Huh7 exprimant la GFP. La streptavidine rouge (DyLight™633) est visible en microscopie à fluorescence. (B) Nuages de points objectivant les cellules Huh7 en bas à gauche et les macrophages en haut à droite dans la condition contrôle (streptavidine sans peptide) et l'évolution des fluorescences des deux populations sous l'effet des peptides CPB et GBVA10-9. (C) Tableau des intensités absolues de la fluorescence rouge dans les deux populations cellulaires, pour les conditions contrôle, CPB et GBVA10-9. (D) Rapport des intensités de la fluorescence rouge dans les deux types cellulaires pour les différentes conditions expérimentales. (E) Effets des inhibiteurs d'endocytose (génistéine) et de phagocytose (latrunculine) sur l'internalisation des complexes peptide-streptavidine contrôle ou associés aux peptides CPB et GBVA10-9. Les résultats sont exprimés en valeurs absolues de fluorescence dans les cellules Huh7 et les macrophages.

Pour le peptide GBVA10-9, sa complexation avec la streptavidine augmente de façon considérable l'internalisation du conjugué dans les deux types cellulaires mais, là aussi, le peptide réduit l'écart dans l'internalisation entre les cellules Huh7 et les macrophages avec un rapport qui n'est plus que de 1,9.

Par ailleurs, le conjugué formé entre le peptide CPBscr et la streptavidine est beaucoup moins bien capté que celui portant le CPB natif. La même observation a été faite pour les peptides modifiés du GBVA10-9 *versus* le GBVA10-9 « natif ».

L'utilisation de deux inhibiteurs chimiques de l'endocytose et de la phagocytose, respectivement la génistéine et la latrunculine, a permis d'aborder les mécanismes contribuant à l'internalisation des complexes. Ces données suggèrent fortement que le complexe CPB-streptavidine est internalisé principalement par endocytose dans les cellules d'hépatome et par un double mécanisme impliquant à la fois la phagocytose et endocytose dans les macrophages. De plus, la très forte captation du conjugué GBVA-10-9-streptavidine se produit en partie par endocytose et probablement par un autre mécanisme, du moins dans les macrophages, qui pourrait s'appuyer sur les propriétés physico-chimiques de ce peptide hydrophobe. L'hypothèse d'un peptide capable de diffuser au moins partiellement au travers des membranes est proposée.

IV. ARTICLE 2

Article

Circumsporozoite Protein of *Plasmodium berghei*- and George Baker Virus A-Derived Peptides Trigger Efficient Cell Internalization of Bioconjugates and Functionalized Poly(ethylene glycol)-*b*-poly(benzyl malate)-Based Nanoparticles in Human Hepatoma Cells

Elise Vène ^{1,2}, Kathleen Jarnouen ¹, Catherine Ribault ¹, Manuel Vlach ^{1,3}, Yann Verres ¹, Mickaël Bourgeois ^{4,5}, Nicolas Lepareur ^{1,6,*}, Sandrine Cammas-Marion ^{1,7,*} and Pascal Loyer ^{1,*}

Citation: Vène, E.; Jarnouen, K.; Ribault, C.; Vlach, M.; Verres, Y.; Bourgeois, M.; Lepareur, N.; Cammas-Marion, S.; Loyer, P. Circumsporozoite Protein of *Plasmodium berghei*- and George Baker Virus A-Derived Peptides Trigger Efficient Cell Internalization of Bioconjugates and Functionalized Poly(ethylene glycol)-*b*-poly(benzyl malate)-Based Nanoparticles in Human Hepatoma Cells. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 804. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14040804>

Academic Editors: Iman Kavianiinia and Makhdoom Sarwar

Received: 10 March 2022

Accepted: 3 April 2022

Published: 6 April 2022

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



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

¹ Institut NUMECAN (Nutrition Metabolisms and Cancer), Inserm, UMR-S 1241, INRAE UMR-A 1341, Univ Rennes, F-35000 Rennes, France; elise.vene@chu-rennes.fr (E.V.); kathleen.jarnouen@live.fr (K.J.); catherine.ribault@univ-rennes1.fr (C.R.); manuel.vlach@agrocampus-ouest.fr (M.V.); yann.verres@univ-rennes1.fr (Y.V.)

² Pôle Pharmacie, Service Hospitalo-Universitaire de Pharmacie, CHU Rennes, 35033 Rennes, France

³ INRAE, Institut AGRO, PEGASE UMR 1348, 35590 Saint-Gilles, France

⁴ CRCINA, Inserm, CNRS, Université de Nantes, 44000 Nantes, France; mickael.bourgeois@univ-nantes.fr

⁵ ARRONAX Cyclotron, 44817 Saint Herblain, France

⁶ Comprehensive Cancer Center Eugène Marquis, 35000 Rennes, France

⁷ Institut des Sciences Chimiques de Rennes (ISCR), Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes, CNRS UMR 6226, University of Rennes, F-35042 Rennes, France

* Correspondence: n.lepareur@rennes.unicancer.fr (N.L.); sandrine.marion.1@ensc-rennes.fr (S.C.-M.); pascal.loyer@univ-rennes1.fr (P.L.)

Abstract: In order to identify the peptides, selected from the literature, that exhibit the strongest tropism towards human hepatoma cells, cell uptake assays were performed using biotinylated synthetic peptides bound to fluorescent streptavidin or engrafted onto nanoparticles (NPs), prepared from biotin-poly(ethylene glycol)-*block*-poly(benzyl malate) (Biot-PEG-*b*-PMLABe) via streptavidin bridging. Two peptides, derived from the circumsporozoite protein of *Plasmodium berghei*- (CPB) and George Baker (GB) Virus A (GBVA10-9), strongly enhanced the endocytosis of both streptavidin conjugates and NPs in hepatoma cells, compared to primary human hepatocytes and non-hepatic cells. Unexpectedly, the uptake of CPB- and GBVA10-9 functionalized PEG-*b*-PMLABe-based NPs by hepatoma cells involved, at least in part, the peptide binding to apolipoproteins, which would promote NP's interactions with cell membrane receptors of HDL particles. In addition, CPB and GBVA10-9 peptide-streptavidin conjugates favored the uptake by hepatoma cells over that of the human macrophages, known to strongly internalize nanoparticles by phagocytosis. These two peptides are promising candidate ligands for targeting hepatocellular carcinomas.

Keywords: hepatoma cells; macrophages; George Baker (GB) virus A10-9; circumsporozoite protein of *Plasmodium berghei*; polymeric nanoparticles; bioconjugates; opsonization

1. Introduction

In oncology, the development of most chemotherapies relies on the identification of small molecules, targeting altered molecular pathways in cancer cells, but rarely considers a site-specific delivery. Consequently, many cancer chemotherapeutics do not accumulate specifically at sites of the tumor, but distribute evenly throughout the body, often

resulting in deleterious side effects and limited bioavailability. These drawbacks significantly contribute to the retrieval of promising molecules and lack of efficacy of approved drugs [1,2]. To overcome these limitations, the concept of “vectorized therapy” has emerged to achieve more specific drug delivery to tumors [3–5], using ligands such as aptamers, polysaccharides, peptides, proteins, and antibodies to generate drug-bioconjugates and functionalized nanoparticles, which selectively recognize membrane receptors of tumor cells to achieve an “active” tumor targeting [3].

Antibody-drug conjugates (ADC) are well-implemented as targeting agents in oncology, with many ADC approved by National Agencies for Drug Regulation for various hematological cancers and solid tumors [6]. More recently, short synthetic peptides have gained interest as targeting bioconjugates for cancer imaging and treatments, due to their high specificity of interaction and excellent biocompatibility [7–11]. Peptides specifically recognize cell membrane-associated proteins on a subset of cell types and can also exert antiproliferative [12], antiangiogenic [13], and cytotoxic [14,15] activities. Furthermore, several cell-penetrating peptides (CPP) have also been synthesized [9,11], after the demonstration that short domains of the transcription protein trans-activator of the human immunodeficiency virus [16] and *Drosophila* Antennapedia homeodomain [17] showed the remarkable ability to diffuse across cell membranes.

Nanoparticles (NPs) embedding drugs have appeared as a suitable strategy to prevent the rapid elimination of therapeutic payloads and achieve a prolonged plasma drug concentration [18,19]. This strategy was reinforced by the discovery of the enhanced permeability and retention effect (EPR) in rodents [20], defined as the extravasation of macromolecules and nanovectors, through the fenestrated and leaky blood vessels, as well as their accumulation within tumors [2,21,22]. However, only few nanomedicines have been approved by regulatory authorities and reached the clinical practice [3], because of their limited efficacy and concerns, regarding their toxicity [23,24]. The lack of efficacy could be due, at least in part, to the fact that the EPR effect may not be as predominant in humans, compared to mice, because of differences in hemodynamics between the two species, and tumor heterogeneity in humans. In order to improve tumor targeting, NPs were functionalized with peptide and protein ligands of the membrane receptors expressed in tumor cells [5,25–28]. While recent articles describe increases in tumor targeting by peptide-decorated NPs [3,5], others conclude to the negligible efficiency because of the reduced diffusion of NPs into solid tumors and their internalization by macrophages within the tumors [29,30], as well as the mononuclear phagocyte system (MPS) in the liver and spleen [2].

Hepatocellular carcinoma (HCC), the most predominant primary liver malignancy worldwide, belongs to the group of refractory cancers resistant to chemotherapies. Only a small fraction of patients are eligible for curative surgical treatments at the early stages of the disease [31]. For most patients, palliative neoadjuvant therapies, such as transarterial chemoembolization and radioembolization [32], and systemic chemotherapies are proposed. In 2007, the FDA approved the tyrosine kinase inhibitor sorafenib as the first line of treatment for advanced HCC [33]. In the last five years, successive phase II and III trials demonstrated the efficiency of several others tyrosine kinase and angiogenesis inhibitors against HCC, including regorafenib [34], lenvatinib [35], cabozantinib [36], and ramucirumab [37,38]. Following these clinical trials, these new drugs were approved as first- or second-line systemic therapy options for patients with unresectable HCC and/or to reduce the risk of recurrence following surgical resection [32,39]. The use of immunotherapy with nivolumab and pembrolizumab were also approved for advanced HCC after tumor progression under sorafenib and lenvatinib [39–42]. These immunotherapies show, however, moderate improvement on the overall survival and for a limited number of patients [43]. Clinical trials are currently evaluating their use at earlier stages of HCC as neoadjuvant [32] and in association with other therapeutic approaches such as the radioembolization [44]. Nevertheless, HCC remains among the most refractory cancers, and alternative strategies are urgently needed.

While many bioconjugates and NPs have been designed for both imaging and therapy in oncology [45–47], only few articles described the evaluation of peptide bioconjugates and peptide-functionalized NPs for the theranostics of HCC and most studies reported rather disappointing results [10,48]. These data emphasize the need to identify specific peptides for designing novel peptide bioconjugates and peptide-decorated NPs targeting hepatic cancer cells more efficiently. Some peptides have been identified mainly by phage display, using hepatoma cells or proteins overexpressed in HCC, such as the glypican-3, as baits [49–53]. These peptides, either covalently bound to fluorescent molecular probes to produce bioconjugates or engrafted onto NPs, exhibit tropism toward hepatoma cells in vitro and in xenograft HCC mouse models. However, these studies rarely investigate the internalization of nanovectors by normal human hepatocytes and macrophages. These studies often use rodent models of HCC, with ectopic implantation of human hepatoma cells in immuno-incompetent nude mice, which lack the active compartment of the MPS, such as macrophages. The development of novel bioconjugates and functionalized NPs promoting the uptake by cancer hepatic cells over the phagocytosis by macrophages would be of interest for the treatment of HCC [54,55].

In this context, our first objective was to identify the peptides that exhibit a strong tropism towards human hepatoma cells, compared to normal hepatocytes in primary culture, by screening a collection of synthetic hepatotropic peptides selected from the literature, but never compared together in the same study. For this task, biotinylated peptides were bound to fluorescent streptavidin to form model bioconjugates, or engrafted through streptavidin bridging onto biotinylated NPs prepared from the amphiphilic block copolymer biotin-poly(ethylene glycol)-*block*-poly(benzyl malate) (biot-PEG-*b*-PMLABe) and encapsulating a hydrophobic fluorescent probe into their hydrophobic PMLABe inner core [56–58]. Herein, we demonstrated that the peptides CPB and GBVA10-9 derived from the circumsporozoite protein of *Plasmodium berghei* and George Baker (GB) virus A, respectively, showed the highest tropism towards hepatoma cells. Using these peptides, the second aim of this study was to investigate whether their specific amino acid sequence was the main determinant to drive the cell uptake of peptide bioconjugates and peptide-decorated NPs by hepatoma cells. We generated scrambled and/or mutated control peptides for both CPB and GBVA10-9 and compared the uptake of native versus control peptide bioconjugates and -NPs in various hepatoma cell lines. We demonstrated that CPB and GBVA10-9 native peptide bioconjugates were more efficiently internalized than their control counterparts. The internalization of PEGylated PMLABe-based NPs by hepatoma cells was also strongly enhanced by CPB- and GBVA10-9 peptides through a mechanism that involves, at least in part, the peptide's binding to apolipoproteins and HDL, which promoted interaction with cell membrane receptors. Then, we set up a coculture system mixing Huh7 human hepatoma cells and primary macrophages in order to determine whether CPB and GBVA10-9 peptide-streptavidin conjugates could favor the uptake by hepatoma cells over that of macrophages in this in vitro model evaluating the cell competition for the internalization of our peptide-streptavidin bioconjugates.

2. Materials and Methods

2.1. Reagents and Peptides

William's E medium, RPMI 1640 medium, penicillin/streptomycin (5000 IU/mL, 5000 µg/mL), L-glutamine (2 mM), trypsin-EDTA, Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS), CellLight™ lysosomes-GFP, streptavidin DyLight™ 488 conjugated, streptavidin DyLight™ 633 conjugated, Pierce® streptavidin agarose resin, Hoechst 33342, and 16% formaldehyde were purchased from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Fetal bovine sera (FBS) were from GE Healthcare Life Sciences (Villabe, France), Eurobio Scientific (Les Ulis, France), and Biosera (Grosseron distributor, Coueron, France). Human serum pooled male was obtained from Biotrend Chemikalien GmbH (Köln, Germany).

Minimum essential medium (MEM) Eagle, dimethyl sulfoxide (DMSO), genistein, chlorpromazine hydrochloride, insulin from bovine pancreas, biotin, latrunculin A, and saponin were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Hydrocortisone hemisuccinate was from Serb (Paris, France). Streptavidin recombinant was purchased from Anaspec (Fremont, CA, USA). Human CD14 microbeads and recombinant human granulocyte macrophage colony-stimulating factor (rhGM-CSF) were purchased from Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany). The α -biotin- ω -carboxy poly(ethylene glycol) (BiotPEG_nCOOH), with a weight average molar mass (M_w) of 3000 g/mol ($n = 62$), was purchased from Iris Biotech GMBH (Marktredwitz, Germany). DiD Oil (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine perchlorate) was purchased from Invitrogen (Thermo Fischer Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France). Recombinant human apolipoproteins A1 (ApoA-1) and E3 (ApoE-3) were obtained from Bio-Techne (Noyal-Châtillon-sur-Seiche, France). All peptides (Table 1), modified at the N-terminal end by adding a biotinylated lysine, were synthesized by Eurogentec (Seraing, Belgium), with purity rates of >85%, as determined by high-pressure liquid chromatography. The HDL purification kit was purchased from MyBioSource (CliniSciences, Nanterre, France).

2.2. Materials

Characterization of biotinylated-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ copolymer was performed using nuclear magnetic resonance spectra (¹H NMR) and were recorded on a Bruker Advanced III 400 spectrometer (Bruker, Wissembourg, France). Data are not shown in the manuscript. Weight average molar mass (M_w) and dispersity ($\bar{D} = M_w/M_n$) values were measured by size exclusion chromatography (SEC) in THF at 40 °C (flow rate = 1.0 mL/min) on a GPC2502 Viscotek apparatus (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK), equipped with a refractive index detector Viscotek VE 3580 RI (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK), guard column Viscotek TGuard org 10 × 4.6 mm, LT5000L mixed medium org 300 × 7.8 mm gel column (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK), and GPC/SEC OmniSEC software (OmniSEC™4.6.1, Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK). The polymer samples were dissolved in THF (2 mg/mL). All elution curves were calibrated with poly(styrene) standards. Dynamic light scattering (DLS) and zeta potential (electrophoretic light scattering, ELS) measurements were performed on a Nano-sizer ZS90 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK) at 25 °C, with a He–Ne laser (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK) at 633 nm and with a detection angle of 90°.

Fluorescent cells were visualized using a Zeiss AxioVert A.1 microscope, coupled with a Colibri.2 illumination system (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Germany). Intracellular localization was evaluated using a Leica SP8 AOBS resonant scanning confocal microscope, with an inverted Leica DMI 6000 microscope stand (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), using the Microscopy Rennes Imaging Center (MRic) facility of the Biology and Health Federative research structure Biosit (SFR Biosit, University of Rennes 1, France). Images were processed using the open-source software ImageJ/Fiji. The fluorescence emitted by cells was quantified by flow cytometry (LSRFortessa™ X-20, Becton Dickinson), using the cytometry core facility of the SFR Biosit (University of Rennes 1, France). Cytometry data were analyzed using the FlowLogic software (7.2.1 version, Inivai Technologies, Mentone Victoria, Australia).

2.3. Cell Culture

HepaRG cells were cultured as previously described [59]. Briefly, progenitors HepaRG were cultured in William's E medium, supplemented with 2 mM L-glutamine, 50 IU/mL penicillin, 50 µg/mL streptomycin, 5 mg/L insulin, 10⁻⁵ M hydrocortisone hemisuccinate, and 10% FBS. To obtain differentiated HepaRG cells, progenitors were cultured for 14 days to obtain confluent quiescent cells and maintained for two additional weeks in medium supplemented with 2% DMSO. MEM medium, supplemented with 10% FBS, 50 IU/mL penicillin, 50 µg/mL streptomycin, and 2 mM L-glutamine, was used to culture the HepG2 and Huh7 cells. Human primary hepatocytes, obtained from the Centre de

Ressources Biologiques (CRB) of Rennes, were cultured in William's E medium, supplemented with 2 mM L-glutamine, 50 IU/mL penicillin, 50 µg/mL streptomycin, 5 mg/L insulin, 10^{-5} M hydrocortisone hemisuccinate, 10% FBS, and 2% DMSO. The bronchial carcinoid NCI-H727 cells were cultured in RPMI 1640 medium containing 10% FBS, 50 IU/mL penicillin, 50 µg/mL streptomycin, and 2 mM L-glutamine.

Human peripheral blood mononuclear cells were isolated from the buffy coat of healthy donors (Etablissement Français du Sang, Rennes, France) by centrifugation on UNI-SEP maxi U10 (Novamed). Monocytes were isolated using anti-human CD14 antibodies conjugated magnetic MicroBeads (Miltenyi Biotec SAS, Paris, France) and were plated at a density of 0.5×10^5 cells per well in 48-well plates. HPM were obtained after differentiation of monocytes with 50 ng/mL rhGM-CSF in RPMI 1640 medium, supplemented with 5 IU/mL penicillin, 5 mg/mL streptomycin, 2 mM L-glutamine, and 10% FBS during 7 days, as previously described [60]. After 7 days of differentiation, the culture medium was removed, and 1×10^5 cells Huh7 hepatoma cells expressing the green fluorescent protein (GFP) were added in HPM's wells. RPMI 1640 medium, supplemented with 10% FBS, 50 IU/mL penicillin, 50 µg/mL streptomycin, and 2 mM L-glutamine, was used for the coculture. GFP-expressing Huh7 cells were produced by lentiviral transduction of Huh7 cells plated at low cell density (10^5 cells per well in 24-well plates), with pre-made lentiviral particles (ILV-EF1-GFP) obtained from Flash Therapeutics (Toulouse, France). All cells were incubated at 37 °C, with 5% humidified CO₂.

2.4. Preparation of Peptide-Functionalized PMLABe-Based Nanoparticles

Nanoparticles (NPs) embedding the fluorescence probe DiD Oil were prepared by nanoprecipitation starting from the biotinylated-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ (Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃) amphiphilic block copolymer, which was synthesized as previously described, with slight modifications [56]. Briefly, the Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ was obtained by anionic ring-opening polymerization (aROP) of benzyl malolactonate (MLABe), in the presence of the tetraethylammonium salt of the α -biotin- ω -carboxylate-PEG₆₂ as an initiator, which was previously obtained by mixing one equivalent of ω -biotin, α -carboxylic acid-PEG₆₂, and one equivalent of tetraethylammonium hydroxide. The molar mass of the PMLABe block was fixed by the ratio monomer (MLABe)/initiator at 15,000 g/mol. After consumption of all the monomer, the crude amphiphilic block copolymer was purified by precipitation in an excess of ethanol. After drying under vacuum, the purified Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ was analyzed by ¹H NMR (structure and molar mass of PMLABe block) and SEC (average molar mass and dispersity).

¹H NMR (400.1 MHz; (CD₃)₂CO), δ (ppm): 2.83 (s, 2nH, CO₂CH₂C₆H₅), 3.56–3.59 (m, 4 mH (m = 62), Biot (CH₂CH₂O)₆₂), 5.00–5.05 (m, 2nH, CHCH₂CO₂), 5.41–5.44 (m, 1nH, CHCH₂CO₂), and 7.19–7.23 (m, 5nH, CO₂CH₂C₆H₅).

M_{NMR} = 15,500 g/mol for the PMLABe block – M_{block copolymer} = 17,900 g/mol.

SEC (THF, polystyrene standards, 1 mL/min): M_w = 8200 g/mol, \bar{D} = 1.20.

NPs encapsulating the fluorescence probe DiD Oil were prepared by the nanoprecipitation method previously described [61]. Five mg of Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ were dissolved into 100 µL of DMF. Fifty µL of a DiD Oil solution, at a concentration of 1 mg/mL in DMF, were added into the polymer solution (1 wt% the mass of the block copolymer, i.e., 0.5 mg of DiD Oil). This mix was nanoprecipitated into 1 mL of distilled water, under vigorous stirring, for 1 h at room temperature. Free DiD Oil was removed by filtration through a Sephadex PD10 column, while DiD Oil-loaded Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃-based NPs eluted in 3.5 mL of water. All the NP's suspensions ($\sim 2.85 \cdot 10^{12}$ NPs/mL) were characterized by DLS and ELS: hydrodynamic diameter = 89 ± 10 nm, dispersity index (PDI) = 0.25 ± 0.1 , and zeta potential = -40 ± 5 mV.

The engrafting of the biotinylated peptides onto Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ NPs was obtained via a two-step streptavidin/biotin coupling [57]. For one well of 24-well plates, 3 µL of recombinant streptavidin (stock solution at 182 µM) and 7 µL of biotinylated peptides (stock solution 150 µM) were mixed with 5 µL of PBS and incubated together for 1 h

at 4 °C. Then, 5 µL of NPs (5 mg of copolymer/3.5 mL) were added and incubated with the streptavidin and biotinylated peptide complexes for another 1 h at 4 °C. After dilution of the peptide-NP mixes (20 µL) in culture medium (500 µL/well of 24-well plates), the final concentrations of streptavidin, peptide, and copolymer were 1 µM, 2 µM, and 1 µM, respectively. Control NPs were generated by coupling PEGylated biotin, instead of peptides, onto NPs at the same final concentration. To measure the size and zeta potential of NPs during incubation, suspensions of control and peptide-functionalized NPs (80 µL) were diluted in 1720 µL of culture medium and analyzed by DLS and ELS. Then, 200 µL of FBS were added in batches of peptide-NPs, which were incubated for 24 h at 37 °C, in absence of cells, before analysis by DLS and ELS.

2.5. *In Vitro Cellular Uptake of Peptide-Conjugates and NPs*

The progenitor HepaRG, HepG2, Huh7, and NCI-H727 cells were seeded in 24- or 48-well plates at 6.5×10^4 , 2×10^5 , 6.5×10^4 , and 1.5×10^5 cells per cm^2 (~80% confluency), respectively, and incubated with peptide conjugates and NPs one day after seeding. Differentiated HepaRG cells were obtained after 30 days of culture (Section 2.3), prior to the uptake assay. Human primary hepatocytes were plated at 2×10^5 cells/ cm^2 and treated 2 to 3 days after seeding. For the coculture between HPM- and GFP-expressing Huh7, cells were incubated 1 day after setting up the coculture.

Biotin and biotinylated peptides were conjugated to DyLight™ 488 or 633 fluorescent streptavidin for 1 h at 4 °C, prior to incubation with cells. Then, streptavidin complexes were added to 180 µL of appropriate culture medium at final concentrations of 0.4 µM streptavidin and 1.2 µM of biotin or biotinylated peptides. The incubation was carried for 24 h. For the experiments of cell uptake inhibition, cells were incubated with peptide-streptavidin conjugates for 4 h, in the absence or presence of genistein (100 µM) or latrunculin A (500 nM), to avoid degradation of the compounds or cytotoxicity.

Control and peptide-functionalized NPs were prepared as described in Section 2.4. Culture medium was withdrawn and replaced by 500 µL (in 24-well plates) of fresh culture media, containing NPs at a final concentration of 25 µg/mL in copolymer, corresponding to $\sim 5.10^{10}$ NPs/mL. For NP's uptake inhibition, cells were incubated with NPs for 4 h, in the absence or presence of both chlorpromazine (20 µM) and genistein (100 µM), in culture medium. To evaluate the effects of HDL and ApoE3 on internalization of NPs in HepaRG cells, HDL were purified from 10 mL of human serum, according to the manufacturer's instructions (MyBioSource), and recombinant human ApoE3 were purchased. Purified HDL and ApoE3 were added in various amounts, ranging from 0.1 to 2 µL and 0.1 to 8 µg/mL, respectively, and mixed to control and peptide-functionalized NPs, prior to the dilution in culture media and incubation with cells.

After incubation at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂, cell monolayers were washed twice with PBS and photographs were acquired using fluorescence microscope. Then, the cells were detached with trypsin-EDTA and resuspended in complete medium for flow cytometry analysis. Dot plots of forward scatter (FSC: x axis) and side scatter (SSC: y axis) allowed us to gate the viable single cells (Figure S1). Untreated cells were used to determine autofluorescence, arbitrary set at ~30 for all cell types. The fluorescence emitted by streptavidin DyLight™ 488 was measured using the FITC-A channel, and the fluorescence emitted by both streptavidin DyLight™ 633 and NPs encapsulating DiD Oil were detected using the APC-A channel. Means of fluorescence were expressed as fluorescence intensity (MFI) of the single cell population (Figure S1). The effects of peptides on the cell uptake of DL488-SA-peptide bioconjugates and peptide-decorated NPs was evaluated with the ratio of MFI for cells incubated with peptide-functionalized streptavidin or NPs versus MFI for cells incubated with streptavidin or NPs without peptides.

For confocal microscopy, HepaRG cells grown in 8-well coverglass Nunc™ Lab-Tek™ (Thermofisher scientific) were incubated with peptides functionalized-NPs at 37 °C for 24 h, fixed using 4% paraformaldehyde in PBS at room temperature (RT) for 10 min, and permeabilized and saturated with 0.5% saponin and 3% FBS in PBS for 1 h at RT.

Then, cells were incubated with rabbit anti-Rab7 monoclonal antibody (D95F2, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) overnight at 4 °C. Cells were washed three times with PBS and incubated with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-rabbit IgG antibody (Eurobio Scientific, Les Ulis, France) for 1 h at room temperature, protected from light. Nuclei were stained with Hoechst for 30 min at RT in the dark. The images were acquired using SP8 confocal microscope with LAS AF software and analyzed with Fiji/ImageJ.

2.6. Opsonization of NPs and Peptide-Streptavidin Agarose Resin

The opsonization of NPs was studied using a protein adsorption assay followed by western blot analysis. Biot-PEG₆₂-b-PMLA_{Be73}-based NPs (functionalized or not) were incubated in William's E medium supplemented with 10% human serum during 24 h at 37 °C under 5% CO₂ humidified atmosphere. Adsorption of plasma proteins onto peptide-streptavidin agarose resin (Pierce® Thermofisher Scientific, USA) was studied by binding peptides (2 µg, 5 µL) onto 10 µL of settled of resin, followed by incubation for 30 min at 4 °C with 10% human serum (25 µL) and PBS (200 µL).

NPs were collected by centrifugation at 14,000 g for 30 min, while agarose beads were spun down at 5000× g for 1 min at 4 °C. The pellets were washed once with cold PBS (500 µL), prior to denaturation of micelles and bound proteins with 50 µL of denaturing buffer (Tris-HCl 100 mM, pH 6.8, bromophenol blue 0.2%, sodium dodecyl sulfate 8%, glycerol 20%, and β-mercaptoethanol 5%) and 50µL of MOPS/SDS buffer pH 7.7 (Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA). Samples were boiled in a water bath for 10 min. Proteins were loaded and separated by electrophoresis on polyacrylamide gels (iD PAGE gel, 4–12%, Eurogentec, (Seraing, Belgium) and then transferred to nitrocellulose membranes (iBlot® 2NC Mini Stacks, Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA). Standard PageRuler™ Plus prestained protein ladder (Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA) was run in parallel. The membranes were blocked with 3% bovine serum albumin (BSA) fraction V (Eurobio) in 1X Tris-buffered saline, 0.1% Tween 20 (TBST) at room temperature (RT), for 1 h, then incubated overnight at 4 °C, with the following primary antibodies diluted in TBST containing 3% BSA, followed by rinsing three times with TBST: mouse anti-human complement C3 proteins (B-9), mouse anti-human apolipoprotein C-I (Y-13) and mouse anti-human apolipoprotein-E (A1.4) (purchased from Santa Cruz Biotechnologies (Dallas, TX, USA); goat anti-human transferrin (1205Y2) and goat anti-human albumin (1140V7) (obtained from Kent laboratories (Bellingham, WA USA); and goat anti-human IgG (A-0293) (from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)). The membranes were then incubated for 1 h at RT with the appropriate horseradish peroxidase (HRP) secondary antibodies: polyclonal rabbit anti-mouse, polyclonal goat anti-rabbit, and polyclonal rabbit anti-goat (Dako, Glostrup Kommune, Denmark) After incubation, the membranes were washed three times with TBST and developed using the SuperSignal™ WestDura chemiluminescent substrate kit for HRP detection (Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA), according to the manufacturer's instructions. The proteins were visualized with the Fusion FX system (Vilber-Lourmat, Eberhardzell Germany).

2.7. Statistical Analysis

All quantitative data were expressed as the mean ± standard deviation (SD). Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Differences between two groups were analyzed using two-tailed Mann-Whitney *U* test. A non-parametric Kruskal-Wallis test with Dunns' post-test was used to compare the means of more than two groups. Significant differences are presented as * *p* < 0.05, ** *p* < 0.01, *** *p* < 0.001, and ^{ns} not significant.

3. Results

3.1. Selection of Hepatotropic and Non-Hepatic Peptides

We selected, from the literature, 11 peptides previously reported to show hepatotropism towards in vitro and/or in vivo models of human and murine hepatic cancer cells as baits (Table 1). RGD peptide has been widely used to target many different types of cancer cells [62], including hepatoma cells [55,57], via its well-documented affinity for the $\alpha_v\beta_3$ integrins. We selected a cyclic RGD-like peptide, which constituted our reference in the experiments of cell uptake, as well as its RAD negative control. We also used the peptides L5-2 [63] and SRIF-14 [10], derived from the functional domains of natural ligands of the glypican 3 protein and somatostatin receptors, respectively, which are frequently overexpressed in HCC. We selected the short peptides HCBP1 and HCBP4 [64], A54 [65], DKN [66], CGK [67], and SP94 [68], which were previously identified by phage-display using hepatoma cells, although their cellular targets remain unknown.

Table 1. Peptides and negative control peptides. Eleven peptides were selected to study their tropism towards human hepatoma cells in vitro: RGD, L5-2, SRIF-14, HCBP1 and HCBP4, A54, DKN, CGK, SP94, CPB, and GBVA10-9. The peptides CP15 and ATW, initially discovered for their binding to human colon cancer and endothelial cells, respectively, were selected as controls of non-hepatotropic peptides. RAD, CPBscr, GBVA10-13, and GBVA10-9scr peptides are mutated or scrambled peptides used as negative control for the in vitro cell uptake assays. The amino acid sequences, cellular and/or molecular targets, length, and molecular weight are indicated. References describing the cellular/molecular tropism of these peptides are indicated.

Name	Sequence	Target (Receptor/Cells or Tissue)	Length	MW (g/mol)	Ref
RGD	Cyclo(RGDYK)(Biotin)	$\alpha_v\beta_3$ integrins	5	846	[62]
L5-2	YFLTRQK(Biotin)	Glypican-3	8	1282	[63]
SRIF-14	AGC(S)-KNNFFWKTFTSC(S)-K(Biotin)	Somatostatin receptor	15	1991	[10]
HCBP1	FQHPSFIK(Biotin)	ND/HepG2	8	1230	[64]
HCBP4	PLPTLPLK(Biotin)	ND/HepG2	8	1103	[64]
A54	AGKGTSPLETPK(Biotin)	ND/BEL-7402	13	1512	[65]
DKN	DKNLQLHK(Biotin)	ND/Rat liver	8	1220	[66]
CGK	CGKRK(Biotin)	Protein p32/gC1qR/HABP1/Tumor stroma and angiogenic endothelial cells	5	816	[67]
SP94	SFSIIHTPILPLK(Biotin)	ND/Malhavu (+ 59T, Hep3B, HepG2, NTUBL, SKHep1)	13	1691	[68]
CPB	Acetyl-CKNEKKNKIERNNKLKQPPK(Biotin)	Heparan sulfate proteoglycan	20	2705	[69]
GBVA10-9	CWVRLGRYLLRRLKTLFTK(Biotin)	ND. Anti-HCV activity	19	2649	[70]
CP15	VHLGYATK(Biotin)	ND/HT29 and SW480	8	1113	[71]
ATW	ATWLPVVK(Biotin)	Neuropilin-1/Endothelial cells	8	1137	[72]
RAD	Cyclo(RADYK)(Biotin)	Negative control of RGD	5	860	[5]
CPBscr	EKIPNKEKPNKKNKERQKK(Biotin)	Negative control for CPB	19	2577	None
GBVA10-13	KWVRLGRKLLRRLKPKFKK(Biotin)	Negative control for GBVA10-9	19	2677	[70]
GBVA10-9scr	LTCLKGRLVRLRRTYFLK(Biotin)	Negative control for GBVA10-9	19	2649	None

We included two additional peptides, CPB and GBVA10-9, derived from proteins expressed in pathogens infecting hepatocytes. The 19 amino-acid CPB peptide from the circumsporozoite protein (CSP) of *Plasmodium berghei* were involved in the infection of hepatocytes by the parasite and previously used to prepare CPB-containing liposomes that target mouse liver [69]. The CPB peptide contains a consensus heparan sulfate proteoglycan binding sequence. We have also chosen the amphipathic helical GBVA10-9 peptide derived from the NS5 protein region of selected *Flaviviridae* viruses because of its potent anti-hepatitis C virus activities [70]. The heptapeptide peptides CP15 [71] and ATW [72], initially discovered for their binding to human colon cancer and endothelial cells,

respectively, were selected as controls of non-hepatotropic peptides in the screening. While the CP15 cell target is unknown, the ATW peptide binds to neuropilin-1, a vascular endothelial growth factor (VEGF) co-receptor [72].

3.2. Cell Uptake of Streptavidin-Peptide Bioconjugates

The biotinylated peptides were bound to fluorescent DyLight™ 488 streptavidin (DL488-SA), at a 3:1 molar ratio, to form model bioconjugates [73] and evaluate the ability of the selected peptides to trigger the uptake of streptavidin in HepaRG, Huh7, and HepG2 hepatoma cells, human hepatocytes in primary culture, and non-hepatic NCI-H727 bronchial cancer cells (Figure 1). In a first experiment, we determined whether the control biotin–streptavidin conjugate without peptides (Figure 1A) was internalized by these different cell types, as well as to evidence a putative difference in “passive” cell uptake between cell types (Figure 1B). The mean of fluorescence intensity (MFI), analyzed by flow cytometry, in untreated cells (auto-fluorescence) was arbitrarily set at ≈ 30 units (a.u) for all cell types. The MFI measured after 24 h of incubation with the control biotin–streptavidin conjugate revealed a significant disparity in the binding and uptake of this control bioconjugate between the cell types (Figure 1B). We observed a very low fluorescence for primary human hepatocytes, an intermediate MFI for HepG2, Huh7, and NCI-H727 cells, as well as a much higher fluorescence for the progenitor and differentiated HepaRG cells. Nevertheless, this overall binding/uptake of the control biotin–streptavidin complex remained low as demonstrated by the weak fluorescence signal observed by flow cytometry (Figure 1B) and microscopy in HepaRG cells (Figure 1C).

In order to assess the influence of the selected hepatotropic and non-hepatotropic peptides on the cell uptake of streptavidin (Figure 1D–F), we expressed the results as the ratio of MFI between cells incubated with DL488-SA-peptide bioconjugates versus cells incubated with the control biotin–streptavidin bioconjugate, in order to consider the differences in cell uptake of the control complex observed with the different cell types (Figure 1B,C). Among hepatotropic peptides, only the CPB, GBVA10-9, and SRIF-14 peptides significantly enhanced the uptake of bioconjugates in hepatoma cells, compared to that obtained with the control biotin–streptavidin complex (Figure 1D). The strong increase in the uptake of GBVA10-9-DL488-SA complex was quantified by flow cytometry and confirmed by fluorescence microscopy in HepaRG cells, compared to that observed with the control biotin-DL488-SA conjugate (Figures 1C and S2). The cell uptake of CPB- and GBVA10-9-DL488-SA complexes occurred mainly through endocytosis, as demonstrated by the intracellular accumulation of peptide-DL488-SA complexes, evidenced by confocal microscopy (Figure S2), which was strongly decreased by endocytosis inhibitors chlorpromazine and genistein.

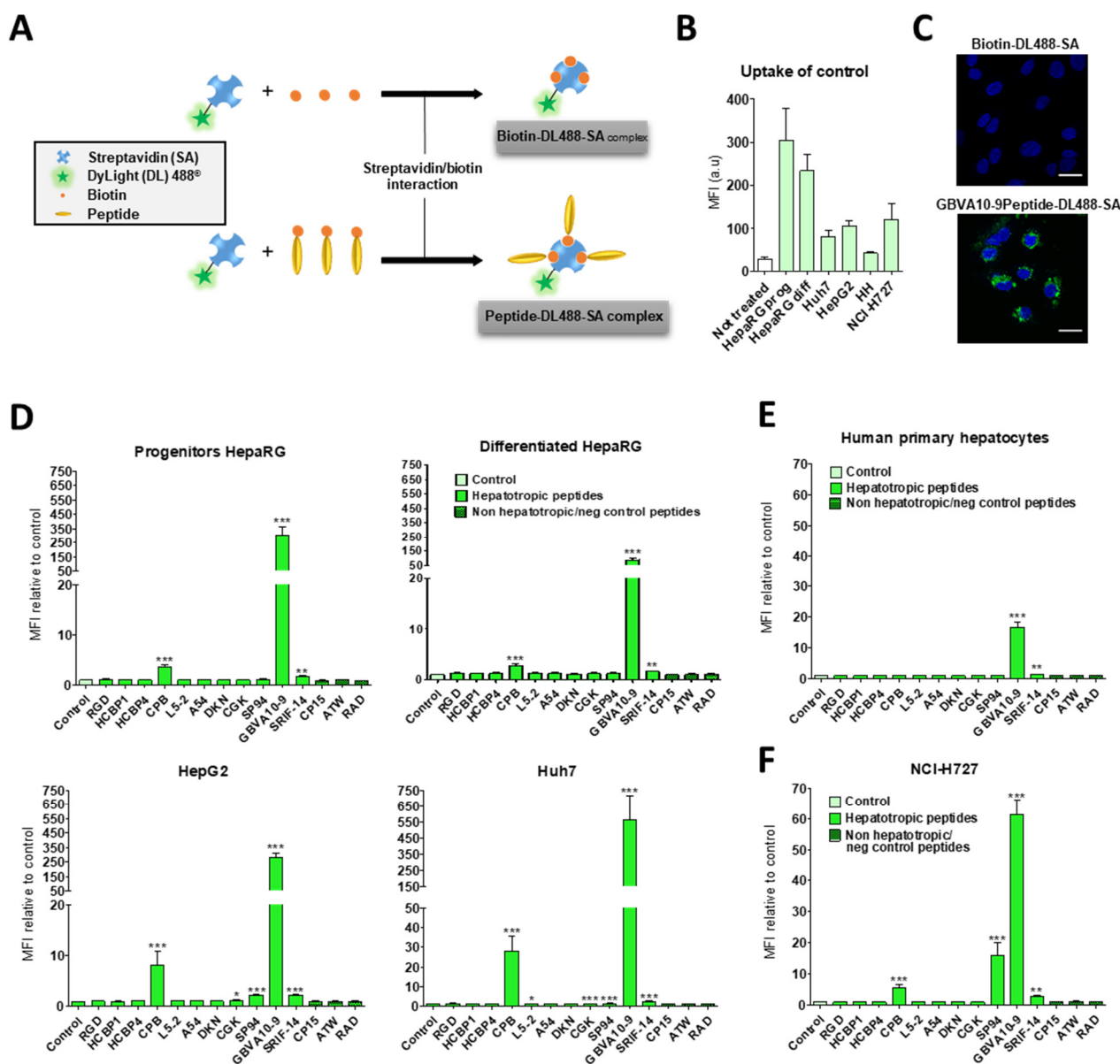


Figure 1. In vitro screening of peptide-fluorescent streptavidin conjugates. (A) Streptavidin DyLight 488® (DL488-SA) was conjugated to biotin or biotinylated peptides to generate control- and peptide-streptavidin complexes, respectively. The cell uptake of DL488-SA was quantified after 24 h incubation by flow cytometry with FITC channel, to measure the relative mean of cell fluorescence (MFI). (B) Comparative cell uptake of the control biotin-DL488-SA conjugate by hepatic cancer cell lines (HepaRG, HepG2, and Huh7), human primary hepatocytes (HH), and bronchial NCI-H727 cells. The laser's voltage was adjusted to bring all untreated cells at MFI of 30 arbitrary units (a.u). Data are presented as the mean of fluorescence intensity (MFI) \pm SD. (C) Fluorescence microscopy images of differentiated HepaRG after 24 h incubation, with control or biotinylated-GBVA10-9 peptide conjugated to DL488-SA. Bars correspond to 20 μ m. In vitro uptake of peptide- DL488-SA conjugates in (D) hepatic cancer cell lines, (E) human primary hepatocytes, and (F) bronchial carcinoid cell line. In order to evaluate the effect of peptides on the cellular uptake, data are presented as the mean of fluorescence intensity (MFI) of cells incubated with peptide-streptavidin complexes, relative to MFI in cells incubated control (biotin-streptavidin) conjugate \pm SD (MFI ratio). Significant changes in MFI ratio at * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, control vs. peptides. Statistical analyses were performed using Kruskal–Wallis non-parametric test, followed by Dunn's post-hoc test.

The increase in bioconjugate's uptake was particularly marked in Huh7 cells, with MFI that were 28 and 568 times greater in the presence of CPB and GBVA10-9 peptides, respectively, compared to those detected with the control bioconjugate. In human

hepatocytes, only GBVA10-9 and SRIF-14 peptides significantly increased the bioconjugates' uptake (Figure 1E), but to a much weaker extent, compared to hepatoma cells, since the MFI ratios measured in presence of GBVA10-9-DL488-SA bioconjugate was only 16.8 times greater than that measured with the control biotin-DL488-SA bioconjugate (Figure 1E). Similarly, the CPB, GBVA10-9, and SRIF-14 peptides also enhanced streptavidin's uptake by bronchial cancer NCI-H727 cells, since the ratios between MFI in cells exposed to peptide- versus biotin-DL488-SA complexes for these three peptides were 5.5, 61.4, and 3, respectively (Figure 1F). Unexpectedly, the SP94, which weakly affected the streptavidin uptake in hepatoma cells, induced a 16-fold increase in MFI of the NCI-H727 cells.

Together, our data demonstrated that, among the peptides selected for this screen, based upon previous results reporting their binding to hepatoma cells, only the CPB and GBVA10-9 peptides showed a high tropism towards human hepatoma cells in our experimental conditions.

To assess the role of the specific amino acid sequence of the CPB and GBVA10-9 peptides in the bioconjugate's uptake by hepatoma cells, we synthesized three control peptides, i.e., the CPBscr, GBVA10-9scr, and GBVA10-13 peptides (Table 1). The scrambled CPBscr and GBVA10-9scr peptides contain the same amino acid composition, compared to their native CPB and GBVA10-9 counterparts, but with a random sequence. The GBVA10-13 control was derived from the GBVA10-9 peptide whose modifications, made to the amino acid sequence, resulted in loss of anti-HCV activity of the native GBVA10-9 [70]. The peptide-DL488-SA bioconjugates were incubated with hepatoma cells and NCI-H727 cells to determine whether modifications of the amino acid sequence within the control peptides affected the cell uptake of bioconjugates. The relative MFI were measured by flow cytometry in untreated cells (control) and in cells incubated with peptide-DL488-SA bioconjugates, which allowed a direct comparison of the overall uptake in the different cell lines (Figure 2).

The results first evidenced that the uptake of native GBVA10-9-DL488-SA bioconjugate was much higher than that measured with the CPB-DL488-SA complex, since 20- to 60-fold differences in fluorescence levels were observed between the two bioconjugates. The data also confirmed that CPB and GBVA10-9 peptides strongly enhanced the uptake of bioconjugates, compared to that of the control biotin-DL488-SA complex for all cell types (Figure 2). Moreover, the uptake was higher in hepatoma cells than in NCI-H727 bronchial cells, except for differentiated HepaRG cells incubated with the CPB-DL488-SA bioconjugate (Figure 2A,B). Importantly, cells incubated with the CPBscr-DL488-SA complex exhibited MFI almost equivalent to those incubated with peptide-free control bioconjugate, which indicated that the modifications of the amino acid sequence of the CPB peptide induced a complete loss of cell recognition (Figure 2A,C). Similarly, the MFI measured for cells exposed to GBVA10-9scr- and GBVA10-13-DL488-SA bioconjugates were strongly reduced, compared to those found with GBVA10-9-DL488-SA complex, although they remained significantly higher than those of biotin-DL488-SA controls (Figure 2B,C).

These data strongly suggested that the specific amino acid sequences of both CPB and GBVA10-9 peptides were the major determinant of the peptide-mediated uptake of the fluorescent streptavidin bioconjugate by hepatoma cells.

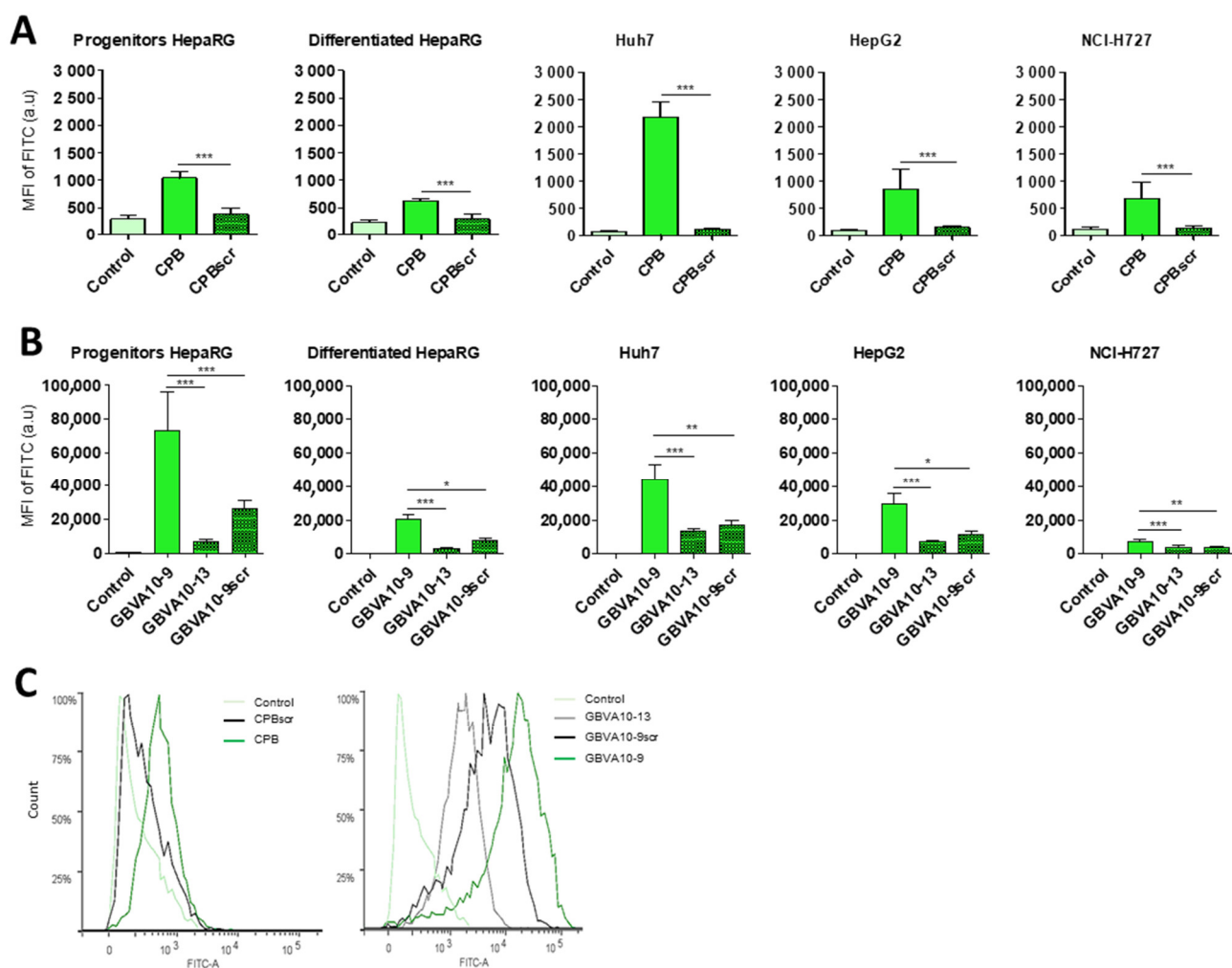


Figure 2. Influence of the amino acid sequence of CPB and GBVA10-9 on the uptake of peptide-streptavidin complexes. CPB, GBVA10-9, and their mutated/scrambled controls were conjugated to streptavidin DyLight 488® (DL488-SA). Cell uptake was evaluated by flow cytometry after 24 h incubation with hepatic cell lines (HepaRG, Huh7, and HepG2) or bronchial NCI-H727 cells. MFI were first adjusted in untreated cells (control) and arbitrary set at ≈ 30 units (a.u.) for all cell types. **(A)** Comparison between CPB and its scrambled peptide. Statistical analyses were performed using Mann–Whitney non-parametric test: *** $p \leq 0.001$, CPB vs. CPBscr. **(B)** Comparison between GBVA10-9 and its control peptides (GBVA10-13 and GBVA10-9scr). Statistical analyses were performed using Kruskal–Wallis non-parametric test, followed by Dunn’s post-hoc test: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, GBVA10-9 vs. control peptides. **(C)** Histograms of flow cytometry illustrating the GBVA10-9-, GBVA10-13, and GBVA10-9scr-DL488-SA uptake by differentiated HepaRG cells.

3.3. Cell Uptake of Peptide-Decorated Nanoparticles

We next investigated whether the hepatotropic peptides selected (Table 1) could enhance the uptake of nanocarriers by hepatoma cells, in order to compare the hepatotropism between peptide-NPs and peptide-DL488-SA bioconjugates. The biotinylated peptides were bound to nanoparticles (NPs), prepared from biotin-poly(ethylene glycol)-block-poly(benzyl malate) (Biot-PEG₆₂-b-PMLABe₇₃) harboring biotin at their surface [74–76] and containing the hydrophobic DiD Oil fluorescent probe (Figure 3A), which allowed the quantification of NP’s cell uptake by flow cytometry and microscopy [57].

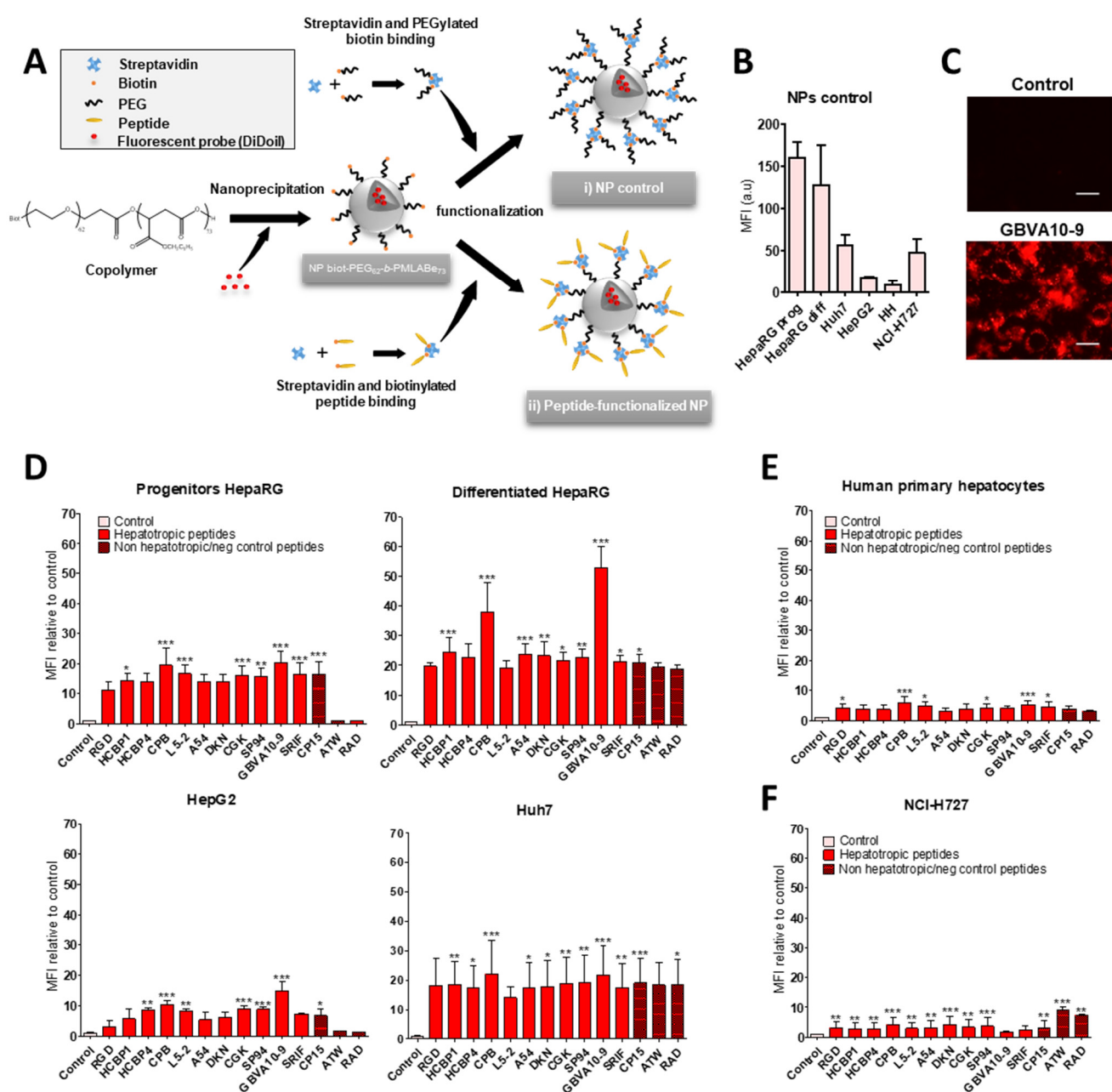


Figure 3. Uptake of peptide-functionalized NPs. (A) The fluorescent probe DiDoil was encapsulated into NPs prepared from Biot-PEG₆₂-b-PMLABe₇₃ copolymer to allow their detection. NPs were: (i) control biotin–streptavidin (Biot–Strept) Biot-PEG₆₂-b-PMLABe₇₃ NPs; (ii) peptide-functionalized Biot-PEG₆₂-b-PMLABe₇₃ NPs using biotinylated-peptide streptavidin bridging. Comparative cell uptake was measured after 24 h incubation by flow cytometry on APC channel. (B) Comparative cell uptake of control Biot–Strept–Biot-PEG₆₂-b-PMLABe₇₃ NPs by hepatic cancer cell lines (HepaRG, HepG2, and Huh7), human primary hepatocytes (HH), and bronchial NCI-H727 cells. The mean of fluorescence intensity (MFI) in untreated cells was arbitrary set at ≈30 units (a.u.) for all cell types. (C) Fluorescence microscopy images of differentiated HepaRG after 24 h incubation, with control or GBVA10-9 peptide conjugated to NPs. Bars correspond to 100 μm. Effects of the different peptides on the NP's uptake in (D) hepatoma cells, (E) human primary hepatocytes, and (F) bronchial carcinoid cells after 24 h incubations. Data are presented as the ratio of the mean of fluorescence intensity (MFI) of cells incubated with peptide-functionalized NPs relative to MFI in cells incubated with control Biot–Strept–Biot-PEG₆₂-b-PMLABe₇₃ NPs ± SD (MFI ratio). Statistical analyses were performed using Kruskal–Wallis non-parametric test, followed by Dunn's post-hoc test: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, control vs. peptides NPs.

In a first experiment, we compared the uptake of control biotin–streptavidin–biotin–PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ NPs without peptide(s) (Figure 3A) in HepaRG, Huh7, and HepG2 hepatoma cells, human hepatocytes in primary culture, and NCI-H727 cells (Figure 3B). As previously observed with the control biotin–streptavidin bioconjugates (Figure 1B), we found important differences in the MFI of the different cell types incubated for 24 h with the biotin–streptavidin biotin–PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ NPs, which revealed various levels of NPs' uptake activities between the cell types (Figure 3B). The human hepatocytes and HepG2 cells internalized low amounts of NPs, Huh7, and NCI-H727 cells showed intermediate MFI, while the progenitor and differentiated HepaRG cells exhibited much higher fluorescence levels.

In order to assess the peptide's influence on the cell uptake of peptides-NPs (Figure 3D–F), we expressed the results of flow cytometry as the ratio of MFI between cells incubated with peptide-decorated NPs versus cells exposed to control biotin–streptavidin biotin–PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ NPs without peptides, in order to consider the differences in the “passive” uptake observed between the cell types (Figure 3B). All the hepatotropic peptides strongly enhanced the NPs' uptake in the hepatoma cells (Figure 3D). Although the addition of peptides onto NPs significantly increased the NP's internalization in human hepatocytes (Figure 3E) and NCI-H727 cells (Figure 3F), the positive effects on the cell uptake remained much weaker in these two cell types, compared to that observed in hepatoma cells. The CPB and GBVA10-9 peptides induced the highest increase in NP's uptake in the hepatoma cells, particularly in HepaRG cells (Figure 3D). The strong accumulation of GBVA10-9-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ NPs in HepaRG cells was confirmed by fluorescence microscopy in HepaRG cells (Figure 3C). Unexpectedly, the non-hepatotropic peptides ATW and RAD also enhanced the NP's uptake in differentiated HepaRG, Huh7, and NCI-H727 cells, but not in progenitor HepaRG and HepG2 cells (Figure 3D,F).

Our data demonstrated that the addition of peptides onto NPs significantly enhanced their cell uptake. These results also questioned the specificity of the NP-cell interaction mediated by the peptides via their binding to membrane receptors in a sequence-specific manner, since nearly all the peptides strongly increased the NP's cell uptake, including non-hepatotropic ones in HepaRG, Huh7, and NCI-H727, in contrast with the lack of targeting effect observed with most peptide-DL488-SA bioconjugates.

The role of the amino acid sequence of CPB and GBVA10-9 peptides in the NP's uptake by hepatoma and NCI-H727 cells was addressed using CPBscr, GBVA10-9scr, and GBVA10-13 control peptides. We measured the relative MFI of cells incubated with NPs harboring CPB and GBVA10-9 peptides, as well as their negative control counterparts, to compare the overall NP's uptake between cell types and the effects of the mutated control peptides on the NP's internalization (Figure 4A–C). Our data showed that the MFI were much higher in hepatoma cells than in NCI-H727 cells, confirming the greater uptake of NPs by hepatic cells. We also found that addition of CPBscr onto NPs significantly reduced the cell uptake, compared to that observed with CPB-decorated NPs, except in the progenitor HepaRG cells (Figure 4A,C), although the MFI obtained for cells incubated with CPBscr-decorated NPs remained much higher than those measured for cells exposed to control NPs without peptides. Conversely, the MFI of the HepaRG, Huh7, and NCI-H727 cells incubated with NPs harboring GBVA10-9scr and GBVA10-13 control peptides were either not significantly different or even higher from the MFI measured in cells exposed to GBVA10-9-decorated NPs. In contrast, the NP's uptake was decreased in HepG2 cells incubated with NPs functionalized with GBVA10-9scr and GBVA10-13 control peptides, compared to the internalization obtained with GBVA10-9-decorated NPs.

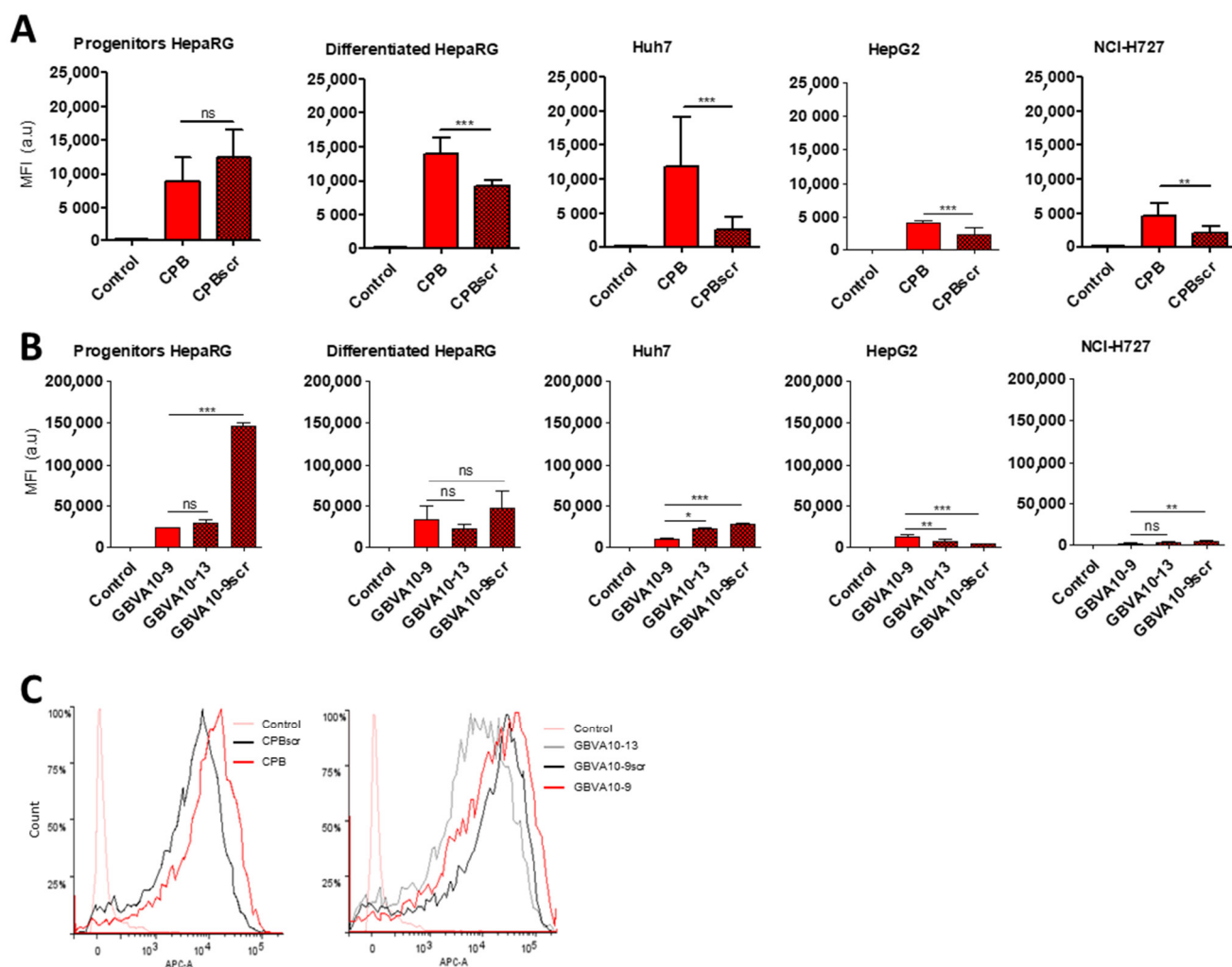


Figure 4. Influence of the amino acid peptide sequence of CPB and GBVA10-9 in the uptake of functionalized NPs. CPB, GBVA10-9 and their modified (mutated/scrambled) control peptides were grafted on NPs via streptavidin/biotin bridge. Cell uptake of NPs was evaluated by flow cytometry (APC channel) after 24 h incubation in hepatic cancer cell lines (HepaRG, Huh7, and HepG2) or bronchial NCI-H727 cells. Data are presented as mean of fluorescence intensity (MFI) \pm SD. MFI were first adjusted in untreated cells (control) arbitrary set at 30 units (a.u) for all cell types. (A) Comparison between CPB and its scrambled peptide. Statistical analyses were performed using Mann–Whitney non-parametric test: ^{ns} not significant, ^{**} $p \leq 0.01$, ^{***} $p \leq 0.001$, CPB vs. CPBscr. (B) Comparison between GBVA10-9 and its control peptides (GBVA10-13 and GBVA10-9scr) Statistical analyses were performed using Kruskal–Wallis non-parametric test, followed by Dunn’s post-hoc test: ^{ns} not significant, ^{*} $p \leq 0.05$, ^{**} $p \leq 0.01$, ^{***} $p \leq 0.001$, GBVA10-9 vs. negative control peptides. (C) NPs uptake by differentiated HepaRG cells visualized by flow cytometry. Histograms of flow cytometry illustrating the uptake of GBVA10-9-, GBVA10-13, and GBVA10-9scr-functionalized NPs in differentiated HepaRG cells.

These data strongly suggested that the specific amino acid sequence of the CPB peptide contributed, at least for some cell types, to the NP-cell interaction and the cell uptake, since the addition of negative control peptide reduced the NP’s uptake. Our results also indicated that the internalization of GBVA10-9-decorated NPs did not strictly rely on the recognition of binding sites on hepatoma cells mediated by the specific sequence of GBVA10-9, since the two control peptides had no effect or enhanced the NP’s cell uptake peptides.

3.4. High Density Lipoprotein (HDL) and Apolipoprotein E Play a Pivotal Role in the Peptide-Decorated NP's Endocytosis by Hepatoma Cells

To further investigate the mechanism of the NP's internalization, we used inhibitors of endocytic pathways known to be involved in the uptake of most nanocarriers [5]. HepaRG cells were incubated with NPs harboring the CPB, GBVA10-9, and their control peptides, in the absence or presence of a mix of chlorpromazine and genistein, known to inhibit clathrin- and caveola-mediated endocytic mechanisms [77]. As expected, the treatment with endocytosis inhibitors significantly reduced the MFI of HepaRG cells incubated with NPs functionalized with all the peptides (Figure 5A), confirming that their internalization occurred via endocytosis and probably by macropinocytosis. This was not further investigated in this study. We also studied the intracellular localization of NPs by confocal microscopy, which showed the strong cytoplasmic accumulation of fluorescent nanocarriers containing DiD Oil around cell nuclei, particularly for GBVA10-9- and GBVA10-9scr-decorated NPs (Figure 5B). The DiD Oil staining partially co-localized with the Rab7 GTPase (Figures 5B and S3) known to be associated with membranes of late endosomes. The DiD Oil-containing NPs were also detected within lysosomes expressing the lysosome-associated membrane protein 1 (LAMP1) green, fluorescent fusion protein by confocal microscopy (Figure S4).

After systemic administration, like any other antigen, NPs are recognized by antibodies, proteins of the complement system, as well as many plasma proteins via non-specific interactions, to form a protein corona via the so-called opsonization process [78–80]. The composition of the protein corona on NPs is qualitatively and quantitatively dynamic, varies with the physicochemical parameters at the surface of NPs, and partially governs their systemic lifetime and cell uptake [80]. In a previous work, we showed that presence of fetal calf serum (FCS) in the culture medium also leads to opsonization of polymeric NPs affecting cell internalization [81]. To determine whether the nature of the peptides used to functionalize NPs could affect the composition of the protein corona, we studied by immunoblotting the presence of opsonins onto NPs exhibiting CPB, GBVA10-9, and their negative control peptides at their surface (Figure 5C). As expected, we detected albumin and transferrin, two very abundant plasma proteins known to bind to polymeric NPs [80,81]. Their relative levels did not significantly vary between the different peptide-NPs. In contrast, we evidenced quantitative variations for the iC3b protein, apolipoproteins (ApoA-I, ApoC-I, and ApoE), and immunoglobulins (Figure 5C). Notably, ApoA-I and ApoE were much more abundant on NPs harboring GBVA10-9 and its control peptides and, to a lesser extent, on CPB-functionalized NPs, compared their relative levels on the other control NPs.

The amphipathic helical GBVA10-9 peptide was derived from the C5A peptidic domain of the NS5A protein of *Flaviviridae* GB virus A (GBV-A) and showed potent anti-HCV activity by inhibiting the viral entry [70,82]. Interestingly, some amphipathic peptides, such as C5A and GBVA10-9, have α -helical conformations [83] and show antiviral properties [84]. HCV entry into hepatocytes is a complex and multistep process involving viral attachment, receptor binding, and endocytosis, in which the ApoE was shown to play a key role via its specific interaction with the C-terminal α -helix domain of NS5A [85,86]. HCV particles bind to several lipoproteins and transiently interact with low-density lipoprotein (LDL) and high-density lipoprotein (HDL) particles to form lipoviral particles that attach to hepatocytes via the binding to the lipoprotein receptors [87]. These data combined to our results, showing that higher amounts of ApoA-I and ApoE were bound to NPs harboring GBVA10-9 and its control peptides, which prompted us to investigate if apolipoproteins could interact with CPB, GBVA10-9, and control peptides.

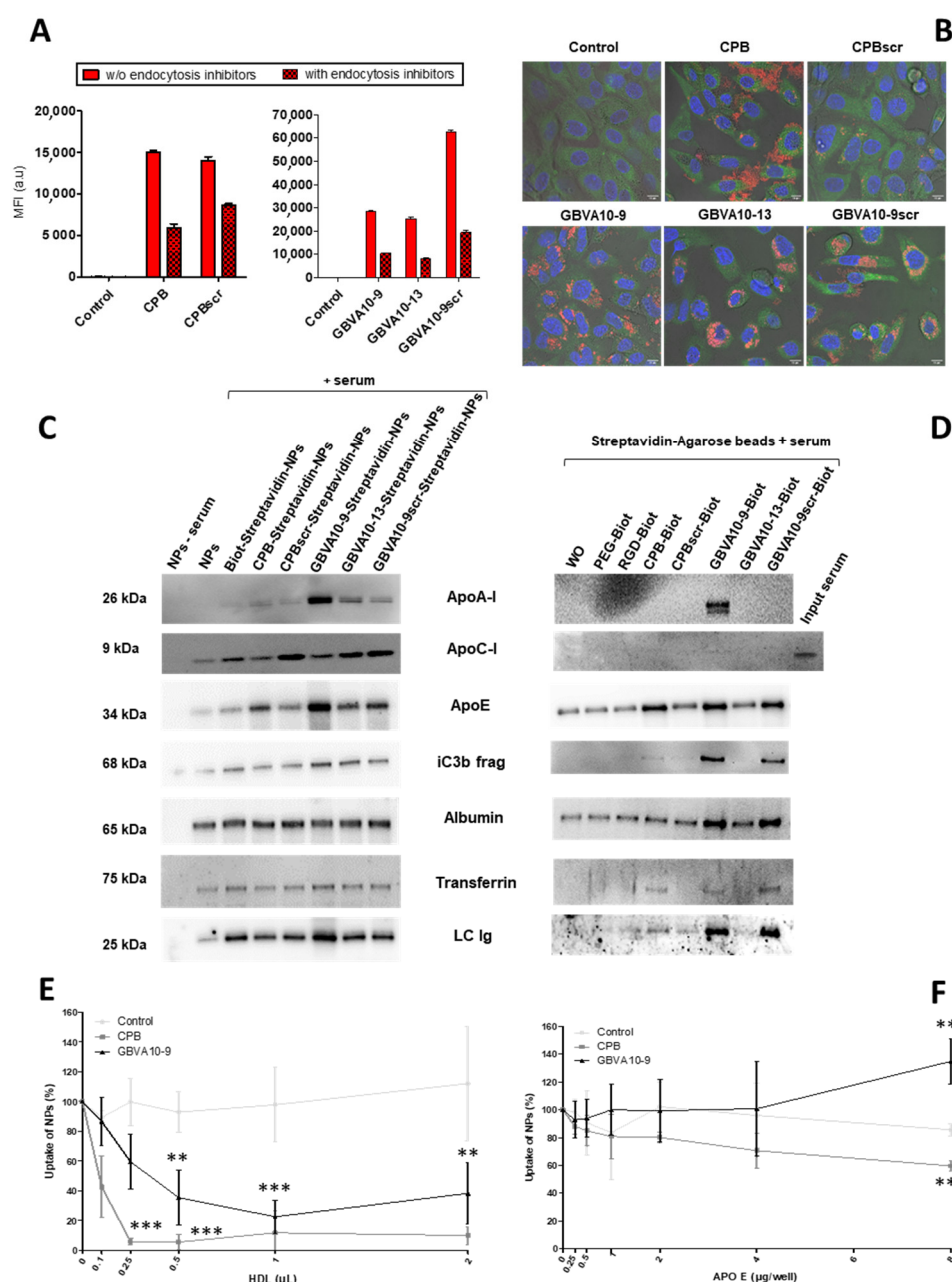


Figure 5. Mechanism of NP's uptake in HepaRG cells (A) Internalization (MFI) of NPs functionalized with CPB, GBVA10-9 and their modified (mutated/scrambled) peptides by HepaRG cells in absence or presence of the endocytosis inhibitors genistein and chlorpromazine, measured by flow cytometry. ((B) and Figure S3) Confocal microscopy of progenitor HepaRG cells incubated with CPB, GBVA10-9, and their modified (mutated/scrambled) peptides for the detection of the endosomal Rab7 GTPase (green), fluorescent nanocarriers containing DiD Oil (red) and the nuclear DNA stained with Hoechst (blue). (C) Immunoblotting of human plasma proteins [apolipoproteins (Apo) AI, CI, E, IC3b complement fragment (IC3b), albumin, transferrin, and light chain of immunoglobulins (LC Ig)] bound onto bare NPs and peptide-functionalized NPs. (D) pull-down assay and immunoblotting of human plasma proteins using bare and peptide-functionalized agarose beads. Internalization of fluorescent control NPs, CPB, and GBVA10-9 peptide-functionalized NPs by HepaRG cells, in the absence or presence of increasing amounts of Human HDL (E) and recombinant apolipoprotein E (F). Fluorescence intensity (MFI) was arbitrarily set as 100% in cells incubated with control and peptide-functionalized NPs in absence of HDL or ApoE. Variations in MFI of cells incubated with NPs in presence of HDL and ApoE were expressed in percentage of the corresponding control condition. Statistical analyses were performed using Kruskal–Wallis non-parametric test, followed by Dunn's post-hoc test: ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, GBVA10-9-, or CPB-functionalized NPs vs. control Biot-PEG₆₂-b-PMLABe₇₃ NPs.

We set up a pulldown assay by mixing biotinylated CPB, GBVA10-9, and control peptides with human serum, then, the peptides were immobilized onto streptavidin-agarose beads and proteins bound to the beads was analyzed by immunoblotting (Figure 5D). The pulldown assay showed that ApoA-I was detected only on GBVA10-9 agarose beads, while ApoC-I was barely detectable in any samples. In addition, higher amounts of ApoE, iC3b protein, transferrin, and immunoglobulins were found associated with CPB-, GBVA10-9-, and GBVA10-9scr-streptavidin-agarose beads. Albumin was detected in all samples at slightly higher amounts on GBVA10-9 and GBVA10-9scr-streptavidin-agarose beads.

These data confirmed that functionalization of PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃-based NPs with peptides affected the formation of the protein corona and suggested that apolipoproteins ApoA-I and ApoE, two main components of HDL, may interact with CPB and GBVA10-9 and could regulate the cell uptake of functionalized NPs in hepatoma cells. This hypothesis is further supported by the observation that the hydrodynamic diameter (Dh) of CPB- and GBVA10-9 functionalized NPs is much higher than that of NPs without peptides (Figure S5). In addition, the Dh increased with time during incubation in culture medium supplemented with FCS (Figure S5), suggesting formation of macromolecular aggregates between peptide-functionalized NPs, plasma proteins, and HDL.

In order to study the influence of HDL and apolipoproteins on cell internalization of CPB- and GBVA10-9-functionalized NPs, we incubated HepaRG cells with fluorescent control biotin-streptavidin biotin-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ NPs (without peptide), CPB-, and GBVA10-9-streptavidin-biotin-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ NPs, in the absence or presence of increasing amounts of purified HDL (Figures 5E and S6) and recombinant human ApoE3 protein (Figure 5F), and we analyzed the MFI of cells by flow cytometry. While the overall MFI of the cells incubated with control NPs without peptide was not affected by the addition of HDL, the MFI of HepaRG cells incubated with CPB- and GBVA10-9-functionalized NPs was strongly decreased by HDL in a dose-dependent manner (Figure 5E), suggesting a competition between NPs and HDL for cell uptake. The ApoE3 protein showed opposite effects on cell uptake of CPB- and GBVA10-9-functionalized NPs. While the ApoE3 decreased the internalization of CPB-functionalized NPs, it increased the cell uptake of GBVA10-9-functionalized NPs in the presence of high concentrations of ApoE3 in culture media, compared to the uptake of control NPs (Figure 5F).

Together, these data demonstrated that the internalization of PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃-based NPs by hepatoma cells was strongly enhanced by the engrafting of CPB- and GBVA10-9 peptides onto NPs, through a mechanism that involves, at least in part, the binding of apolipoproteins and HDL onto these two peptides, which could promote the interaction of NPs with cell membrane receptors.

3.5. CPB and GBVA-Derived Peptide-Streptavidin Conjugates Improve Endocytosis by Hepatoma Cells over the Uptake by Macrophages in a Coculture In Vitro Model

We next used CPB and GBVA10-9 peptide-streptavidin bioconjugates (DL633-SA-peptide), which both showed amino acid sequence-dependent tropism towards hepatoma cells (Figure 2) to determine whether these bioconjugates increased the uptake in vitro by hepatoma cells over that of macrophages. We set up a coculture system, associating Huh7 human hepatoma cells and human macrophages (HPM), in order to evaluate the cell competition for the internalization of DL633-SA-peptide complexes. To discriminate the two cell types by flow cytometry, we used Huh7 cells that stably express GFP proteins (Figure 6A). Cocultures were exposed to peptide-DL633-SA bioconjugates and the red fluorescence emitted by the streptavidin was measured in GFP positive Huh7 cells and GFP negative HPM (Figure 6A,B).

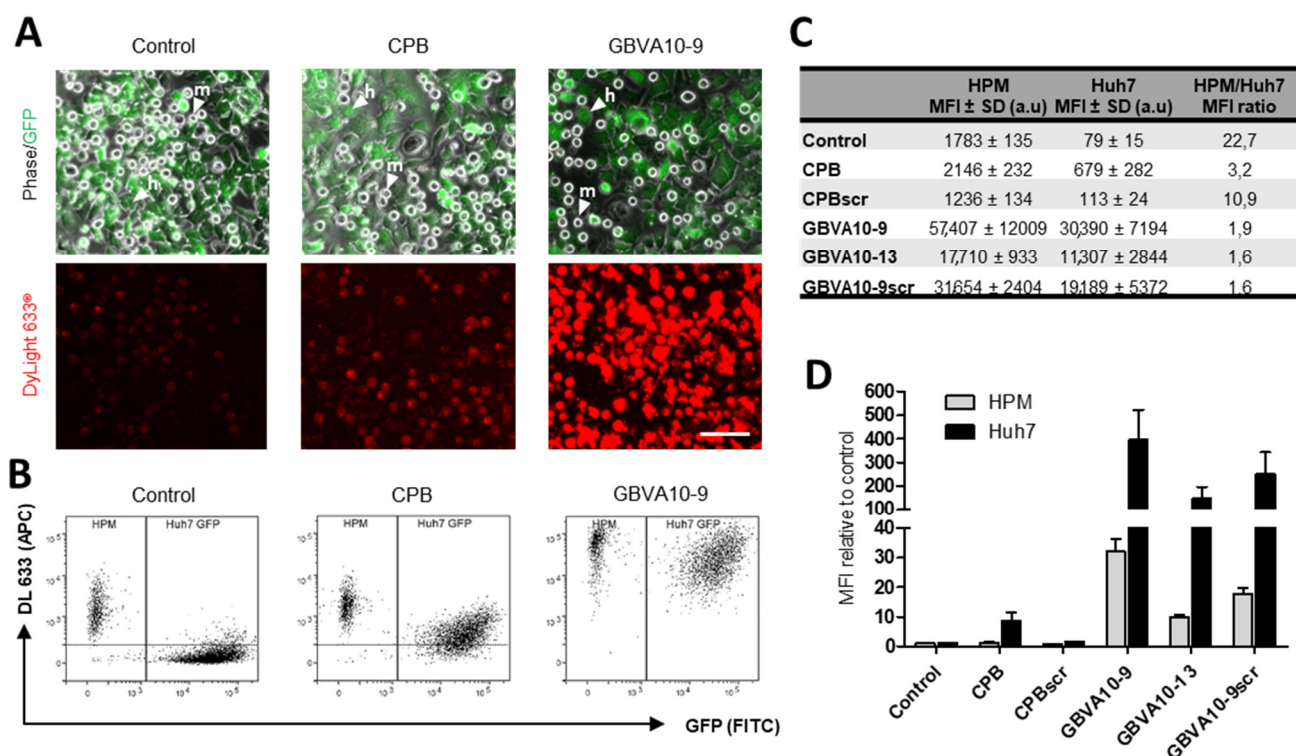


Figure 6. Coculture between human primary macrophages (HPM) and Huh7 cells. HPM- and GFP-expressing Huh7 cells were cultured together in same well during 24 h. Then streptavidin DyLight 633[®]-peptide conjugates (DL633-SA-peptide) were added in culture medium for 24 h incubation. Cells were wash twice before analysis. Cellular uptake of control DL633-SA-Biot and DL633-SA-peptide was evaluated by fluorescence microscopy and flow cytometry. (A) Upper panel: HPM (m) are visualized by phase contrast and GFP expressing Huh7 cells (h) are detected by fluorescence microscopy at 470 nm. Lower panel: Intracellular DL633-SA-Biot and DL633-SA-peptide were observed by fluorescence microscopy at 590 nm. Images shown are representative of multiple independent experiments. White bar corresponds to 10 μ m. (B) Representative flow cytometry dot plots. The rectangular gates separate HPM on the left and GFP-expressing Huh7 on the right, according to fluorescence detection using FITC channel. We analyzed DL633-SA-Biot and DL633-SA-peptide uptake in each cell populations by measuring fluorescence intensity on APC channel. (C) Data are presented as mean of fluorescence intensity on APC channel \pm SD. In the last column, we calculated the ratio between the fluorescence emitted by HPM and Huh7. (D) Peptides effect on the uptake of streptavidin Dylight by HPM and Huh7 in coculture. Data are presented as the mean of fluorescence intensity (MFI) relative to control \pm SD.

In cocultures incubated with DL633-SA-Biot, the MFI was much higher in HPM than Huh7 cells with a 22.7 MFI ratio (Figure 6B–D), confirming that HPM in this coculture model exhibited strong phagocytosis activities of macromolecular complexes. The MFI measured for the native CPB-DL633-SA complex indicated that CPB peptide slightly increased the complex uptake by HPM (statistically not significant), while it strongly enhanced the internalization by Huh7 cells (Figure 6B,C) with a ~8.5-fold increase, compared to DL633-SA-Biot (Figure 6D). These data demonstrated that CPB peptide significantly reduced the difference in the cell uptake between the two cell types, although the internalization by HPM remained higher, since the HPM/Huh7 MFI ratio was ~3.2 (Figure 6C). Importantly, the uptake of CPBscr-DL633-SA bioconjugate was not significantly different to that of control DL633-SA-Biot complex in both cell types (Figure 6C,D), confirming that the specific amino acid sequence of CPB was crucial in the hepatoma cell targeting.

The uptake of native GBVA10-9-DL633-SA bioconjugate was much higher than those measured with DL633-SA-Biot control and CPB-DL633-SA complex in both cell types (Figure 6B,C). However, GBVA10-9 induced a much higher increase in complexes

internalization in Huh7 (~384-fold), compared to that in HPM (~32-fold) (Figure 6D), which led to a 1.9 ratio value in MFI between the two cell types (Figure 6C). Interestingly, GBVA10-13 and GBVA10-9scr peptides also induced an increase in the uptake of bioconjugates in Huh7 and HPM, although significantly lower -MFI ratio of 1.6) than that observed for GBVA10-9 (Figure 6C).

Together, these data demonstrated that both CPB and GBVA-10-9 peptides strongly enhanced the cell uptake of streptavidin in Huh7 hepatoma cells over that in human macrophages, and constitute good candidate ligands for targeting HCC. In addition, the CPB-mediated uptake of streptavidin relies on the specific amino acid sequence of the peptide, since its scrambled control counterpart has no effect on the streptavidin's internalization in both cell types. In contrast, GBVA10-13 and GBVA10-9scr peptide complexes, although internalized in a lower extend than GBVA-10-9 conjugate, were much more internalized than the DL633-SA-Biot control, suggesting that the uptake of these three peptide bioconjugates by hepatoma cell does not strictly rely on the amino acid sequence of the peptides and the recognition of a cell surface receptor.

In order to determine the mechanism(s) involved in the uptake of peptide-streptavidin complexes by HPM, we studied the effects of phagocytosis and endocytosis inhibitors, latrunculin and genistein, respectively, on the internalization of control DL633-SA, CPB-, and GBVA-10-9-DL633-SA bioconjugates in the coculture model (Figure 7A).

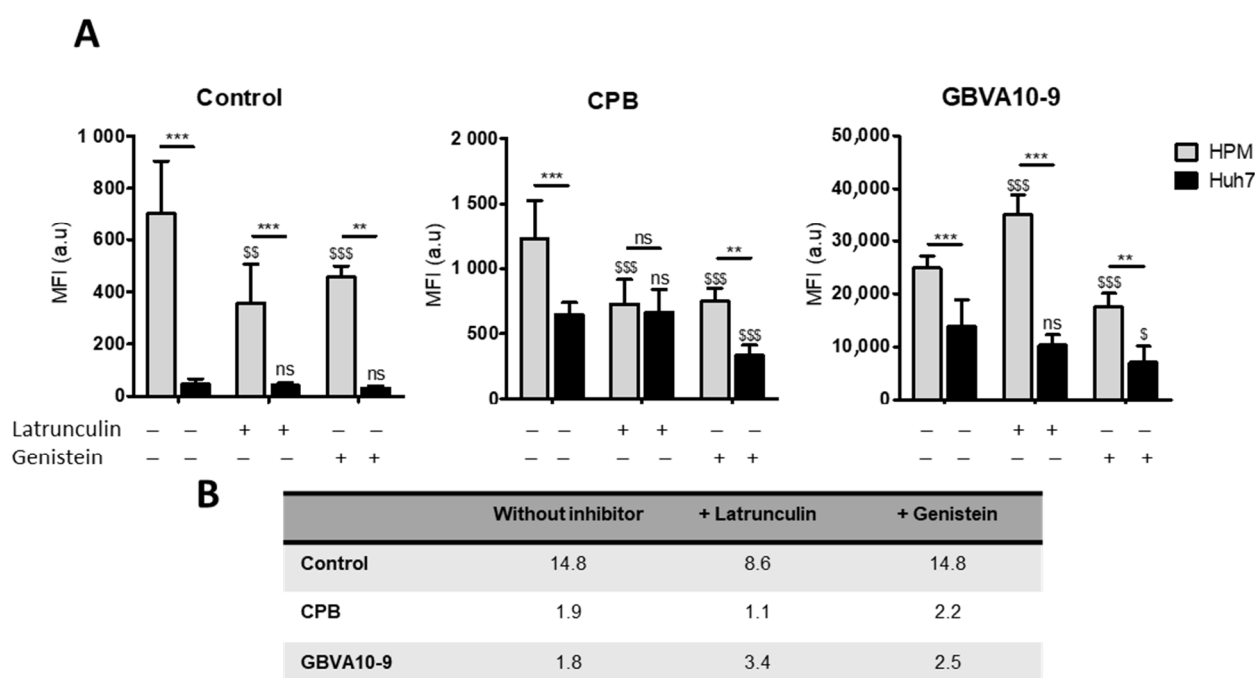


Figure 7. Influence of phagocytosis or endocytosis inhibition on DL633-SA-peptide bioconjugates uptake by cocultured HPM/Huh7. Cocultures of HPM and GFP-transfected Huh7 were treated with control or DL633-SA-peptide bioconjugates in absence or presence of phagocytosis inhibitor (latrunculin 500 nM) or endocytosis inhibitor (genistein 100 μ M). After 4 h of incubation at 37 $^{\circ}$ C, cells were washed twice and the cell uptake of bioconjugates was evaluated by flow cytometry. (A) Data are presented as mean of fluorescence intensity (MFI) on APC channel \pm SD. Statistical analyses were performed using Mann–Whitney non-parametric test. *ns* not significant, **** $p \leq 0.01$, ***** $p \leq 0.001$, HPM vs. Huh7. *ns* not significant, *§* $p \leq 0.05$, *§§* $p \leq 0.01$, *§§§* $p \leq 0.001$, comparison with the corresponding condition without inhibitor treatment. (B) In the table, we calculated the ratio between the fluorescence emitted by HPM and the fluorescence emitted by Huh7.

The uptake of control- and CPB-DL633-SA complexes was significantly reduced by both latrunculin and genistein in HPM. In contrast, latrunculin had no effect on the uptake in Huh7 while genistein decreased the internalization of CPB-DL633-SA complex.

Importantly, in cocultures exposed to latrunculin, the MFI in both HPM and Huh7 was nearly identical (MFI ratio at 1.1) (Figure 7B) demonstrating that pharmacological inhibition of phagocytosis in HPM improved the targeting of hepatoma cells by CPB peptide bioconjugates over the internalization by HPM.

As observed for CPB-DL633-SA complex, the treatment with latrunculin had no effect on the MFI in Huh7 while it unexpectedly increased the uptake of GBVA-10-9-DL633-SA bioconjugates in HPM (Figure 7). To further studied the internalization of GBVA-10-9-DL633-SA complex in HPM treated with latrunculin, we incubated GBVA-10-9-DL633-SA bioconjugate in pure culture of HPM (without Huh7 hepatoma cells), which confirmed the strong internalization of this complex in HPM in presence of latrunculin without changes in the distribution of the fluorescence staining (Figure S7). In contrast, the exposure to genistein decreased the MFI levels emitted by GBVA-10-9-DL633-SA complex in both cell types.

These data strongly suggest that CPB-DL633-SA complex is internalized mainly by endocytosis in hepatoma cells and by a dual mechanism involving both phagocytosis and endocytosis in HPM. In addition, the very strong uptake of GBVA-10-9-DL633-SA bioconjugate occurs partially by endocytosis and probably by another mechanism, at least in HPM that could rely on physicochemical properties of this amphipathic helical peptide.

4. Discussion

Using peptides previously known to bind to human hepatoma cells in vitro and in xenograft HCC mouse models [10,49–53,55,57,63–72,88–90], we first determined which peptides exhibited the strongest tropism towards hepatoma cells by investigating the cell uptake of peptide bioconjugates and peptide-decorated NPs by different cell types, including hepatoma cell lines, human hepatocytes, and macrophages in primary cultures. The first striking result, regarding the internalization of peptide-fluorescent streptavidin DyLight™ (488 DL488-SA) complexes, was that most selected peptides did not significantly enhance the binding and/or internalization of the fluorescent streptavidin by hepatoma cells. Peptides L5-2, CGK, SP94, and SRIF-14 showed weak positive effects on cell uptake, but not in all hepatoma cells. Conversely, CPB and GBVA10-9 peptides, derived from proteins expressed in pathogens infecting hepatocytes, strongly enhanced the uptake of DL488-SA in hepatoma cells and, to a much lesser extent, in human hepatocytes and NCI-H727 bronchial cancer cells. In contrast with the limited number of peptides affecting cell uptake of DL488-SA, the functionalization of Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃-based NPS [56,81,91], with all the selected peptides, especially CPB and GBVA10-9 peptides, strongly increased the NP's uptake by hepatoma cells. These data further reinforce our strategy to develop route of synthesis to covalently bind peptides onto PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ copolymers [92].

The striking difference observed in the effects of peptides on cell internalization between peptide-DL488-SA conjugates and peptide-functionalized NPs led us to question whether the specific amino acid sequence of the peptides was a crucial determinant in the cell uptake of peptide bioconjugates and peptide-decorated NPs. The concept of peptide-drug conjugates and peptide-functionalized NPs relies on the specific recognition by peptide ligands of membrane receptor(s) expressed by a subset of cells, in order to achieve an “active” cell targeting [3]. To investigate the role of the CPB and GBVA10-9 specific amino acid sequences in the cell uptake of streptavidin conjugates and peptide-decorated NPs, we used modified peptides CPBscr, GBVA10-13, and GBVA10-9scr, which were designed by redistribution or substitution in the native amino acid sequences. Experiments performed using native and modified peptide-DL488-SA demonstrated that cellular uptake of peptide-conjugates was significantly higher with CPB and GBVA10-9 than with their modified counterparts. These data indicated that the specific amino-acid sequence of CPB and GBVA10-9 peptides was a main determinant of the cell internalization for these bioconjugate models. In contrast, evaluation of cell uptake of peptide-functionalized NPs demonstrated that both GBVA10-9 and its scramble-control peptides strongly enhanced

internalization by hepatoma cells, suggesting that peptides physicochemical features and/or formation of a protein corona could be the main drivers of the NPs' cell internalization, rather than the recognition of a membrane receptor mediated by a specific peptide sequence, unlike the CPB peptide, for which the amino acid sequence is determinant for the cell uptake.

The opsonization is part of the innate immune system, enhancing the activity of the mononuclear phagocyte system (MPS) to clear pathogens from the body. This well-documented phenomenon, observed with all nano-objects, is a rapid process, leading to the formation of a protein corona at the surface of nanovectors, with a dynamic remodeling over time in blood [78–81]. Proteomics analyses performed on various NPs incubated with serum demonstrated that numerous plasma proteins (>100 different proteins and peptides) bind onto nano-vectors, including immunoglobulins, lipoproteins, complement, coagulation factors, and many others [78–81,93]. Authors have brought evidence that the protein corona formation and dynamics might depend on the physicochemical features of the nanovectors, including rigidity, hydrophilic, or hydrophobic surface, as well as charged or neutral zeta potential [93]. Proteins interact with NPs by different mechanisms, mainly electrostatic, hydrophobic, and hydrogen-bonding [93]. Lipoproteins, especially apolipoproteins E and A-I, are particularly enriched in NP's protein corona, most likely through direct interaction with lipids, in case of liposomes and lipid NPs [94,95], as well as the hydrophobic core of polymeric NPs [78–81]. Interestingly, reports have recently shown that proteins within the corona, including the ApoE, induce structural rearrangements that may impact their cell internalization and overall biodistribution in vivo [93].

In order to reduce opsonization and scavenging by MPS, NPs have been optimized through the modulation of their size, shape [2], surface charge [96], and chemical structure [97–99], including the synthesis of amphiphilic copolymers with a poly(ethylene glycol) (PEG) block. The corresponding PEGylated NPs exhibit a hydrophobic core and hydrophilic corona of PEG segments that acts as a steric shield reducing the binding of opsonins and uptake by MPS and extending their systemic lifetime [78,79], but strongly reducing their interaction with most cell types and their subsequent endocytosis [91]. We previously demonstrated that the amphiphilic block copolymer Biot-PEG_{62-b}-PMLABe₇₃ also strongly reduced the formation of the protein corona and cell uptake by hepatoma cells, compared to the opsonization of NPs prepared from PMLABe₇₃ homopolymer [81]. This observation was the rationale for the use of the Biot-PEG_{62-b}-PMLABe₇₃, in order to reduce the influence of the protein corona on the NP's uptake.

The hypothesis that formation of a protein corona onto GBVA10-9 and CPB functionalized PEGylated NPs could be a crucial determinant of the cell uptake by hepatoma cells was investigated. Herein, we showed that addition of these two peptides modified the protein corona onto NPs by increasing the binding of several plasma proteins, including ApoA-I and ApoE, known to be main components of the protein corona of many polymeric nanomaterials [80]. ApoA-I being a major component of HDL, we evaluated the effect of purified HDL particles on the cell uptake of control biotin–streptavidin biotin-PEG_{62-b}-PMLABe₇₃ NPs, CPB-, and GBVA10-9 streptavidin–biotin-PEG_{62-b}-PMLABe₇₃ NPs. Addition of HDL to the culture medium of HepaRG hepatoma cells strongly reduced the cell uptake of peptide-functionalized NPs, but not that of control NPs. These data strongly suggested that the increase in cell internalization of GBVA10-9 and CPB functionalized NPs would involve the binding of HDL to these peptides. This conclusion was strengthened by pull-down assays using streptavidin–biotin-PEG_{62-b}-PMLABe₇₃ NPs and streptavidin-agarose beads harboring GBVA10-9 and CPB peptides, which further evidenced strong binding of ApoA-I and ApoE but also iC3b fragment, albumin, transferrin, and immunoglobulins to these two peptides. These data confirmed that GBVA10-9 and CPB peptides modulated the binding of plasma proteins to NPs and suggested that peculiar protein coronas characterized each peptide-functionalized NP to regulate cell uptake. Our data are in agreement with the previous reports showing that high affinity ApoA-I

and ApoE to low-density lipoprotein (LDLR) and HDL receptors, which are overexpressed in liver cancer cells, could be used to target HCC [100–102].

In this study, we have also compared the *in vitro* uptake of CPB and GBVA10-9 peptides–streptavidin bioconjugates between hepatoma cells and macrophages, in order to determine whether these peptides endowed streptavidin bioconjugates with improved hepatoma cell targeting ability over that of macrophages, which are part of the mononuclear phagocyte system (MPS). The MPS in the normal liver involves resident Kupffer cells, while, in HCC, both Kupffer cells and monocyte-derived macrophages recruited to the tumor are very active [103], which impairs the targeting of tumoral hepatocytes by nanotechnology-based therapy. To address this issue, we developed an *in vitro* coculture system associating GFP positive Huh7 human hepatoma cells and primary macrophages (HPM) to mimic the cell competition for the internalization of our peptide-streptavidin bioconjugates. Using this model, we first evidenced that HPM were functional in this coculture system, since they exhibit a 22-fold higher phagocytic activity of control biotin-DL488-SA complex without peptide, compared to the internalization of the same control conjugate in Huh7 hepatoma cells. We next demonstrated that both CPB and GBVA10-9 peptides strongly improved the hepatoma cell targeting, possibly by different behaviors.

CPB peptide induced a ~10-fold increase in cell internalization in hepatoma cells, compared to a slight increase in HPM, while GBVA10-9 peptide strongly enhanced streptavidin cell uptake in both cell types. Peptide-DL488-SA conjugates were internalized both by phagocytosis and endocytosis, at least in part by a caveolin-dependent mechanism, since the genistein inhibitor of pinocytosis [74] reduced their cell uptake in HPM and hepatoma cells. However, differences in the levels of cell uptake and sensitivity to chemical inhibitors were observed. A possible explanation would be that the two peptides are internalized by different mechanisms in HPM and Huh7 cells. This hypothesis is reinforced by the following observations: (i) CPB-DL633-SA complex is internalized mostly by endocytosis in hepatoma cells and by both phagocytosis and endocytosis in HPM; (ii) genistein reduces GBVA10-9-DL488-SA's uptake in both HPM and Huh7 cells, while the phagocytosis inhibitor latrunculin increased its internalization only in HPM. From these data and a previous report demonstrating that GBVA10-9 can inhibit HCV entry at a post-attachment step through its amphipathicity and helicity features [70], it can be hypothesized that the amphipathic helical GBVA10-9 peptide could interact with apolipoproteins and/or act as a cell penetrating peptide, both properties contributing to GBVA10-9-DL488-SA cell internalization, especially in HPM, independently from active phagocytosis and endocytosis.

5. Conclusions

Our results showed that CPB and GBVA10-9, derived from the circumsporozoite protein of *Plasmodium berghei* and George Baker virus A, respectively, strongly increased the uptake of both streptavidin conjugates and biotin poly(ethylene glycol)-*block*-poly(benzyl malate) NPs in human hepatoma cells. In addition, our data provide evidence that peptide-functionalized nanomedicine may favor the uptake by hepatoma cells over that of macrophages and demonstrated that CPB- and GBVA10-9 constituted promising potent targeting agents for the diagnosis and/or treatment of HCC.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/pharmaceutics14040804/s1>. Figure S1: Methodology to measure cell fluorescence in flow cytometry. Figure S2: Intracellular detection of peptide-streptavidin DyLight 488® conjugates. Figure S3: Colocalization of Rab7 GTPase and fluorescent NPs. Figure S4: Colocalization of lysosome-associated membrane protein 1 (LAMP1) protein and GBVA10-9-decorated fluorescent NPs. Figure S5: Characterization of the size distribution of NPs functionalized with peptides in culture media. Figure S6: Characterization of HDL purified from human serum. Figure S7: Confocal microscopy, allowing for the visualization of GBVA10-9-DL633-SA conjugates in human macrophages (HPM) in pure cultures, in the absence or presence of phagocytosis inhibitor latrunculin.

Author Contributions: Conceptualization, E.V., M.B., N.L., S.C.-M. and P.L.; methodology, E.V., C.R., K.J., M.V., Y.V. and P.L.; software, E.V., K.J. and M.V.; validation, N.L., S.C.-M. and P.L.; formal analysis, N.L., S.C.-M. and P.L.; investigation E.V., C.R., K.J., M.V., Y.V. and P.L.; data curation, E.V., M.V. and P.L.; writing—original draft preparation, E.V. and P.L.; writing—review and editing, N.L., M.B. and S.C.-M.; supervision, P.L.; project administration, P.L.; funding acquisition, N.L., S.C.-M., and P.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) (call “Chimie pour la Médecine, FRM N°DCM20181039540), l’Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC, 3-year PhD fellowship to E.V.), Ligue contre le Cancer (comités 35 et 17), Cancéropôle Grand Ouest (Call Emergence n°17/028), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), and Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).

Institutional Review Board Statement: Human primary monocytes were purified from buffy coat of healthy donors obtained from the Etablissement Français du Sang (EFS Rennes, France), in compliance with the French legislation on blood donation and blood products’ use and safety. Human liver biopsies and primary hepatocytes were obtained from the processing of biological samples through the Centre de Ressources Biologiques (CRB Santé of Rennes BB-0033-00,056), under French legal guidelines, and fulfilled the requirements of the institutional ethics committee.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study

Data Availability Statement: Data supporting reported results are publicly available at Mendeley data (<https://data.mendeley.com/>) and can be accessed (since 1 April 2022) using the following link: Loyer, Pascal (2022), “Vène et al. CPB- and GBVA-derived peptides trigger efficient cell internalization of bioconjugates and functionalized PMLABe-based nanoparticles in human hepatoma cells”, Mendeley Data, V1, doi: 10.17632/tcx26rtxf8.1.

Acknowledgments: The authors thank the members of the Centre de Ressources Biologiques (CRB) Santé of Rennes for providing human liver biopsies (authorization n°BB-0033-00,056), company Biopredic International (Saint Grégoire, France) for purification of the human hepatocytes, and flow cytometry and microscopy core facilities MRic of the Fédération de Recherche Biosit (University of Rennes 1, France) for technical assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Kola, I.; Landis, J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 711–715.
2. Blanco, E.; Shen, H.; Ferrari, M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33*, 941–951.
3. Wicki, A.; Witzigmann, D.; Balasubramanian, V.; Huwyler, J. Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications *J. Control. Release* **2015**, *200*, 138–157.
4. Qin, H.; Ding, Y.; Mujeeb, A.; Zhao, Y.; Nie, G. Tumor Microenvironment Targeting and Responsive Peptide-Based Nanoformulations for Improved Tumor Therapy. *Mol. Pharmacol.* **2017**, *92*, 219–231.
5. Zhu, Y.; Feijen, J.; Zhong, Z. Dual-targeted nanomedicines for enhanced tumor treatment. *Nano Today* **2018**, *18*, 65–85.
6. Joubert, N.; Beck, A.; Dumontet, C.; Denevault-Sabourin, C. Antibody-Drug Conjugates: The Last Decade. *Pharmaceutics* **2020**, *13*, 245.
7. Tornesello, A.L.; Buonaguro, L.; Tornesello, M.L.; Buonaguro, F.M. New Insights in the Design of Bioactive Peptides and Chelating Agents for Imaging and Therapy in Oncology. *Molecules* **2017**, *22*, 1282.
8. Le Joncour, V.; Laakkonen, P. Seek & Destroy, use of targeting peptides for cancer detection and drug delivery. *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, *26*, 2797–2806.
9. Kalmouni, M.; Al-Hosani, S.; Magzoub, M. Cancer targeting peptides. *Cell. Mol. Life Sci.* **2019**, *76*, 2171–2183.
10. Eychenne, R.; Bouvry, C.; Bourgeois, M.; Loyer, P.; Benoist, E.; Lepareur, N. Overview of Radiolabeled Somatostatin Analogs for Cancer Imaging and Therapy. *Molecules* **2020**, *25*, 4012.
11. Araste, F.; Abnous, K.; Hashemi, M.; Taghdisi, S.M.; Ramezani, M.; Alibolandi, M. Peptide-based targeted therapeutics: Focus on cancer treatment. *J. Control. Release* **2018**, *292*, 141–162.
12. Liu, J.; Qu, J.; Zhou, W.; Huang, Y.; Jia, L.; Huang, X.; Qian, Z.; Xia, J.; Yu, Y. Syntenin-targeted peptide blocker inhibits progression of cancer cells. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *154*, 354–366.

13. Wang, F.; Dong, X.; Xiu, P.; Zhong, J.; Wei, H.; Xu, Z.; Li, T.; Liu, F.; Sun, X.; Li, J. T7 peptide inhibits angiogenesis via downregulation of angiopoietin-2 and autophagy. *Oncol. Rep.* **2015**, *33*, 675–684.
14. Li, S.; Zhang, T.; Xu, W.; Ding, J.; Yin, F.; Xu, J.; Sun, W.; Wang, H.; Sun, M.; Cai, Z.; Hua, Y. Sarcoma-Targeting Peptide-Decorated Polypeptide Nanogel Intracellularly Delivers Shikonin for Upregulated Osteosarcoma Necroptosis and Diminished Pulmonary Metastasis. *Theranostics* **2018**, *8*, 1361–1375.
15. Liu, F.; Wang, F.; Dong, X.; Xiu, P.; Sun, P.; Li, Z.; Shi, X.; Zhong, J. T7 peptide cytotoxicity in human hepatocellular carcinoma cells is mediated by suppression of autophagy. *Int. J. Mol. Med.* **2019**, *44*, 523–534.
16. Vivès, E.; Brodin, P.; Lebleu, B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 16010–16017.
17. Derossi, D.; Joliot, A.H.; Chassaing, G.; Prochiantz, A. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 10444–10450.
18. Torchilin, V.P. Multifunctional nanocarriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2006**, *58*, 1532–1555.
19. Cabral, H.; Miyata, K.; Kishimura, A. Nanodevices for studying nano-pathophysiology. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, *74*, 35–52.
20. Matsumura, Y.; Maeda, H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: Mechanism of tumor-tropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res.* **1986**, *46*, 6387–6392.
21. Maeda, H.; Nakamura, H.; Fang, J. The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 71–79.
22. Maeda, H.; Tsukigawa, K.; Fang, J. A Retrospective 30 Years After Discovery of the Enhanced Permeability and Retention Effect of Solid Tumors: Next-Generation Chemotherapeutics and Photodynamic Therapy—Problems, Solutions, and Prospects. *Microcirculation* **2016**, *23*, 173–182.
23. Raemdonck, K.; De Smedt, S.C. Lessons in simplicity that should shape the future of drug delivery. *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33*, 1026–1027.
24. Stinchcombe, T.E.; Socinski, M.A.; Walko, C.M.; O’Neil, B.H.; Collichio, F.A.; Ivanova, A.; Mu, H.; Hawkins, M.J.; Goldberg, R.M.; Lindley, C.; et al. Phase I and pharmacokinetic trial of carboplatin and albumin-bound paclitaxel, ABI-007 (Abraxane) on three treatment schedules in patients with solid tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2007**, *60*, 759–766.
25. Valetti, S.; Mura, S.; Noiray, M.; Arpicco, S.; Dosio, F.; Vergnaud, J.; Desmaële, D.; Stella, B.; Couvreur, P. Peptide conjugation: Before or after nanoparticle formation? *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25*, 1971–1983.
26. Roveri, M.; Bernasconi, M.; Leroux, J.-C.; Luciani, P. Peptides for tumor-specific drug targeting: State of the art and beyond. *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5*, 4348–4364.
27. Shi, N.-Q.; Li, Y.; Zhang, Y.; Shen, N.; Qi, L.; Wang, S.-R.; Qi, X.-R. Intelligent “Peptide-Gathering Mechanical Arm” Tames Wild “Trojan-Horse” Peptides for the Controlled Delivery of Cancer Nanotherapeutics. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 41767–41781.
28. Sun, H.; Dong, Y.; Feijen, J.; Zhong, Z. Peptide-decorated polymeric nanomedicines for precision cancer therapy. *J. Control. Release* **2018**, *290*, 11–27.
29. Dai, Q.; Wilhelm, S.; Ding, D.; Syed, A.M.M.; Sindhvani, S.; Zhang, Y.; Chen, Y.Y.; MacMillan, P.; Chan, W.C.W. Quantifying the Ligand-Coated Nanoparticle Delivery to Cancer Cells in Solid Tumors. *ACS Nano* **2018**, *12*, 8423–8435.
30. Penn, C.A.; Yang, K.; Zong, H.; Lim, J.-Y.; Cole, A.; Yang, D.; Baker, J.; Goonewardena, S.N.; Buckanovich, R.J. Therapeutic Impact of Nanoparticle Therapy Targeting Tumor-Associated Macrophages. *Mol. Cancer Ther.* **2018**, *17*, 96–106.
31. Ghavimi, S.; Apfel, T.; Azimi, H.; Persaud, A.; Pysopoulos, N.T. Management and Treatment of Hepatocellular Carcinoma with Immunotherapy: A Review of Current and Future Options. *J. Clin. Transl. Hepatol.* **2020**, *8*, 168–176.
32. Akateh, C.; Black, S.M.; Conteh, L.; Miller, E.D.; Noonan, A.; Elliott, E.; Pawlik, T.M.; Tsung, A.; Cloyd, J.M. Neoadjuvant and adjuvant treatment strategies for hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* **2019**, *25*, 3704–3721.
33. Llovet, J.M.; Ricci, S.; Mazzaferro, V.; Hilgard, P.; Gane, E.; Blanc, J.-F.; de Oliveira, A.C.; Santoro, A.; Raoul, J.-L.; Forner, A.; et al. SHARP Investigators Study Group. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **2008**, *359*, 378–390.
34. Bruix, J.; Qin, S.; Merle, P.; Granito, A.; Huang, Y.-H.; Bodoky, G.; Pracht, M.; Yokosuka, O.; Rosmorduc, O.; Breder, V.; et al. RESORCE Investigators. Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): A randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* **2017**, *389*, 56–66.
35. Kudo, M.; Finn, R.S.; Qin, S.; Han, K.-H.; Ikeda, K.; Piscaglia, F.; Baron, A.; Park, J.-W.; Han, G.; Jassem, J.; Blanc, J.F.; et al. Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: A randomised phase 3 non-inferiority trial. *Lancet* **2018**, *391*, 1163–1173.
36. Abou-Alfa, G.K.; Meyer, T.; Cheng, A.-L.; El-Khoueiry, A.B.; Rimassa, L.; Ryoo, B.-Y.; Cicin, I.; Merle, P.; Chen, Y.; Park, J.-W.; et al. Cabozantinib in Patients with Advanced and Progressing Hepatocellular Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *379*, 54–63.
37. Gilibert, M.; Raoul, J.-L. Potential of ramucirumab in treating hepatocellular carcinoma patients with elevated baseline alpha-fetoprotein. *J. Hepatocell. Carcinoma* **2018**, *5*, 91–98.
38. Zhu, A.X.; Kang, Y.-K.; Yen, C.-J.; Finn, R.S.; Galle, P.R.; Llovet, J.M.; Assenat, E.; Brandi, G.; Pracht, M.; Lim, H.Y.; et al. REACH-2 study investigators. Ramucirumab after sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma and increased α -feto-protein concentrations (REACH-2): A randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **2019**, *20*, 282–296.
39. Faivre, S.; Rimassa, L.; Finn, R.S. Molecular therapies for HCC: Looking outside the box. *J. Hepatol.* **2020**, *72*, 342–352.

40. El-Khoueiry, A.B.; Sangro, B.; Yau, T.; Crocenzi, T.S.; Kudo, M.; Hsu, C.; Kim, T.-Y.; Choo, S.-P.; Trojan, J.; Welling, T.H.; et al. Nivolumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma (CheckMate 040): An open-label, non-comparative, phase 1/2 dose escalation and expansion trial. *Lancet* **2017**, *389*, 2492–2502.
41. Zhu, A.X.; Finn, R.S.; Edeline, J.; Cattan, S.; Ogasawara, S.; Palmer, D.; Verslype, C.; Zagonel, V.; Fartoux, L.; Vogel, A.; et al. KEYNOTE-224 investigators, Pembrolizumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma previously treated with sorafenib (KEYNOTE-224): A non-randomised, open-label phase 2 trial. *Lancet Oncol.* **2018**, *19*, 940–952.
42. Yau, T.; Hsu, C.; Kim, T.-Y.; Choo, S.-P.; Kang, Y.-K.; Hou, M.-M.; Numata, K.; Yeo, W.; Chopra, A.; Ikeda, M.; et al. Nivolumab in advanced hepatocellular carcinoma: Sorafenib-experienced Asian cohort analysis. *J. Hepatol.* **2019**, *71*, 543–552.
43. Heinrich, S.; Castven, D.; Galle, P.R.; Marquardt, J.U. Translational Considerations to Improve Response and Overcome Therapy Resistance in Immunotherapy for Hepatocellular Carcinoma. *Cancers* **2020**, *12*, 2495.
44. Bouvry, C.; Palard, X.; Edeline, J.; Ardisson, V.; Loyer, P.; Garin, E.; Lepareur, N. Transarterial Radioembolization (TARE) Agents beyond 90Y-Microspheres. *BioMed Res. Int.* **2018**, *2018*, e1435302.
45. Fernandes, D.A.; Kolios, M.C. Near-infrared absorbing nanoemulsions as nonlinear ultrasound contrast agents for cancer theranostics. *J. Mol. Liq.* **2019**; *287*, 110848.
46. Fernandes, D.A.; Fernandes, D.D.; Malik, A.; Gomes, G.W.; Appak-Baskoy, S.; Berndt, E.; Gradinaru, C.C.; Kolios, M.C. Multi-functional nanoparticles as theranostic agents for therapy and imaging of breast cancer. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2021**, *218*, 112110.
47. Alshamrani, M. Broad-Spectrum Theranostics and Biomedical Application of Functionalized Nanomaterials. *Polymers* **2022**, *14*, 1221.
48. Haubner, R.; Finkenstedt, A.; Stegmayr, A.; Rangger, C.; Decristoforo, C.; Zoller, H.; Virgolini, I.J. [(68)Ga]NODAGA-RGD-Metabolic stability, biodistribution, and dosimetry data from patients with hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2016**, *43*, 2005–2013.
49. Zhu, D.; Qin, Y.; Wang, J.; Zhang, L.; Zou, S.; Zhu, X.; Zhu, L. Novel Glypican-3-Binding Peptide for in Vivo Hepatocellular Carcinoma Fluorescent Imaging. *Bioconjug. Chem.* **2016**, *27*, 831–839.
50. Fang, Y.; Yang, W.; Cheng, L.; Meng, F.; Zhang, J.; Zhong, Z. EGFR-targeted multifunctional polymersomal doxorubicin induces selective and potent suppression of orthotopic human liver cancer in vivo. *Acta Biomater.* **2017**, *64*, 323–333.
51. Jing, R.; Zhou, X.; Zhao, J.; Wei, Y.; Zuo, B.; You, A.; Rao, Q.; Gao, X.; Yang, R.; Chen, L.; et al. Fluorescent peptide highlights micronodules in murine hepatocellular carcinoma models and humans in vitro. *Hepatology* **2018**, *68*, 1391–1411.
52. Qin, Z.; Wang, J.; Wang, Y.; Wang, G.; Wang, X.; Zhou, Z.; Liu, G.; Gao, S.; Zhu, L. Identification of a Glypican-3-Binding Peptide for In Vivo Non-Invasive Human Hepatocellular Carcinoma Detection. *Macromol. Biosci.* **2017**, *17*, 4.
53. Li, Y.; Zhang, J.; Gu, J.; Hu, K.; Huang, S.; Conti, P.S.; Wu, H.; Chen, K. Radiofluorinated GPC3-Binding Peptides for PET Imaging of Hepatocellular Carcinoma. *Mol. Imaging Biol.* **2020**, *22*, 134–143.
54. Reddy, L.H.; Couvreur, P. Nanotechnology for therapy and imaging of liver diseases. *J. Hepatol.* **2011**, *55*, 1461–1466.
55. Zhang, X.; Ng, H.L.H.; Lu, A.; Lin, C.; Zhou, L.; Lin, G.; Zhang, Y.; Yang, Z.; Zhang, H. Drug delivery system targeting advanced hepatocellular carcinoma: Current and future. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2016**, *12*, 853–869.
56. Huang, Z.W.; Laurent, V.; Chetouani, G.; Ljubimova, J.Y.; Holler, E.; Benvegnu, T.; Loyer, P.; Cammas-Marion, S. New functional degradable and bio-compatible nanoparticles based on poly (malic acid) derivatives for site-specific anti-cancer drug delivery. *Int. J. Pharm.* **2012**, *423*, 84–92.
57. Loyer, P.; Bedhouche, W.; Huang, Z.W.; Cammas-Marion, S. Degradable and biocompatible nanoparticles decorated with cyclic RGD peptide for efficient drug delivery to hepatoma cells in vitro. *Int. J. Pharm.* **2013**, *454*, 727–737.
58. Loyer, P.; Cammas-Marion, S. Natural and synthetic poly (malic acid)-based derivatives: A family of versatile biopolymers for the design of drug nanocarriers. *J. Drug Target.* **2014**, *22*, 556–575.
59. Corlu, A.; Loyer, P. Culture Conditions Promoting Hepatocyte Proliferation and Cell Cycle Synchronization. *Methods Mol. Biol.* **2015**, *1250*, 27–51.
60. Gicquel, T.; Robert, S.; Loyer, P.; Victoni, T.; Bodin, A.; Ribault, C.; Gleonnec, F.; Couillin, I.; Boichot, E.; Lagente, V. IL-1 β production is dependent on the activation of purinergic receptors and NLRP3 pathway in human macrophages. *FASEB J.* **2015**, *29*, 4162–4173.
61. Thioune, O.; Fessi, H.; Devissaguet, J.P.; Puisieux, F. Preparation of pseudolatex by nanoprecipitation: Influence of the solvent nature on intrinsic viscosity and interaction constant. *Int. J. Pharm.* **1997**, *146*, 233–238.
62. Alipour, M.; Baneshi, M.; Hosseinkhani, S.; Mahmoudi, R.; Jabari Arabzadeh, A.; Akrami, M.; Mehrzad, J.; Bardania, H. Recent progress in biomedical applications of RGD-based ligand: From precise cancer theranostics to biomaterial engineering: A systematic review. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2020**, *108*, 839–850.
63. Lee, Y.L.; Ahn, B.-C.; Lee, Y.; Lee, S.-W.; Cho, J.-Y.; Lee, J. Targeting of hepatocellular carcinoma with glypican-3-targeting peptide ligand. *J. Pept. Sci.* **2011**, *17*, 763–769.
64. Zhang, B.; Zhang, Y.; Wang, J.; Zhang, Y.; Chen, J.; Pan, Y.; Ren, L.; Hu, Z.; Zhao, J.; Liao, M.; et al. Screening and Identification of a Targeting Peptide to Hepatocarcinoma from a Phage Display Peptide Library. *Mol. Med.* **2007**, *13*, 246–254.
65. Du, B.; Han, H.; Wang, Z.; Kuang, L.; Wang, L.; Yu, L.; Wu, M.; Zhou, Z.; Qian, M. Targeted drug delivery to hepatocarcinoma in vivo by phage-displayed specific binding peptide. *Mol. Cancer Res.* **2010**, *8*, 135–144.
66. Jung, E.; Lee, N.K.; Kang, S.-K.; Choi, S.-H.; Kim, D.; Park, K.; Choi, K.; Choi, Y.-H.; Jung, D.H. Identification of tissue-specific targeting peptide. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2012**, *26*, 1267–1275.

67. Mäkelä, A.R.; Matilainen, H.; White, D.J.; Ruoslahti, E.; Oker-Blom, C.; Enhanced baculovirus-mediated transduction of human cancer cells by tumor-homing peptides. *J. Virol.* **2006**, *80*, 6603–6611.
68. Lo, A.; Lin, C.-T.; Wu, H.-C. Hepatocellular carcinoma cell-specific peptide ligand for targeted drug delivery. *Mol. Cancer Ther.* **2008**, *7*, 579–589.
69. Longmuir, K.J.; Robertson, R.T.; Haynes, S.M.; Baratta, J.L.; Waring, A.J. Effective targeting of liposomes to liver and hepatocytes in vivo by incorporation of a Plasmodium amino acid sequence. *Pharm. Res.* **2006**, *23*, 759–769.
70. Liu, X.; Huang, Y.; Cheng, M.; Pan, L.; Si, Y.; Li, G.; Niu, Y.; Zhao, L.; Zhao, J.; Li, X.; et al. Screening and rational design of hepatitis C virus entry inhibitory peptides derived from GB virus A NS5A. *J. Virol.* **2013**, *87*, 1649–1657.
71. Zhang, Y.; Chen, J.; Zhang, Y.; Hu, Z.; Hu, D.; Pan, Y.; Ou, S.; Liu, G.; Yin, X.; Zhao, J.; et al. Panning and identification of a colon tumor binding peptide from a phage display peptide library. *J. Biomol. Screen.* **2007**, *12*, 429–435.
72. Tirand, L.; Frochot, C.; Vanderesse, R.; Thomas, N.; Trinquet, E.; Pinel, S.; Viriot, M.-L.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M. A peptide competing with VEGF165 binding on neuropilin-1 mediates targeting of a chlorin-type photosensitizer and potentiates its photodynamic activity in human endothelial cells. *J. Control. Release* **2006**, *111*, 153–164.
73. Minamihata, K.; Maeda, Y.; Yamaguchi, S.; Ishihara, W.; Ishiwatari, A.; Takamori, S.; Yamahira, S.; Nagamune, T. Photosensitizer and polycationic peptide-labeled streptavidin as a nano-carrier for light-controlled protein transduction. *J. Biosci. Bioeng.* **2015**, *120*, 630–636.
74. Morales, D.P.; Wonderly, W.R.; Huang, X.; McAdams, M.; Chron, A.B.; Reich, N.O. Affinity-Based Assembly of Peptides on Plasmonic Nanoparticles Delivered Intracellularly with Light Activated Control. *Bioconjug. Chem.* **2017**, *28*, 1816–1820.
75. Jain, A.; Cheng, K. The principles and applications of avidin-based nanoparticles in drug delivery and diagnosis. *J. Control Release* **2017**, *245*, 27–40.
76. Jo, A.; Zhang, R.; Allen, I.C.; Riffle, J.S.; Davis, R.M. Design and Fabrication of Streptavidin-Functionalized, Fluorescently Labeled Polymeric Nanocarriers. *Langmuir* **2018**, *34*, 15783–15794.
77. Vercauteren, D.; Vandenbroucke, R.E.; Jones, A.T.; Rejman, J.; Demeester, J.; De Smedt, S.C.; Sanders, N.N.; Braeckmans, K. The use of inhibitors to study endocytic pathways of gene carriers: Optimization and pitfalls. *Mol. Ther.* **2010**, *18*, 561–569.
78. Owens, D.E.; Peppas, N.A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **2006**, *307*, 93–102.
79. Tenzer, S.; Docter, D.; Kuharev, J.; Musyanovych, A.; Fetz, V.; Hecht, R.; Schlenk, F.; Fischer, D.; Kiouptsi, K.; Reinhardt, C.; et al. Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. *Nat. Nanotechnol.* **2013**, *8*, 772–781.
80. Abbina, S.; Takeuchi, L.E.; Anilkumar, P.; Yu, K.; Rogalski, J.C.; Sheno, R.A.; Constantinescu, I.; Kizhakkedathu, J.N. Blood circulation of soft nanomaterials is governed by dynamic remodeling of protein opsonins at nano-biointerface. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 3048.
81. Vène, E.; Barouti, G.; Jarnouen, K.; Gicquel, T.; Rauch, C.; Ribault, C.; Guillaume, S.M.; Cammas-Marion, S.; Loyer, P. Opsonisation of nanoparticles prepared from poly (β -hydroxybutyrate) and poly (trimethylene carbonate)-b-poly (malic acid) amphiphilic diblock copolymers: Impact on the in vitro cell uptake by primary human macrophages and HepaRG hepatoma cells. *Int. J. Pharm.* **2016**, *513*, 438–452.
82. Cheng, G.; Montero, A.; Gastaminza, P.; Whitten-Bauer, C.; Wieland, S.F.; Isogawa, M.; Fredericksen, B.; Selvarajah, S.; Gallay, P.A.; Ghadiri, M.R.; et al. A virocidal amphipathic $\{\alpha\}$ -helical peptide that inhibits hepatitis C virus infection in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 3088–3093.
83. Kim, G.C.; Ahn, J.H.; Oh, J.H.; Nam, S.; Hyun, S.; Yu, J.; Lee, Y. Photoswitching of Cell Penetration of Amphipathic Peptides by Control of α -Helical Conformation. *Biomacromolecules* **2018**, *19*, 2863–2869.
84. Delcroix, M.; Riley, L.W. Cell-Penetrating Peptides for Antiviral Drug Development. *Pharmaceutics* **2010**, *3*, 448–470.
85. Benga, W.J.A.; Krieger, S.E.; Dimitrova, M.; Zeisel, M.B.; Parnot, M.; Lupberger, J.; Hildt, E.; Luo, G.; McLauchlan, J.; Baumert, T.F.; et al. Apolipoprotein E interacts with hepatitis C virus nonstructural protein 5A and determines assembly of infectious particles. *Hepatology* **2010**, *51*, 43–53.
86. Cun, W.; Jiang, J.; Luo, G. The C-terminal α -helix domain of apolipoprotein E is required for interaction with nonstructural protein 5A and assembly of hepatitis C virus. *J. Virol.* **2010**, *84*, 11532–11541.
87. Lindenbach, B.D.; Rice, C.M. The ins and outs of hepatitis C virus entry and assembly. *Nat. Rev. Microbiol.* **2013**, *11*, 688–700.
88. Fleming, B.D.; Ho, M. Glypican-3 Targeting Immunotoxins for the Treatment of Liver Cancer. *Toxins* **2016**, *8*, E274.
89. Zhang, J.; Zheng, Y.; Xie, X.; Wang, L.; Su, Z.; Wang, Y.; Leong, K.W.; Chen, M. Cleavable Multifunctional Targeting Mixed Micelles with Sequential pH-Triggered TAT Peptide Activation for Improved Antihepatocellular Carcinoma Efficacy. *Mol. Pharm.* **2017**, *14*, 3644–3659.
90. Wu, C.-D.; Lee, J.-C.; Wu, H.-C.; Lee, C.-W.; Lin, C.-F.; Hsu, M.-C.; Lin, C.-T. Preclinical verification of the efficacy by targeting peptide-linked liposomal nanoparticles for hepatocellular carcinoma therapy. *Nanobiomedicine* **2019**, *6*, 1849543519880762.
91. Casajus, H.; Saba, S.; Vlach, M.; Vène, E.; Ribault, C.; Tranchimand, S.; Nugier-Chauvin, C.; Dubreucq, E.; Loyer, P.; Cammas-Marion, S.; et al. Cell Uptake and Biocompatibility of Nanoparticles Prepared from Poly(benzyl malate) (Co)polymers Obtained through Chemical and Enzymatic Polymerization in Human HepaRG Cells and Primary Macrophages. *Polymers* **2018**, *10*, 1244.
92. Brossard, C.; Vlach, M.; Vène, E.; Ribault, C.; Dorcet, V.; Noiret, N.; Loyer, P.; Lepareur, N.; Cammas-Marion, S. Synthesis of Poly(Malic Acid) Derivatives End-Functionalized with Peptides and Preparation of Biocompatible Nanoparticles to Target Hepatoma Cells. *Nanomaterials* **2021**, *11*, 958.

93. Li, H.; Wang, Y.; Tang, Q.; Yin, D.; Tang, C.; He, E.; Zou, L.; Peng, Q. The protein corona and its effects on nanoparticle-based drug delivery systems. *Acta Biomater.* **2021**, *129*, 57–72.
94. Sebastiani, F.; Yanez Arteta, M.; Lerche, M.; Porcar, L.; Lang, C.; Bragg, R.A.; Elmore, C.S.; Krishnamurthy, V.R.; Russell, R.A.; Darwish, T.; et al. Apolipoprotein E Binding Drives Structural and Compositional Rearrangement of mRNA-Containing Lipid Nanoparticles. *ACS Nano* **2021**, *15*, 6709–6722.
95. Lee, H. Effect of Protein Corona on Nanoparticle-Lipid Membrane Binding: The Binding Strength and Dynamics. *Langmuir* **2021**, *37*, 3751–3760.
96. Arvizo, R.R.; Miranda, O.R.; Moyano, D.F.; Walden, C.A.; Giri, K.; Bhattacharya, R.; Robertson, J.D.; Rotello, V.M.; Reid, J.M.; Mukherjee, P. Modulating pharmacokinetics, tumor uptake and biodistribution by engineered nanoparticles. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e24374.
97. Nel, A.E.; Mädler, L.; Velegol, D.; Xia, T.; Hoek, E.M.V.; Somasundaran, P.; Klaessig, F.; Castranova, V.; Thompson, M. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat. Mater.* **2009**, *8*, 543–557.
98. Moghimi, S.M.; Hunter, A.C.; Murray, J.C. Long-circulating and target-specific nanoparticles: Theory to practice. *Pharmacol. Rev.* **2001**, *53*, 283–318.
99. Mahon, E.; Salvati, A.; Baldelli Bombelli, F.; Lynch, I.; Dawson, K.A. Designing the nanoparticle-biomolecule interface for targeting and therapeutic delivery. *J. Control. Release* **2012**, *161*, 164–174.
100. Chung, N.S.; Wasan, K.M. Potential role of the low-density lipoprotein receptor family as mediators of cellular drug uptake. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, *56*, 1315–1334.
101. Shen, W.-J.; Azhar, S.; Kraemer, F.B. SR-B1: A Unique Multifunctional Receptor for Cholesterol Influx and Efflux. *Annu. Rev. Physiol.* **2018**, *80*, 95–116.
102. Li, M.; Su, Y.; Zhang, F.; Chen, K.; Xu, X.; Xu, L.; Zhou, J.; Wang, W. A dual-targeting reconstituted high-density lipoprotein leveraging the synergy of sorafenib and anti-miRNA21 for enhanced hepatocellular carcinoma therapy. *Acta Biomater.* **2018**, *75*, 413–426.
103. Roohani, S.; Tacke, F. Liver Injury and the Macrophage Issue: Molecular and Mechanistic Facts and Their Clinical Relevance. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 7249.

V. TRAVAUX EN COURS ET PERSPECTIVES

L'ensemble de ces résultats nous a permis d'identifier deux peptides d'intérêt pour le ciblage des cellules hépatiques cancéreuses, le CPB et le GBVA10-9. Cependant, ce travail a également mis en évidence la difficulté de caractériser le tropisme de peptides courts pour des cellules en général, et les cellules hépatiques dans le cas présent. Il s'est avéré indispensable de répéter les expériences un grand nombre de fois afin d'établir une analyse statistique robuste.

Le choix d'un couplage des peptides directement sur une streptavidine fluorescente, bien qu'ayant des limites, permet de rapidement identifier les peptides pertinents. A l'inverse, le couplage de peptide biotinylés aux NPs Biot-PEG₆₂-b-PMLABe₇₃ *via* la streptavidine, bien que rapide et simple à mettre en œuvre, présente la limite d'une protéine de grande taille saturant la surface des NPs et pouvant masquer les peptides. Par ailleurs, l'opsonisation de NPs avec cette saturation de streptavidine est également une limite sérieuse à cette approche. Cependant, dans nos modèles cellulaires, les résultats obtenus avec cette approche nous ont fait aborder les questions diverses, telles que les différences d'internalisation de NPs entre les types cellulaires, les méthodes d'analyse de la captation cellulaire, ou encore les mécanismes et les cinétiques d'internalisation. Ces travaux ont posé des premières bases du sujet dans l'équipe

A partir de ces résultats et de l'identification des peptides CPB et GBVA10-9, plusieurs financements ont été obtenus (Ligue contre le Cancer, Réseau Vectorisation du Cancéropôle Grand-ouest, Fondation pour la Recherche Médicale) qui ont permis de développer de nouveaux objectifs. Trois projets de thèse ont été élaborés tant sur le versant chimie (synthèse de copolymères fonctionnalisées et de peptides modifiés) que sur le versant biologie pour l'évaluation *in vitro* et *in vivo* de nouvelles NPs et de nouveaux peptides radiomarqués.

La première thèse a été conduite par Clarisse Brossard, sous l'encadrement de S. Cammas-Marion, qui a élaboré des nanovecteurs multifonctionnels pour la vectorisation ciblée de radionucléides dans le cadre de la théranostique du CHC.

Les peptides GBVA10-9 et CPB ont été greffés sur des (co)polymères dérivés du PMLA. Dans le cadre de ce travail, deux méthodes de bioconjugaison ont été sélectionnées : la réaction entre un thiol et un maléimide et la réaction entre un isothiocyanate et une amine. Ces conjugués nous ont permis d'élaborer des NPs polymères biocompatibles, fonctionnalisées avec les peptides.

Les études *in vitro* sur une lignée cellulaire d'hépatome humain ont montré que la nature du peptide et celle de l'espaceur utilisé entre le peptide et le (co)polymère, ainsi que la méthode de préparation des NPs, ont une grande influence sur la capacité des cellules à reconnaître les NPs fonctionnalisées par des peptides. A ce stade, deux articles ont été publiés (Brossard et al., 2021, 2022) auxquels j'ai été associée. Ce travail est poursuivi par un second doctorant chimiste, Baptiste Taffoureau.

Parmi les développements possibles avec ces NPs, l'équipe s'intéresse à la radiothérapie interne vectorisée. Le premier système de vectorisation ciblée de radionucléides consiste donc à greffer le peptide sélectionné à la surface de NPs possédant une molécule chélatant un radionucléide. Le chélate peut être soit greffé sur une extrémité du copolymère soit encapsulé dans le cœur des NPs.

Le second système étudié est basé sur le greffage direct du peptide sélectionné sur un ligand bifonctionnel adapté au radionucléide choisi. Des dérivés peptidiques ligand-GBVA10-9 et ligand-CPB ont été synthétisés par la création d'une liaison thiourée ou thioéther de succinimidyle. Certains d'entre eux ont été radiomarqués avec du gallium-68 ou du cuivre-64. Les premières évaluations *in*

in vitro ont montré que la nature du peptide ainsi que celle du ligand ont une influence sur la captation cellulaire. Les dérivés peptidiques composés de GBVA10-9 sont prometteurs pour la vectorisation ciblée de radionucléides à visée diagnostique et/ou thérapeutique dans le cadre du diagnostic et du traitement du CHC. Ces travaux d'évaluation des peptides radiomarqués sont conduits par une troisième doctorante, Hanadi Nahas.

Dans le cadre de nos projets, les radionucléides sélectionnés sont le technétium-99m (^{99m}Tc), le gallium-68 (^{68}Ga), le cuivre-64 (^{64}Cu) pour le diagnostic et le rhénium-188 (^{188}Re), le lutétium-177 (^{177}Lu), l'yttrium-90 (^{90}Y), le cuivre-67 (^{67}Cu) pour la thérapie. Par ailleurs, cinq ligands ont été choisis en raison de leur affinité pour les radionucléides sélectionnés (Figure 92), et de la possibilité d'effectuer des modifications chimiques pour introduire des fonctions de couplage permettant le greffage des ligands modifiés sur les peptides (GBVA10-9, CPB) et sur les (co)polymères.

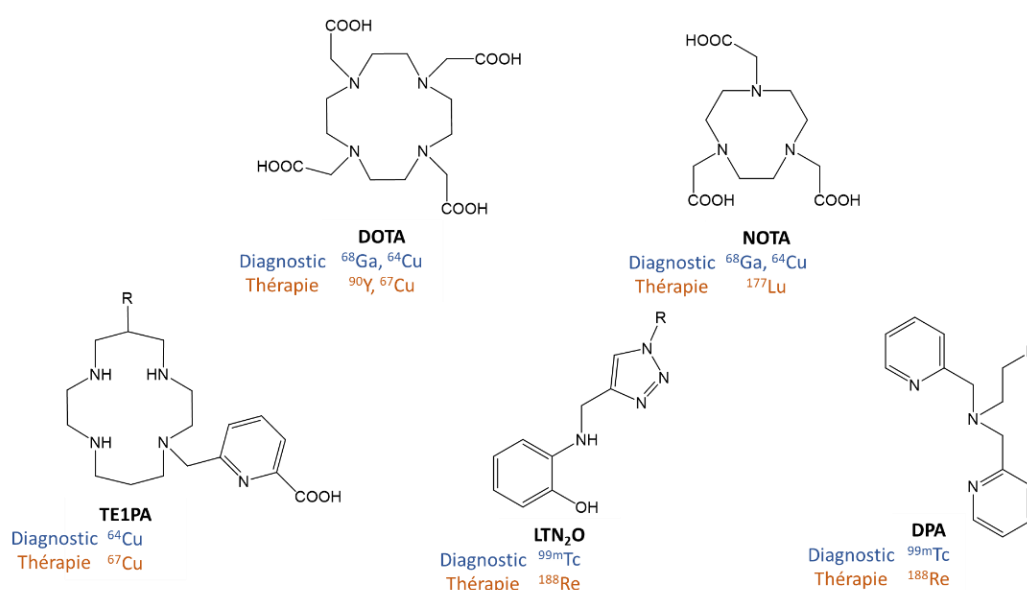


Figure 92 : Ligands et radionucléides sélectionnés dans le cadre du projet de thèse

Deux ligands commerciaux, l'acide 2,2',2'',2'''-(1,4,7,10-tétrazacyclododécane-1,4,7,10-tétrayl)tétraacétique (DOTA) et l'acide (2,2',2''-(1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triayl)triacétique (NOTA), ont été sélectionnés comme référence. Parallèlement, trois ligands originaux ont été également sélectionnés : le cyclam monopicolinate TE1PA (acide 6-((6-(4-aminobenzyl)-1,4,8,11-tétrazacyclotétradecan-1-yl)méthyl)picolinique) pour le ^{64}Cu et le ^{67}Cu , et les ligands tripodal N₂O LTN₂O (4-[4-(2-hydroxyphenylamino)méthyl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl]aminobenzène) et dipicolylamine (DPA) pour le ^{99m}Tc et le ^{188}Re (Figure 92).

CHAPITRE III : Internalisation et cytotoxicité d'un complexe organométallique à l'or sous formes libre et encapsulée dans des nanoparticules polymères à base de dérivés du PMLA_{Be73} dans les cellules d'hépatome

I. CONTEXTE DE L'ETUDE

Malgré les progrès importants dans la prise en charge des patients atteints de cancers hépatiques et le développement de nouvelles approches thérapeutiques pour leur traitement, ces cancers restent dans la catégorie des tumeurs de mauvais pronostic défini par une survie inférieure à 30% à 5 ans après le diagnostic. Les cancers hépatiques sont caractérisés par leur diagnostic souvent tardif, leur grande résistance aux chimiothérapies et leur forte hétérogénéité tumorale.

Pour contourner la diversité moléculaire et l'hétérogénéité cellulaire des tumeurs hépatiques et dans une direction à l'opposé du développement de traitements très ciblés sur des mutations caractérisant les CHC, une recherche de nouvelles molécules antiprolifératives et/ou cytotoxiques altérant le métabolisme et/ou le statut redox des cellules cancéreuses pourrait apporter de nouvelles pistes thérapeutiques.

Certains complexes organométalliques, constitués d'un métal et d'un ligand organique, sont connus pour avoir des propriétés biologiques remarquables. Par exemple, le cisplatine, agent ciblant l'ADN, est utilisé en cancérologie depuis des décennies. Néanmoins, en raison de la toxicité importante de ce complexe et de ses analogues ainsi que de l'émergence de résistances, il existe aujourd'hui un fort intérêt à concevoir de nouveaux complexes organométalliques dont l'activité anticancéreuse pourrait résulter du ciblage d'autres macromolécules que l'ADN. En effet, les métaux comme le fer, le cobalt, le nickel, le manganèse et le zinc sont des oligo-éléments essentiels, cofacteurs structuraux et catalytiques de métalloprotéines, qui participent à de multiples voies métaboliques. L'altération des contenus en ces métaux dans les cellules cancéreuses comparativement aux cellules normales atteste également de l'évolution des métabolismes au cours de l'hépatocarcinogénèse (Cano et al., 2021). Différents éléments de la littérature indiquent que des complexes métalliques incorporant ces métaux permettent d'induire la mort de cellules cancéreuses, notamment dans les cellules hépatiques, par plusieurs voies/mécanismes incluant l'inhibition de la réplication de l'ADN, de la phosphorylation oxydative mitochondriale et de la glycolyse, l'induction d'un stress oxydatif ou encore des altérations épigénétiques (Jin et al., 2020; M. Li et al., 2020; Raj R et al., 2020).

Par ailleurs, la nature physico-chimique de molécules antitumorales peut conditionner leur accumulation dans les différents compartiments cellulaires. Il a été montré que des molécules cationiques amphiphiles sont capables de pénétrer et de s'accumuler dans les mitochondries, pouvant alors entraîner, pour certaines d'entre-elles, des dysfonctions mitochondriales par inhibition de la chaîne respiratoire, de la β -oxydation des acides gras et du cycle de Krebs ou de se concentrer dans les lysosomes, ce qui peut altérer les fonctions de ces organites intracellulaires (Begrache et al., 2011; Valalda et al., 2020), ces altérations pouvant aboutir à la mort cellulaire (Anand et al., 2019). Des travaux récents ont apporté la preuve de concept que des médicaments cationiques amphiphiles classiques pouvaient être repositionnés en anticancéreux grâce à leurs capacités à s'accumuler dans les mitochondries et les lysosomes (Valalda et al., 2020).

Dans le but de concevoir des complexes organométalliques ciblant des molécules autres que l'ADN, le potentiel d'autres métaux que le platine (Pt) est évalué ainsi que la synthèse de nouveaux ligands véhiculant ces métaux. Parmi les diverses familles de complexes les plus synthétisées et les plus évaluées depuis une trentaine d'années, les complexes d'or (I) et (III), notamment associés à des ligands diaminocarbènes (NHC), ont conduit à des résultats intéressants, y compris dans de rares études *in vivo*, tandis que leurs mécanismes d'action au niveau cellulaire commencent à être compris (Guarra et al., 2021; Karaaslan et al., 2020; W. Liu & Gust, 2016; Porchia et al., 2018). Plus récemment, quelques complexes de manganèse (Mn), où le métal présente différents degrés d'oxydation et équipés de ligands variés, ont été évalués en tant qu'agents antitumoraux potentiels (Ansari et al., 2009; Milbeo et al., 2021). Ces composés encore peu évalués en stratégie antitumorale présentent un

potentiel inexploré, notamment sous forme encapsulée qui permettrait d'accumuler ces complexes organométalliques préférentiellement dans les cellules cancéreuses.

En effet, la difficulté d'accumuler des quantités suffisantes de chimiothérapies dans les tumeurs et/ou de maintenir une concentration plasmatique élevée de principes actifs (PAs) contribue de manière significative à l'abandon de molécules prometteuses et au manque d'efficacité des PAs approuvés (Kola & Landis, 2004). Pour surmonter ces limitations, les nano-vecteurs incorporant des PAs organométalliques pourraient être une stratégie appropriée pour ralentir l'élimination des chimiothérapies et pour accroître la concentration en PAs au niveau de la tumeur et/ou dans le microenvironnement des cellules cancéreuses (Torchilin, 2006; Y. Zhu et al., 2018).

En parallèle des travaux réalisés dans le chapitre II, j'ai participé à la collaboration initiée avec l'équipe Organométalliques : Matériaux et Catalyse (OMC, Institut de Chimie de Rennes, CNRS UMR6226), plus particulièrement avec C. Crévisy et M. Mauduit. Pour des raisons de confidentialité, les structures du composé (OMC-1) que j'ai utilisé ainsi que de nouveaux organométalliques récemment synthétisés et en cours d'évaluation ne seront pas décrites et seulement représentées par une nomenclature (OMC-n).

Cette première étude avait pour objectifs de déterminer les paramètres d'encapsulation de ce type de composés et d'évaluer la sensibilité des cellules issues de CHC aux complexes organométalliques.

II. METHODOLOGIE

II.1. Lignées cellulaires utilisées

Les études ont été menées sur trois lignées cellulaires humaines différentes issues de carcinomes hépatocellulaires : HepaRG, Huh7 et HepG2 (Figure 93).

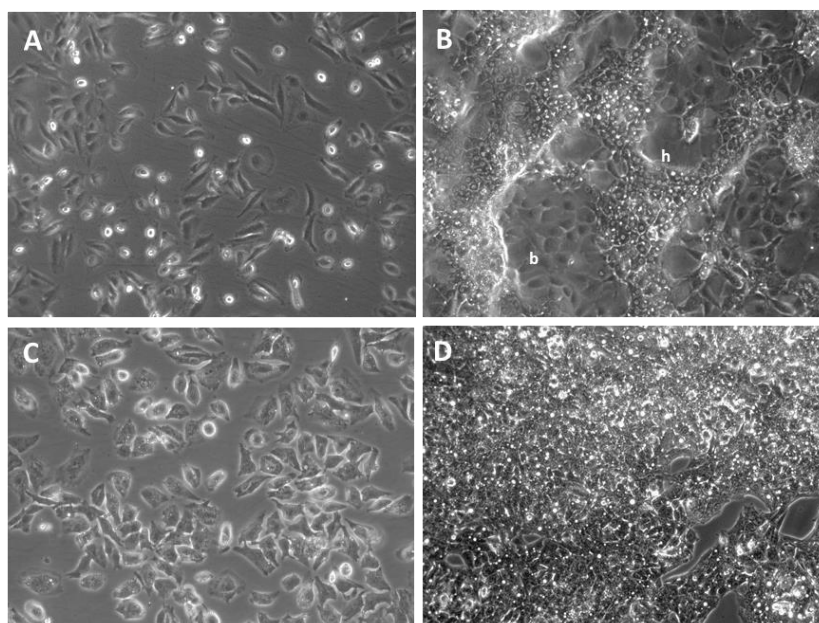


Figure 93 : Images en microscopie optique à contraste de phase des différentes lignées cellulaires
(A) Cellules HepaRG progénitrices. (B) Cellules HepaRG différenciées : cellules hépatocytaires « h » et biliaires « b ». (C) Cellules Huh7. (D) Cellules HepG2.

Les cellules HepaRG présentent la particularité d'être des progéniteurs bipotents capables, une fois arrivés à confluence, de se différencier en cellules de type hépatocytaire et cellules de type biliaire.

II.2. Formes libre et encapsulée de la molécule OMC-1

Le premier complexe organométallique à avoir été utilisé était la molécule OMC-1, un complexe d'or hydrophobe fluorescent. Son caractère hydrophobe en faisait un bon candidat pour l'encapsulation dans des nanoparticules (NPs) à base de PMLABe₇₃ ou de copolymère à blocs PEG₄₂-*b*-PMLABe₇₃, par la technique de nanoprécipitation en milieu aqueux. L'encapsulation dans le cœur des NPs devait permettre d'obtenir une excellente solubilité du complexe, mais également, permettre sa vectorisation et donc, à terme, une meilleure biodistribution *in vivo* de la molécule. Les complexes organométallique et les polymères ont été synthétisés à l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes (Equipes OMC et COrint de l'Institut des Sciences Chimiques de Rennes) par Sophie Colombel-Rouen, Marc Mauduit, Christophe Crévisy et Sandrine Cammas-Marion.

Le principe actif (PA) OMC-1 libre a été fourni sous forme de poudre : 14 mg ont été dissous dans 1,37 mL de diméthylsulfoxyde (DMSO) pour obtenir une solution mère concentrée à 10 mM. Une dilution au 1/10^{ème} a ensuite été réalisée dans du DMSO afin d'obtenir une solution de travail concentrée à 1 mM. La solution mère et la solution de travail ont été conservées au réfrigérateur. Le DMSO se solidifiant à une température inférieure à 18°C, le tube contenant la solution du composé OMC-1 est décongelé 1 à 2 minutes au bain-marie (37°C) avant de pouvoir être utilisée.

Concernant les formes encapsulées, trois lots de NPs ont été utilisés au cours des expériences, leurs caractéristiques sont résumées dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Caractéristiques des différents lots de NPs utilisés

	N° lot	Masse de polymère (mg)	Volume échantillon (µL)	Concentration en polymère (µg/mL)	Dh (nm)	Nb NPs/échantillon	Nb NPs /mL	Quantité PA ajoutée (mg)	E.E	Quantité PA encapsulée (mol)	Quantité PA encapsulée /NPs (mol)
PMLABe ₇₃ [OMC-1]	20190207	5	3500	1429	181	1,24.10 ¹²	3,54.10 ¹¹	0,5	0,67	3,27.10 ⁻⁷	2,64.10 ⁻¹⁹
	20190328	5	3380	1479	186	1,14.10 ¹²	3,38.10 ¹¹	0,5	0,67	3,27.10 ⁻⁷	2,87.10 ⁻¹⁹
	20190524	5	3350	1493	173	1,42.10 ¹²	4,24.10 ¹¹	0,5	0,58	2,83.10 ⁻⁷	2.10 ⁻¹⁹
PEG ₄₂ - <i>b</i> -PMLABe ₇₃ [OMC-1]	20190207	5	3410	1466	69	2,24.10 ¹³	6,56.10 ¹²	0,5	0,62	3,03.10 ⁻⁷	1,35.10 ⁻²⁰
	20190328	5	3370	1484	62	3,08.10 ¹³	9,15.10 ¹²	0,5	0,60	2,93.10 ⁻⁷	9,51.10 ⁻²¹
	20190524	5	3200	1563	59	3,58.10 ¹³	1,12.10 ¹³	0,5	0,43	2,10.10 ⁻⁷	5,87.10 ⁻²¹

Dh = Diamètre hydrodynamique ; E.E = efficacité d'encapsulation

Pour chaque échantillon de NPs, le nombre (Nb) de NPs a été déterminé en utilisant la formule suivante :

$$Nb \text{ de NPs} = \frac{3 \times \text{masse polymère}(\text{en g})}{1,3 \times 4 \times \pi \times \text{rayon NPs}(\text{en cm})^3}$$

Le calcul de la quantité du composé OMC-1 par NP a permis de réaliser les expériences à concentration équivalente de PA quelle que soit la forme utilisée (PA libre ou encapsulé).

II.3. Essais de captation cellulaire

II.3.1. Evaluation de la captation cellulaire par cytométrie en flux

Les cellules sontensemencées en plaques de 24 puits à la densité de 100 000 cellules/puits. Les traitements durent 24 à 72 heures et sont débutés :

- A J+1 après l'ensemencement pour les HepaRG progéniteurs et les Huh7
- A J+2 ou J+3 après l'ensemencement pour les HepG2
- Au-delà de J+30 après l'ensemencement pour les HepaRG différenciés

Pour chaque expérience, les cellules sont réparties en 4 conditions (Figure 94) :

- « CTRL »: cellules non traitées
- « PMLABe [OMC-1 à 1,64 μ M] » : cellules traitées avec les NPs PMLABe₇₃ encapsulant OMC-1
- « PEG-PMLABe [OMC-1 1,64 μ M] » : cellules traitées avec les NPs PEG_{42-b}-PMLABe₇₃ encapsulant OMC-1
- « OMC-1 libre 1,64 μ M » : cellules traitées avec la molécule OMC-1 sous forme libre

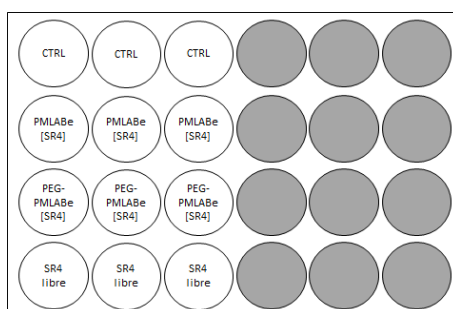


Figure 94 : Plan de plaque pour les essais de captation cellulaire

La captation a été évaluée pour une concentration en OMC-1 libre ou encapsulé de 1,64 μ M. Pour les NPs, cette concentration en PA correspond à des concentrations en polymère variant entre 25 et 40 μ g/mL selon les lots de NPs. Des résultats antérieurs de l'équipe ont montré une absence de cytotoxicité des NPs à base de PMLABe₇₃ et de PEG_{42-b}-PMLABe₇₃ entre 25 et 50 μ g/mL de polymère.

Une fois le traitement terminé, les cellules sont lavées avec un tampon salin PBS et mises en suspension. Pour les essais de captation en cinétique, les cellules sont fixées au paraformaldéhyde 4% après chaque temps d'incubation afin d'être toutes analysées simultanément à la fin du protocole. La mesure de la fluorescence émise par les cellules est réalisée par cytométrie en flux grâce au cytomètre LSR Fortessa X-20 (Becton Dickinson) disponible sur la plate-forme cytomeTRI de Biosit (Figure 95). Le fluorochrome est excité avec le laser bleu 488nm et la détection se fait avec le filtre PerCP-Cy5-5. Les résultats sont analysés avec le logiciel Flow Logic v7.2.1 (Miltenyi).

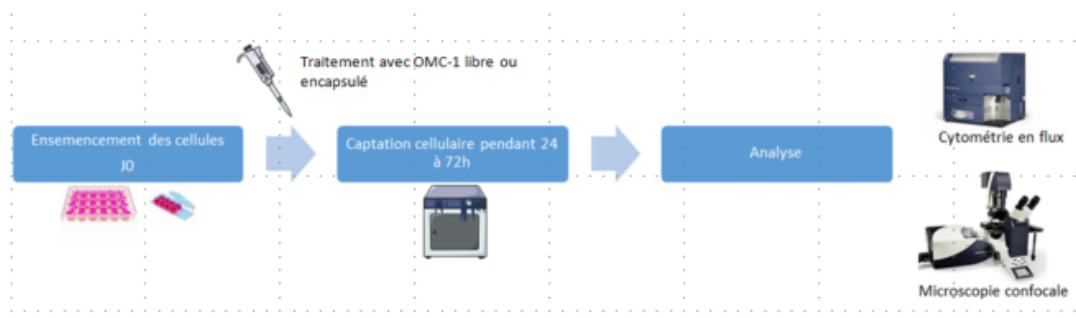


Figure 95 : Représentation schématique des différentes étapes du protocole d'évaluation de la captation cellulaire de la molécule OMC-1 sous forme libre ou encapsulée

II.3.2. Etude de la localisation cellulaire par microscopie confocale

Les cellules HepaRG progénitrices ont été ensemencées dans des Lab-Tek de 8 puits (Réf : 155411, Nunc) à la densité de 20 000 cellules/puits. Les traitements avec la molécule OMC-1 libre ou encapsulée ont démarré à J+2 après l'ensemencement. Au bout de 24h la captation a été stoppée en lavant les cellules avec un tampon salin (PBS) puis les marquages suivants ont été réalisés :

- Marquage des acides nucléiques grâce au Hoechst (Réf : 33342, ThermoScientific) : contre-colorant nucléaire émettant une fluorescence bleue en cas de liaison à l'ADN double brin.
- Marquage des lysosomes grâce au LysoTracker green (Réf : L7526, Life Technologies) : fluorochrome couplé à une base faible s'accumulant spécifiquement dans les organites acides.
- Marquage des mitochondries grâce au Mitotracker green FM (Réf : M7514, Life Technologies) : composé fluorescent sous forme oxydé qui s'accumule dans les mitochondries actives.

Les marqueurs ont été dilués dans du milieu de culture William's E (Réf : 22551-022, Gibco) sans sérum de veau foetal. Le Hoechst est utilisé à 10 µg/mL. Le LysoTracker ainsi que le Mitotracker sont utilisés à 100nM. Les cellules sont incubées en présence des marqueurs pendant 30 minutes à 37°C à l'abri de la lumière. Le milieu contenant les marqueurs est ensuite remplacé par du milieu de culture William's E complet après avoir effectué préalablement deux lavages au PBS. Les cellules doivent être conservées à l'abri de la lumière. L'observation en microscopie confocale est réalisée grâce au microscope DMI 6000 CS TCS SP8 (Leica) disponible sur la plate-forme MRic Photonics de Biosit (Tableau 9). Les images sont analysées avec le logiciel ImageJ.

Tableau 9 : Caractéristiques des marqueurs employés et lasers utilisés en microscopie confocale

Marqueurs	Excitation (nm)	Emission (nm)	Lasers utilisés
Hoechst	350	461	Diode laser - 405nm
Mitotracker Green	490	516	Laser argon – 488nm
LysoTracker Green	504	511	Laser argon – 488nm
OMC-1	468	670	Diode laser – 561nm

II.3.3. Essais de cytotoxicité

Les essais ont été menés sur des cellules HepaRG progénitrices, HepaRG différenciées et HepG2 respectivement ensemencées à 10 000, 8500 et 30 000 cellules par puits en plaques de 96 puits. Pour les HepaRG progéniteurs et les HepG2, les traitements ont été débutés le lendemain de l'ensemencement et arrêtés au bout de 48h. Concernant les HepaRG différenciés, les traitements ont été démarrés 40 jours après l'ensemencement et ont duré 72h.

Les traitements avec la molécule OMC-1 libre ou encapsulée ont été réalisés pour une gamme de concentration allant de 1 à 10 μM . Cela correspond à des concentrations en polymère comprises entre 15 et 176 $\mu\text{g/mL}$ pour les NPs PMLABe₇₃ et entre 17 et 238 $\mu\text{g/mL}$ pour les NPs PEG₄₂-b-PMLABe₇₃. Afin d'étudier une potentielle cytotoxicité relative aux polymères eux-mêmes, des NPs n'encapsulant pas de PA (NPs vides) ont été utilisées (Tableau 10). Le paracétamol à 10mM est utilisé comme contrôle positif de mort cellulaire. Deux contrôles négatifs sont mis en œuvre : *i*. Cellules non traitées, incubées dans du milieu de culture contenant de l'eau en quantité équivalente au volume de NPs le plus important utilisé dans l'expérience, *ii*. Cellule non traitées, incubées dans du milieu de culture contenant le même pourcentage de DMSO que les cellules traitées par le composé OMC-1 libre.

Tableau 10 : Caractéristiques des NPs vides

	N° lot	Masse de polymère (mg)	Volume échantillon (μL)	Concentration en polymère ($\mu\text{g/mL}$)	Dh (nm)	Nb NPs/échantillon	Nb NPs/mL
PMLABe ₇₃ vides	20190412	5	3385	1477	130	$3,35 \cdot 10^{12}$	$9,88 \cdot 10^{11}$
	20190524	5	3450	1449	148	$2,27 \cdot 10^{12}$	$6,57 \cdot 10^{11}$
PEG ₄₂ -b-PMLABe ₇₃ vides	20190412	5	3460	1445	96	$8,31 \cdot 10^{12}$	$2,40 \cdot 10^{12}$
	20190524	5	3400	1471	85	$1,20 \cdot 10^{13}$	$3,52 \cdot 10^{12}$

A l'issue du traitement, les cellules ont été lavées au PBS puis 100 μL de milieu William's E sans rouge de phénol (Réf : A12176-01, Gibco) ont été introduits dans chaque puits. La mesure de la viabilité cellulaire a été réalisée grâce au kit CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Réf : G7571, Promega) en suivant le protocole du fournisseur. L'évaluation de la viabilité cellulaire est basée sur la quantification de l'Adénosine Tri-Phosphate (ATP) cellulaire, signe de la présence de cellules métaboliquement actives. Le kit permet de lyser les cellules puis la réaction de la luciférine avec l'ATP catalysée par la luciférase induit un signal lumineux corrélé à la quantité d'ATP présent (Figure 96). L'intensité du signal est mesurée grâce au lecteur de micro-plaques POLARstar Omega® (BMG Labtech). La quantité d'ATP est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes en culture.

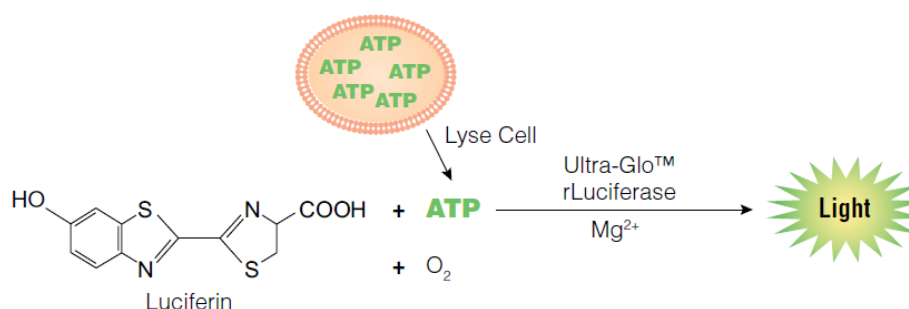


Figure 96 : Principe de la réaction luciférine/luciférase générant un signal lumineux corrélé à la viabilité cellulaire D'après le manuel technique du laboratoire Promega.

II.3.4. Analyse des données

Les analyses statistiques et graphiques sont effectuées avec le logiciel Prism 5.0® (Graph Pad Software). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart-type. Les résultats obtenus pour la molécule OMC-1 libre sont comparés avec les résultats obtenus pour les NPs chargées en OMC-1 grâce à un test de Kruskal-Wallis et d'un post-test de Dunn's. Une différence est considérée comme statistiquement significative avec une $p_{\text{value}} < 0,05$ (* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$).

III. RESULTATS

III.1. Captation cellulaire de la molécule OMC-1 sous forme libre ou encapsulée

III.1.1. Captation sur 24h

Dans un premier temps, la captation du composé OMC-1 (libre ou encapsulé) par différentes lignées cellulaires d'hépatome a été évaluée à l'issue d'un traitement de 24h. Les résultats (Figure 97) montrent que : *i.* Le complexe libre est mieux capté par les lignées Huh7 et HepG2 que lorsqu'il est encapsulé dans les NPs quel que soit le (co)polymère les constituant, *ii.* Les NPs à base de PMLABe₇₃ encapsulant le complexe d'or sont légèrement mieux captées par les cellules HepaRG différenciées et progénitrices que par les cellules Huh7 et HepG2 (Figure 97A), *iii.* La présence de la couronne hydrophile de PEG diminue fortement la captation des NPs par toutes les lignées cellulaires étudiées en accord avec l'effet de « furtivité » apporté par le PEG et décrit dans le chapitre I.

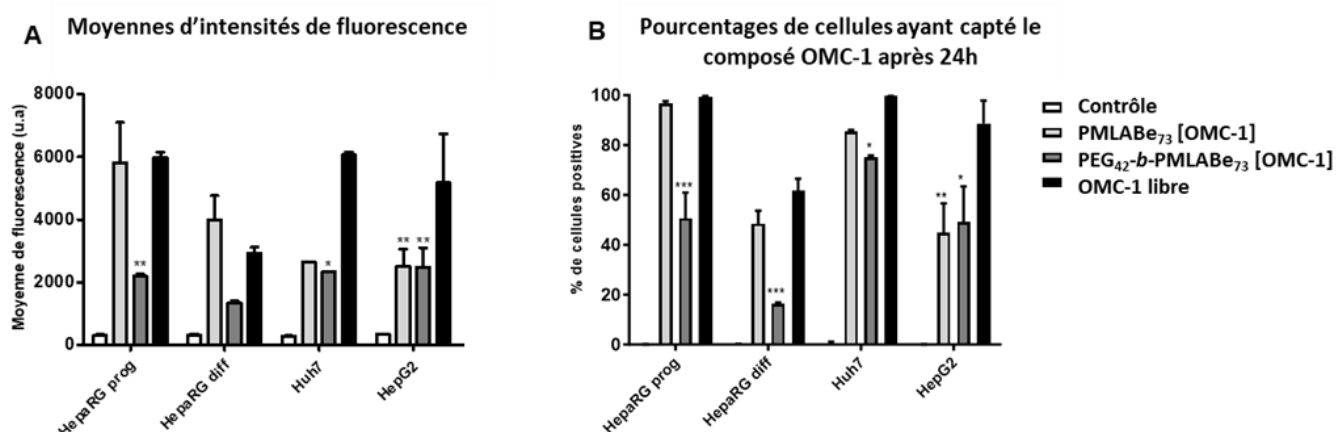


Figure 97 : Résultats des analyses par cytométrie en flux des cellules incubées avec les NPs chargées en composé OMC-1 et avec la molécule libre pendant 24 heures

Quatre types cellulaires ont été utilisés : HepaRG progéniteurs (n=6), HepaRG différenciés (n=6), Huh7 (n=3) et HepG2 (n=6). (A) Moyenne de l'intensité de fluorescence reflétant la quantité de molécule OMC-1 captée par les cellules. (B) Pourcentage de cellules positives en fluorescence c'est-à-dire les cellules ayant capté le composé OMC-1.

III.1.2. Cinétique de captation

Nous avons ensuite évalué la cinétique de captation des NPs chargées en complexe d'or et du complexe d'or libre par les cellules HepaRG progénitrices, HepaRG différenciées et HepG2 (Figure 98). Les cellules ont été traitées pendant 24, 48 et 72h. Les NPs PMLABe₇₃[OMC-1] sont captées plus rapidement et efficacement que le complexe d'or libre par les cellules HepaRG (progénitrices et différenciées) alors que le contraire est observé avec les cellules HepG2. Pour les cellules HepaRG, la captation des NPs PMLABe₇₃[OMC-1] continue à augmenter au-delà de 24h tandis que la captation a tendance à se stabiliser pour les NPs PEG₄₂-b-PMLABe₇₃[OMC-1] et le composé OMC-1 libre après 24h de traitement.

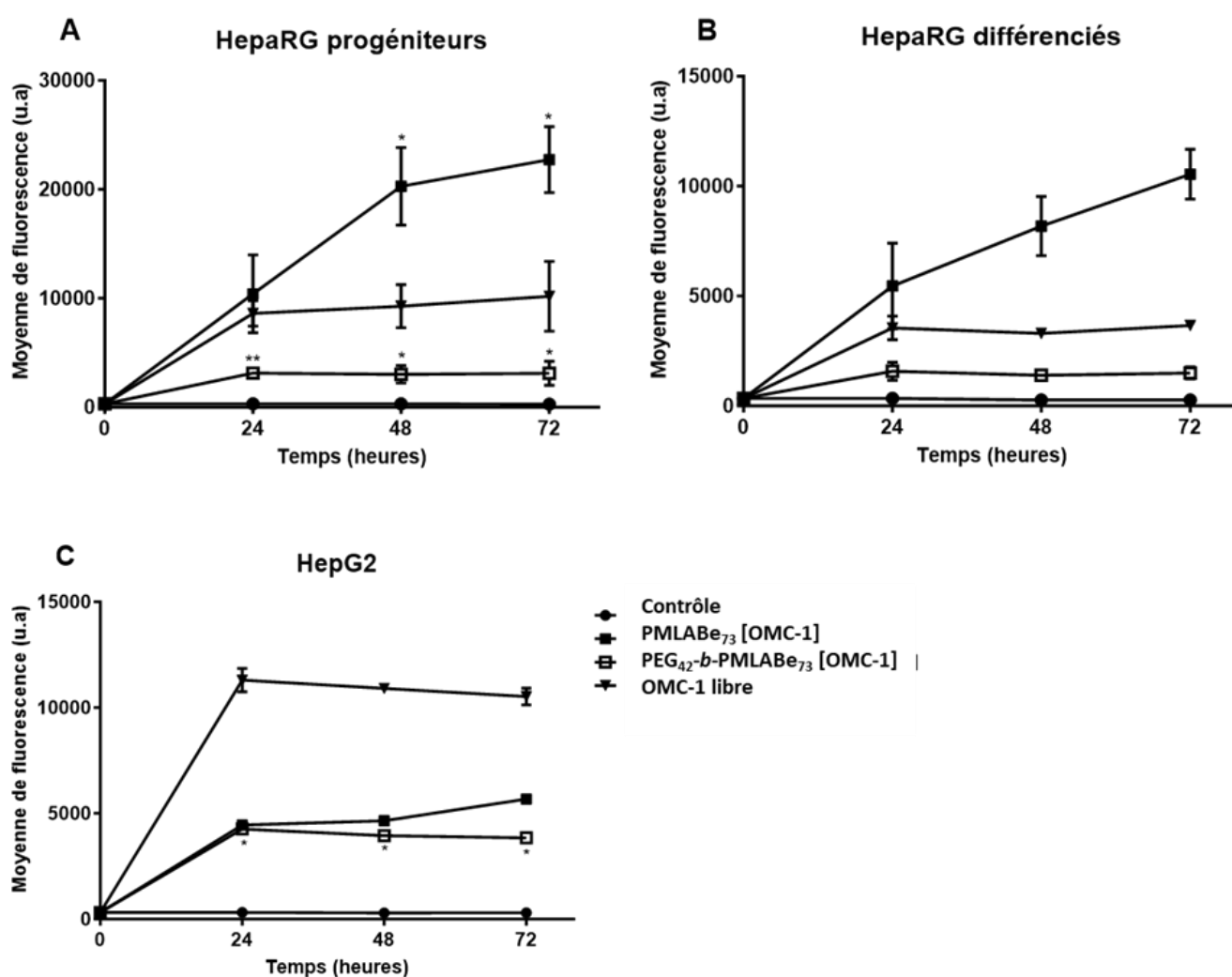


Figure 98 : Résultats des essais de captation des NPs chargées en OMC-1 et du OMC-1 libre

Les cellules ont été traitées pendant 24, 48 et 72h. L'intensité de fluorescence émise par les cellules a été mesurée par cytométrie en flux. Les essais de captation ont été réalisés sur des cellules (A) HepaRG progénitrices (n=9), (B) HepaRG différenciées (n=6) et (C) HepG2.

Après 72h d'incubation avec les NPs PMLABe₇₃[OMC-1], les nuages de points bi-paramétriques des cellules HepaRG progénitrices indiquent une augmentation de la valeur du paramètre side-scatter (SSC), c'est-à-dire l'indice de structure/granularité, ce qui pourrait correspondre à l'accumulation de NPs PMLABe₇₃ [OMC-1] dans les cellules (Figure 99B). Les images prises en microscopie par contraste de phase montrent que la densité cellulaire est diminuée lorsque que les cellules sont traitées avec le complexe d'or (Figure 99B, C et D) par rapport à la condition contrôle (Figure 99A) mais que la morphologie des cellules ne semble pas être modifiée sous l'effet des traitements. Ces observations sont des arguments en faveur d'un effet anti-prolifératif de la molécule OMC-1.

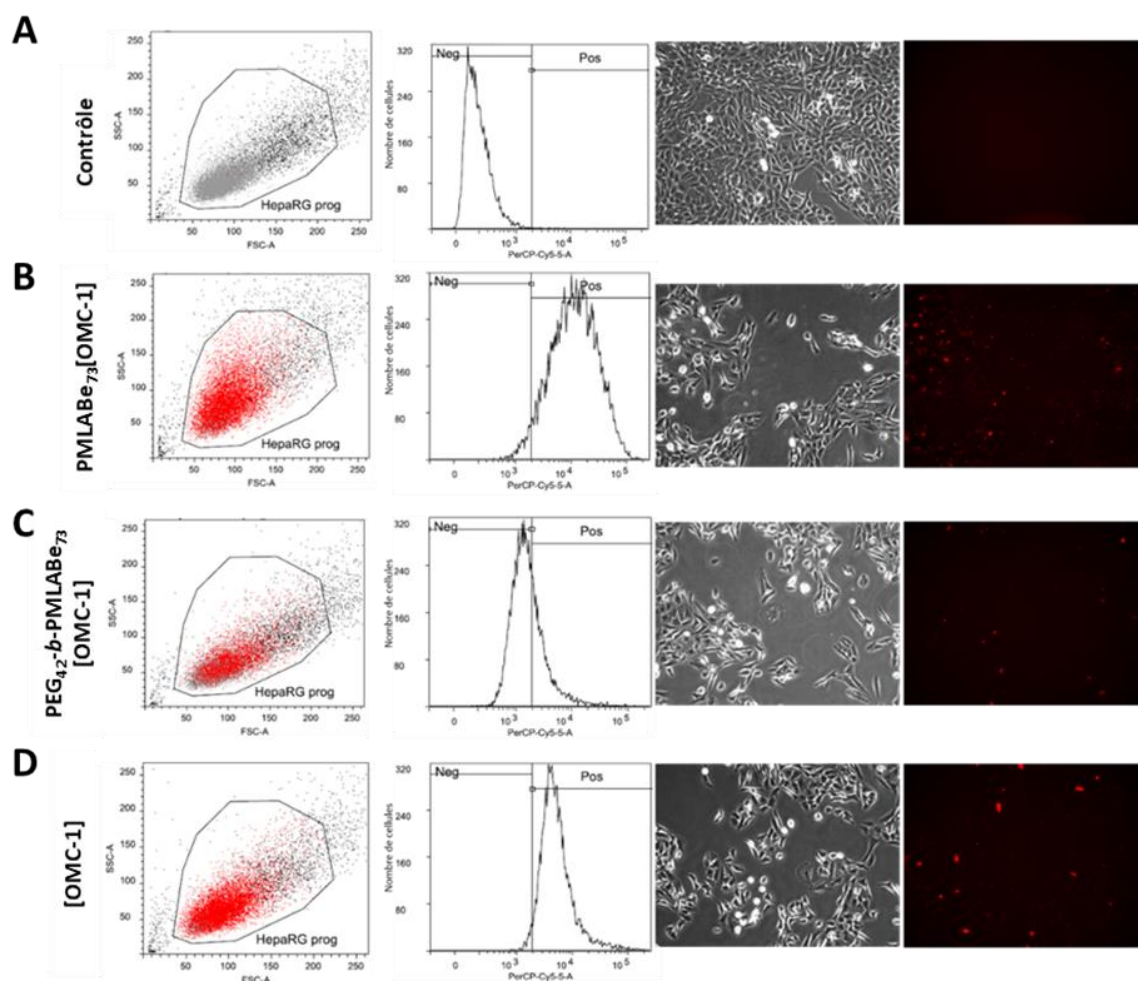


Figure 99 : Signaux obtenus par cytométrie en flux et images de microscopie correspondantes (contraste de phase et fluorescence) après 72h de traitement sur des cellules HepaRG progénitrices

(A) La condition « contrôle » correspond à des cellules HepaRG progénitrices incubées sans aucun traitement (ni NPs, ni OMC-1). Pour les autres conditions expérimentales, les cellules HepaRG progénitrices ont été incubées pendant 72 heures avec (B) des NPs PMLABe₇₃ chargées en OMC-1, (C) des NPs PEG₄₂-b-PMLABe₇₃ chargées en OMC-1 ou (D) le composé OMC-1 libre.

III.1.3. Localisation intra-cellulaire

Des cellules HepaRG différenciées ont été traitées avec le complexe d'or libre ou chargé dans des NPs puis transmises à la plate-forme ImPACcell (Biosit, Rennes) pour l'analyse par microscopie à fluorescence. L'observation de ces cellules à la fin de la période de 48h de traitement (Figure 100)

montre qu'une partie du composé OMC-1 précipite dans le milieu, visible sous forme d'agrégats fluorescents. Par contre, la forme encapsulée de ce complexe dans les NPs à base de PMLABe₇₃ est détectée préférentiellement dans les cellules hépatocytaires, les cholangiocytes étant beaucoup plus faiblement marqués. Le signal obtenu avec les NPs PEG₄₂-b-PMLABe₇₃[OMC-1] est moins intense dans le cytoplasme des cellules, en accord avec le signal de fluorescence mesuré par cytométrie en flux (Figure 99C).

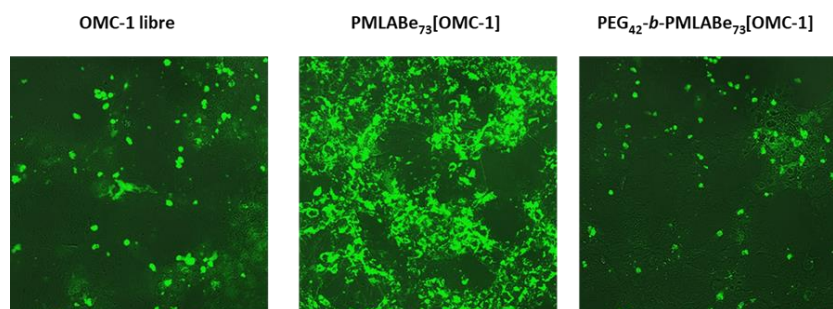


Figure 100 : Localisation de la fluorescence de la molécule OMC-1 (vert) dans les cellules HepaRG différenciées après 48h de traitement

Afin d'affiner la localisation du complexe d'or, une étude préliminaire a été réalisée en microscopie confocale sur des cellules HepaRG progénitrices traitées pendant 24h avec le composé OMC-1 libre ou chargé dans des NPs. La superposition des images obtenues permet de visualiser la localisation des NPs chargées en complexe d'or et le complexe d'or seul (coloration rouge) (Figure 101).

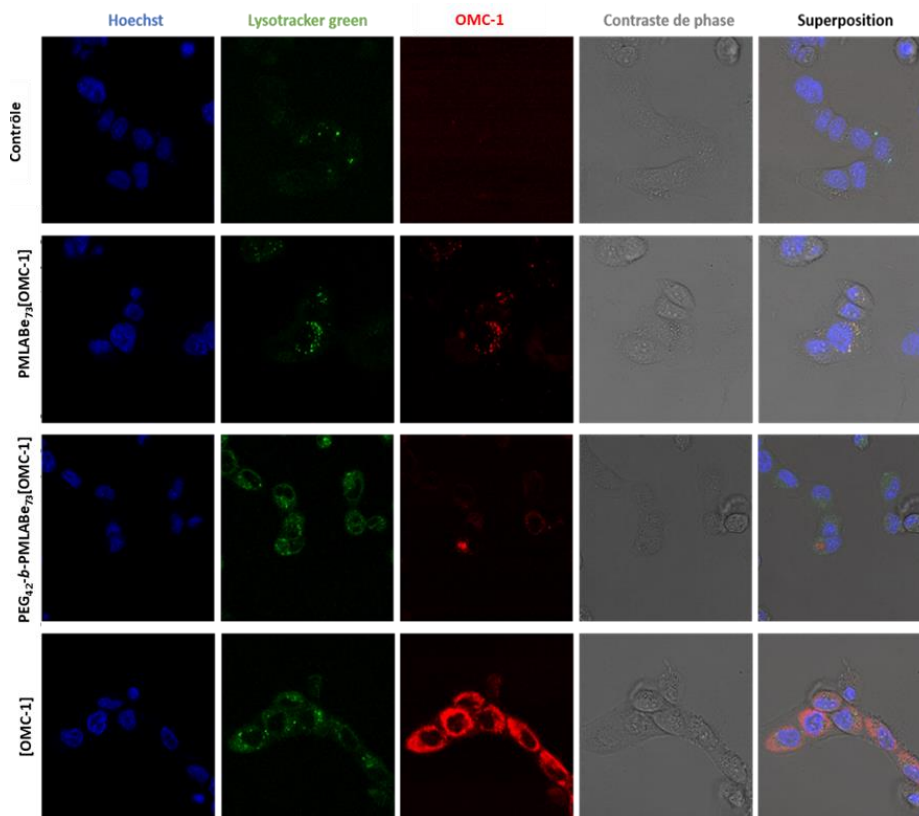


Figure 101 : Images obtenues par microscopie confocale des cellules HepaRG progénitrices après 24h d'incubation

Les images montrent que la molécule OMC-1 libre ou encapsulée a été internalisée dans les cellules par sa visualisation en coloration rouge autour des noyaux bleus. Par ailleurs, pour les cellules incubées avec les NPs PMLABe₇₃ chargées en complexe d'or, un signal jaune est observé traduisant la colocalisation des signaux verts (lysosomes) et des signaux rouges (OMC-1). Les images de la Figure 101 semblent mettre en évidence que : *i.* les NPs PEG₄₂-*b*-PMLABe₇₃[OMC-1] ne soient que très peu captées par ces cellules (confirmation des résultats obtenus par cytométrie en flux), *ii.* les NPs PMLABe₇₃[OMC-1] soient localisées dans les lysosomes des cellules HepaRG, *iii.* le complexe d'or seul soit localisé de façon diffuse dans le cytoplasme de ces cellules.

En parallèle, un marquage des mitochondries à l'aide du réactif mitotracker vert a été réalisé après avoir traité des cellules HepaRG progéniteurs pendant 24h avec le complexe d'or libre ou encapsulé. Les images obtenues en microscopie confocale (Figure 102) ne mettent pas en évidence de colocalisation entre le composé OMC-1 et les mitochondries.

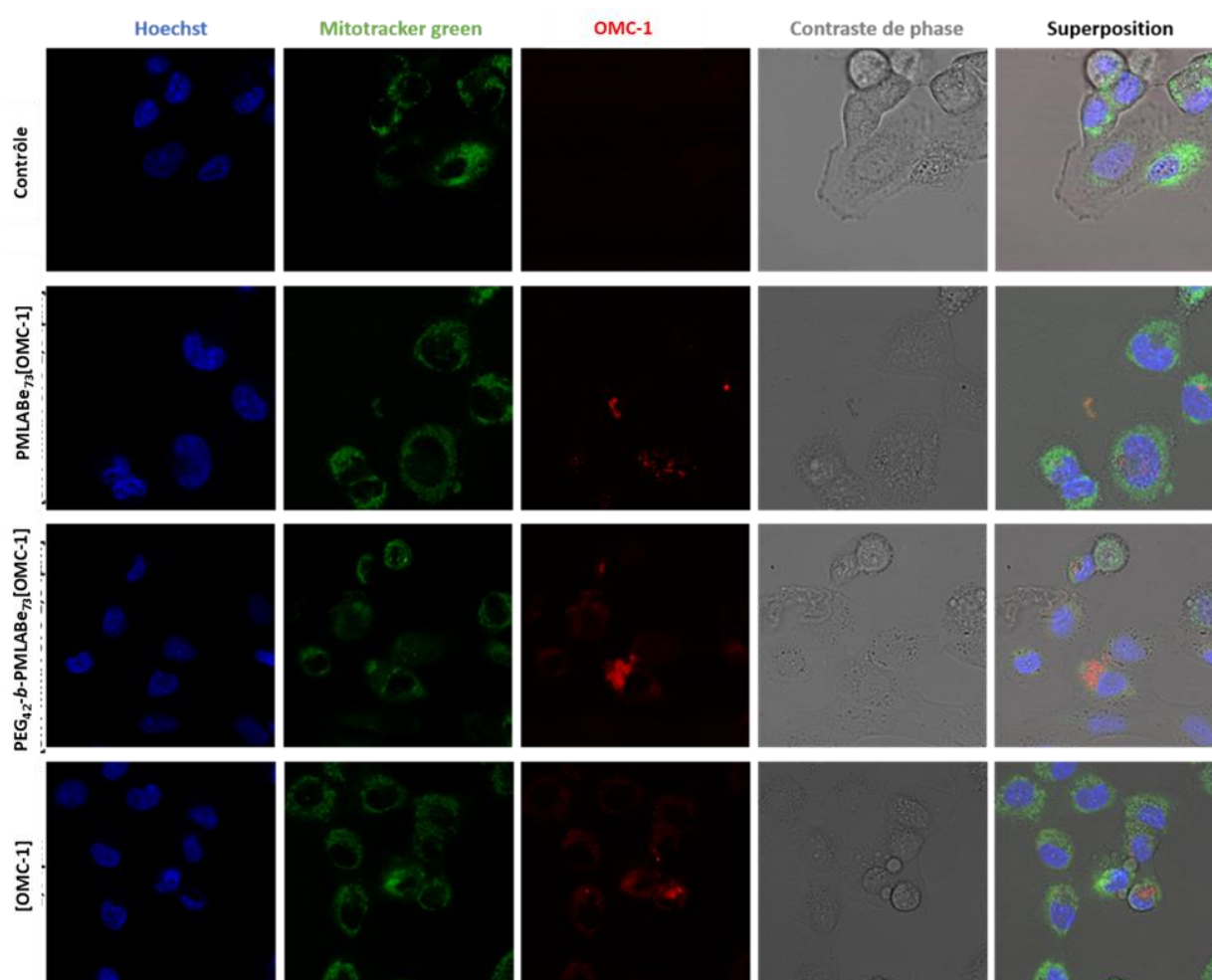


Figure 102 : Images obtenues par microscopie confocale des cellules HepaRG progénitrices après 24h d'incubation

III.2. Evaluation de la cytotoxicité induite par la molécule OMC-1 libre ou encapsulée

III.2.1. Test de viabilité cellulaire

Sur l'ensemble des modèles cellulaires étudiés, le complexe d'or libre semble plus cytotoxique que les formes encapsulées (Figure 103). Cependant la faible solubilité du produit induit la formation d'agrégats insolubles qui pourraient accentuer l'effet toxique observé sur les cellules. Par ailleurs, les résultats obtenus montrent que le complexe d'or libre ou chargé dans des NPs affecte de manière très différente la viabilité des cellules HepaRG progénitrices et différenciées (Figure 103A et C). En effet, lorsque les cellules sont incubées avec le complexe d'or à 10 μM encapsulé dans des NPs, la viabilité des HepaRG progéniteurs diminue aux alentours de 20 à 30% tandis que les HepaRG différenciés, pourtant traités 24 heures de plus, conservent une viabilité d'environ 70%. Les HepaRG progéniteurs étant des cellules très proliférantes, cette observation pourrait être en faveur d'un effet du complexe d'or sur la prolifération cellulaire. Pour étudier cet effet potentiellement anti-prolifératif, des analyses de cycle cellulaire par cytométrie en flux et des expériences d'incorporation de 5, bromo-desoxyuridine (BrdU) sont notamment envisagées

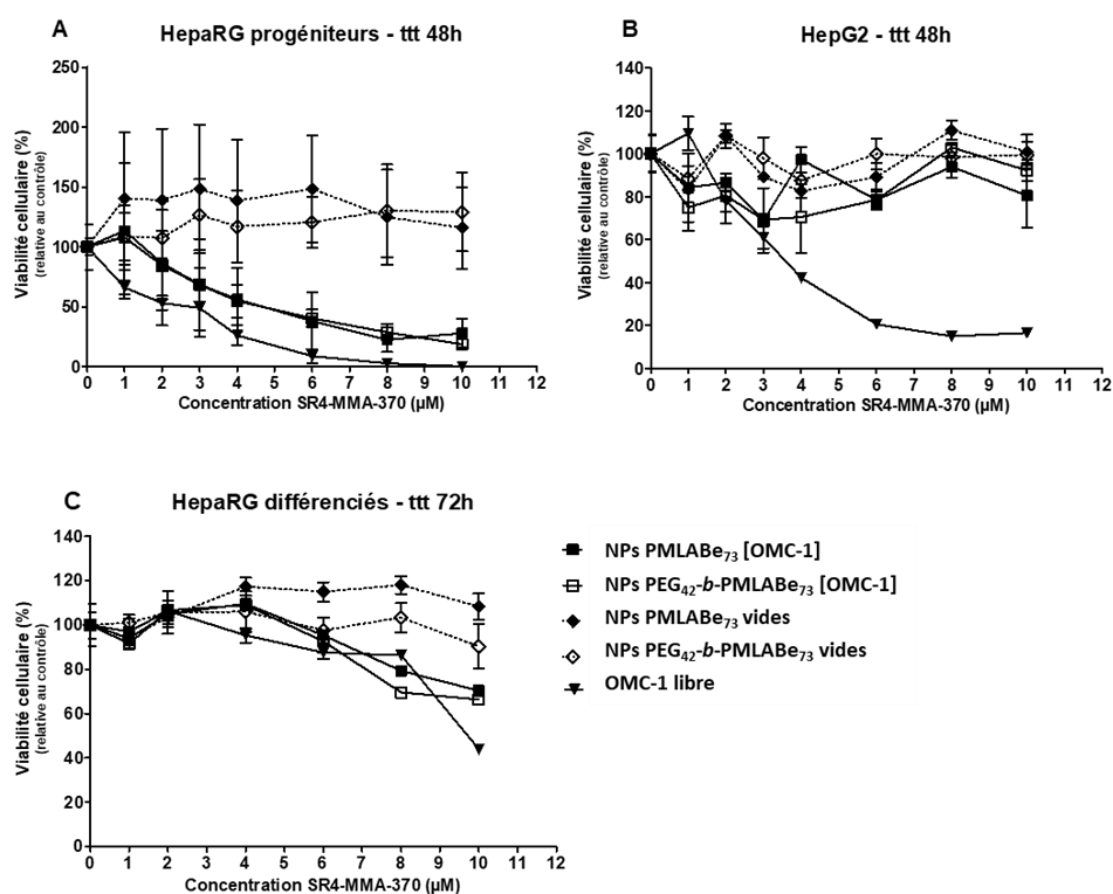


Figure 103 : Résultats du test de cytotoxicité in vitro après 48 à 72 heures d'incubation

Les mesures de viabilité cellulaire ont été réalisées sur des cellules (A) HepaRG progénitrices (n=6), (B) HepG2 (n=3) et (C) HepaRG différenciées (n=3) avec les NPs vides, les NPs chargées en OMC-1 et le composé OMC-1 libre.

III.2.2. Phalloïdine et CYP3A4

Le marquage des fibres d'actine par la phalloïdine a permis de mettre en évidence une modification de l'organisation du cytosquelette des cellules HepaRG différenciées avec le composé OMC-1 libre et encapsulé. Nous avons observé que le complexe d'or seul, à forte concentration, précipite dans le milieu de culture et induit la formation de fibres de stress qui pourrait expliquer l'effet cytotoxique détecté aux fortes concentrations. Il est également observé que le complexe d'or seul induit une dilatation des canalicules biliaires au niveau des hépatocytes et cela dès la dose de 1 μ M (Figure 104). Concernant les formes encapsulées, il nous faut définir si les NPs vides modifient ces structures.

Concernant l'expression du CYP3A4, l'évaluation de l'intensité de fluorescence est difficile car elle se superpose à la fluorescence du OMC-1 libre ou encapsulé.

En revanche, le comptage des noyaux ne montre pas de réduction du nombre des cellules aux doses testées et sont en accord avec les résultats du test ATP.

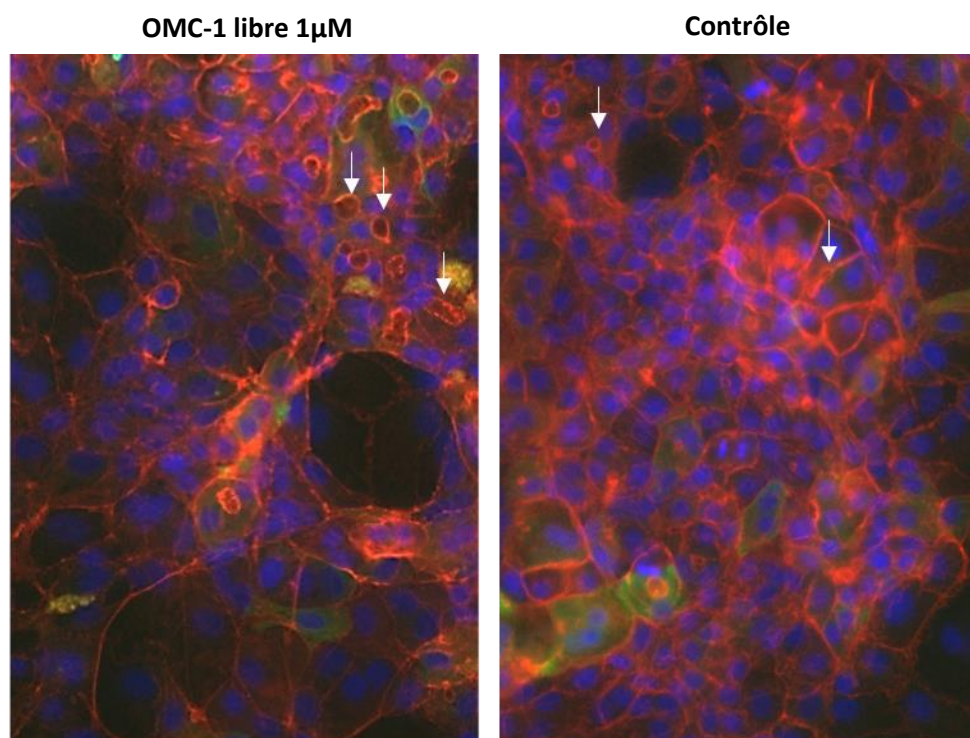


Figure 104 : Images obtenues par microscopie des cellules HepaRG différenciées après 48h d'incubation
Marquage phalloïdine (rouge), marquage cytochrome P4503A4 (vert), noyau (bleu). Les canalicules biliaires sont indiqués à l'aide de flèches blanches. Les marquages et images ont été réalisées sur la plateforme ImpACcell.

IV. DISCUSSION ET PERSPECTIVES EXPERIMENTALES

Dans cette étude, notre but était d'initier des essais d'encapsulation de PAs pouvant avoir des effets cytotoxiques et/ou cytotatiques. Dans des travaux antérieurs, l'encapsulation de doxorubicine dans les NPs de PMLABe₇₃ et PEG₄₂-b-PMLABe₇₃ avait été réalisée et avait permis d'induire une cytotoxicité

globalement équivalente à celle de la doxorubicine libre dans des cultures de cellules hépatiques Huh7 (Huang et al., 2012). Cependant, la doxorubicine encapsulée dans ce type de NPs diffusait des NPs avec un effet « *burst* », dans une proportion importante puisque près de 50% du composé était libéré des NPs dans une solution saline isotonique en moins de 10h. Ce phénomène est probablement dû au caractère amphiphile de la doxorubicine dont une petite proportion s'intègre dans la couronne de PEG des NPs qui donc rapidement libérée dans le milieu extérieur (Loyer et al., 2013).

L'un des intérêts des NPs est de pouvoir encapsuler des molécules plus lipophiles et dont l'administration sous forme libre en solution injectable serait difficile du fait de leur faible solubilité en phase aqueuse. Ceci pourrait permettre d'évaluer l'intérêt thérapeutique de molécules dont les caractéristiques physico-chimiques tendent à les exclure d'une application médicale alors que certaines peuvent présenter des effets biologiques intéressants.

Parmi les thèmes de l'équipe, des travaux portent sur l'étude de l'homéostasie des métaux et en particulier du fer mais également sur l'utilisation diagnostique et thérapeutique d'autres métaux. En effet différents métaux, notamment les terres rares et les métaux de transition, sont de plus en plus utilisés comme isotopes stables pour créer des PAs cytotoxiques ou comme radionucléides pour des applications en imagerie et en thérapie en oncologie. Les thérapies à base de métaux sont, sans aucun doute, des approches prometteuses pour les applications cliniques dans la thérapie vectorisée du cancer lorsqu'elles sont combinées à des molécules de synthèse, des NPs ou des microsphères qui permettent un adressage préférentiel au site tumoral.

Notre collaboration avec l'Institut des Sciences Chimiques de Rennes (ISCR), dont l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes fait partie, nous a conduit à développer différents composés organométalliques, avec ce premier exemple de la molécule OMC-1. Cette étude « pilote » avec une molécule lipophile contenant de l'or avait été choisie également pour sa propriété de fluorescence qui permettait une visualisation simple de la molécule dans les cellules en s'affranchissant de l'utilisation d'un composé comme le DiDoil utilisé pour détecter les NPs dans nos études précédentes. Cette stratégie a bien fonctionné puisque le composé OMC-1 est efficacement encapsulé dans les NPs de PMLABe₇₃ et leur variante PEGylée. Par ailleurs, la fluorescence du composé OMC-1 permet bien d'évaluer l'internalisation des NPs par les cellules en cytométrie et de les visualiser en microscopie à fluorescence.

Cette étude nous a également conduit à nous poser la question des quantités de PA présentes dans les milieux de culture des cellules sachant que les diamètres hydrodynamiques des NPs ne sont pas équivalents et que les taux d'encapsulation ne sont pas non plus identiques entre les NPs non PEGylées et PEGylées, et même pour un même type de NPs entre deux lots différents. Aussi, une quantification précise de la quantité de PA par quantité de (co)polymères et de NPs a été réalisée afin de permettre une comparaison plus directe des effets cytotoxiques observés entre les traitements par le composé OMC-1 sous forme libre (non-encapsulée) et encapsulée.

Nos résultats ont montré, à nouveau, que les NPs non-PEGylées étaient mieux captées que celles qui étaient formulées à partir du copolymère PEG₄₂-*b*-PMLABe₇₃. L'utilisation d'un composé fluorescent a permis également de montrer que les cellules HepaRG incubées avec la molécule libre présentaient une fluorescence plus faible que celles incubées avec le composé encapsulé dans les NPs de PMLABe₇₃. Pour les cellules HepG2, l'inverse est observé avec une fluorescence plus élevée dans les cellules incubées avec la molécule OMC-1 libre. Ces résultats pourraient cependant s'expliquer par l'observation que nous avons faite dans plusieurs autres expériences, à savoir que les cellules HepaRG, progénitrices et différenciées, captent plus efficacement les NPs produites à partir de PMLABe₇₃ que les cellules HepG2.

Nous avons également montré que la molécule OMC-1, sous une forme non-encapsulée, induisait une cytotoxicité dans les cellules HepaRG proliférantes et les cellules HepG2 avec des IC_{50} d'environ 2 à 4 μM pour une seule exposition aiguë. Par contre, pour les cellules HepaRG différenciées quiescentes, l' IC_{50} est nettement plus élevée aux alentours de 10 μM , suggérant que la cytotoxicité serait plus importante sur des cellules en division active, à moins que les capacités métaboliques des cellules hépatocytaires HepaRG ne catabolisent la molécule OMC-1 réduisant ainsi son potentiel cytotoxique.

De façon intéressante, la plus forte cytotoxicité de la molécule OMC-1 sous forme encapsulée est observée pour les cellules HepaRG proliférantes qui captent le plus efficacement les NPs formulées à partir de PMLABe₇₃. Cependant, il était surprenant d'observer une cytotoxicité quasi-équivalente dans les cellules incubées avec les NPs de copolymère PEG₄₂-*b*-PMLABe₇₃ alors que ces NPs sont beaucoup moins bien captées que les NPs non-PEGylées. La même observation est faite pour les cellules HepaRG différenciées. Par contre, la molécule OMC-1 encapsulée n'induit qu'une très faible toxicité dans les cellules HepG2 sans différence significative entre les NPs non-PEGylées ou PEGylées qui sont d'ailleurs captées de façon assez similaire par les deux types cellulaires. A partir de ces données préliminaires, il peut être fait l'hypothèse que la cytotoxicité de la molécule OMC-1 sous forme encapsulée ne résulte pas uniquement de toxicité intrinsèque du composé lui-même, puisque les IC_{50} dans les deux types cellulaires HepaRG proliférant et HepG2 sont proches. La cytotoxicité pourrait également résulter de la capacité des cellules à capter les NPs et, peut être, de la libération du composé à partir des NPs puisque nous ne possédons pas d'éléments permettant d'affirmer que le composé est libéré de façon équivalente à partir des NPs produites avec le polymère PMLABe₇₃ et le copolymère PEG₄₂-*b*-PMLABe₇₃. Par ailleurs, le diamètre hydrodynamique des NPs de PMLABe₇₃[OMC-1] est significativement plus élevé que celui des NPs de PEG₄₂-*b*-PMLABe₇₃[OMC-1] (180 nm *versus* 65 nm), ce qui est en faveur d'une plus grande stabilité des NPs sous l'effet du PEG et, potentiellement, d'une diffusion et/ou libération plus difficile du composé OMC-1 dans les NPs PEGylées.

Le fait que nous ayons une cytotoxicité équivalente avec la molécule libre et les formulations de NPs PMLABe₇₃[OMC-1] est un résultat encourageant puisqu'il ne s'agissait pas tant d'un objectif d'accroître la cytotoxicité de la molécule OMC-1 que de mettre au point une formulation encapsulée cytotoxique qui génèrera très probablement une biodistribution et une biodisponibilité très différentes de celles de la molécule libre *in vivo*. De plus, ces résultats de cytotoxicité ont été obtenus avant que nous ne disposions de NPs fonctionnalisées par le GBVA10-9 et le CPB. Il sera donc important de tester de nouvelles formulations encapsulant le composé OMC-1 et d'évaluer la réponse cytotoxique sur des expositions plus longues et chroniques, mimant les traitements réitérés chez les patients. Par ailleurs, il serait important d'étudier si l'effet biologique du composé repose sur un mécanisme cytostatique ou de mort cellulaire. L'hypothèse d'une altération du statut redox et d'un éventuel stress oxydatif peut être proposée, comme nous l'avons observé pour d'autres traitements avec d'autres métaux que l'or, comme le fer et le manganèse, *in vivo* (Desmots et al., 2002) et *in vitro* (Petitjean et al., 2023).

Dans le cadre de notre collaboration avec l'ISCR, d'autres composés organométalliques ont été synthétisés (OMC-2 et OMC-3) présentant des structures chimiques et des métaux différents qui sont en cours d'évaluation mais pour lesquels nous observons des cytotoxicités plus fortes avec des $IC_{50} < 1 \mu M$.

Nous avons également évalué des complexes nickel-bis(dithiolène) qui sont des absorbeurs stables dans le proche-infrarouge et présentent des propriétés photothermiques remarquables sous irradiation qui peuvent être exploitées pour détruire des cellules tumorales avec une délivrance contrôlée de principes actifs à partir de NPs polymère ou de liposomes (Ciancone et al., 2019).

Les objectifs de notre projet sont donc maintenant de continuer à exploiter les propriétés photothermiques des complexes dithiolène pour faire de la thérapie photothermique sous irradiation

dans la région du proche infrarouge NIR-II ($\lambda = 1\ 000\text{--}1\ 600\ \text{nm}$) et d'accroître les efficacités de ciblage en utilisant des peptides hépatotropes. Contrairement à la fenêtre NIR-I (700-1 000 nm), la fenêtre NIR-II offre des profondeurs de pénétration tissulaire plus importantes et des valeurs d'exposition laser permises plus élevées. Or, les complexes or-bis(dithiolène), qui n'ont pas encore été étudiés à l'heure actuelle, absorbent exactement dans cette fenêtre de longueurs d'onde. Ce projet a pour but maintenant de développer de nouvelles NPs polymères biocompatibles contenant des complexes or-bis(dithiolène) pour la thérapie photothermique (PTT), des fluorophores pour la bioimagerie et des fonctions de ciblage peptidiques des cellules tumorales.

DISCUSSION GENERALE

Le carcinome hépatocellulaire (CHC), la tumeur hépatique prédominante dans le monde, appartient au groupe des cancers de mauvais pronostic (CMP, médiane de survie < à 33% à 5 ans). Les difficultés dans le traitement des CHC sont liées au diagnostic souvent tardif, la diversité des « profils » moléculaires et métaboliques, la forte hétérogénéité intra-tumorale et la grande résistance aux thérapies. Une fraction des patients est éligible à des chirurgies curatives aux stades précoces de la maladie. Pour la plupart des patients, des traitements palliatifs sont proposés, qui ne montrent qu'une faible amélioration de la survie globale avec des effets secondaires parfois graves.

Dans ce contexte, les associations caritatives telles que la Fondation ARC pour la recherche sur le cancer et la Ligue Contre le Cancer, les Cancéropôles et l'Institut National du Cancer (INCA) lancent régulièrement des appels d'offres dans le domaine des CMP, incluant le CHC et le cholangiocarcinome intra-hépatique. Ces programmes visent à améliorer les connaissances et à proposer de nouvelles solutions pour prévenir et traiter les CMP. De plus, ces financements visent à promouvoir et labelliser des réseaux de recherche spécialisés sur ces cancers. Notre laboratoire participe à ces programmes par des projets qui ont été financés par La Ligue Contre le Cancer, le Cancéropôle Grand-Ouest, La Fondation pour la Recherche Médicale et l'INCA. Me concernant, j'ai également bénéficié d'un financement de l'ARC pour réaliser une thèse de Sciences dans le domaine de la vectorisation et du ciblage du CHC.

Au début du XX^{ème} siècle, Paul Ehrlich, prix Nobel de médecine en 1908, imagine le concept de « *magic bullet* » reposant sur l'utilisation d'agents thérapeutiques capables de cibler et détruire spécifiquement un pathogène ou une cellule cancéreuse sans affecter les cellules saines de l'hôte. Ce médecin Allemand faisait, à cette époque, référence à l'observation de fixations spécifiques de certaines molécules, comme des colorants, sur des structures cellulaires données, qu'il élargissait au concept de médicaments qui cibleraient préférentiellement certains tissus. Depuis les années 1970, la théorie se concrétise grâce au développement des thérapies ciblées et des nanovecteurs permettant d'acheminer un principe actif (PA) de manière spécifique vers son site d'action. L'application des nanotechnologies à la médecine, représente aujourd'hui un domaine en plein essor, à l'interface entre chimie, physique et biologie. L'utilisation de la nanomédecine est particulièrement intéressante en cancérologie, domaine dans lequel les nanovecteurs peuvent permettre de protéger des PAs du catabolisme et de libérer de fortes concentrations de PA au niveau d'un site tumoral tout en limitant la toxicité pour les tissus sains. Cette approche est notamment séduisante pour les cancers résistants à la chimiothérapie tels que le CHC.

La vectorisation de PAs par des nanovecteurs vise donc à cibler le plus spécifiquement possible les cellules tumorales en limitant l'impact sur les cellules saines. Trois formes de ciblage thérapeutique des cellules tumorales ont été présentées dans ce manuscrit : le ciblage passif, le ciblage actif et l'activation *via* un stimulus extérieur. Cependant, l'emploi de la vectorisation des principes actifs en thérapie anticancéreuse s'associe à plusieurs défis qui, à ce jour, restreignent l'efficacité des formulations nanomédicales dont nous disposons dans le domaine de l'oncologie. Ces principaux « *challenges* » sont liés en premier lieu à l'efficacité du ciblage tumoral, réduit par de multiples barrières biologiques en particulier dans le cas d'injection systémique des nanovecteurs, et dans un second niveau à l'évaluation toxicologique des NPs.

Les barrières biologiques du ciblage tumorale par les NPs peuvent être définies comme tous les « *obstacles* » physiques et biologiques réduisant l'adressage des NPs au site tumoral. L'interaction entre les NPs et le système immunitaire est liée au mode d'administration des nanovecteurs qui peut

être réalisé, dans certains protocoles, par injection intra-tumorale ou *via* les vaisseaux irrigant la tumeur. Plus généralement, les NPs sont conçues pour être administrées par voie intraveineuse. L'injection des NPs dans le sang est immédiatement suivie de leur opsonisation par les protéines plasmatiques incluant les immunoglobulines, les protéines du complément et de multiples protéines sériques très abondantes. Ce mécanisme faciliterait la reconnaissance des NPs par les cellules du système phagocytaire mononucléaire puis leur phagocytose, limitant ainsi la distribution vers les organes cibles et leur efficacité thérapeutique (Behzadi et al., 2017).

La seconde limitation dans le ciblage tumoral est l'extravasation et l'accumulation des NPs sur le site tumoral conditionnées par la perméabilité de la néovascularisation de la tumeur (Figure 105). Cette perméabilité conduirait à un effet EPR et une accumulation de NPs dans la tumeur qui peut être renforcée par un ciblage plus actif reposant sur une fonctionnalisation des NPs. Au sein même de la tumeur, plusieurs barrières peuvent réduire le ciblage des cellules tumorales. Dans de nombreux cancers incluant les CHC, des dépôts importants de protéines matricielles pourraient piéger les NPs et limiter leur internalisation cellulaire (Figure 105). Cependant, les NPs resteraient au sein de la tumeur et pourraient libérer un PA au « voisinage » des cellules tumorales et induire une cytotoxicité plus sélective. Dans la tumeur, le microenvironnement est souvent hypoxique et acide produisant des conditions physicochimiques qui impactent la stabilité des NPs. De plus, la forte hétérogénéité cellulaire peut constituer un facteur affectant l'efficacité du ciblage tumoral. Ces différentes caractéristiques des tumeurs peuvent probablement fortement moduler, de façon positive ou négative, l'accumulation de NPs et l'effet thérapeutique des PAs.

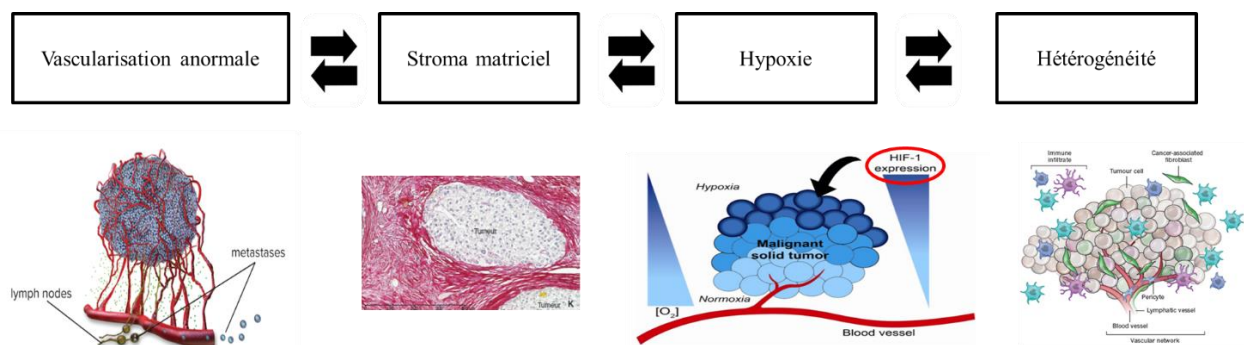


Figure 105 : Caractéristiques des tumeurs pouvant influencer le ciblage tumoral par les NPs

La néovascularisation, très variable en fonction des tumeurs et au sein d'une même tumeur, influence fortement l'effet EPR. Le stade de la fibrose, en particulier dans le CHC, peut contribuer à réduire l'accessibilité des NPs aux cellules tumorales. L'hypoxie et l'hétérogénéité cellulaire des tumeurs pourraient être des facteurs modulant l'accumulation et la stabilité des NPs dans les tumeurs.

Un autre paramètre crucial à prendre en compte lors de la conception et de l'évaluation de nanovecteurs est la biocompatibilité des constituants et des nano-objets formulés. Etant donné la très grande diversité chimique et physicochimique des NPs, l'évaluation nanotoxicologique est souvent complexe à mettre en œuvre avec des aspects liés à la biodistribution des nanovecteurs, leur mécanisme d'internalisation, leur dégradation, l'activation de processus de toxicité et d'inflammation, et l'élimination des produits de dégradation.

Dans le contexte du traitement des CHC et cholangiocarcinomes intrahépatiques, notre équipe poursuit des essais cliniques concernant la radioembolisation sélective par délivrance intra-artérielle

de lipiodol et de microsphères radiomarquées. Sur un autre versant pré-clinique, nous évaluons les NPs à base de dérivés du PMLABe₇₃ en abordant plusieurs aspects : leur fonctionnalisation, en particulier par des peptides, leurs modifications chimiques par l'ajout de chaînes PEG de longueurs, et donc de masses molaires, variables, la formulation par association de l'homopolymère PMLABe₇₃ avec des proportions variables des différents copolymères PEG_n-*b*-PMLABe₇₃, et plus récemment par l'ajout de DOTAP (1,2-Dioléoyl-3-triméthyle-ammonium propane) dans les formulations de NPs à base de PMLABe₇₃ afin de produire des NPs cationiques pour des applications en transfert de gènes.

Le choix de l'utilisation du PMLABe₇₃ et de ses dérivés est justifié par la bonne maîtrise des voies de synthèse de ces (co)polymères (Casajus et al., 2018; Huang et al., 2012), la possibilité de les produire en grandes quantités, leur biocompatibilité et leur catabolisme en molécules assimilables par les cellules. Par ailleurs, la nature des fins de chaîne de ces (co)polymères, modulables en fonction de l'amorceur utilisé, permettent des fonctionnalisations (Brossard et al., 2021; Huang et al., 2012). De nombreux copolymères à blocs constitués d'un bloc hydrophile biocompatible de PEG et d'un bloc hydrophobe dégradé et biocompatible, souvent un poly(ester), ont été synthétisés, comme le PEG-*b*-poly(ϵ -caprolactone) (T. Zhou et al., 2016) ou le PEG-*b*-poly(L-lactide) (Y. Liu et al., 2020). Cependant, les poly(esters) couramment utilisés sont dépourvus de groupes fonctionnels limitant ainsi la modulation de leurs propriétés physico-chimiques et/ou le greffage de molécules biologiquement actives. Par conséquent, des (co)polymères fonctionnels et/ou fonctionnalisables plus complexes ont été élaborés et portent des molécules d'intérêt (c'est-à-dire un PA, un agent de ciblage, des sondes de fluorescence) liées de manière covalente soit à la chaîne polymère principale, soit à l'une des extrémités de la macromolécule. Les (co)polymères dérivés du PMLABe₇₃ font partie de ces (co)polymères spécifiquement élaborés pour des applications dans le domaine biomédical (Loyer & Cammas-Marion, 2014).

Mon travail de thèse a principalement consisté en des études complémentaires sur la biocompatibilité des NPs formulées à partir des (co)polymères dérivés du PMLABe₇₃, de rechercher des peptides de ciblage des cellules de CHC, et d'aborder des études d'encapsulation de composés organométalliques dans ces NPs polymères.

Dans la première partie de mon travail de thèse, nos principaux résultats confirment que l'internalisation par les macrophages de NPs formulées à partir de l'homopolymère PMLABe₇₃ est très rapide et très supérieure à celle observée dans les cellules d'hépatome comme les cellules HepaRG, au moins sur un temps court, inférieur à 24h. Cependant, nous avons montré que la captation de NPs est très variable entre les cultures de macrophages obtenues à partir de monocytes circulants issus de différents donneurs sains. Ces résultats hétérogènes nous ont contraints à présenter les données de captation pour les différents donneurs afin d'illustrer cette hétérogénéité. De plus, nous confirmons l'effet inhibiteur de la couronne de PEG à la surface des NPs sur la captation par les deux modèles cellulaires, macrophages et cellules d'hépatome, en accord avec les nombreuses données de la littérature obtenues *in vitro* (Daou et al., 2009; Xie et al., 2007) et *in vivo* (Lipka et al., 2010) pour divers types cellulaires. Par contre, nous avons obtenu des résultats originaux concernant l'importance du degré de PEGylation sur la captation des NPs : 1) l'inhibition significative de la captation des NPs par les macrophages n'est visible que lorsque les NPs ne sont formulées qu'avec le copolymère PEG₄₂-*b*-PMLABe₇₃. Les NPs formulées avec des proportions variables du copolymère PEGylé (de 0 à 75%) sont captées dans les mêmes proportions, 2) l'inhibition de la captation des NPs PEGylées à 100% est plus forte en présence de sérum qu'en absence, *a contrario* de l'hypothèse d'une opsonisation qui augmenterait la phagocytose par les macrophages (Hoffman, 2008).

Ces résultats ont été complétés par des expériences plus récentes réalisées, notamment, par Saad Saba. Les résultats ont montré que l'internalisation des NPs par les cellules HepaRG était inversement proportionnelle au degré de PEGylation, et de façon dose dépendante au degré de PEGylation. Ces

résultats mettent en évidence deux comportements très différents entre des macrophages et des cellules hépatiques cancéreuses vis-à-vis de l'internalisation des NPs en fonction du degré de PEGylation, possiblement liés à des mécanismes différents d'internalisation pour ces deux types cellulaires. En effet, bien que nos données de microscopie apportent des arguments concordant pour conclure à une internalisation des NPs dans nos deux modèles cellulaires, l'utilisation d'inhibiteur de phagocytose et d'endocytose indiquent que l'internalisation des NPs PMLABe₇₃ par les macrophages se fait à la fois par phagocytose et pinocytose, tandis que la pinocytose serait le mécanisme principalement mis en jeu par les HepaRG progénitrices.

Lorsque l'incubation des cellules se poursuit au-delà de 24h, les membres de l'équipe ont constaté à nouveau des différences qui sont étudiées plus en détail. Il a été observé que la captation des NPs PMLABe₇₃ par les cellules HepaRG progénitrices est croissante jusqu'au temps 48h. Puis, après un second traitement à ce même temps, le profil de la courbe présente un plateau indiquant une saturation de cette internalisation par les cellules. Enfin, après un dernier traitement à 120h, la fluorescence n'augmente plus et a tendance à légèrement diminuer (Figure 106A).

Des traitements multiples des macrophages par des NPs PMLABe₇₃ et encapsulant 0,1 wt% de DiD Oil (NPs PMLABe₇₃[DiD Oil 0,1wt%]) ont montré que la fluorescence augmente avec le temps et après chaque nouvelle incubation et qu'aucun signe de saturation de l'internalisation n'est visible (Figure 106B). De façon intéressante, un traitement unique (au temps 0h) suivi d'une étude de l'évolution de la fluorescence après élimination du milieu contenant des NPs à 48h indique que la courbe de fluorescence présente un maximum à 48h, puis tend à diminuer avec le temps jusqu'à 168h. De plus, le transfert d'un milieu avec des NPs PMLABe₇₃[DiD Oil 0,1wt%], après 48h d'une première exposition aux macrophages, dans un puit contenant des macrophages « naïfs » conduit à une faible internalisation suggérant qu'une quantité limitée de NPs était encore présente dans le milieu.

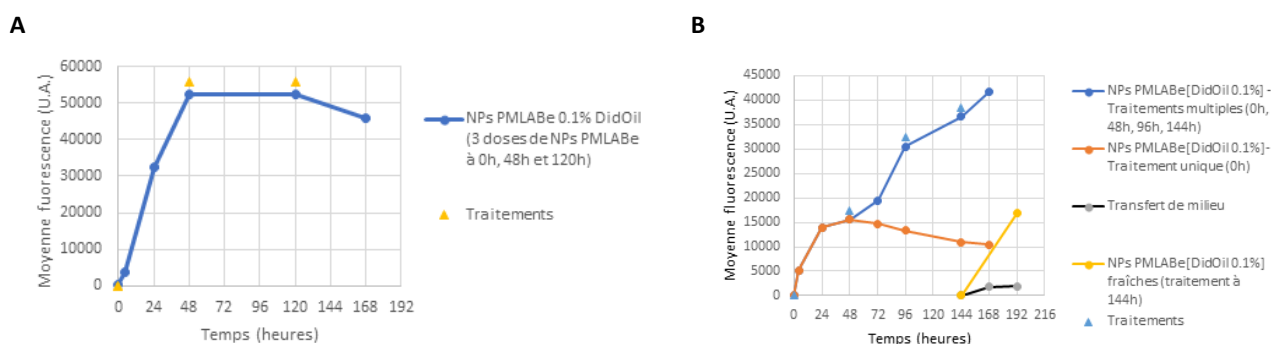


Figure 106 : Expériences de captation des NPs formulées à partir de PMLABe₇₃ sur plusieurs jours et avec des expositions répétées

(A) Graphique représentant les moyennes de fluorescence de cellules HepaRG en fonction du temps suite à des traitements répétitifs (aux temps indiqués par un triangle) avec des NPs PMLABe₇₃[0,1wt% DiD Oil]. (B) Graphique représentant les moyennes de fluorescence des macrophages en fonction du temps suite à des traitements uniques ou répétitifs avec des NPs PMLABe₇₃[0,1wt% DiD Oil] aux temps 0, 48, 96h et 144h. Des expériences de transfert de milieux de 48h sur des cellules non traitées initialement ont également été réalisées à 144h ainsi qu'un changement de milieux avec un traitement aux NPs PMLABe₇₃[DiD Oil 0,1wt%] sur des cellules non-traitées.

En parallèle et à titre de contrôle, des macrophages naïfs incubés à 6 jours internalisent fortement les NPs, confirmant que ces macrophages, même après un maintien en culture de plusieurs jours, sont toujours capables de phagocyter des NPs et sont donc toujours fonctionnels sur ce temps de culture.

Ces résultats permettent de proposer plusieurs conclusions et de formuler quelques hypothèses. La première conclusion concerne le phénomène de saturation de la captation des NPs de PMLABe₇₃ par

des cellules HepaRG. Cette observation a été faite par plusieurs personnes de l'équipe sur de multiples lots de NPs et à des périodes différentes. C'est donc une donnée statistiquement significative.

Nous émettons deux hypothèses pour apporter une explication à ce phénomène : la première serait une forme de « toxicité » qui inhiberait l'endocytose des cellules sous l'effet de l'accumulation intracellulaire des NPs de PMLABe₇₃. Cette hypothèse semble cependant infirmée par des premières données indiquant que d'autres nanovecteurs différents (microsphère de polystyrène) ou molécules fluorescentes (albumine marquée) ne sont pas différemment internalisées par des cellules ayant capté ou non des NPs de PMLABe₇₃. La seconde hypothèse est liée à la prolifération des cellules HepaRG utilisées dans ces essais de captation. Pour les tests d'internalisation de NPs, les macrophages sont des cellules quiescentes, alors que les cellules HepaRG, dans leur état incomplètement différencié, sont ensemencées à densité moyenne après trypsination d'une culture à forte densité. Les cellules HepaRG entretenues en routine sont ensemencées à faible densité, prolifèrent activement pendant quelques jours avant d'atteindre une forte densité et la quiescence, soit 1 à 2 semaines après ensemencement (voir paragraphe I.2.3 - Modèles cellulaires *in vitro* d'hépatocytes normaux et transformés et Figure 107A). La prolifération la plus active est observée dans les 4 à 5 jours après l'ensemencement et, surtout, un phénomène de synchronie du cycle cellulaire est observé lors des 2 premiers jours (Figure 107B).

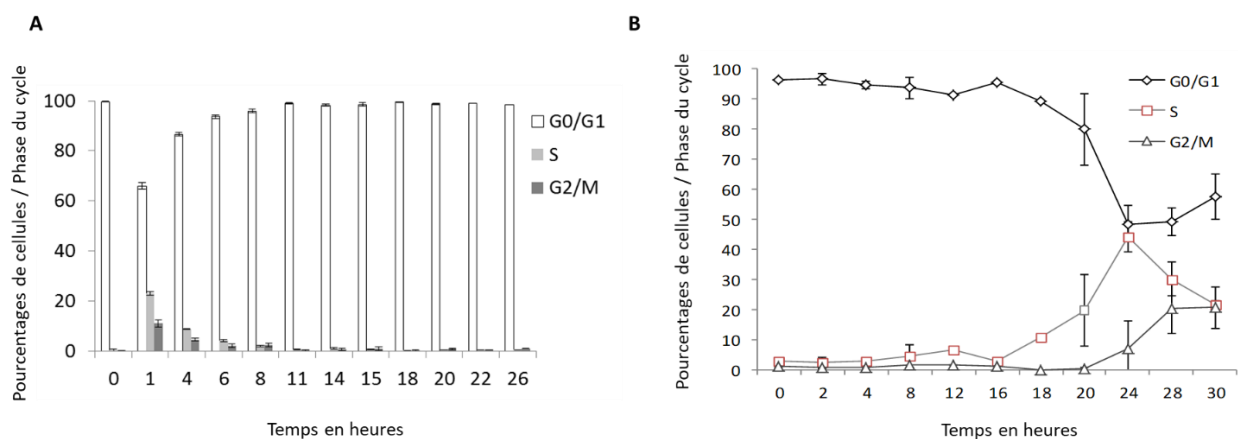


Figure 107 : Prolifération des cellules HepaRG

(A) Contenus en ADN évalués par cytométrie en flux dans des cellules HepaRG dans une cinétique de 26 jours post-ensemencement, protocole utilisé pour leur différenciation. Le contenu en ADN est déterminé par marquage à l'iodure de propidium permettant de distinguer les cellules selon leur contenu en ADN : G0/G1 (2N), G2/M (4N), S (2N < X < 4N). (B) Analyse du contenu en ADN dans les 30 heures qui suivent la trypsination et l'ensemencement des cellules HepaRG, indiquant la synchronie partielle de l'entrée et de la progression d'une fraction des cellules HepaRG dans le cycle cellulaire.

Classiquement, des cellules normales et les cellules HepaRG, dont la régulation du cycle cellulaire n'est pas profondément altérée (Laurent et al., 2013), présentent une inhibition de contact à forte densité induisant un arrêt du cycle cellulaire en G0/G1 (Vlach et al., 2019). La rupture des contacts intercellulaires lors de la trypsination et l'ensemencement à faible densité induisent la reprise du cycle cellulaire de façon partiellement synchronisée (Figure 107B). Puis, la perte de synchronie et l'apparition de petites colonies de cellules réduisent rapidement, pour une partie de la population de cellules HepaRG, le taux de prolifération. Nous postulons que l'internalisation rapide et très efficace des NPs de PMLABe₇₃ observée dans les cellules HepaRG soit en partie conditionnée par la synchronie du cycle cellulaire. Cette hypothèse est en cours d'évaluation dans l'équipe.

Nous avons montré que les NPs formulées à partir de PMLABe₇₃ et PEG₆₂-b-PMLABe₇₃ n'induisent pas la production de cytokines pro-inflammatoires dans un modèle de macrophages humains primaires et

qu'elles sont faiblement cytotoxiques pour la lignée cellulaire hépatique HepaRG. De plus, les résultats récents, mettant en évidence l'absence de toxicité et de bonnes internalisations par les macrophages lors d'incubations réitérées, confirment l'excellente biocompatibilité de ces NPs à base de dérivés du PMLABe₇₃.

Un objectif principal du travail de thèse était d'étudier l'influence de peptides, considérés comme hépatotropes (chapitre 2), sur la captation cellulaire des NPs Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃. Lors de cette étude, nous n'avons pas cherché à identifier de nouveaux peptides mais à comparer des peptides déjà répertoriés dans la littérature. Parallèlement, dans l'équipe, un projet de criblage d'une banque de phages par la technique de phage display a été réalisé afin de découvrir de nouveaux peptides ciblant les cholangiocytes et des cellules souches cancéreuses (Metlej, 2019). Cette approche a permis d'identifier un peptide à fort tropisme pour les cholangiocytes et 2 peptides ciblant les cellules souches cancéreuses (Metlej et collaborateurs, données en cours de rédaction et soumises à brevet).

Pour le ciblage des cellules de CHC, afin d'exposer des peptides à la surface des NPs, nous avons utilisé la streptavidine comme intermédiaire de couplage entre les NPs Biot-PEG₆₂-*b*-PMLABe₇₃ et le peptide biotinylé RGD. Cet échafaudage moléculaire bien que très artificiel permettait de rapidement tester le possible effet de tropisme. Parallèlement, le choix d'un couplage des peptides directement sur une streptavidine fluorescente, bien qu'ayant des limites, permettait également d'identifier les peptides pertinents. Ces deux approches ont conduit à des observations en partie divergentes et à des choix de peptides d'intérêt. La divergence majeure était que pour les complexes streptavidine-peptides, la majorité des peptides sélectionnés n'avait pas d'effet positif sur l'internalisation de la streptavidine alors qu'à l'inverse, l'ajout des peptides en surface des NPs augmentait fortement l'internalisation, parfois de façon non spécifique puisque des peptides utilisés comme contrôles négatifs donnaient également un effet positif sur l'internalisation. Cependant, les deux peptides CPB et GBVA10-9 étaient ceux qui induisaient la plus grande internalisation de la streptavidine et des NPs polymères.

La stratégie d'évaluation de l'internalisation des NPs sous l'effet des peptides *via* un pontage à la streptavidine apparaît, *a posteriori*, sujette à caution. En effet, elle met difficilement en évidence des effets nets des peptides sur l'internalisation malgré le fait que la captation de NPs contrôles présentant de la streptavidine saturée en biotine en surface soit beaucoup plus faible. La pertinence de cette approche est remise en cause par l'utilisation de peptides contrôles dont la séquence ne devrait, *a priori*, pas accroître l'internalisation. Par ailleurs, l'utilisation de peptides mutés, pour ceux ayant significativement augmenté l'internalisation, n'entraîne pas toujours une perte de l'effet positif suggérant que, au moins pour certains peptides notamment le GBVA10-9, l'effet positif du peptide sur l'internalisation des NPs ne repose pas sur la seule séquence en acides aminés. Ainsi, l'hypothèse de départ proposant que l'adjonction d'un peptide en surface pourrait permettre, par sa séquence en acides aminés, la fixation sur un récepteur spécifique, par un effet ligand-récepteur, n'est pas systématiquement le déterminant dans les échafaudages NPs-streptavidine-peptides que nous avons élaborés.

Dans ce travail, avec l'exemple du GBVA10-9, des éléments sur l'importance de l'opsonisation à la surface des NPs fonctionnalisées dans la captation cellulaire ont été apportés. Nos résultats démontrent la fixation sur les NPs fonctionnalisées de protéines à tropisme hépatique telles que les apolipoprotéines. De plus, l'ajout en excès de particules HDL dans les milieux de culture réduit la captation de NPs par les cellules hépatiques suggérant un rôle et/ou une compétition des HDL dans l'internalisation des NPs.

L'opsonisation mais aussi la capacité des NPs fonctionnalisées pourraient être en partie conditionnées par la longueur des peptides. En effet, nous avons observé que l'internalisation des NPs

fonctionnalisées par les peptides les plus longs, GBVA10-9 et CPB, était plus rapide et significativement plus élevée que celle des peptides plus courts, comme les A54, RGD, DKN et HCBP1, qui augmentaient également la captation mais dans une moindre proportion (Figure 108).

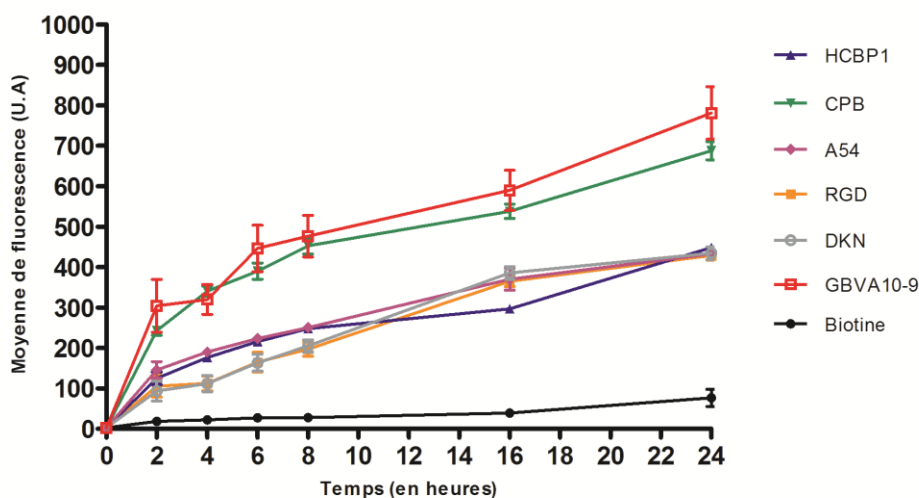


Figure 108 : Effet des peptides sur l'internalisation des NPs Biot-PEG₆₂-b-PMLA^{Be73}

Cinétique d'internalisation des NPs fonctionnalisées par des peptides longs (CPB et GBVA10-9) et courts (HCBP1, A54, RGD, DKN) au cours du temps et pendant 24 heures.

Malgré ces incertitudes sur le mode d'action des peptides permettant la reconnaissance des cellules de CHC, l'ensemble de ces résultats nous a permis d'identifier deux peptides d'intérêt pour le ciblage des cellules hépatiques cancéreuses, le CPB et le GBVA10-9, avec lesquels nous avons poursuivi des travaux visant à valoriser ces peptides pour des applications en théranostique. Plusieurs financements ont été obtenus (Ligue Contre le Cancer, réseau « Vectorisation, Imagerie, Radiothérapies » (VIR) du Cancéropole Grand-ouest, Fondation pour la Recherche Médicale) qui ont permis de définir de nouveaux objectifs au travers de trois projets de thèse sur le versant chimie (synthèse de copolymères fonctionnalisés et de peptides modifiés) et le versant biologie pour l'évaluation *in vitro* et *in vivo* de nouvelles NPs radiomarquées et de nouveaux peptides radiomarqués.

Clarisse Brossard (Thèse ENSCR, Vectorisation ciblée de radionucléides *via* les peptides GBVA10-9 et CPB pour le diagnostic et/ou la thérapie du carcinome hépatocellulaire, soutenue le 29-04-2022) a élaboré des nanovecteurs multifonctionnels pour la vectorisation ciblée de radionucléides dans le cadre de la théranostique du CHC. Les peptides GBVA10-9 et CPB ont été greffés sur des (co)polymères dérivés du poly(acide malique) (PMLA) par deux méthodes de bioconjugaison permettant de s'affranchir de la streptavidine: 1) la réaction entre un isothiocyanate et une amine permettant de synthétiser des copolymères avec les peptides en extrémité de chaîne, puis de préparer une formulation des NPs avec ces polymères fonctionnalisés, 2) la réaction entre un thiol et un maléimide greffé en extrémité de chaîne et permettant le greffage des peptides après formulations des NPs. Ces travaux ont permis de formuler des NPs polymères fonctionnalisées avec les deux peptides (Brossard et al., 2021, 2022). Le premier résultat important est que tous les (co)polymères ont permis de formuler des NPs avec des caractéristiques physicochimiques différentes, par exemple des diamètres variants de 60 à 180 nm.

Les études *in vitro* sur des lignées cellulaires d'hépatome humain ont montré que le mode de greffage influençait fortement la captation des NPs par les cellules issues de CHC. A titre d'exemple, les NPs formulées à partir des (co)polymères PMLABe₇₃ et GBVA10-9-PMLABe₇₃ (90/10 wt%) étaient captées de la même façon que les NPs de PMLABe₇₃ démontrant que l'adjonction du peptide n'avait aucun effet positif sur l'internalisation (Brossard et al., 2021). Dans ce cas, nous avons postulé que le peptide, très hydrophobe, était piégé dans le cœur hydrophobe des NPs. A l'inverse, le greffage du peptide GBVA10-9 sur des NPs de PMLABe₇₃ et maléimide-PMLABe₇₃ (90/10 wt%) après formulation augmentait très fortement l'internalisation comparativement aux mêmes NPs sans peptide (Brossard et al., 2022). Ainsi, la nature du peptide et celle de l'espaceur utilisé entre le peptide et le (co)polymère, et la méthode de préparation des NPs, ont une grande influence sur la capacité de reconnaissance des cellules par ces NPs fonctionnalisées par les peptides.

La seconde voie pour valoriser les deux peptides est basée sur le greffage des peptides sur un ligand bifonctionnel adapté à chélation de radionucléides d'intérêt clinique. Des dérivés peptidiques ligands-GBVA10-9 et ligand-CPB ont été synthétisés par la création d'une liaison thiourée ou thioéther de succinimidyle permettant, dans un premier temps, de greffer les peptides à deux ligands commerciaux, l'acide 2,2',2'',2'''-(1,4,7,10-tétrazacyclododécane-1,4,7,10-tétrayl)tétraacétique (DOTA) et l'acide (2,2',2''-(1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triayl)triacétique (NOTA). Dans l'équipe, Hanadi Nahas a radiomarké, au gallium-68 et cuivre-64, certains de ces peptides modifiés. Les premières évaluations *in vitro* ont montré que la nature du peptide ainsi que celle du ligand ont également une influence sur la captation cellulaire, avec des dérivés peptidiques composés de GBVA10-9 prometteurs pour la vectorisation ciblée de radionucléides à visée diagnostique et/ou thérapeutique dans le cadre du diagnostic et du traitement du carcinome hépatocellulaire. Des expériences *in vivo* sont en cours pour étudier la biodistribution des peptides marqués au gallium-68 dans un modèle ectopique de CHC, plus précisément des souris immunocompétentes sur lesquelles des cellules Hepa1-6 ont été greffées en sous-cutané. La synthèse de nouveaux peptides modifiés est poursuivie par Baptiste Taffoureau, doctorant ENSCR financé par La Ligue Contre le Cancer CD35 et la région Bretagne (ARED), qui réalise le greffage des deux peptides sur trois ligands originaux fournis par des collaborateurs à Brest (R. Triper) et Toulouse (Eric Benoit) : le cyclam monopicolinate TE1PA (acide 6-((6-(4-aminobenzyl)-1,4,8,11-tétrazacyclotétradecan-1-yl)méthyl)picolinique) pour le marquage au ⁶⁴Cu et ⁶⁷Cu, et les ligands tripodal N₂O LTN₂O (4-[4-(2-hydroxyphenylamino)méthyl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl]aminobenzène) et dipycolylamine (DPA) pour le marquage au ^{99m}Tc et au ¹⁸⁸Re.

En parallèle du second chapitre de la thèse consacré à l'étude de peptides de ciblage des cellules de CHC, j'ai débuté une collaboration sur des essais d'encapsulation de composés organométalliques, avec ce premier exemple de la molécule OMC-1, un composé lipophile contenant de l'or. OMC-1 avait été choisi également pour sa propriété de fluorescence qui permettait une visualisation simple de la molécule dans les cellules en s'affranchissant de l'utilisation d'un composé comme le DiD Oil utilisé pour détecter les NPs dans nos études précédentes.

La première conclusion de cette étude est que l'encapsulation du composé OMC-1 est très efficace dans les NPs de PMLABe₇₃ et PEG_{62-b}-PMLABe₇₃, sans libération du composé après formulation, confirmant que des molécules lipophiles ne présentent pas d'effet « burst » comme observé avec des composés plus hydrophiles ou amphiphiles comme la doxorubicine (Huang et al., 2012). Ces NPs formulées encapsulant le composé OMC-1 sont stables pendant plusieurs semaines. Par ailleurs, la fluorescence du composé OMC-1 a été utile afin de confirmer l'encapsulation et pour suivre l'internalisation des NPs par les cellules en cytométrie de flux et en microscopie à fluorescence. Ces résultats confirment donc l'intérêt de ces NPs pour l'encapsulation de molécules plus lipophiles et dont l'administration sous forme libre en solution injectable paraît inenvisageable du fait de leur faible

solubilité en phase aqueuse. Cet aspect est conforté par des résultats récents de l'équipe pour lesquels des composés organométalliques moins lipophiles ont été encapsulés avec des efficacités d'encapsulation moyennes ($\approx 50\%$) à faibles ($< 25\%$) rendant ensuite délicate l'élimination du composé non-encapsulé et ne permettant pas de disposer de NPs à fortes concentrations en PA. Ces nanovecteurs sont donc actuellement utilisés par l'équipe dans la perspective d'encapsulation de PAs fortement lipophiles pour permettre d'évaluer l'intérêt thérapeutique de molécules dont les caractéristiques physicochimiques tendent à les exclure d'une application médicale alors que certaines peuvent présenter des effets biologiques intéressants.

Parmi ces molécules en cours d'évaluation, de nouvelles molécules organométalliques lipophiles contenant de l'or et du manganèse sont plus particulièrement étudiés, en collaboration avec l'équipe de M. Mauduis et C. Crévisy (Equipe « Organométalliques : Matériaux et Catalyse », OMC, de l'Institut des Sciences Chimiques de Rennes, ISCR, localisée à l'École Nationale Supérieure de Chimie de Rennes) pour leurs effets cytotoxiques. Les premières données sur les mécanismes de cytotoxicité semblent impliquer l'induction d'un stress oxydant et d'apoptose. Des complexes nickel-bis(dithiolène), absorbeurs stables dans le proche-infrarouge présentant des propriétés photothermiques remarquables sous irradiation, sont également testés sous forme encapsulée en collaboration avec l'équipe de F. Camerel (Equipe « Matière Condensée et Systèmes Electroattractifs », MaCSE, de l'ISCR). Dans ces études des NPs natives et fonctionnalisées par les peptides CPB et GBVA10-9 seront utilisées.

En conclusion, notre travail aura permis de mieux caractériser la captation des NPs à base de dérivés du PMLABe₇₃ par les cellules hépatiques tumorales et les macrophages humains ainsi que d'apporter des arguments complémentaires sur leur biocompatibilité. J'ai également étudié le tropisme des peptides CPB et GBVA10-9 pour les cellules hépatiques cancéreuses dans la perspective de leur utilisation pour cibler le CHC sous forme de peptides radiomarqués ou pour la fonctionnalisation de NPs formulées à partir de dérivés du PMLABe₇₃.

BIBLIOGRAPHIE

- Abbina, S., Takeuchi, L. E., Anilkumar, P., Yu, K., Rogalski, J. C., Shenoj, R. A., Constantinescu, I., & Kizhakkedathu, J. N. (2020). Blood circulation of soft nanomaterials is governed by dynamic remodeling of protein opsonins at nano-biointerface. *Nature Communications*, *11*(1), 3048. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16772-x>
- Abedin, F., Asmatulu, E., & Andalib, M. N. (2021). Nanomaterials and Human Health : An Overview. In V. Kumar, P. Guleria, S. Ranjan, N. Dasgupta, & E. Lichtfouse (Éds.), *Nanotoxicology and Nanoecotoxicology Vol. 2* (p. 165-180). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-69492-0_7
- Adams, D., Polydefkis, M., González-Duarte, A., Wixner, J., Kristen, A. V., Schmidt, H. H., Berk, J. L., Losada López, I. A., Dispenzieri, A., Quan, D., Conceição, I. M., Slama, M. S., Gillmore, J. D., Kyriakides, T., Ajroud-Driss, S., Waddington-Cruz, M., Mezei, M. M., Planté-Bordeneuve, V., Attarian, S., ... patisiran Global OLE study group. (2021). Long-term safety and efficacy of patisiran for hereditary transthyretin-mediated amyloidosis with polyneuropathy : 12-month results of an open-label extension study. *The Lancet. Neurology*, *20*(1), 49-59. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(20\)30368-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(20)30368-9)
- Ahmed, N., Fessi, H., & Elaissari, A. (2012). Theranostic applications of nanoparticles in cancer. *Drug Discovery Today*, *17*(17-18), 928-934. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.03.010>
- Akateh, C., Black, S. M., Conteh, L., Miller, E. D., Noonan, A., Elliott, E., Pawlik, T. M., Tsung, A., & Cloyd, J. M. (2019). Neoadjuvant and adjuvant treatment strategies for hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, *25*(28), 3704-3721. <https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i28.3704>
- Aldosari, B. N., Alfagih, I. M., & Almurshedi, A. S. (2021). Lipid Nanoparticles as Delivery Systems for RNA-Based Vaccines. *Pharmaceutics*, *13*(2), 206. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13020206>
- Alipour, M., Baneshi, M., Hosseinkhani, S., Mahmoudi, R., Jabari Arabzadeh, A., Akrami, M., Mehrzad, J., & Bardania, H. (2020). Recent progress in biomedical applications of RGD-based ligand : From precise cancer theranostics to biomaterial engineering: A systematic review. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, *108*(4), 839-850. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36862>
- Aliyandi, A., Zuhorn, I. S., & Salvati, A. (2020). Disentangling Biomolecular Corona Interactions With Cell Receptors and Implications for Targeting of Nanomedicines. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *8*, 599454. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.599454>
- Alrushaid, N., Khan, F. A., Al-Suhaimi, E. A., & Elaissari, A. (2023). Nanotechnology in Cancer Diagnosis and Treatment. *Pharmaceutics*, *15*(3), 1025. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15031025>
- Anand, A., Liu, B., Dicroce Giacobini, J., Maeda, K., Rohde, M., & Jäätelä, M. (2019). Cell Death Induced by Cationic Amphiphilic Drugs Depends on Lysosomal Ca²⁺ Release and Cyclic AMP. *Molecular Cancer Therapeutics*, *18*(9), 1602-1614. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-18-1406>
- Ansari, K. I., Kasiri, S., Grant, J. D., & Mandal, S. S. (2009). Apoptosis and anti-tumour activities of manganese(III)-salen and -salphen complexes. *Dalton Transactions (Cambridge, England: 2003)*, *40*, 8525-8531. <https://doi.org/10.1039/b905276c>
- Anselmo, A. C., & Mitragotri, S. (2021). Nanoparticles in the clinic : An update post COVID-19 vaccines. *Bioengineering & Translational Medicine*, *6*(3), e10246. <https://doi.org/10.1002/btm2.10246>
- Arap, W., Pasqualini, R., & Ruoslahti, E. (1998). Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science (New York, N.Y.)*, *279*(5349), 377-380. <https://doi.org/10.1126/science.279.5349.377>

- Arvizo, R. R., Miranda, O. R., Moyano, D. F., Walden, C. A., Giri, K., Bhattacharya, R., Robertson, J. D., Rotello, V. M., Reid, J. M., & Mukherjee, P. (2011). Modulating pharmacokinetics, tumor uptake and biodistribution by engineered nanoparticles. *PLoS One*, *6*(9), e24374. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024374>
- Bang, Y.-J., Golan, T., Lin, C.-C., Dahan, L., Fu, S., Moreno, V., Geva, R., Reck, M., Wasserstrom, H. A., Mi, G., Laing, N., & Goff, L. W. (2019). Ramucirumab (Ram) and durvalumab (Durva) treatment of metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC), gastric/gastroesophageal junction (G/GEJ) adenocarcinoma, and hepatocellular carcinoma (HCC) following progression on systemic treatment(s). *Journal of Clinical Oncology*, *37*(15_suppl), 2528-2528. https://doi.org/10.1200/JCO.2019.37.15_suppl.2528
- Banimohamad-Shotorbani, B., Rahmani Del Bakhshayesh, A., Mehdipour, A., Jarolmasjed, S., & Shafaei, H. (2021). The efficiency of PCL/HAp electrospun nanofibers in bone regeneration : A review. *Journal of Medical Engineering & Technology*, *45*(7), 511-531. <https://doi.org/10.1080/03091902.2021.1893396>
- Baron, L., Gombault, A., Fanny, M., Villeret, B., Savigny, F., Guillou, N., Panek, C., Le Bert, M., Lagente, V., Rassendren, F., Riteau, N., & Couillin, I. (2015). The NLRP3 inflammasome is activated by nanoparticles through ATP, ADP and adenosine. *Cell Death & Disease*, *6*(2), e1629. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.576>
- Bashir, M. R., Bhatti, L., Marin, D., & Nelson, R. C. (2015). Emerging applications for ferumoxytol as a contrast agent in MRI. *Journal of Magnetic Resonance Imaging: JMRI*, *41*(4), 884-898. <https://doi.org/10.1002/jmri.24691>
- Bechmann, L. P., Hannivoort, R. A., Gerken, G., Hotamisligil, G. S., Trauner, M., & Canbay, A. (2012). The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. *Journal of Hepatology*, *56*(4), 952-964. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.08.025>
- Begrache, K., Massart, J., Robin, M.-A., Borgne-Sanchez, A., & Fromenty, B. (2011). Drug-induced toxicity on mitochondria and lipid metabolism : Mechanistic diversity and deleterious consequences for the liver. *Journal of Hepatology*, *54*(4), 773-794. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.11.006>
- Behzadi, S., Serpooshan, V., Tao, W., Hamaly, M. A., Alkawareek, M. Y., Dreaden, E. C., Brown, D., Alkilany, A. M., Farokhzad, O. C., & Mahmoudi, M. (2017). Cellular uptake of nanoparticles : Journey inside the cell. *Chemical Society Reviews*, *46*(14), 4218-4244. <https://doi.org/10.1039/c6cs00636a>
- Berenblum, I., & Shubik, P. (1947). A new, quantitative, approach to the study of the stages of chemical carcinogenesis in the mouse's skin. *British Journal of Cancer*, *1*(4), 383-391. <https://doi.org/10.1038/bjc.1947.36>
- Bertrand, N., Grenier, P., Mahmoudi, M., Lima, E. M., Appel, E. A., Dormont, F., Lim, J.-M., Karnik, R., Langer, R., & Farokhzad, O. C. (2017). Mechanistic understanding of in vivo protein corona formation on polymeric nanoparticles and impact on pharmacokinetics. *Nature Communications*, *8*(1), 777. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00600-w>
- Bertrand, N., & Leroux, J.-C. (2012). The journey of a drug-carrier in the body : An anatomophysiological perspective. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, *161*(2), 152-163. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.09.098>
- Bhushan, B. (2012). Bioinspired structured surfaces. *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, *28*(3), 1698-1714. <https://doi.org/10.1021/la2043729>

- Bissell, D. M., Arenson, D. M., Maher, J. J., & Roll, F. J. (1987). Support of cultured hepatocytes by a laminin-rich gel. Evidence for a functionally significant subendothelial matrix in normal rat liver. *The Journal of Clinical Investigation*, 79(3), 801-812. <https://doi.org/10.1172/JCI112887>
- Blanc, J. F., Debaillon-Vesque, A., Roth, G., Barbare, J. C., Baumann, A. S., Boige, V., Boudjema, K., Bouattour, M., Crehange, G., Dauvois, B., Decaens, T., Dewaele, F., Farges, O., Guiu, B., Hollebecque, A., Merle, P., Selves, J., Aparicio, T., Ruiz, I., & Bouché, O. (2021). Hepatocellular carcinoma : French Intergroup Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up (SNFGE, FFCD, GERCOR, UNICANCER, SFCD, SFED, SFRO, AFEF, SIAD, SFR/FRI). *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, 45(2), 101590. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2020.101590>
- Blanc JF, Barbare JC, Boige V, Boudjema K, Créhange G, Decaens T, Farges O, Guiu B, Merle P, Selves L, & Trinchet JC. (2015, Juin). *Carcinome hépatocellulaire*. Thésaurus National de Cancérologie Digestive. <http://www.tncd.org>
- Blanco, E., Shen, H., & Ferrari, M. (2015). Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nature Biotechnology*, 33(9), 941-951. <https://doi.org/10.1038/nbt.3330>
- Blumberg, B. S. (1977). Australia antigen and the biology of hepatitis B. *Science (New York, N.Y.)*, 197(4298), 17-25. <https://doi.org/10.1126/science.325649>
- Boisseau, P., & Loubaton, B. (2011). Nanomedicine, nanotechnology in medicine. *Comptes Rendus. Physique*, 12(7), 620-636. <https://doi.org/10.1016/j.crhy.2011.06.001>
- Boldt, D. H. (1999). New perspectives on iron : An introduction. *The American Journal of the Medical Sciences*, 318(4), 207-212. <https://doi.org/10.1097/00000441-199910000-00001>
- Bonvalot, S., Rutkowski, P. L., Thariat, J., Carrère, S., Ducassou, A., Sunyach, M.-P., Agoston, P., Hong, A. M., Mervoyer, A., Rastrelli, M., Moreno, V., Li, R. K., Tiangco, B. J., Herráez, A. C., Gronchi, A., Sy-Ortin, T., Hohenberger, P., de Baère, T., Cesne, A. L., ... Pápai, Z. (2022). Final Safety and Health-Related Quality of Life Results of the Phase 2/3 Act.In.Sarc Study With Preoperative NBTXR3 Plus Radiation Therapy Versus Radiation Therapy in Locally Advanced Soft-Tissue Sarcoma. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 114(3), 422-432. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2022.07.001>
- Bonvalot, S., Rutkowski, P. L., Thariat, J., Carrère, S., Ducassou, A., Sunyach, M.-P., Agoston, P., Hong, A., Mervoyer, A., Rastrelli, M., Moreno, V., Li, R. K., Tiangco, B., Herraez, A. C., Gronchi, A., Mangel, L., Sy-Ortin, T., Hohenberger, P., de Baère, T., ... Papai, Z. (2019). NBTXR3, a first-in-class radioenhancer hafnium oxide nanoparticle, plus radiotherapy versus radiotherapy alone in patients with locally advanced soft-tissue sarcoma (Act.In.Sarc) : A multicentre, phase 2-3, randomised, controlled trial. *The Lancet. Oncology*, 20(8), 1148-1159. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(19\)30326-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30326-2)
- Boopathy, L. K., Gopal, T., Roy, A., Kalari Kandy, R. R., & Arumugam, M. K. (2023). Recent trends in macromolecule-conjugated hybrid quantum dots for cancer theranostic applications. *RSC Advances*, 13(27), 18760-18774. <https://doi.org/10.1039/d3ra02673f>
- Bosetti, C., Turati, F., & La Vecchia, C. (2014). Hepatocellular carcinoma epidemiology. *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology*, 28(5), 753-770. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2014.08.007>
- Bouvry, C., Palard, X., Edeline, J., Ardisson, V., Loyer, P., Garin, E., & Lepareur, N. (2018). Transarterial Radioembolization (TARE) Agents beyond 90Y-Microspheres. *BioMed Research International*, 2018, 1435302. <https://doi.org/10.1155/2018/1435302>

- Braet, F., & Wisse, E. (2002). Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae : A review. *Comparative Hepatology*, *1*(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1476-5926-1-1>
- Bralet, M. P., Régimbeau, J. M., Pineau, P., Dubois, S., Loas, G., Degos, F., Valla, D., Belghiti, J., Degott, C., & Terris, B. (2000). Hepatocellular carcinoma occurring in nonfibrotic liver : Epidemiologic and histopathologic analysis of 80 French cases. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, *32*(2), 200-204. <https://doi.org/10.1053/jhep.2000.9033>
- Brasseur, F., Couvreur, P., Kante, B., Deckers-Passau, L., Roland, M., Deckers, C., & Speiser, P. (1980). Actinomycin D absorbed on polymethylcyanoacrylate nanoparticles : Increased efficiency against an experimental tumor. *European Journal of Cancer*, *16*(11), 1441-1445. [https://doi.org/10.1016/0014-2964\(80\)90053-5](https://doi.org/10.1016/0014-2964(80)90053-5)
- Brossard, C., Vlach, M., Jacquet, L., Vène, E., Dorcet, V., Loyer, P., Cammas-Marion, S., & Lepareur, N. (2022). Hepatotropic Peptides Grafted onto Maleimide-Decorated Nanoparticles : Preparation, Characterization and In Vitro Uptake by Human HepaRG Hepatoma Cells. *Polymers*, *14*(12), 2447. <https://doi.org/10.3390/polym14122447>
- Brossard, C., Vlach, M., Vène, E., Ribault, C., Dorcet, V., Noiret, N., Loyer, P., Lepareur, N., & Cammas-Marion, S. (2021). Synthesis of Poly(Malic Acid) Derivatives End-Functionalized with Peptides and Preparation of Biocompatible Nanoparticles to Target Hepatoma Cells. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, *11*(4), 958. <https://doi.org/10.3390/nano11040958>
- Brun, E., & Sicard-Roselli, C. (2014). Could nanoparticle corona characterization help for biological consequence prediction? *Cancer Nanotechnology*, *5*(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s12645-014-0007-5>
- Buzea, C., Pacheco, I. I., & Robbie, K. (2007). Nanomaterials and nanoparticles : Sources and toxicity. *Biointerphases*, *2*(4), MR17-71. <https://doi.org/10.1116/1.2815690>
- Cabillic, F., & Corlu, A. (2016). Regulation of Transdifferentiation and Retrodifferentiation by Inflammatory Cytokines in Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*, *151*(4), 607-615. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.06.052>
- Cabral, H., Matsumoto, Y., Mizuno, K., Chen, Q., Murakami, M., Kimura, M., Terada, Y., Kano, M. R., Miyazono, K., Uesaka, M., Nishiyama, N., & Kataoka, K. (2011). Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size. *Nature Nanotechnology*, *6*(12), 815-823. <https://doi.org/10.1038/nnano.2011.166>
- Cammass, S., Béar, M. M., Moine, L., Escalup, R., Ponchel, G., Kataoka, K., & Guérin, P. (1999). Polymers of malic acid and 3-alkylmalic acid as synthetic PHAs in the design of biocompatible hydrolyzable devices. *International Journal of Biological Macromolecules*, *25*(1-3), 273-282. [https://doi.org/10.1016/s0141-8130\(99\)00042-2](https://doi.org/10.1016/s0141-8130(99)00042-2)
- Cano, L., Bertani, S., Island, M.-L., Cerapio, J. P., Ruiz, E., Pineau, P., Monbet, V., Boudjema, K., Taxa, L., Casavilca-Zambrano, S., Ropert, M., Turlin, B., & Loréal, O. (2021). Metallomic profile in non-cirrhotic hepatocellular carcinoma supports a phenomenon of metal metabolism adaptation in tumor cells. *Scientific Reports*, *11*(1), 14195. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93369-4>
- Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, *473*(7347), 298-307. <https://doi.org/10.1038/nature10144>
- Carnovale, C., Bryant, G., Shukla, R., & Bansal, V. (2019). Identifying Trends in Gold Nanoparticle Toxicity and Uptake : Size, Shape, Capping Ligand, and Biological Corona. *ACS Omega*, *4*(1), 242-256. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b03227>

- Carrese, B., Sanità, G., & Lamberti, A. (2022). Nanoparticles Design for Theranostic Approach in Cancer Disease. *Cancers*, *14*(19), 4654. <https://doi.org/10.3390/cancers14194654>
- Carvalho, J. R., & Verdelho Machado, M. (2018). New Insights About Albumin and Liver Disease. *Annals of Hepatology*, *17*(4), 547-560. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0012.0916>
- Casajus, H., Saba, S., Vlach, M., Vène, E., Ribault, C., Tranchimand, S., Nugier-Chauvin, C., Dubreucq, E., Loyer, P., Cammas-Marion, S., & Lepareur, N. (2018). Cell Uptake and Biocompatibility of Nanoparticles Prepared from Poly(benzyl malate) (Co)polymers Obtained through Chemical and Enzymatic Polymerization in Human HepaRG Cells and Primary Macrophages. *Polymers*, *10*(11), 1244. <https://doi.org/10.3390/polym10111244>
- Cerec, V., Glaise, D., Garnier, D., Morosan, S., Turlin, B., Drenou, B., Gripon, P., Kremsdorf, D., Guguen-Guillouzo, C., & Corlu, A. (2007). Transdifferentiation of hepatocyte-like cells from the human hepatoma HepaRG cell line through bipotent progenitor. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, *45*(4), 957-967. <https://doi.org/10.1002/hep.21536>
- Chen, B., Dai, W., He, B., Zhang, H., Wang, X., Wang, Y., & Zhang, Q. (2017). Current Multistage Drug Delivery Systems Based on the Tumor Microenvironment. *Theranostics*, *7*(3), 538-558. <https://doi.org/10.7150/thno.16684>
- Chen, H., Wang, L., Yu, Q., Qian, W., Tiwari, D., Yi, H., Wang, A. Y., Huang, J., Yang, L., & Mao, H. (2013). Anti-HER2 antibody and ScFvEGFR-conjugated antifouling magnetic iron oxide nanoparticles for targeting and magnetic resonance imaging of breast cancer. *International Journal of Nanomedicine*, *8*, 3781-3794. <https://doi.org/10.2147/IJN.S49069>
- Chen, J., Guo, Z., Tian, H., & Chen, X. (2016). Production and clinical development of nanoparticles for gene delivery. *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development*, *3*, 16023. <https://doi.org/10.1038/mtm.2016.23>
- Chen, Q., Riviere, J. E., & Lin, Z. (2022). Toxicokinetics, dose-response, and risk assessment of nanomaterials: Methodology, challenges, and future perspectives. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Nanomedicine and Nanobiotechnology*, *14*(6), e1808. <https://doi.org/10.1002/wnan.1808>
- Chen, S., & Bashir, R. (2023). Advances in field-effect biosensors towards point-of-use. *Nanotechnology*, *34*(49), 492002. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/acf3f0>
- Cheng, D., Chai, J., Wang, H., Fu, L., Peng, S., & Ni, X. (2021). Hepatic macrophages: Key players in the development and progression of liver fibrosis. *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*, *41*(10), 2279-2294. <https://doi.org/10.1111/liv.14940>
- Cheng, G., Montero, A., Gastaminza, P., Whitten-Bauer, C., Wieland, S. F., Isogawa, M., Fredericksen, B., Selvarajah, S., Gallay, P. A., Ghadiri, M. R., & Chisari, F. V. (2008). A virocidal amphipathic {alpha}-helical peptide that inhibits hepatitis C virus infection in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(8), 3088-3093. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712380105>
- Cheng, X., & Lee, R. J. (2016). The role of helper lipids in lipid nanoparticles (LNPs) designed for oligonucleotide delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *99*(Pt A), 129-137. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.01.022>
- Chiang, C.-J., Yang, Y.-W., You, S.-L., Lai, M.-S., & Chen, C.-J. (2013). Thirty-year outcomes of the national hepatitis B immunization program in Taiwan. *JAMA*, *310*(9), 974-976. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.276701>

- Chiba, T., Kita, K., Zheng, Y.-W., Yokosuka, O., Saisho, H., Iwama, A., Nakauchi, H., & Taniguchi, H. (2006). Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, *44*(1), 240-251. <https://doi.org/10.1002/hep.21227>
- Ciancone, M., Bellec, N., Cammas-Marion, S., Dolet, A., Vray, D., Varray, F., Le Goff-Gaillard, C., Le Goff, X., Arlot-Bonnemains, Y., & Camerel, F. (2019). Liposomes Containing Nickel-Bis(dithiolene) Complexes for Photothermal Theranostics. *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, *35*(47), 15121-15130. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b01296>
- Coelho, T., Adams, D., Silva, A., Lozeron, P., Hawkins, P. N., Mant, T., Perez, J., Chiesa, J., Warrington, S., Tranter, E., Munisamy, M., Falzone, R., Harrop, J., Cehelsky, J., Bettencourt, B. R., Geissler, M., Butler, J. S., Sehgal, A., Meyers, R. E., ... Suhr, O. B. (2013). Safety and efficacy of RNAi therapy for transthyretin amyloidosis. *The New England Journal of Medicine*, *369*(9), 819-829. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1208760>
- Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., & Mantovani, A. (2009). Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer : Links to genetic instability. *Carcinogenesis*, *30*(7), 1073-1081. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp127>
- Comité Biotechnologique du LEEM. (2013). *Applications des nanotechnologies à la médecine*. <https://www.leem.org/publication/applications-des-nanotechnologies-la-medecine>
- Corlu, A., Kneip, B., Lhadi, C., Leray, G., Glaise, D., Baffet, G., Bourel, D., & Guguen-Guillouzo, C. (1991). A plasma membrane protein is involved in cell contact-mediated regulation of tissue-specific genes in adult hepatocytes. *The Journal of Cell Biology*, *115*(2), 505-515. <https://doi.org/10.1083/jcb.115.2.505>
- Corlu, A., & Loyer, P. (2015). Culture Conditions Promoting Hepatocyte Proliferation and Cell Cycle Synchronization. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1250*, 27-51. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2074-7_3
- Couvreur, P., Tulkens, P., Roland, M., Trouet, A., & Speiser, P. (1977). Nanocapsules : A new type of lysosomotropic carrier. *FEBS Letters*, *84*(2), 323-326. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(77\)80717-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(77)80717-5)
- Couvreur, P., & Vauthier, C. (2006). Nanotechnology : Intelligent design to treat complex disease. *Pharmaceutical Research*, *23*(7), 1417-1450. <https://doi.org/10.1007/s11095-006-0284-8>
- D'Addio, S. M., Saad, W., Ansell, S. M., Squiers, J. J., Adamson, D. H., Herrera-Alonso, M., Wohl, A. R., Hoyer, T. R., Macosko, C. W., Mayer, L. D., Vauthier, C., & Prud'homme, R. K. (2012). Effects of block copolymer properties on nanocarrier protection from in vivo clearance. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, *162*(1), 208-217. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.06.020>
- Dai, Q., Wilhelm, S., Ding, D., Syed, A. M., Sindhvani, S., Zhang, Y., Chen, Y. Y., MacMillan, P., & Chan, W. C. W. (2018). Quantifying the Ligand-Coated Nanoparticle Delivery to Cancer Cells in Solid Tumors. *ACS Nano*, *12*(8), 8423-8435. <https://doi.org/10.1021/acs.nano.8b03900>
- Daniel, Y., Lelou, E., Aninat, C., Corlu, A., & Cabillic, F. (2021). Interplay between Metabolism Reprogramming and Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer Stem Cells. *Cancers*, *13*(8), 1973. <https://doi.org/10.3390/cancers13081973>
- Daou, T. J., Li, L., Reiss, P., Josserand, V., & Texier, I. (2009). Effect of poly(ethylene glycol) length on the in vivo behavior of coated quantum dots. *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, *25*(5), 3040-3044. <https://doi.org/10.1021/la8035083>

- Defossez, G., Le Guyader-Peyrou, S., Uhry, Z., Grosclaude, P., Colonna, M., & Dantony, E. (2019). *Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018. Synthèse.* (p. 20). Saint Maurice: Santé publique France. <https://www.santepubliquefrance.fr/>
- de Raucourt, E. (2018). Rôle du foie en hémostase. *EMC - Hépatologie*, 13(2), 1-10. [https://doi.org/10.1016/S1155-1976\(17\)80142-X](https://doi.org/10.1016/S1155-1976(17)80142-X)
- Deschatrette, J., & Weiss, M. C. (1974). Characterization of differentiated and dedifferentiated clones from a rat hepatoma. *Biochimie*, 56(11-12), 1603-1611. [https://doi.org/10.1016/s0300-9084\(75\)80286-0](https://doi.org/10.1016/s0300-9084(75)80286-0)
- Désert, R., Rohart, F., Canal, F., Sicard, M., Desille, M., Renaud, S., Turlin, B., Bellaud, P., Perret, C., Clément, B., Lê Cao, K.-A., & Musso, O. (2017). Human hepatocellular carcinomas with a periportal phenotype have the lowest potential for early recurrence after curative resection. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 66(5), 1502-1518. <https://doi.org/10.1002/hep.29254>
- Desmots, F., Rissel, M., Pigeon, C., Loyer, P., Loréal, O., & Guillouzo, A. (2002). Differential effects of iron overload on GST isoform expression in mouse liver and kidney and correlation between GSTA4 induction and overproduction of free radicles. *Free Radical Biology & Medicine*, 32(1), 93-101. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(01\)00767-5](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(01)00767-5)
- Dhaliwal, A., & Zheng, G. (2019). Improving accessibility of EPR-insensitive tumor phenotypes using EPR-adaptive strategies : Designing a new perspective in nanomedicine delivery. *Theranostics*, 9(26), 8091-8108. <https://doi.org/10.7150/thno.37204>
- Dianat, N., Dubois-Pot-Schneider, H., Steichen, C., Desterke, C., Leclerc, P., Raveux, A., Combettes, L., Weber, A., Corlu, A., & Dubart-Kupperschmitt, A. (2014). Generation of functional cholangiocyte-like cells from human pluripotent stem cells and HepaRG cells. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 60(2), 700-714. <https://doi.org/10.1002/hep.27165>
- Dixon, K., & Koprass, E. (2004). Genetic alterations and DNA repair in human carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, 14(6), 441-448. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2004.06.007>
- Dixon, L. J., Barnes, M., Tang, H., Pritchard, M. T., & Nagy, L. E. (2013). Kupffer cells in the liver. *Comprehensive Physiology*, 3(2), 785-797. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120026>
- Dolgin, E. (2021). The tangled history of mRNA vaccines. *Nature*, 597(7876), 318-324. <https://doi.org/10.1038/d41586-021-02483-w>
- dos Santos, O. A. L., Pizzorno Backx, B., Abumousa, R. A., & Bououdina, M. (2022). Environmental Implications Associated with the Development of Nanotechnology : From Synthesis to Disposal. *Nanomaterials*, 12(23), 4319. <https://doi.org/10.3390/nano12234319>
- Doufène, K., Lapinte, V., Gaveau, P., Félix, G., Cacciaguerra, T., Chopineau, J., Robin, J.-J., Devoisselle, J.-M., & Aubert-Pouëssel, A. (2019). Tunable vegetable oil/silica hybrid microparticles for poorly water-soluble drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 567, 118478. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118478>
- Du, B., Han, H., Wang, Z., Kuang, L., Wang, L., Yu, L., Wu, M., Zhou, Z., & Qian, M. (2010). Targeted drug delivery to hepatocarcinoma in vivo by phage-displayed specific binding peptide. *Molecular Cancer Research: MCR*, 8(2), 135-144. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-09-0339>
- Du, Y., Liu, D., & Du, Y. (2022). Recent advances in hepatocellular carcinoma therapeutic strategies and imaging-guided treatment. *Journal of Drug Targeting*, 30(3), 287-301. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2021.1999963>

- Du, Y.-Z., Cai, L.-L., Liu, P., You, J., Yuan, H., & Hu, F.-Q. (2012). Tumor cells-specific targeting delivery achieved by A54 peptide functionalized polymeric micelles. *Biomaterials*, *33*(34), 8858-8867. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.08.043>
- Dubois-Pot-Schneider, H., Fekir, K., Coulouarn, C., Glaise, D., Aninat, C., Jarnouen, K., Le Guével, R., Kubo, T., Ishida, S., Morel, F., & Corlu, A. (2014). Inflammatory cytokines promote the retrodifferentiation of tumor-derived hepatocyte-like cells to progenitor cells. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, *60*(6), 2077-2090. <https://doi.org/10.1002/hep.27353>
- Edamoto, Y., Hara, A., Biernat, W., Terracciano, L., Cathomas, G., Riehle, H.-M., Matsuda, M., Fujii, H., Scoazec, J.-Y., & Ohgaki, H. (2003). Alterations of RB1, p53 and Wnt pathways in hepatocellular carcinomas associated with hepatitis C, hepatitis B and alcoholic liver cirrhosis. *International Journal of Cancer*, *106*(3), 334-341. <https://doi.org/10.1002/ijc.11254>
- Edeline, J., Bridgewater, J., Campillo-Gimenez, B., Neveu, E., Phelip, J.-M., Neuzillet, C., Boudjema, K., Rolland, Y., Valle, J. W., Garin, E., Malka, D., & Lamarca, A. (2023). Chemotherapy with or without selective internal radiation therapy for intrahepatic cholangiocarcinoma : Data from clinical trials. *Hepatology (Baltimore, Md.)*. <https://doi.org/10.1097/HEP.0000000000000544>
- Edeline, J., & Garin, E. (2020). Streamlining TARE or personalizing SIRT? Different philosophies to treat different HCCs with Yttrium-90.... *Journal of Hepatology*, *72*(6), 1046-1048. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.03.026>
- Edeline, J., Rolland, Y., Campillo-Gimenez, B., Bourien, H., Trochet, M., Garin, E., & Boudjema, K. (2023). Selective Internal Radiation Therapy (Yttrium-90 Glass Microspheres) Combined with Capecitabine in the Neoadjuvant Setting of Operable Intrahepatic CHOLangiocarcinoma : The SIROCHO Trial Design. *Annals of Surgical Oncology*, *30*(1), 21-22. <https://doi.org/10.1245/s10434-022-12708-5>
- El-Khoueiry, A. B., Kim, R. D., Harris, W. P., Sung, M. W., Waldschmidt, D., Iqbal, S., Zhang, X. (Amily), Nakajima, K., & Galle, P. R. (2020). Phase Ib study of regorafenib (REG) plus pembrolizumab (PEMBRO) for first-line treatment of advanced hepatocellular carcinoma (HCC). *Journal of Clinical Oncology*, *38*(4_suppl), 564-564. https://doi.org/10.1200/JCO.2020.38.4_suppl.564
- El-Serag, H. B. (2011). Hepatocellular carcinoma. *The New England Journal of Medicine*, *365*(12), 1118-1127. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1001683>
- El-Serag, H. B., & Rudolph, K. L. (2007). Hepatocellular carcinoma : Epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*, *132*(7), 2557-2576. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.04.061>
- Erlinger, S. (2018). Sécrétion biliaire. *Hépatologie*, *33*(4), 1-10. [https://doi.org/10.1016/S1155-1976\(18\)66450-2](https://doi.org/10.1016/S1155-1976(18)66450-2)
- European Association for the Study of the Liver. (2017). EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *Journal of Hepatology*, *67*(2), 370-398. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.03.021>
- European Association for the Study of the Liver. (2018). EASL Clinical Practice Guidelines : Management of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, *69*(1), 182-236. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.03.019>
- European Association for the Study of the Liver. (2020). EASL recommendations on treatment of hepatitis C: Final update of the series☆. *Journal of Hepatology*, *73*(5), 1170-1218. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.08.018>
- European Association For The Study Of The Liver & European Organisation For Research And Treatment Of Cancer. (2012). EASL-EORTC clinical practice guidelines : Management of

- hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, 56(4), 908-943. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.12.001>
- Eychenne, R., Bouvry, C., Bourgeois, M., Loyer, P., Benoist, E., & Lepareur, N. (2020). Overview of Radiolabeled Somatostatin Analogs for Cancer Imaging and Therapy. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(17), 4012. <https://doi.org/10.3390/molecules25174012>
- Ezike, T. C., Okpala, U. S., Onoja, U. L., Nwike, C. P., Ezeako, E. C., Okpara, O. J., Okoroafor, C. C., Eze, S. C., Kalu, O. L., Odoh, E. C., Nwadike, U. G., Ogbodo, J. O., Umeh, B. U., Ossai, E. C., & Nwanguma, B. C. (2023). Advances in drug delivery systems, challenges and future directions. *Heliyon*, 9(6), e17488. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e17488>
- Fábián, Á., Vereb, G., & Szöllösi, J. (2013). The hitchhikers guide to cancer stem cell theory : Markers, pathways and therapy. *Cytometry Part A*, 83A(1), 62-71. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22206>
- Faivre, S., Rimassa, L., & Finn, R. S. (2020). Molecular therapies for HCC : Looking outside the box. *Journal of Hepatology*, 72(2), 342-352. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.09.010>
- Farazi, P. A., & DePinho, R. A. (2006). Hepatocellular carcinoma pathogenesis : From genes to environment. *Nature Reviews. Cancer*, 6(9), 674-687. <https://doi.org/10.1038/nrc1934>
- Feingold, K. R. (2000). Introduction to Lipids and Lipoproteins. In K. R. Feingold, B. Anawalt, A. Boyce, G. Chrousos, W. W. de Herder, K. Dhatariya, K. Dungan, A. Grossman, J. M. Hershman, J. Hofland, S. Kalra, G. Kaltsas, C. Koch, P. Kopp, M. Korbonits, C. S. Kovacs, W. Kuohung, B. Laferrère, E. A. McGee, ... D. P. Wilson (Éds.), *Endotext*. MDText.com, Inc. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK305896/>
- Fekir, K., Dubois-Pot-Schneider, H., Désert, R., Daniel, Y., Glaise, D., Rauch, C., Morel, F., Fromenty, B., Musso, O., Cabillic, F., & Corlu, A. (2019). Retrodifferentiation of Human Tumor Hepatocytes to Stem Cells Leads to Metabolic Reprogramming and Chemoresistance. *Cancer Research*, 79(8), 1869-1883. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-2110>
- Fernandes, E., Ferreira, J. A., Andreia, P., Luís, L., Barroso, S., Sarmiento, B., & Santos, L. L. (2015). New trends in guided nanotherapies for digestive cancers: A systematic review. *Journal of Controlled Release*, 209, 288-307. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.05.003>
- Fox, M. E., Szoka, F. C., & Fréchet, J. M. J. (2009). Soluble Polymer Carriers for the Treatment of Cancer : The Importance of Molecular Architecture. *Accounts of chemical research*, 42(8), 1141-1151. <https://doi.org/10.1021/ar900035f>
- Gabizon, A., Bradbury, M., Prabhakar, U., Zamboni, W., Libutti, S., & Grodzinski, P. (2014). Cancer nanomedicines : Closing the translational gap. *Lancet (London, England)*, 384(9961), 2175-2176. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61457-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61457-4)
- Gao, H., Zhang, Q., Yang, Y., Jiang, X., & He, Q. (2015). Tumor homing cell penetrating peptide decorated nanoparticles used for enhancing tumor targeting delivery and therapy. *International Journal of Pharmaceutics*, 478(1), 240-250. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.11.029>
- Garin, E., Palard, X., Rolland, Y., Le Sourd, S., Lepareur, N., Ardisson, V., Bouvry, C., Laffont, S., Campillo-Gimenez, B., Bellissant, E., & Edeline, J. (2023). 188Re-SSS Lipiodol Radioembolization in HCC Patients : Results of a Phase 1 Trial (Lip-Re-01 Study). *Cancers*, 15(8), 2245. <https://doi.org/10.3390/cancers15082245>
- Garin, E., Rolland, Y., Edeline, J., Icard, N., Lenoir, L., Laffont, S., Mesbah, H., Breton, M., Sulpice, L., Boudjema, K., Rohou, T., Raoul, J.-L., Clement, B., & Boucher, E. (2015). Personalized dosimetry with intensification using 90Y-loaded glass microsphere radioembolization induces prolonged overall survival in hepatocellular carcinoma patients with portal vein thrombosis. *Journal of*

- Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine*, 56(3), 339-346. <https://doi.org/10.2967/jnumed.114.145177>
- Garin, E., Tselikas, L., Guiu, B., Chalaye, J., Edeline, J., de Baere, T., Assenat, E., Tacher, V., Robert, C., Terroir-Cassou-Mounat, M., Mariano-Goulart, D., Amaddeo, G., Palard, X., Hollebecque, A., Kafrouni, M., Regnault, H., Boudjema, K., Grimaldi, S., Fourcade, M., ... DOSISPHERE-01 Study Group. (2021). Personalised versus standard dosimetry approach of selective internal radiation therapy in patients with locally advanced hepatocellular carcinoma (DOSISPHERE-01): A randomised, multicentre, open-label phase 2 trial. *The Lancet. Gastroenterology & Hepatology*, 6(1), 17-29. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(20\)30290-9](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(20)30290-9)
- Germain, M., Caputo, F., Metcalfe, S., Tosi, G., Spring, K., Åslund, A. K. O., Pottier, A., Schiffelers, R., Ceccaldi, A., & Schmid, R. (2020). Delivering the power of nanomedicine to patients today. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 326, 164-171. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.07.007>
- Gicquel, T., Robert, S., Loyer, P., Victoni, T., Bodin, A., Ribault, C., Gleonnec, F., Couillin, I., Boichot, E., & Lagente, V. (2015). IL-1 β production is dependent on the activation of purinergic receptors and NLRP3 pathway in human macrophages. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 29(10), 4162-4173. <https://doi.org/10.1096/fj.14-267393>
- Glaise, D., Ilyin, G. P., Loyer, P., Cariou, S., Bilodeau, M., Lucas, J., Puisieux, A., Ozturk, M., & Guguen-Guillouzo, C. (1998). Cell cycle gene regulation in reversibly differentiated new human hepatoma cell lines. *Cell Growth & Differentiation: The Molecular Biology Journal of the American Association for Cancer Research*, 9(2), 165-176.
- Gomes, A. C., Mohsen, M., & Bachmann, M. F. (2017). Harnessing Nanoparticles for Immunomodulation and Vaccines. *Vaccines*, 5(1), 6. <https://doi.org/10.3390/vaccines5010006>
- Goodell, M. A., Brose, K., Paradis, G., Conner, A. S., & Mulligan, R. C. (1996). Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *The Journal of Experimental Medicine*, 183(4), 1797-1806.
- Goubault, C., Sciortino, F., Mongin, O., Jarry, U., Bostoën, M., Jakobczyk, H., Burel, A., Dutertre, S., Troadec, M.-B., Kahn, M. L., Chevance, S., & Gauffre, F. (2020). The Ouzo effect : A tool to elaborate high-payload nanocapsules. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 324, 430-439. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.05.023>
- Graham, U. M., Jacobs, G., Yokel, R. A., Davis, B. H., Dozier, A. K., Birch, M. E., Tseng, M. T., Oberdörster, G., Elder, A., & DeLouise, L. (2017). From Dose to Response : In Vivo Nanoparticle Processing and Potential Toxicity. *Advances in experimental medicine and biology*, 947, 71-100. https://doi.org/10.1007/978-3-319-47754-1_4
- Grimm, C. F., Ortmann, D., Mohr, L., Michalak, S., Krohne, T. U., Meckel, S., Eisele, S., Encke, J., Blum, H. E., & Geissler, M. (2000). Mouse alpha-fetoprotein-specific DNA-based immunotherapy of hepatocellular carcinoma leads to tumor regression in mice. *Gastroenterology*, 119(4), 1104-1112. <https://doi.org/10.1053/gast.2000.18157>
- Gripon, P., Rumin, S., Urban, S., Le Seyec, J., Glaise, D., Cannie, I., Guyomard, C., Lucas, J., Trepo, C., & Guguen-Guillouzo, C. (2002). Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(24), 15655-15660. <https://doi.org/10.1073/pnas.232137699>
- Guarnieri, D., Guaccio, A., Fusco, S., & Netti, P. A. (2011). Effect of serum proteins on polystyrene nanoparticle uptake and intracellular trafficking in endothelial cells. *Journal of Nanoparticle Research*, 13, 4295-4309. <https://doi.org/10.1007/s11051-011-0375-2>

- Guarra, F., Pratesi, A., Gabbiani, C., & Biver, T. (2021). A focus on the biological targets for coinage metal-NHCs as potential anticancer complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 217, 111355. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2021.111355>
- Guguen-Guillouzo, C., Clément, B., Baffet, G., Beaumont, C., Morel-Chany, E., Glaise, D., & Guillouzo, A. (1983). Maintenance and reversibility of active albumin secretion by adult rat hepatocytes co-cultured with another liver epithelial cell type. *Experimental Cell Research*, 143(1), 47-54. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(83\)90107-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(83)90107-6)
- Guichard, C., Amaddeo, G., Imbeaud, S., Ladeiro, Y., Pelletier, L., Maad, I. B., Calderaro, J., Bioulac-Sage, P., Letexier, M., Degos, F., Clément, B., Balabaud, C., Chevet, E., Laurent, A., Couchy, G., Letouzé, E., Calvo, F., & Zucman-Rossi, J. (2012). Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. *Nature Genetics*, 44(6), 694-698. <https://doi.org/10.1038/ng.2256>
- Guillouzo, A., & Guguen-Guillouzo, C. (2008). Evolving concepts in liver tissue modeling and implications for in vitro toxicology. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 4(10), 1279-1294. <https://doi.org/10.1517/17425255.4.10.1279>
- Gustafson, H. H., Holt-Casper, D., Grainger, D. W., & Ghandehari, H. (2015). Nanoparticle Uptake : The Phagocyte Problem. *Nano Today*, 10(4), 487-510. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2015.06.006>
- Halamoda-Kenzaoui, B., Geertsma, R., Pouw, J., Prina-Mello, A., Carrer, M., Roesslein, M., Sips, A., Weltring, K. M., Spring, K., & Bremer-Hoffmann, S. (2022). Future perspectives for advancing regulatory science of nanotechnology-enabled health products. *Drug Delivery and Translational Research*, 12(9), 2145-2156. <https://doi.org/10.1007/s13346-022-01165-y>
- Hallan, S. S., Sguizzato, M., Esposito, E., & Cortesi, R. (2021). Challenges in the Physical Characterization of Lipid Nanoparticles. *Pharmaceutics*, 13(4), 549. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13040549>
- Han, F., Meng, Q., Xie, E., Li, K., Hu, J., Chen, Q., Li, J., & Han, F. (2023). Engineered biomimetic micro/nano-materials for tissue regeneration. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11, 1205792. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1205792>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9)
- Hannoun, Z., Steichen, C., Dianat, N., Weber, A., & Dubart-Kupperschmitt, A. (2016). The potential of induced pluripotent stem cell derived hepatocytes. *Journal of Hepatology*, 65(1), 182-199. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.02.025>
- Haraguchi, N., Utsunomiya, T., Inoue, H., Tanaka, F., Mimori, K., Barnard, G. F., & Mori, M. (2006). Characterization of a side population of cancer cells from human gastrointestinal system. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 24(3), 506-513. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0282>
- He, H., Liu, L., Morin, E. E., Liu, M., & Schwendeman, A. (2019). Survey of Clinical Translation of Cancer Nanomedicines-Lessons Learned from Successes and Failures. *Accounts of Chemical Research*, 52(9), 2445-2461. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.9b00228>
- Heinrich, S., Castven, D., Galle, P. R., & Marquardt, J. U. (2020). Translational Considerations to Improve Response and Overcome Therapy Resistance in Immunotherapy for Hepatocellular Carcinoma. *Cancers*, 12(9), 2495. <https://doi.org/10.3390/cancers12092495>
- Hemmati, J., Azizi, M., Asghari, B., & Arabestani, M. R. (2023). Multidrug-Resistant Pathogens in Burn Wound, Prevention, Diagnosis, and Therapeutic Approaches (Conventional Antimicrobials and Nanoparticles). *The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology = Journal*

- Canadien des Maladies Infectieuses et de la Microbiologie Médicale*, 2023, 8854311. <https://doi.org/10.1155/2023/8854311>
- Hennrich, U., & Benešová, M. (2020). [68Ga]Ga-DOTA-TOC: The First FDA-Approved 68Ga-Radiopharmaceutical for PET Imaging. *Pharmaceuticals*, 13(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/ph13030038>
- Ho, W., Gao, M., Li, F., Li, Z., Zhang, X.-Q., & Xu, X. (2021). Next-Generation Vaccines : Nanoparticle-Mediated DNA and mRNA Delivery. *Advanced Healthcare Materials*, 10(8), e2001812. <https://doi.org/10.1002/adhm.202001812>
- Hoffman, A. S. (2008). The origins and evolution of « controlled » drug delivery systems. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 132(3), 153-163. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.08.012>
- Holczbauer, Á., Factor, V. M., Andersen, J. B., Marquardt, J. U., Kleiner, D. E., Raggi, C., Kitade, M., Seo, D., Akita, H., Durkin, M. E., & Thorgeirsson, S. S. (2013). Modeling pathogenesis of primary liver cancer in lineage-specific mouse cell types. *Gastroenterology*, 145(1), 221-231. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.03.013>
- Hoshida, Y., Nijman, S. M. B., Kobayashi, M., Chan, J. A., Brunet, J.-P., Chiang, D. Y., Villanueva, A., Newell, P., Ikeda, K., Hashimoto, M., Watanabe, G., Gabriel, S., Friedman, S. L., Kumada, H., Llovet, J. M., & Golub, T. R. (2009). Integrative transcriptome analysis reveals common molecular subclasses of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Research*, 69(18), 7385-7392. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1089>
- Hu, Q., Rijcken, C. J. F., van Gaal, E., Brundel, P., Kostkova, H., Etrych, T., Weber, B., Barz, M., Kiessling, F., Prakash, J., Storm, G., Hennink, W. E., & Lammers, T. (2016). Tailoring the physicochemical properties of core-crosslinked polymeric micelles for pharmaceutical applications. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 244(Pt B), 314-325. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.07.012>
- Huang, Z. W., Laurent, V., Chetouani, G., Ljubimova, J. Y., Holler, E., Benvegna, T., Loyer, P., & Cammas-Marion, S. (2012). New functional degradable and bio-compatible nanoparticles based on poly(malic acid) derivatives for site-specific anti-cancer drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 423(1), 84-92. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.04.035>
- Hulla, J. E., Sahu, S. C., & Hayes, A. W. (2015). Nanotechnology : History and future. *Human & Experimental Toxicology*, 34(12), 1318-1321. <https://doi.org/10.1177/0960327115603588>
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. (2012a). Biological agents. Volume 100 B. A review of human carcinogens. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans / World Health Organization, International Agency for Research on Cancer*, 100(Pt B), 1-441.
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. (2012b). Chemical agents and related occupations. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans / World Health Organization, International Agency for Research on Cancer*, 100(Pt F), 9-562.
- Ibrahim, M. A. I., Othman, R., Chee, C. F., & Ahmad Fisol, F. (2023). Evaluation of Folate-Functionalized Nanoparticle Drug Delivery Systems-Effectiveness and Concerns. *Biomedicines*, 11(7), 2080. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11072080>
- Ioannou, A., Fontana, M., & Gillmore, J. D. (2023). RNA Targeting and Gene Editing Strategies for Transthyretin Amyloidosis. *BioDrugs: Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy*, 37(2), 127-142. <https://doi.org/10.1007/s40259-023-00577-7>

- Islam, R., Maeda, H., & Fang, J. (2022). Factors affecting the dynamics and heterogeneity of the EPR effect: Pathophysiological and pathoanatomic features, drug formulations and physicochemical factors. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 19(2), 199-212. <https://doi.org/10.1080/17425247.2021.1874916>
- Isom, H. C., Secott, T., Georgoff, I., Woodworth, C., & Mummaw, J. (1985). Maintenance of differentiated rat hepatocytes in primary culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(10), 3252-3256. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.10.3252>
- Jennings, G. T., & Bachmann, M. F. (2008). The coming of age of virus-like particle vaccines. *Biological Chemistry*, 389(5), 521-536. <https://doi.org/10.1515/bc.2008.064>
- Jérôme, C., & Lecomte, P. (2008). Recent advances in the synthesis of aliphatic polyesters by ring-opening polymerization. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(9), 1056-1076. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.02.008>
- Jiang, Y., Huo, S., Mizuhara, T., Das, R., Lee, Y.-W., Hou, S., Moyano, D. F., Duncan, B., Liang, X.-J., & Rotello, V. M. (2015). The Interplay of Size and Surface Functionality on the Cellular Uptake of Sub-10 nm Gold Nanoparticles. *ACS Nano*, 9(10), 9986-9993. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b03521>
- Jin, C., Li, Y., Su, Y., Guo, Z., Wang, X., Wang, S., Zhang, F., Zhang, Z., Shao, J., & Zheng, S. (2020). Novel copper complex CTB regulates methionine cycle induced TERT hypomethylation to promote HCC cells senescence via mitochondrial SLC25A26. *Cell Death & Disease*, 11(10), 844. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03048-x>
- Jing, R., Zhou, X., Zhao, J., Wei, Y., Zuo, B., You, A., Rao, Q., Gao, X., Yang, R., Chen, L., Lu, Z., Zhou, Q., Zhang, N., & Yin, H. (2018). Fluorescent peptide highlights micronodules in murine hepatocellular carcinoma models and humans in vitro. *Hepatology*, 68(4), 1391-1411. <https://doi.org/10.1002/hep.29829>
- Juliano, R. L. (2018). Intracellular Trafficking and Endosomal Release of Oligonucleotides: What We Know and What We Don't. *Nucleic Acid Therapeutics*, 28(3), 166-177. <https://doi.org/10.1089/nat.2018.0727>
- Jung, E., Lee, N. K., Kang, S.-K., Choi, S.-H., Kim, D., Park, K., Choi, K., Choi, Y.-J., & Jung, D. H. (2012). Identification of tissue-specific targeting peptide. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 26(11), 1267-1275. <https://doi.org/10.1007/s10822-012-9614-6>
- Kaeokhamloed, N., Legeay, S., & Roger, E. (2022). FRET as the tool for in vivo nanomedicine tracking. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 349, 156-173. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.06.048>
- Kanebratt, K. P., & Andersson, T. B. (2008). HepaRG cells as an in vitro model for evaluation of cytochrome P450 induction in humans. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 36(1), 137-145. <https://doi.org/10.1124/dmd.107.017418>
- Kanwal, F., Kramer, J., Asch, S. M., Chayanupatkul, M., Cao, Y., & El-Serag, H. B. (2017). Risk of Hepatocellular Cancer in HCV Patients Treated With Direct-Acting Antiviral Agents. *Gastroenterology*, 153(4), 996-1005.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.06.012>
- Karaaslan, M. G., Aktaş, A., Gürses, C., Gök, Y., & Ateş, B. (2020). Chemistry, structure, and biological roles of Au-NHC complexes as TrxR inhibitors. *Bioorganic Chemistry*, 95, 103552. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103552>
- Khedri, M., Afsharchi, F., Souderjani, A. H., Rezvantalab, S., Didandeh, M., Maleki, R., Musaie, K., Santos, H. A., & Shahbazi, M.-A. (2022). Molecular scale study on the interactions of

- biocompatible nanoparticles with macrophage membrane and blood proteins. *Nano Select*, 3(8), 1252-1263. <https://doi.org/10.1002/nano.202200043>
- Kim, T. H., Koh, Y. H., Kim, B. H., Kim, M. J., Lee, J. H., Park, B., & Park, J.-W. (2021). Proton beam radiotherapy vs. radiofrequency ablation for recurrent hepatocellular carcinoma: A randomized phase III trial. *Journal of Hepatology*, 74(3), 603-612. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.09.026>
- Klaunig, J. E., Kamendulis, L. M., & Xu, Y. (2000). Epigenetic mechanisms of chemical carcinogenesis. *Human & Experimental Toxicology*, 19(10), 543-555. <https://doi.org/10.1191/096032700701546442>
- Knowles, B. B., Howe, C. C., & Aden, D. P. (1980). Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science (New York, N.Y.)*, 209(4455), 497-499. <https://doi.org/10.1126/science.6248960>
- Köck, K., & Brouwer, K. L. R. (2012). A perspective on efflux transport proteins in the liver. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 92(5), 599-612. <https://doi.org/10.1038/clpt.2012.79>
- Kola, I., & Landis, J. (2004). Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nature Reviews. Drug Discovery*, 3(8), 711-715. <https://doi.org/10.1038/nrd1470>
- Kolosnjaj-Tabi, J., Wilhelm, C., Clément, O., & Gazeau, F. (2013). Cell labeling with magnetic nanoparticles: Opportunity for magnetic cell imaging and cell manipulation. *Journal of Nanobiotechnology*, 11(1), S7. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-11-S1-S7>
- Koniaris, L. G., McKillop, I. H., Schwartz, S. I., & Zimmers, T. A. (2003). Liver regeneration. *Journal of the American College of Surgeons*, 197(4), 634-659. [https://doi.org/10.1016/S1072-7515\(03\)00374-0](https://doi.org/10.1016/S1072-7515(03)00374-0)
- Kouser, L., Paudyal, B., Kaur, A., Stenbeck, G., Jones, L. A., Abozaid, S. M., Stover, C. M., Flahaut, E., Sim, R. B., & Kishore, U. (2018). Human Properdin Opsonizes Nanoparticles and Triggers a Potent Pro-inflammatory Response by Macrophages without Involving Complement Activation. *Frontiers in Immunology*, 9, 131. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00131>
- Kristen, A. V., Ajroud-Driss, S., Conceição, I., Gorevic, P., Kyriakides, T., & Obici, L. (2019). Patisiran, an RNAi therapeutic for the treatment of hereditary transthyretin-mediated amyloidosis. *Neurodegenerative Disease Management*, 9(1), 5-23. <https://doi.org/10.2217/nmt-2018-0033>
- Krol, A. J., Beaune, P., de Waziers, I., & Lorient, M.-A. (2015). Métabolisme des xénobiotiques. *EMC - Hépatologie*, 30(2), 1-9. [https://doi.org/10.1016/S1155-1976\(15\)31590-4](https://doi.org/10.1016/S1155-1976(15)31590-4)
- Ku, S. H., Kim, K., Choi, K., Kim, S. H., & Kwon, I. C. (2014). Tumor-targeting multifunctional nanoparticles for siRNA delivery: Recent advances in cancer therapy. *Advanced Healthcare Materials*, 3(8), 1182-1193. <https://doi.org/10.1002/adhm.201300607>
- Kue, C. S., Kamkaew, A., Burgess, K., Kiew, L. V., Chung, L. Y., & Lee, H. B. (2016). Small Molecules for Active Targeting in Cancer. *Medicinal Research Reviews*, 36(3), 494-575. <https://doi.org/10.1002/med.21387>
- Kullak-Ublick, G. A., Paumgartner, G., & Berr, F. (1995). Long-term effects of cholecystectomy on bile acid metabolism. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 21(1), 41-45.
- Kullak-Ublick, G. A., Stieger, B., & Meier, P. J. (2004). Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease. *Gastroenterology*, 126(1), 322-342. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2003.06.005>
- Lammer, J., Malagari, K., Vogl, T., Pilleul, F., Denys, A., Watkinson, A., Pitton, M., Sergent, G., Pfammatter, T., Terraz, S., Benhamou, Y., Avajon, Y., Gruenberger, T., Pomoni, M.,

- Langenberger, H., Schuchmann, M., Dumortier, J., Mueller, C., Chevallier, P., ... PRECISION V Investigators. (2010). Prospective randomized study of doxorubicin-eluting-bead embolization in the treatment of hepatocellular carcinoma: Results of the PRECISION V study. *Cardiovascular and Interventional Radiology*, *33*(1), 41-52. <https://doi.org/10.1007/s00270-009-9711-7>
- Lammers, T., Aime, S., Hennink, W. E., Storm, G., & Kiessling, F. (2011). Theranostic nanomedicine. *Accounts of Chemical Research*, *44*(10), 1029-1038. <https://doi.org/10.1021/ar200019c>
- Lass, A., Zimmermann, R., Oberer, M., & Zechner, R. (2011). Lipolysis—A highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores. *Progress in Lipid Research*, *50*(1), 14-27. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2010.10.004>
- Laurent, V., Glaise, D., Nübel, T., Gilot, D., Corlu, A., & Loyer, P. (2013). Highly efficient SiRNA and gene transfer into hepatocyte-like HepaRG cells and primary human hepatocytes: New means for drug metabolism and toxicity studies. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *987*, 295-314. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-321-3_25
- Laurent-Puig, P., & Zucman-Rossi, J. (2006). Genetics of hepatocellular tumors. *Oncogene*, *25*(27), 3778-3786. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209547>
- Lazarovits, J., Sindhvani, S., Tavares, A. J., Zhang, Y., Song, F., Audet, J., Krieger, J. R., Syed, A. M., Stordy, B., & Chan, W. C. W. (2019). Supervised Learning and Mass Spectrometry Predicts the in Vivo Fate of Nanomaterials. *ACS Nano*, *13*(7), 8023-8034. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b02774>
- Leclercq, I., & Sempoux, C. (2018). Histophysiologie du foie. *EMC - Hépatologie*, *13*(3), 1-12. [https://doi.org/10.1016/S1155-1976\(18\)54296-0](https://doi.org/10.1016/S1155-1976(18)54296-0)
- Lee, H. (2021). Effect of Protein Corona on Nanoparticle-Lipid Membrane Binding: The Binding Strength and Dynamics. *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, *37*(12), 3751-3760. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.1c00249>
- Lee, Y. L., Ahn, B.-C., Lee, Y., Lee, S.-W., Cho, J.-Y., & Lee, J. (2011). Targeting of hepatocellular carcinoma with glypican-3-targeting peptide ligand. *Journal of Peptide Science: An Official Publication of the European Peptide Society*, *17*(11), 763-769. <https://doi.org/10.1002/psc.1400>
- Lepeltier, E., Bourgaux, C., & Couvreur, P. (2014). Nanoprecipitation and the « Ouzo effect »: Application to drug delivery devices. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *71*, 86-97. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.12.009>
- Lerner, D. A., Bégu, S., Aubert-Pouëssel, A., Polexe, R., Devoisselle, J.-M., Azaïs, T., & Tichit, D. (2020). Synthesis and Properties of New Multilayer Chitosan@layered Double Hydroxide/Drug Loaded Phospholipid Bilayer Nanocomposite Bio-Hybrids. *Materials (Basel, Switzerland)*, *13*(16), 3565. <https://doi.org/10.3390/ma13163565>
- Les nanomatériaux manufacturés—Brochure—INRS.* (s. d.). Consulté 18 octobre 2023, à l'adresse <https://www.inrs.fr/media.html?refINRS=ED%206050>
- Lesniak, A., Salvati, A., Santos-Martinez, M. J., Radomski, M. W., Dawson, K. A., & Åberg, C. (2013). Nanoparticle adhesion to the cell membrane and its effect on nanoparticle uptake efficiency. *Journal of the American Chemical Society*, *135*(4), 1438-1444. <https://doi.org/10.1021/ja309812z>
- Li, F., Li, R., Lu, F., Xu, L., Gan, L., Chu, W., Yan, M., & Gong, H. (2023). Adverse effects of silver nanoparticles on aquatic plants and zooplankton: A review. *Chemosphere*, *338*, 139459. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.139459>

- Li, H., Wang, Y., Tang, Q., Yin, D., Tang, C., He, E., Zou, L., & Peng, Q. (2021). The protein corona and its effects on nanoparticle-based drug delivery systems. *Acta Biomaterialia*, *129*, 57-72. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.05.019>
- Li, M., Shao, J., Guo, Z., Jin, C., Wang, L., Wang, F., Jia, Y., Zhu, Z., Zhang, Z., Zhang, F., Zheng, S., & Wang, X. (2020). Novel mitochondrion-targeting copper(II) complex induces HK2 malfunction and inhibits glycolysis via Drp1-mediated mitophagy in HCC. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *24*(5), 3091-3107. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14971>
- Li, R.-D., Yin, B.-C., & Ye, B.-C. (2016). Ultrasensitive, colorimetric detection of microRNAs based on isothermal exponential amplification reaction-assisted gold nanoparticle amplification. *Biosensors & Bioelectronics*, *86*, 1011-1016. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.07.042>
- Li, T., Cipolla, D., Rades, T., & Boyd, B. J. (2018). Drug nanocrystallisation within liposomes. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, *288*, 96-110. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.09.001>
- Li, Y.-J., Dong, M., Kong, F.-M., & Zhou, J.-P. (2015). Folate-decorated anticancer drug and magnetic nanoparticles encapsulated polymeric carrier for liver cancer therapeutics. *International Journal of Pharmaceutics*, *489*(1-2), 83-90. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.04.028>
- Libutti, S. K., Paciotti, G. F., Byrnes, A. A., Alexander, H. R., Gannon, W. E., Walker, M., Seidel, G. D., Yuldasheva, N., & Tamarkin, L. (2010). Phase I and pharmacokinetic studies of CYT-6091, a novel PEGylated colloidal gold-rhTNF nanomedicine. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *16*(24), 6139-6149. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-0978>
- Lin, Z., Monteiro-Riviere, N. A., & Riviere, J. E. (2016). A physiologically based pharmacokinetic model for polyethylene glycol-coated gold nanoparticles of different sizes in adult mice. *Nanotoxicology*, *10*(2), 162-172. <https://doi.org/10.3109/17435390.2015.1027314>
- Lindenbach, B. D., & Rice, C. M. (2013). The ins and outs of hepatitis C virus entry and assembly. *Nature Reviews. Microbiology*, *11*(10), 688-700. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3098>
- Lipka, J., Semmler-Behnke, M., Sperling, R. A., Wenk, A., Takenaka, S., Schleh, C., Kissel, T., Parak, W. J., & Kreyling, W. G. (2010). Biodistribution of PEG-modified gold nanoparticles following intratracheal instillation and intravenous injection. *Biomaterials*, *31*(25), 6574-6581. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.05.009>
- Liu, M. A. (2019). A Comparison of Plasmid DNA and mRNA as Vaccine Technologies. *Vaccines*, *7*(2), 37. <https://doi.org/10.3390/vaccines7020037>
- Liu, W., & Gust, R. (2016). Update on metal N-heterocyclic carbene complexes as potential anti-tumor metallodrugs. *Coordination Chemistry Reviews*, *329*, 191-213. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2016.09.004>
- Liu, X., Huang, Y., Cheng, M., Pan, L., Si, Y., Li, G., Niu, Y., Zhao, L., Zhao, J., Li, X., Chen, Y., & Yang, W. (2013). Screening and rational design of hepatitis C virus entry inhibitory peptides derived from GB virus A NS5A. *Journal of Virology*, *87*(3), 1649-1657. <https://doi.org/10.1128/JVI.02201-12>
- Liu, Y., Xu, C., Fan, X., Loh, X. J., Wu, Y.-L., & Li, Z. (2020). Preparation of mixed micelles carrying folates and stable radicals through PLA stereocomplexation for drug delivery. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, *108*, 110464. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110464>
- Ljubimova, J. Y., Fujita, M., Khazenon, N. M., Lee, B.-S., Wachsmann-Hogiu, S., Farkas, D. L., Black, K. L., & Holler, E. (2008). Nanoconjugate based on polymalic acid for tumor targeting. *Chemico-biological interactions*, *171*(2), 195-203. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2007.01.015>

- Llovet, J. M., Kelley, R. K., Villanueva, A., Singal, A. G., Pikarsky, E., Roayaie, S., Lencioni, R., Koike, K., Zucman-Rossi, J., & Finn, R. S. (2021). Hepatocellular carcinoma. *Nature Reviews. Disease Primers*, 7(1), 6. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00240-3>
- Llovet, J. M., Kudo, M., Cheng, A.-L., Finn, R. S., Galle, P. R., Kaneko, S., Meyer, T., Qin, S., Dutcus, C. E., Chen, E., Dubrovsky, L., & Zhu, A. X. (2019). Lenvatinib (len) plus pembrolizumab (pembro) for the first-line treatment of patients (pts) with advanced hepatocellular carcinoma (HCC) : Phase 3 LEAP-002 study. *Journal of Clinical Oncology*, 37(15_suppl), TPS4152-TPS4152. https://doi.org/10.1200/JCO.2019.37.15_suppl.TPS4152
- Llovet, J. M., Ricci, S., Mazzaferro, V., Hilgard, P., Gane, E., Blanc, J.-F., de Oliveira, A. C., Santoro, A., Raoul, J.-L., Forner, A., Schwartz, M., Porta, C., Zeuzem, S., Bolondi, L., Greten, T. F., Galle, P. R., Seitz, J.-F., Borbath, I., Häussinger, D., ... SHARP Investigators Study Group. (2008). Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *The New England Journal of Medicine*, 359(4), 378-390. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0708857>
- Llovet, J. M., Schwartz, M., & Mazzaferro, V. (2005). Resection and liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Seminars in Liver Disease*, 25(2), 181-200. <https://doi.org/10.1055/s-2005-871198>
- Lo, A., Lin, C.-T., & Wu, H.-C. (2008). Hepatocellular carcinoma cell-specific peptide ligand for targeted drug delivery. *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(3), 579-589. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-07-2359>
- Lo, S., Mahmoudi, E., & Fauzi, M. B. (2023). Applications of drug delivery systems, organic, and inorganic nanomaterials in wound healing. *Discover Nano*, 18(1), 104. <https://doi.org/10.1186/s11671-023-03880-y>
- Longmuir, K. J., Robertson, R. T., Haynes, S. M., Baratta, J. L., & Waring, A. J. (2006). Effective targeting of liposomes to liver and hepatocytes in vivo by incorporation of a Plasmodium amino acid sequence. *Pharmaceutical Research*, 23(4), 759-769. <https://doi.org/10.1007/s11095-006-9609-x>
- Lopez-Trabada Ataz, D., Dumont, S., & André, T. (2015). [Nab-paclitaxel]. *Bulletin Du Cancer*, 102(6), 568-576. <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2015.03.020>
- Loyer, P., Bedhouche, W., Huang, Z. W., & Cammas-Marion, S. (2013). Degradable and biocompatible nanoparticles decorated with cyclic RGD peptide for efficient drug delivery to hepatoma cells in vitro. *International Journal of Pharmaceutics*, 454(2), 727-737. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.05.060>
- Loyer, P., & Cammas-Marion, S. (2014). Natural and synthetic poly(malic acid)-based derivatives : A family of versatile biopolymers for the design of drug nanocarriers. *Journal of Drug Targeting*, 22(7), 556-575. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2014.936871>
- Lux, F., Mignot, A., Mowat, P., Louis, C., Dufort, S., Bernhard, C., Denat, F., Boschetti, F., Brunet, C., Antoine, R., Dugourd, P., Laurent, S., Vander Elst, L., Muller, R., Sancey, L., Josserand, V., Coll, J.-L., Stupar, V., Barbier, E., ... Tillement, O. (2011). Ultrasmall rigid particles as multimodal probes for medical applications. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 50(51), 12299-12303. <https://doi.org/10.1002/anie.201104104>
- Lyons, J. G., Plantz, M. A., Hsu, W. K., Hsu, E. L., & Minardi, S. (2020). Nanostructured Biomaterials for Bone Regeneration. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2020.00922>
- Ma, L., Ji, L., Yu, Y., & Wang, J. (2015). Novel molecular targets for diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Discovery Medicine*, 19(102), 7-14.

- Maeda, H. (2015). Toward a full understanding of the EPR effect in primary and metastatic tumors as well as issues related to its heterogeneity. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *91*, 3-6. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.01.002>
- Maeda, H., Matsumoto, T., Konno, T., Iwai, K., & Ueda, M. (1984). Tailor-making of protein drugs by polymer conjugation for tumor targeting : A brief review on smancs. *Journal of Protein Chemistry*, *3*(2), 181-193. <https://doi.org/10.1007/BF01040499>
- Maeda, H., Nakamura, H., & Fang, J. (2013). The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors : Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *65*(1), 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.10.002>
- Maeda, H., Tsukigawa, K., & Fang, J. (2016). A Retrospective 30 Years After Discovery of the Enhanced Permeability and Retention Effect of Solid Tumors : Next-Generation Chemotherapeutics and Photodynamic Therapy--Problems, Solutions, and Prospects. *Microcirculation (New York, N.Y.: 1994)*, *23*(3), 173-182. <https://doi.org/10.1111/micc.12228>
- Mahon, E., Salvati, A., Baldelli Bombelli, F., Lynch, I., & Dawson, K. A. (2012). Designing the nanoparticle-biomolecule interface for « targeting and therapeutic delivery ». *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, *161*(2), 164-174. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.04.009>
- Maitre, M., & Klein, C. (2016). Métabolismes hépatiques. *EMC - Hépatologie*, *11*(1), 1-15. [https://doi.org/10.1016/S1155-1976\(15\)71495-6](https://doi.org/10.1016/S1155-1976(15)71495-6)
- Mäkelä, A. R., Matilainen, H., White, D. J., Ruoslahti, E., & Oker-Blom, C. (2006). Enhanced Baculovirus-Mediated Transduction of Human Cancer Cells by Tumor-Homing Peptides. *Journal of Virology*, *80*(13), 6603-6611. <https://doi.org/10.1128/JVI.00528-06>
- Malakar, A., Kanel, S. R., Ray, C., Snow, D. D., & Nadagouda, M. N. (2021). Nanomaterials in the environment, human exposure pathway, and health effects : A review. *The Science of the Total Environment*, *759*, 143470. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143470>
- Manolova, V., Flace, A., Bauer, M., Schwarz, K., Saudan, P., & Bachmann, M. F. (2008). Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. *European Journal of Immunology*, *38*(5), 1404-1413. <https://doi.org/10.1002/eji.200737984>
- Marques, A. C., Costa, P. C., Velho, S., & Amaral, M. H. (2023). Lipid Nanoparticles Functionalized with Antibodies for Anticancer Drug Therapy. *Pharmaceutics*, *15*(1), 216. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010216>
- Marques, A. C., Costa, P. J., Velho, S., & Amaral, M. H. (2021). Stimuli-responsive hydrogels for intratumoral drug delivery. *Drug Discovery Today*, *26*(10), 2397-2405. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.04.012>
- Martin, C., Vallet, B., & Riou, B. (2017). *Physiologie humaine appliquée* (1631191). eBook Collection (EBSCOhost). <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=nlebk&AN=1631191&site=eds-live>
- Matsumura, Y., & Maeda, H. (1986). A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy : Mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Research*, *46*(12 Pt 1), 6387-6392.
- McGlynn, K. A., Petrick, J. L., & El-Serag, H. B. (2021). Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, *73* Suppl 1, 4-13. <https://doi.org/10.1002/hep.31288>

- McGlynn, K. A., Petrick, J. L., & London, W. T. (2015). Global epidemiology of hepatocellular carcinoma : An emphasis on demographic and regional variability. *Clinics in liver disease*, 19(2), 223-238. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2015.01.001>
- McNeil, S. E. (2016). Evaluation of nanomedicines : Stick to the basics. *Nature Reviews Materials*, 1(10), Article 10. <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.73>
- Mellid-Carballal, R., Gutierrez-Gutierrez, S., Rivas, C., & Garcia-Fuentes, M. (2023a). Viral protein nanoparticles (Part 1) : Pharmaceutical characteristics. *European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 187, 106460. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2023.106460>
- Mellid-Carballal, R., Gutierrez-Gutierrez, S., Rivas, C., & Garcia-Fuentes, M. (2023b). Viral protein-based nanoparticles (part 2) : Pharmaceutical applications. *European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 189, 106558. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2023.106558>
- Metlej, P. (2019). *Identification de peptides ciblant les cholangiocytes et cellules souches cancéreuses humaines issus de la lignée d'hépatome HepaRG par la technique de phage display* [These de doctorat, Rennes 1]. <https://www.theses.fr/2019REN1B049>
- Mezghrani, O., Tang, Y., Ke, X., Chen, Y., Hu, D., Tu, J., Zhao, L., & Bourkaib, N. (2015). Hepatocellular carcinoma dually-targeted nanoparticles for reduction triggered intracellular delivery of doxorubicin. *International Journal of Pharmaceutics*, 478(2), 553-568. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.10.041>
- Miedema, I. H. C., Zwezerijnen, G. J. C., Huisman, M. C., Doleman, E., Mathijssen, R. H. J., Lammers, T., Hu, Q., van Dongen, G. A. M. S., Rijcken, C. J. F., Vugts, D. J., & Menke-van der Houven van Oordt, C. W. (2022). PET-CT Imaging of Polymeric Nanoparticle Tumor Accumulation in Patients. *Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla.)*, 34(21), e2201043. <https://doi.org/10.1002/adma.202201043>
- Milbeo, P., Quintin, F., Moulat, L., Didierjean, C., Martinez, J., Bantreil, X., Calmès, M., & Lamaty, F. (2021). Synthesis, characterisation and cytotoxic activity evaluation of new metal-salen complexes based on the 1,2-bicyclo[2.2.2]octane bridge. *Tetrahedron Letters*, 63, 152706. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2020.152706>
- Mishra, L., Banker, T., Murray, J., Byers, S., Thenappan, A., He, A. R., Shetty, K., Johnson, L., & Reddy, E. P. (2009). Liver stem cells and hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 49(1), 318-329. <https://doi.org/10.1002/hep.22704>
- Moghimi, S. M., Hunter, A. C., & Andresen, T. L. (2012). Factors controlling nanoparticle pharmacokinetics : An integrated analysis and perspective. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 52, 481-503. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010611-134623>
- Moghimi, S. M., Hunter, A. C., & Murray, J. C. (2001). Long-circulating and target-specific nanoparticles : Theory to practice. *Pharmacological Reviews*, 53(2), 283-318.
- Mohsen, M. O., Augusto, G., & Bachmann, M. F. (2020). The 3Ds in virus-like particle based-vaccines : « Design, Delivery and Dynamics ». *Immunological Reviews*, 296(1), 155-168. <https://doi.org/10.1111/imr.12863>
- Moman, R. N., Gupta, N., & Varacallo, M. (2021). Physiology, Albumin. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459198/>
- Mönkemöller, V., Øie, C., Hübner, W., Huser, T., & McCourt, P. (2015). Multimodal super-resolution optical microscopy visualizes the close connection between membrane and the cytoskeleton

- in liver sinusoidal endothelial cell fenestrations. *Scientific Reports*, 5, 16279. <https://doi.org/10.1038/srep16279>
- Mortimer, G. M., Butcher, N. J., Musumeci, A. W., Deng, Z. J., Martin, D. J., & Minchin, R. F. (2014). Cryptic epitopes of albumin determine mononuclear phagocyte system clearance of nanomaterials. *ACS Nano*, 8(4), 3357-3366. <https://doi.org/10.1021/nn405830g>
- Musso, O., Aninat, C., Loyer, P., & Corlu, A. (2021). Structure et fonctions des hépatocytes. *EMC - Hépatologie*, 36(1), 1-18. [https://doi.org/10.1016/S1155-1976\(20\)55956-1](https://doi.org/10.1016/S1155-1976(20)55956-1)
- Nahon, P., Aubé, C., Moga, L., Chalaye, J., Guiu, B., Luciani, A., Rode, A., Ronot, M., Seror, O., Soussan, M., Sutter, O., Bourlière, M., Bureau, C., de Lédinghen, V., & Ganne-Carrié, N. (2021). Non-invasive diagnosis and follow-up of primary malignant liver tumours. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, 46(1), 101766. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2021.101766>
- Najahi-Missaoui, W., Arnold, R. D., & Cummings, B. S. (2020). Safe Nanoparticles : Are We There Yet? *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 385. <https://doi.org/10.3390/ijms22010385>
- Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyano, K., Yamane, T., & Sato, J. (1982). Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Research*, 42(9), 3858-3863.
- Nel, A. E., Mädler, L., Velegol, D., Xia, T., Hoek, E. M. V., Somasundaran, P., Klaessig, F., Castranova, V., & Thompson, M. (2009). Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nature Materials*, 8(7), 543-557. <https://doi.org/10.1038/nmat2442>
- Ngo, W., Ahmed, S., Blackadar, C., Bussin, B., Ji, Q., Mladjenovic, S. M., Sepahi, Z., & Chan, W. C. W. (2022). Why nanoparticles prefer liver macrophage cell uptake in vivo. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 185, 114238. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2022.114238>
- Nio, K., Yamashita, T., & Kaneko, S. (2017). The evolving concept of liver cancer stem cells. *Molecular Cancer*, 16(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s12943-016-0572-9>
- Nukaly, H. Y., & Ansari, S. A. (2023). An Insight Into the Physicochemical Properties of Gold Nanoparticles in Relation to Their Clinical and Diagnostic Applications. *Cureus*, 15(4), e37803. <https://doi.org/10.7759/cureus.37803>
- Nuyken, O., & Pask, S. D. (2013). Ring-Opening Polymerization—An Introductory Review. *Polymers*, 5(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/polym5020361>
- Oliveira, P. A., Colaço, A., Chaves, R., Guedes-Pinto, H., De-La-Cruz P, L. F., & Lopes, C. (2007). Chemical carcinogenesis. *Anais Da Academia Brasileira De Ciencias*, 79(4), 593-616. <https://doi.org/10.1590/s0001-37652007000400004>
- Owens, D. E., & Peppas, N. A. (2006). Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 307(1), 93-102. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.10.010>
- Padmanabhan, P., Kumar, A., Kumar, S., Chaudhary, R. K., & Gulyás, B. (2016). Nanoparticles in practice for molecular-imaging applications: An overview. *Acta Biomaterialia*, 41, 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.06.003>
- Palard, X., Edeline, J., Rolland, Y., Le Sourd, S., Pracht, M., Laffont, S., Lenoir, L., Boudjema, K., Ugen, T., Brun, V., Mesbah, H., Haumont, L.-A., Loyer, P., & Garin, E. (2018). Dosimetric parameters predicting contralateral liver hypertrophy after unilobar radioembolization of hepatocellular carcinoma. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 45(3), 392-401. <https://doi.org/10.1007/s00259-017-3845-7>

- Park, K., Skidmore, S., Hadar, J., Garner, J., Park, H., Otte, A., Soh, B. K., Yoon, G., Yu, D., Yun, Y., Lee, B. K., Jiang, X., & Wang, Y. (2019). Injectable, long-acting PLGA formulations : Analyzing PLGA and understanding microparticle formation. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 304, 125-134. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.05.003>
- Patton, K., & Thibodeau, G. (2013). *Mosby's Handbook of Anatomy & Physiology* (2nd Edition).
- Pelaz, B., Alexiou, C., Alvarez-Puebla, R. A., Alves, F., Andrews, A. M., Ashraf, S., Balogh, L. P., Ballerini, L., Bestetti, A., Brendel, C., Bosi, S., Carril, M., Chan, W. C. W., Chen, C., Chen, X., Chen, X., Cheng, Z., Cui, D., Du, J., ... Parak, W. J. (2017). Diverse Applications of Nanomedicine. *ACS Nano*, 11(3), 2313-2381. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b06040>
- Pelaz, B., del Pino, P., Maffre, P., Hartmann, R., Gallego, M., Rivera-Fernández, S., de la Fuente, J. M., Nienhaus, G. U., & Parak, W. J. (2015). Surface Functionalization of Nanoparticles with Polyethylene Glycol : Effects on Protein Adsorption and Cellular Uptake. *ACS Nano*, 9(7), 6996-7008. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b01326>
- Peng, W. C., Logan, C. Y., Fish, M., Anbarchian, T., Aguisanda, F., Álvarez-Varela, A., Wu, P., Jin, Y., Zhu, J., Li, B., Grompe, M., Wang, B., & Nusse, R. (2018). Inflammatory Cytokine TNF α Promotes the Long-Term Expansion of Primary Hepatocytes in 3D Culture. *Cell*, 175(6), 1607-1619.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.11.012>
- Penn, C. A., Yang, K., Zong, H., Lim, J.-Y., Cole, A., Yang, D., Baker, J., Goonewardena, S. N., & Buckanovich, R. J. (2018). Therapeutic Impact of Nanoparticle Therapy Targeting Tumor-Associated Macrophages. *Molecular Cancer Therapeutics*, 17(1), 96-106. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-17-0688>
- Petitjean, K., Verres, Y., Bristeau, S., Ribault, C., Aninat, C., Olivier, C., Leroyer, P., Ropert, M., Loréal, O., Herault, O., Amalric, L., Baran, N., Fromenty, B., Corlu, A., & Loyer, P. (2023). Low concentrations of ethylene bisdithiocarbamate pesticides maneb and mancozeb impair manganese and zinc homeostasis to induce oxidative stress and caspase-dependent apoptosis in human hepatocytes. *Chemosphere*, 346, 140535. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.140535>
- Pfeifer, A. M., Cole, K. E., Smoot, D. T., Weston, A., Groopman, J. D., Shields, P. G., Vignaud, J. M., Juillerat, M., Lipsky, M. M., & Trump, B. F. (1993). Simian virus 40 large tumor antigen-immortalized normal human liver epithelial cells express hepatocyte characteristics and metabolize chemical carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(11), 5123-5127. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.11.5123>
- Pieretti, J. C., Beurton, J., Munevar, J., Nagamine, L. C. C. M., Le Faou, A., Seabra, A. B., Clarot, I., & Boudier, A. (2021). The Impact of Multiple Functional Layers in the Structure of Magnetic Nanoparticles and Their Influence on Albumin Interaction. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19), 10477. <https://doi.org/10.3390/ijms221910477>
- Poisson, J., Lemoine, S., Boulanger, C., Durand, F., Moreau, R., Valla, D., & Rautou, P.-E. (2017). Liver sinusoidal endothelial cells : Physiology and role in liver diseases. *Journal of Hepatology*, 66(1), 212-227. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.07.009>
- Polack, F. P., Thomas, S. J., Kitchin, N., Absalon, J., Gurtman, A., Lockhart, S., Perez, J. L., Pérez Marc, G., Moreira, E. D., Zerbini, C., Bailey, R., Swanson, K. A., Roychoudhury, S., Koury, K., Li, P., Kalina, W. V., Cooper, D., Frenck, R. W., Hammitt, L. L., ... C4591001 Clinical Trial Group. (2020). Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *The New England Journal of Medicine*, 383(27), 2603-2615. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2034577>

- Porchia, M., Pellei, M., Marinelli, M., Tisato, F., Del Bello, F., & Santini, C. (2018). New insights in Au-NHCs complexes as anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *146*, 709-746. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.01.065>
- Prabhakar, U., Maeda, H., Jain, R. K., Sevick-Muraca, E. M., Zamboni, W., Farokhzad, O. C., Barry, S. T., Gabizon, A., Grodzinski, P., & Blakey, D. C. (2013). Challenges and key considerations of the enhanced permeability and retention effect for nanomedicine drug delivery in oncology. *Cancer Research*, *73*(8), 2412-2417. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4561>
- Praetorius, A., Labille, J., Scheringer, M., Thill, A., Hungerbühler, K., & Bottero, J.-Y. (2014). Heteroaggregation of titanium dioxide nanoparticles with model natural colloids under environmentally relevant conditions. *Environmental Science & Technology*, *48*(18), 10690-10698. <https://doi.org/10.1021/es501655v>
- Price, L. S. L., Stern, S. T., Deal, A. M., Kabanov, A. V., & Zamboni, W. C. (2020). A reanalysis of nanoparticle tumor delivery using classical pharmacokinetic metrics. *Science Advances*, *6*(29), eaay9249. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aay9249>
- Qiao, Y., Wan, J., Zhou, L., Ma, W., Yang, Y., Luo, W., Yu, Z., & Wang, H. (2019). Stimuli-responsive nanotherapeutics for precision drug delivery and cancer therapy. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Nanomedicine and Nanobiotechnology*, *11*(1), e1527. <https://doi.org/10.1002/wnan.1527>
- Qin, H., Ding, Y., Mujeeb, A., Zhao, Y., & Nie, G. (2017). Tumor Microenvironment Targeting and Responsive Peptide-Based Nanoformulations for Improved Tumor Therapy. *Molecular Pharmacology*, *92*(3), 219-231. <https://doi.org/10.1124/mol.116.108084>
- Rahib, L., Smith, B. D., Aizenberg, R., Rosenzweig, A. B., Fleshman, J. M., & Matrisian, L. M. (2014). Projecting Cancer Incidence and Deaths to 2030 : The Unexpected Burden of Thyroid, Liver, and Pancreas Cancers in the United States. *Cancer Research*, *74*(11), 2913-2921. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0155>
- Raj R, K., D, E., & S, R. (2020). β -Sitosterol-assisted silver nanoparticles activates Nrf2 and triggers mitochondrial apoptosis via oxidative stress in human hepatocellular cancer cell line. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, *108*(9), 1899-1908. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36953>
- Recalcati, S., Correnti, M., Gammella, E., Raggi, C., Invernizzi, P., & Cairo, G. (2019). Iron Metabolism in Liver Cancer Stem Cells. *Frontiers in Oncology*, *9*, 149. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00149>
- Reichmuth, A. M., Oberli, M. A., Jaklenec, A., Langer, R., & Blankschtein, D. (2016). mRNA vaccine delivery using lipid nanoparticles. *Therapeutic Delivery*, *7*(5), 319-334. <https://doi.org/10.4155/tde-2016-0006>
- Reig, M., Forner, A., Rimola, J., Ferrer-Fàbrega, J., Burrel, M., Garcia-Criado, Á., Kelley, R. K., Galle, P. R., Mazzaferro, V., Salem, R., Sangro, B., Singal, A. G., Vogel, A., Fuster, J., Ayuso, C., & Bruix, J. (2022). BCLC strategy for prognosis prediction and treatment recommendation : The 2022 update. *Journal of Hepatology*, *76*(3), 681-693. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2021.11.018>
- Ren, J., Cai, R., Wang, J., Daniyal, M., Baimanov, D., Liu, Y., Yin, D., Liu, Y., Miao, Q., Zhao, Y., & Chen, C. (2019). Precision Nanomedicine Development Based on Specific Opsonization of Human Cancer Patient-Personalized Protein Coronas. *Nano Letters*, *19*(7), 4692-4701. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.9b01774>
- Reubi, J. C. (2003). Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. *Endocrine Reviews*, *24*(4), 389-427. <https://doi.org/10.1210/er.2002-0007>

- Rinella ME. (2015). Nonalcoholic fatty liver disease : A systematic review. *JAMA*, 313(22), 2263-2273. <https://doi.org/10.1001/jama.2015.5370>
- Rizzo, L. Y., Theek, B., Storm, G., Kiessling, F., & Lammers, T. (2013). Recent progress in nanomedicine : Therapeutic, diagnostic and theranostic applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(6), 1159-1166. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.02.020>
- Roco, M. C. (2011). The long view of nanotechnology development : The National Nanotechnology Initiative at 10 years. *Journal of Nanoparticle Research*, 13(2), 427-445. <https://doi.org/10.1007/s11051-010-0192-z>
- Roohani, S., & Tacke, F. (2021). Liver Injury and the Macrophage Issue : Molecular and Mechanistic Facts and Their Clinical Relevance. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14), 7249. <https://doi.org/10.3390/ijms22147249>
- Ruiz, I., & Féray, C. (2015). [Current management of hepatocellular carcinoma]. *Cancer Radiothérapie: Journal De La Société Française De Radiothérapie Oncologique*, 19(6-7), 410-415. <https://doi.org/10.1016/j.canrad.2015.05.008>
- Ruoslahti, E. (2003). The RGD story : A personal account. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, 22(6), 459-465. [https://doi.org/10.1016/s0945-053x\(03\)00083-0](https://doi.org/10.1016/s0945-053x(03)00083-0)
- Saeed, A., Phadnis, M., Park, R., Sun, W., Al-Rajabi, R. M. T., Baranda, J. C., Williamson, S. K., Collins, Z., Firth-Braun, J., Saeed, A., Foster, C., Roberts, B., Subramaniam, D., Kasi, A., & Anant, S. (2020). Cabozantinib (cabo) combined with durvalumab (durva) in gastroesophageal (GE) cancer and other gastrointestinal (GI) malignancies : Preliminary phase Ib CAMILLA study results. *Journal of Clinical Oncology*, 38(15_suppl), 4563-4563. https://doi.org/10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.4563
- Salem, R., Padia, S. A., Lam, M., Chiesa, C., Haste, P., Sangro, B., Toskich, B., Fowers, K., Herman, J. M., Kappadath, S. C., Leung, T., Sze, D. Y., Kim, E., & Garin, E. (2023). Clinical, dosimetric, and reporting considerations for Y-90 glass microspheres in hepatocellular carcinoma : Updated 2022 recommendations from an international multidisciplinary working group. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 50(2), 328-343. <https://doi.org/10.1007/s00259-022-05956-w>
- Salvati, A., Pitek, A. S., Monopoli, M. P., Prapainop, K., Bombelli, F. B., Hristov, D. R., Kelly, P. M., Åberg, C., Mahon, E., & Dawson, K. A. (2013). Transferrin-functionalized nanoparticles lose their targeting capabilities when a biomolecule corona adsorbs on the surface. *Nature Nanotechnology*, 8(2), 137-143. <https://doi.org/10.1038/nnano.2012.237>
- Sarfraz, M., Anjum, F., Zahra, D., Maqsood, A., & Ashfaq, U. A. (2023). Recent Updates on Peptide Molecules in Drug and Vaccine Development. *Current Pharmaceutical Design*, 29(20), 1564-1578. <https://doi.org/10.2174/1381612829666230717121632>
- Scott, C. L., Zheng, F., De Baetselier, P., Martens, L., Saeys, Y., De Prijck, S., Lippens, S., Abels, C., Schoonooghe, S., Raes, G., Devoogdt, N., Lambrecht, B. N., Beschin, A., & Guillems, M. (2016). Bone marrow-derived monocytes give rise to self-renewing and fully differentiated Kupffer cells. *Nature Communications*, 7, 10321. <https://doi.org/10.1038/ncomms10321>
- Sebastiani, F., Yanez Arteta, M., Lerche, M., Porcar, L., Lang, C., Bragg, R. A., Elmore, C. S., Krishnamurthy, V. R., Russell, R. A., Darwish, T., Pichler, H., Waldie, S., Moulin, M., Haertlein, M., Forsyth, V. T., Lindfors, L., & Cárdenas, M. (2021). Apolipoprotein E Binding Drives Structural and Compositional Rearrangement of mRNA-Containing Lipid Nanoparticles. *ACS Nano*, 15(4), 6709-6722. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c10064>
- Semple, S. C., Akinc, A., Chen, J., Sandhu, A. P., Mui, B. L., Cho, C. K., Sah, D. W. Y., Stebbing, D., Crosley, E. J., Yaworski, E., Hafez, I. M., Dorkin, J. R., Qin, J., Lam, K., Rajeev, K. G., Wong, K. F., Jeffs, L.

- B., Nechev, L., Eisenhardt, M. L., ... Hope, M. J. (2010). Rational design of cationic lipids for siRNA delivery. *Nature Biotechnology*, 28(2), 172-176. <https://doi.org/10.1038/nbt.1602>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A. (2022). Cancer statistics, 2022. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 72(1), 7-33. <https://doi.org/10.3322/caac.21708>
- Singh, R., & Lillard, J. W. (2009). Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Experimental and Molecular Pathology*, 86(3), 215-223. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2008.12.004>
- Sipe, J. D., Benson, M. D., Buxbaum, J. N., Ikeda, S., Merlini, G., Saraiva, M. J. M., & Westermarck, P. (2014). Nomenclature 2014 : Amyloid fibril proteins and clinical classification of the amyloidosis. *Amyloid: The International Journal of Experimental and Clinical Investigation: The Official Journal of the International Society of Amyloidosis*, 21(4), 221-224. <https://doi.org/10.3109/13506129.2014.964858>
- Sista, R. S., Ng, R., Nuffer, M., Basmajian, M., Coyne, J., Elderbroom, J., Hull, D., Kay, K., Krishnamurthy, M., Roberts, C., Wu, D., Kennedy, A. D., Singh, R., Srinivasan, V., & Pamula, V. K. (2020). Digital Microfluidic Platform to Maximize Diagnostic Tests with Low Sample Volumes from Newborns and Pediatric Patients. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 10(1), 21. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10010021>
- Smith, P. J., Giroud, M., Wiggins, H. L., Gower, F., Thorley, J. A., Stolpe, B., Mazzolini, J., Dyson, R. J., & Rappoport, J. Z. (2012). Cellular entry of nanoparticles via serum sensitive clathrin-mediated endocytosis, and plasma membrane permeabilization. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 2045-2055. <https://doi.org/10.2147/IJN.S29334>
- Song, G., Darr, D. B., Santos, C. M., Ross, M., Valdivia, A., Jordan, J. L., Midkiff, B. R., Cohen, S., Feinberg, N. N., Miller, C. R., Tarrant, T. K., Rogers, A. B., Dudley, A. C., Perou, C. M., & Zamboni, W. C. (2014). Effects of Tumor Microenvironment Heterogeneity on Nanoparticle Disposition and Efficacy in Breast Cancer Tumor Models. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 20(23), 6083-6095. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0493>
- Stylianopoulos, T., & Jain, R. K. (2013). Combining two strategies to improve perfusion and drug delivery in solid tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(46), 18632-18637. <https://doi.org/10.1073/pnas.1318415110>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020 : GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Tavares, A. J., Poon, W., Zhang, Y.-N., Dai, Q., Besla, R., Ding, D., Ouyang, B., Li, A., Chen, J., Zheng, G., Robbins, C., & Chan, W. C. W. (2017). Effect of removing Kupffer cells on nanoparticle tumor delivery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(51), E10871-E10880. <https://doi.org/10.1073/pnas.1713390114>
- Tenzer, S., Docter, D., Kuharev, J., Musyanovych, A., Fetz, V., Hecht, R., Schlenk, F., Fischer, D., Kiouptsi, K., Reinhardt, C., Landfester, K., Schild, H., Maskos, M., Knauer, S. K., & Stauber, R. H. (2013). Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. *Nature Nanotechnology*, 8(10), 772-781. <https://doi.org/10.1038/nnano.2013.181>
- Thakkar, S., Sharma, D., Kalia, K., & Tekade, R. K. (2020). Tumor microenvironment targeted nanotherapeutics for cancer therapy and diagnosis : A review. *Acta Biomaterialia*, 101, 43-68. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.09.009>
- Thioune, O., Fessi, H., Devissaguet, J. P., & Puisieux, F. (1997). Preparation of pseudolatex by nanoprecipitation : Influence of the solvent nature on intrinsic viscosity and interaction

- constant. *International Journal of Pharmaceutics*, 146(2), 233-238. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(96\)04830-2](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(96)04830-2)
- Tirand, L., Frochot, C., Vanderesse, R., Thomas, N., Trinquet, E., Pinel, S., Viriot, M.-L., Guillemin, F., & Barberi-Heyob, M. (2006). A peptide competing with VEGF165 binding on neuropilin-1 mediates targeting of a chlorin-type photosensitizer and potentiates its photodynamic activity in human endothelial cells. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 111(1-2), 153-164. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.11.017>
- Torchilin, V. P. (2006). Multifunctional nanocarriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(14), 1532-1555. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.09.009>
- Touboul, T., Vallier, L., & Weber, A. (2010). Cellules souches embryonnaires humaines et iPS - Une source fiable d'hépatocytes fœtaux. *médecine/sciences*, 26(12), Article 12. <https://doi.org/10.1051/medsci/201026121061>
- Trinchet, J.-C. (2009). [Hepatocellular carcinoma : Increasing incidence and optimized management]. *Gastroentérologie Clinique Et Biologique*, 33(8-9), 830-839. <https://doi.org/10.1016/j.gcb.2009.04.003>
- Trosko, J. E. (2001). Commentary : Is the concept of « tumor promotion » a useful paradigm? *Molecular Carcinogenesis*, 30(3), 131-137.
- Turati, F., Galeone, C., Rota, M., Pelucchi, C., Negri, E., Bagnardi, V., Corrao, G., Boffetta, P., & La Vecchia, C. (2014). Alcohol and liver cancer : A systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 25(8), 1526-1535. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu020>
- Turato, C., Balasso, A., Carloni, V., Tiribelli, C., Mastrotto, F., Mazzocca, A., & Pontisso, P. (2017). New molecular targets for functionalized nanosized drug delivery systems in personalized therapy for hepatocellular carcinoma. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 268, 184-197. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.10.027>
- Ulery, B. D., Nair, L. S., & Laurencin, C. T. (2011). Biomedical applications of biodegradable polymers. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 49(12), 832-864. <https://doi.org/10.1002/polb.22259>
- Utembe, W., Clewell, H., Sanabria, N., Doganis, P., & Gulumian, M. (2020). Current Approaches and Techniques in Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) Modelling of Nanomaterials. *Nanomaterials*, 10(7), 1267. <https://doi.org/10.3390/nano10071267>
- Vale, W. W. (1978). Distribution, metabolism, and pharmacology of peptides. *Neurosciences Research Program Bulletin*, 16(4), 521-534.
- Varalda, M., Antona, A., Bettio, V., Roy, K., Vachamaram, A., Yellenki, V., Massarotti, A., Baldanzi, G., & Capello, D. (2020). Psychotropic Drugs Show Anticancer Activity by Disrupting Mitochondrial and Lysosomal Function. *Frontiers in Oncology*, 10, 562196. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.562196>
- Vene, E., Barouti, G., Jarnouen, K., Gicquel, T., Rauch, C., Ribault, C., Guillaume, S. M., Cammas-Marion, S., & Loyer, P. (2016). Opsonisation of nanoparticles prepared from poly(β -hydroxybutyrate) and poly(trimethylene carbonate)-b-poly(malic acid) amphiphilic diblock copolymers : Impact on the in vitro cell uptake by primary human macrophages and HepaRG hepatoma cells. *International Journal of Pharmaceutics*, 513(1-2), 438-452. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.09.048>

- Verbeke, R., Lentacker, I., De Smedt, S. C., & Dewitte, H. (2019). Three decades of messenger RNA vaccine development. *Nano Today*, 28, 100766. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2019.100766>
- Verhoef, J. J. F., & Anchordoquy, T. J. (2013). Questioning the Use of PEGylation for Drug Delivery. *Drug Delivery and Translational Research*, 3(6), 499-503. <https://doi.org/10.1007/s13346-013-0176-5>
- Verry, C., Dufort, S., Villa, J., Gavard, M., Iriart, C., Grand, S., Charles, J., Chovelon, B., Cracowski, J.-L., Quesada, J.-L., Mendoza, C., Sancey, L., Lehmann, A., Jover, F., Giraud, J.-Y., Lux, F., Crémillieux, Y., McMahon, S., Pauwels, P. J., ... Balosso, J. (2021). Theranostic AGuIX nanoparticles as radiosensitizer : A phase I, dose-escalation study in patients with multiple brain metastases (NANO-RAD trial). *Radiotherapy and Oncology: Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 160, 159-165. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2021.04.021>
- Vlach, M., Quesnot, N., Dubois-Pot-Schneider, H., Ribault, C., Verres, Y., Petitjean, K., Rauch, C., Morel, F., Robin, M.-A., Corlu, A., & Loyer, P. (2019). Cytochrome P450 1A1/2, 2B6 and 3A4 HepaRG Cell-Based Biosensors to Monitor Hepatocyte Differentiation, Drug Metabolism and Toxicity. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 19(10), 2245. <https://doi.org/10.3390/s19102245>
- Wallace, K., Burt, A. D., & Wright, M. C. (2008). Liver fibrosis. *The Biochemical Journal*, 411(1), 1-18. <https://doi.org/10.1042/BJ20071570>
- Wang, J., Jiang, Z., Huang, C., Zhao, S., Zhu, S., Liu, R., & Zhu, H. (2023). Self-Assembled BODIPY Nanoparticles for Near-Infrared Fluorescence Bioimaging. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 28(7), 2997. <https://doi.org/10.3390/molecules28072997>
- Wang, J.-Q., Wu, Z.-X., Yang, Y., Teng, Q.-X., Li, Y.-D., Lei, Z.-N., Jani, K. A., Kaushal, N., & Chen, Z.-S. (2021). ATP-binding cassette (ABC) transporters in cancer : A review of recent updates. *Journal of Evidence-Based Medicine*, 14(3), 232-256. <https://doi.org/10.1111/jebm.12434>
- Warner, S. (2004). Diagnostics + therapy = theranostics. *Scientist*, 18, 38-39.
- Wei, X., Shamrakov, D., Nudelman, S., Peretz-Damari, S., Nativ-Roth, E., Regev, O., & Barenholz, Y. (2018). Cardinal Role of Intraliposome Doxorubicin-Sulfate Nanorod Crystal in Doxil Properties and Performance. *ACS Omega*, 3(3), 2508-2517. <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01235>
- Wibroe, P. P., Ahmadvand, D., Oghabian, M. A., Yaghmur, A., & Moghimi, S. M. (2016). An integrated assessment of morphology, size, and complement activation of the PEGylated liposomal doxorubicin products Doxil®, Caelyx®, DOXOrubicin, and SinaDoxosome. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 221, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.11.021>
- Wicki, A., Witzigmann, D., Balasubramanian, V., & Huwyler, J. (2015). Nanomedicine in cancer therapy : Challenges, opportunities, and clinical applications. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 200, 138-157. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.12.030>
- Wilhelm, S., Tavares, A. J., Dai, Q., Ohta, S., Audet, J., Dvorak, H. F., & Chan, W. C. W. (2016). Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nature Reviews Materials*, 1(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.14>
- Wilkinson, A. L., Qurashi, M., & Shetty, S. (2020). The Role of Sinusoidal Endothelial Cells in the Axis of Inflammation and Cancer Within the Liver. *Frontiers in Physiology*, 0. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00990>

- Xie, J., Xu, C., Kohler, N., Hou, Y., & Sun, S. (2007). Controlled PEGylation of Monodisperse Fe₃O₄ Nanoparticles for Reduced Non-Specific Uptake by Macrophage Cells. *Advanced Materials*, *19*(20), 3163-3166. <https://doi.org/10.1002/adma.200701975>
- Yardley, D. A. (2013). Nab-Paclitaxel mechanisms of action and delivery. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, *170*(3), 365-372. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.05.041>
- Yau, T., Zagonel, V., Santoro, A., Acosta-Rivera, M., Choo, S. P., Matilla, A., He, A. R., Cubillo Gracián, A., El-Khoueiry, A. B., Sangro, B., Eldawy, T., Bruix, J., Frassinetti, G., Vaccaro, G. M., Tschalka, M., Scheffold, C., Shen, Y., Neely, J., & Piscaglia, F. (2020). Nivolumab (NIVO) + ipilimumab (IPI) + cabozantinib (CABO) combination therapy in patients (pts) with advanced hepatocellular carcinoma (aHCC) : Results from CheckMate 040. *Journal of Clinical Oncology*, *38*(4_suppl), 478-478. https://doi.org/10.1200/JCO.2020.38.4_suppl.478
- Yin, C., Zhu, Y., Lv, Y., Deng, H., & Liu, B. (2023). The potential of engineered multifunctional quantum dots for macrophage theranostics. *The Innovation*, *4*(5), 100492. <https://doi.org/10.1016/j.xinn.2023.100492>
- Yoo, J., Park, C., Yi, G., Lee, D., & Koo, H. (2019). Active Targeting Strategies Using Biological Ligands for Nanoparticle Drug Delivery Systems. *Cancers*, *11*(5), 640. <https://doi.org/10.3390/cancers11050640>
- Youden, B., Jiang, R., Carrier, A. J., Servos, M. R., & Zhang, X. (2022). A Nanomedicine Structure-Activity Framework for Research, Development, and Regulation of Future Cancer Therapies. *ACS Nano*, *16*(11), 17497-17551. <https://doi.org/10.1021/acsnano.2c06337>
- Yue, N.-N., Xu, H.-M., Xu, J., Zhu, M.-Z., Zhang, Y., Tian, C.-M., Nie, Y.-Q., Yao, J., Liang, Y.-J., Li, D.-F., & Wang, L.-S. (2023). Application of Nanoparticles in the Diagnosis of Gastrointestinal Diseases : A Complete Future Perspective. *International Journal of Nanomedicine*, *18*, 4143-4170. <https://doi.org/10.2147/IJN.S413141>
- Yuspa, S. H. (2000). Overview of carcinogenesis : Past, present and future. *Carcinogenesis*, *21*(3), 341-344. <https://doi.org/10.1093/carcin/21.3.341>
- Zafar, H., Javed, R., & Zia, M. (2023). Nanotoxicity assessment in plants : An updated overview. *Environmental Science and Pollution Research International*, *30*(41), 93323-93344. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-29150-z>
- Zhan, C., Gu, B., Xie, C., Li, J., Liu, Y., & Lu, W. (2010). Cyclic RGD conjugated poly(ethylene glycol)-co-poly(lactic acid) micelle enhances paclitaxel anti-glioblastoma effect. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, *143*(1), 136-142. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.12.020>
- Zhang, B., Zhang, Y., Wang, J., Zhang, Y., Chen, J., Pan, Y., Ren, L., Hu, Z., Zhao, J., Liao, M., & Wang, S. (2007). Screening and Identification of a Targeting Peptide to Hepatocarcinoma from a Phage Display Peptide Library. *Molecular Medicine*, *13*(5-6), 246-254. <https://doi.org/10.2119/2006-00115.Zhang>
- Zhang, Y., Chen, J., Zhang, Y., Hu, Z., Hu, D., Pan, Y., Ou, S., Liu, G., Yin, X., Zhao, J., Ren, L., & Wang, J. (2007). Panning and identification of a colon tumor binding peptide from a phage display peptide library. *Journal of Biomolecular Screening*, *12*(3), 429-435. <https://doi.org/10.1177/1087057106299164>
- Zhou, T., Dong, Q., Shen, Y., Wu, W., Wu, H., Luo, X., Liao, X., & Wang, G. (2016). PEG-b-PCL polymeric nano-micelle inhibits vascular angiogenesis by activating p53-dependent apoptosis in zebrafish. *International Journal of Nanomedicine*, *11*, 6517-6531. <https://doi.org/10.2147/IJN.S112658>

-
- Zhou, Y., Yue, T., Ding, Y., Tan, H., Weng, J., Luo, S., & Zheng, X. (2023). Nanotechnology translation in vascular diseases : From design to the bench. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Nanomedicine and Nanobiotechnology*, e1919. <https://doi.org/10.1002/wnan.1919>
- Zhu, D., Qin, Y., Wang, J., Zhang, L., Zou, S., Zhu, X., & Zhu, L. (2016). Novel Glypican-3-Binding Peptide for in Vivo Hepatocellular Carcinoma Fluorescent Imaging. *Bioconjugate Chemistry*, 27(3), 831-839. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00030>
- Zhu, Y., Feijen, J., & Zhong, Z. (2018). Dual-targeted nanomedicines for enhanced tumor treatment. *Nano Today*, 18, 65-85. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2017.12.007>



Titre : Evaluation de nanoparticules polymères à base de dérivés du poly(malate de benzyle) et fonctionnalisation par des peptides hépatotropes pour le ciblage du carcinome hépatocellulaire.

Mots clés : Carcinome hépatocellulaire, nanoparticules polymère, peptides, fonctionnalisation, ciblage cellulaire

Résumé : Nous avons recherché des peptides pour fonctionnaliser des nanoparticules (NPs) formulées à partir de poly(malate de benzyle) (PMLABe) et de dérivés copolymères afin d'améliorer l'internalisation des NPs par les cellules d'hépatome *in vitro*. Le choix de ces (co)polymères était justifié par le fait que leur synthèse est bien maîtrisée et qu'ils sont dénués de toxicité vis-à-vis des cellules hépatiques. Nous avons greffé des peptides biotinylés à la surface des NPs préparées à partir de dérivés du poly(éthylène glycol) (PEG)-*b*-PMLABe également biotinylés, par l'intermédiaire de la streptavidine, puis réalisé le criblage d'une collection de peptides « hépatotropes » de synthèse choisis à partir de données de la littérature. Deux peptides augmentent considérablement la captation des NPs par les cellules d'hépatome humain : les peptides GBVA10-9 et CPB.

Le peptide GBVA10-9 est connu pour inhiber l'infection des hépatocytes humains par le virus de l'hépatite C, et le peptide CPB correspond à un fragment de la protéine circumsporozoite (CSP) de *Plasmodium berghei* impliquée dans l'infection hépatocytaire par le parasite. Nous avons également caractérisé l'internalisation des mêmes peptides, cette fois, liés uniquement à la streptavidine fluorescente, produisant un peptide modifié « modèle ». Les peptides GBVA10-9 et CPB étaient les plus efficaces pour accroître l'internalisation du complexe peptide-streptavidine. Parallèlement à ces travaux de fonctionnalisation des NPs, nous avons débuté des expériences d'encapsulation de molécules à potentiel anticancéreux, une nouvelle classe de composés organométalliques cytotoxiques et les effets sur la survie de cellules *in vitro* ont été évalués.

Title : Evaluation of polymeric nanoparticles derived from poly(benzyl malate) and functionalization by hepatotropic peptides for the targeting of hepatocellular carcinoma.

Keywords : Hepatocellular carcinoma, polymeric nanoparticles, peptides, functionalization, cell targeting

Abstract: We searched for peptides to functionalize nanoparticles (NPs) prepared from poly(benzyl malate) (PMLABe) and copolymer derivatives to enhance the internalization of NPs by hepatoma cells *in vitro*. The choice of these (co)polymers was justified by the fact that their synthesis is well controlled and that they are devoid of toxicity towards hepatic cells. We grafted biotinylated peptides onto the surface of NPs prepared from derivatives of poly(ethylene glycol) (PEG)-*b*-PMLABe also biotinylated via streptavidin and then screened a collection of synthetic "hepatotropic" peptides selected from literature data. Two peptides considerably increase the uptake of NPs by human hepatoma cells: The GBVA10-9 and CPB peptides.

The GBVA10-9 peptide is known to inhibit the infection of human hepatocytes by the hepatitis C virus, and the CPB peptide corresponds to a fragment of the circumsporozoite protein (CSP) of *Plasmodium berghei* involved in hepatocyte infection by the parasite. We have also characterized the internalization of the same peptides, this time bound only to fluorescent streptavidin, yielding a modified "template" peptide. Here again, the GBVA10-9 and CPB peptides were the most effective in increasing the internalization of the peptide-streptavidin complex. In parallel with this work on the functionalization of NPs, we have studied the encapsulation of molecules with anticancer potential, a new class of cytotoxic organometallic compounds and the effects on cell survival *in vitro* have been evaluated.