



HAL
open science

Vectorisation de complexes ferrocéniques par les nanocapsules lipidiques pour le traitement du cancer

Anne-Laure Lainé

► **To cite this version:**

Anne-Laure Lainé. Vectorisation de complexes ferrocéniques par les nanocapsules lipidiques pour le traitement du cancer. Sciences pharmaceutiques. Université d'Angers, 2013. Français. NNT : . tel-01021165

HAL Id: tel-01021165

<https://theses.hal.science/tel-01021165>

Submitted on 9 Jul 2014

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.

Thèse de Doctorat

Anne-Laure LAINÉ

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université d'Angers
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans*

École doctorale : Biologie - Santé

Discipline : Sciences pharmaceutiques
Spécialité : Pharmacologie expérimentale et clinique
Unité de recherche : Inserm U1066

Soutenue le 5 décembre 2013
Thèse N° 1383

Vectorisation de complexes ferrocéniques par les nanocapsules lipidiques pour le traitement du cancer

JURY

Rapporteurs : **Eric ALLÉMANN**, Professeur, Université de Genève
Jean-Luc COLL, Directeur de recherche, Institut Albert Bonniot

Examineurs : **François-Régis BATAILLE**, Professeur, Université d'Angers
Géraldine PIEL, Chef de travaux, Université de Liège

Directeur de Thèse : **Catherine PASSIRANI**, Professeur, Université d'Angers

Co-directeur de Thèse : **Jean-Pierre BENOIT**, Professeur, Université d'Angers

Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu Mr Jean-Pierre Benoit, Professeur à l'Université d'Angers et directeur de l'Unité INSERM U1066, de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire. Merci pour vos conseils et pour avoir pris de votre temps pour suivre mon travail.

Je souhaite adresser un grand MERCI chargé de sincérité et de ferveur à M^{me} Catherine Passirani, Professeur à l'Université d'Angers et directeur de ma thèse, pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sous sa direction. Merci pour ton encadrement, ton soutien et ta disponibilité. Merci également pour ta générosité, et pour nos échanges professionnels et personnels. Je te suis profondément reconnaissante pour ces 3 années de thèse qui représentent une expérience unique autant plaisante qu'enrichissante.

Je remercie M. Eric Allémann, Professeur à l'Université de Genève et M. Jean-Luc Coll, Directeur de recherche à l'Institut Albert Bonniot, d'avoir accepté de consacrer du temps à l'évaluation de ce travail en qualité de rapporteurs. Je remercie également M. François-Régis Bataille, Professeur à l'Université d'Angers et Mme Géraldine Piel, Chef de travaux à l'Université de Liège, d'avoir accepté de juger ce travail en qualité d'examineurs.

J'exprime mes plus vifs remerciements à l'ANR Mécaferrol pour le financement de ma thèse ainsi qu'à toute l'équipe la constituant, M^{me} Anne Vessières, Directeur de recherche CNRS, M. Gérard Jaouen, Professeur à l'école nationale supérieure de chimie de Paris (ENSCP), M. Siden Top, Directeur de recherche CNRS, M. Robert-Alain Toillon, Professeur à l'Université de Lille 1, M. Robert Kiss, Professeur à l'université libre de Bruxelles (ULB), M^{me} Véronique Mathieu, Directeur du laboratoire de toxicologie de l'ULB, et M^{me} Céline Bruyère (ULB) pour ce travail passionnant en collaboration qui a apporté à cette thèse un contenu scientifique riche et varié. Je remercie particulièrement M. Pascal Pigeon, Ingénieur de recherche à l'ENSCP, pour sa disponibilité et sa grande flexibilité pour les synthèses des complexes ferrocéniques.

Merci également au Cancéropôle Grand Ouest pour le financement du congrès « Symposium on Microencapsulation ».

Je tiens à remercier chaleureusement le Dr. Anne Clavreul pour m'avoir formée en biologie, notamment en culture cellulaire et en immunohistologie. J'ai sincèrement apprécié travailler avec toi. Merci pour ta patience, tes conseils, ton soutien et nos discussions scientifiques parfois suffisamment tardives pour que tes enfants te réclament !

Je souhaite témoigner de sincères remerciements aux différents collaborateurs qui ont contribué à ce travail : M^{me} Marie Kempf, Praticien hospitalier au CHU d'Angers, pour son aide et ses conseils sur les études bactériologiques, M. Joel Eyer, Directeur de l'UPRES EA 3143, pour avoir accepté de nous fournir le peptide NFL-TBS, M^{me} Audrey Rousseau, Professeur à l'Université d'Angers et Praticien hospitalier, pour sa grande contribution pour les coupes et l'analyse histologique. Merci pour ton aide, ta disponibilité et l'intérêt porté à mes travaux.

Un grand merci à M^{me} Florence Lefranc, Professeur à l'ULB et chef de clinique, pour ses conseils et son aide avec l'implantation des pompes. Merci également à Maxime Henry pour sa superbe démo de souris vertes ! Merci d'avoir pris le temps de me montrer et de m'expliquer les manipulations FRET. Merci à Julien Balzeau pour ses conseils sur les études concernant le peptide NFL-TBS.

Merci à tous mes collègues de l'unité U1066 qui font tourner le labo ! Brice Calvignac, Jean-Christophe Gimel, Franck Boury, Laurent Lemaire, Claudia Montero-Menei, Patrick Saulnier, François Hindré, Jean-Luc Courthaudon, Stéphanie Pace, Sylvie Avril, Carl Simonsson, Giovanna Lollo, et plus particulièrement à Olivier Thomas pour son aide et nos échanges scientifiques, à Edith Greleau, notre chère secrétaire, toujours au top même pour des demandes tardives ou pressantes, à Emmanuel Garçon pour ses idées et son aide en internalisation cellulaire, Nathalie Juhel pour nos échanges « qualité » (j'ai fini de rédiger, je vais pouvoir faire la SOP UV !), Jérôme Béjaud pour ton aide précieuse en chimie ! Clément Tétaud pour ta patience et pour avoir fait preuve de pédagogie lors des manipulations d'immunohistologie. Camille Belloche et Laurence Sindji pour votre soutien technique. Merci également aux secrétaires de l'Inserm pour leur efficacité !

J'adresse également mes remerciements au Pr. Marie-Claire Venier, au Dr. Brigitte Pech, au Pr. Frédéric Largarce et au Dr. Guillaume Bastiat d'avoir accepté de m'initier à l'enseignement en tant que moniteur. J'ai beaucoup apprécié ces premières expériences d'enseignement très instructives. Un grand merci également à Lionel Chabaud pour son aide au cours des TP notamment pour la réparation des appareils !

Un grand merci au personnel de l'animalerie, Pierre et Jérôme, pour m'avoir formée et guidée tout au long de mes expérimentations animales. Merci d'apporter de la bonne humeur malgré des manip' parfois désastreuses. Merci également à Dominique et Laurent d'avoir pris soin de mes petits rats ! J'en profite pour remercier mes pauvres petites bêtes de leur généreux sacrifice au nom de la science !

Je tiens à remercier mes formidables stagiaires, Katy, Margaux, Elisabetta et Maéva pour tout le travail fourni ! Je vous souhaite une très bonne continuation !

Merci également au Dr. Trinh Hyunh d'avoir pris le temps de me former au début de ma thèse. Je suis très admirative de ton parcours. Je te souhaite une très belle carrière professionnelle.

Un merci des plus sincères à Nolwenn pour ton aide scientifique en HPLC et autres, mais surtout un grand merci pour ton amitié ! Un merci très chaleureux également à Séverine pour ton soutien scientifique et moral !

Bon courage à tous les futurs doctorants du laboratoire : Audrey, Anne-Claire, Pauline, (Vive les 4 mousquetaires !) Khaled (merci KK pour tous les moments inoubliables !), Gaël, Émilie, Delphine, Fabien, Annabelle (on mange ensemble à midi ?), Elise, Amin, Hélène, Shubaash (thanks again for the indian diner), Sravan, Leila, Emma, Angélique. Merci tout particulièrement à Anne-Claire, Pauline et Alexandra pour leur aide précieuse pour suturer les rats !

Merci à JP et Florian pour votre aide au labo mais surtout pour nos longues discussions philosophiques et toutes les soirées angevines ! Topette la mouette !

Merci également au binôme de Carlina tech', Maud et Thomas, pour leurs conseils scientifiques et pour leur bonne humeur communicative !

Un grand merci aux « anciennes » (qui vont sûrement pas aimer ce terme mais rassurez vous, je vous rejoins bientôt !) Erika (When there's sunshine, we'll shine together ! Je te dois mes débuts de thèse si festifs !), Emilie R (je te dois ma fin de thèse festive !), Sandy, Stéphanie et Marie (pour nos discussions scientifiques et privées).

Merci à Nathalie Wauthoz, la petite belge, pour son aide, ses conseils, sa générosité et ses expressions fort belges ! A tantôt à Bruxelles !

Merci aux p'tits jeunes, Thomas, Lousineh, Chantal, Raquel, pour tos nos bons moments passés ensemble ! Merci en particulier à Thomas pour avoir posé des jours pour partir en « vacances » en cette dernière année de thèse ! Un merci « spécial milka » à Hélène (ma petite pito, je ne pouvais pas t'oublier !) pour ton soutien tant professionnel que personnel, et pour ces soirées à refaire le monde ! A quand le voyage ?? Au plaisir de prendre un Layon ou un Aubance avec vous !

Un merci-dédicace à mes coloc' biznounours de bureau : Anita, Desciences, Thomas et Nico. Merci pour votre bonne humeur, vos blagues et les bières en terrasse ! Vous avez su détendre l'atmosphère en cette période de rédaction ! Merci pour cette nouvelle technique de rangement de bureau ultra moderne ! Mais ne vous inquiétez pas, je vous aurai un jour ! Je vous aurai !!!

Un SUPER merci plein d'enthousiasme à ma SUPERCO' Elodie pour nos discussions autant professionnelles que personnelles au RU, au labo, en formation monitorat, à la trinquette, en terrasse et en Bretagne ! Merci de m'avoir accueillie dans ton bureau et merci pour ton soutien ! Je viens te voir bientôt !! En plus, c'est à nouveau la saison des huitres ;-)

Je réserve des remerciements chargés d'émotion :

A Elvire, parce que sans toi j'en serais pas là ! Merci pour tout ce que tu m'as appris. Merci pour tes conseils si précieux tant professionnels que personnels ! Merci de tout cœur d'être toujours là...

A mes copines « suisses » Marlène et Malvina que j'ai quittées à regret pour faire cette thèse. Merci pour vos encouragements et votre présence sans frontière. Merci pour votre amitié inestimable et pour tous nos week end uniques, vivement les prochains !

A Alice, ma copine d'enfance, pour ton soutien et ton amitié intemporelles ! Merci d'être ma valeur sûre !

Je clos ces remerciements en exprimant toute ma reconnaissance à ma famille pour leur soutien inconditionnel. Merci à mes parents, à mon frère, ma belle-sœur, ma fillote, ma nièce et mes grand-parents! Une mention spéciale pour ma petite soeuseur qui désirait avoir sa ligne (et qui est méritée !) : Retire tes particules de terre dans une suspension colloïdale du plancher ! Merci à mon cousin Yoann de s'être intéressé à mes travaux ! Merci de ta façon de te moquer de mes manip' désastreuses qui m'ont permis d'en rire ! Merci à ma petite cousine Charline pour son soutien et son intérêt !

Enfin, Muchas gracias à toi Alé pour ton soutien et pour me supporter (t'es sûrement parti en Angleterre au bon moment !) Merci d'être un exemple de courage et de motivation. Comme tu le dirais : « N'abandonne jamais »...

« À toi Céline »

Sommaire

Introduction générale _____ **12**

1. Le cancer 13

2. Les composés bioorganométalliques à base de ferrocène : les ferrocifènes 18

3. La vectorisation et les nanocapsules lipidiques 21

4. Objectifs de thèse 24

Chapitre 1 : Nouvelle stratégie de traitement du cancer : les LNC de ferrocifène _____ **29**

Publication n°1 : Novel metal-based anticancer drugs: a new challenge in drug delivery 31

Publication n°2 : The in vivo performance of ferrocenyl tamoxifen lipid nanocapsules in xenografted triple negative breast cancer 39

Chapitre 2 : Optimisation du procédé de formulation des LNC furtives (LNC OS) et évaluation de l'efficacité des LNC OS d'ansa-FcdiOH in vivo _____ **48**

Publication n°3 : Conventional vs stealth lipid nanocapsules : formulation and in vivo fate prediction through FRET monitoring 51

Publication n°4 : Inhibition of ectopic glioma tumor growth by a potent ferrocenyl drug loaded into stealth lipid nanocapsules 73

Chapitre 3 : Stratégies d'administration pour la délivrance cérébrale des LNC 96

Notions physiologiques sur le cerveau et stratégies d'administration pour une délivrance cérébrale99

Publication n°5 : Brain tumour targeting strategies via coated ferrociphenol lipid nanocapsules.....120

Résultats non publiés : étude de différentes stratégies d'administration des LNC pour une délivrance cérébrale.....125

Discussion générale 141

1. Genèse des travaux.....142

2. Problématique 1 : optimisation du procédé d'obtention de LNC furtives et leur devenir in vivo.....143

3. Problématique 2 : évaluation de nouveaux composés de la famille des ferrocifènes.....147

4. Problématique 3 : évaluation de différentes modalités d'administration des LNC pour une délivrance cérébrale.....149

Conclusion et perspectives 155

Annexes 160

Annexe 1 : Chapitre de livre : Brain tumors : convection-enhanced delivery of drugs (method).....161

Annexe 2 : Article paru dans « Science et Santé ».....172

Curriculum Vitae 174

Abréviations

ABC	Accelerated blood clearance
ABC	ATP-binding cassette
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARC	Association pour la recherche sur le cancer
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BHL	Barrière hémato-liquidienne
BRCA 1	Breast Cancer 1
BRCP	Breast cancer resistance protein
CED	Convection-enhanced delivery
CEMC	Cellule endothéliale des microcapillaires cérébraux
CSTN	Cancer du sein triple négatif
DiD	1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine perchlorate
DiI	1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine perchlorate
DRO	Dérivé réactif de l'oxygène
DSPE-mPEG2000	1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy-(polyethyleneglycol)-2000]
EGFP	Enhanced green fluorescence protein
ENSCP	École nationale supérieure de chimie de Paris
EPR	Enhanced permeability and retention
FDA	Food and drug administration
FRET	Förster resonance energy transfer
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
ICV	Intracérébroventriculaire
iv	Intraveineux
LCR	Liquide céphalorachidien
LNC	Nanocapsule lipidique
MGMT	O ⁶ -méthylguanine DNA méthyltransférase
MRP	Multidrug resistance protein

MTIC	5-(3-methyl)1-triazen-1-yl-imidazole-4-carboxamide
NCI	National cancer institute
OS	One-step
PARP	Poly(adénosine diphosphate-ribose) polymérase
PC	Plexus choroïdes
PDGFR	Platelet derived-growth factor receptor
PEG	Polyéthylène glycol
P-gp	P-glycoprotéine
PI	Post-insertion
PI	Pression interstitielle
RI	Récepteur à l'insuline
RT	Radiothérapie
RTf	Récepteur à la transferrine
RTK	Récepteur tyrosine kinase
SIACI	Superselective intra-arterial cerebral infusion
SiRNA	Small interfering ribonucleic acid
SLC	Solute carrier
SNC	Système nerveux central
TAT	Trans-acting activator of transcription
TMZ	Témzolomide
VEGF	Vascular endothelial growth factor

Introduction générale

1. Le cancer

Le cancer représente l'une des premières causes de mortalité dans le monde à l'origine de 13% des décès en 2008 (Fig. 1)¹. Chaque année, le nombre de nouveaux cas diagnostiqués augmente, en raison de la croissance et du vieillissement de la population mondiale ainsi que de l'exposition plus fréquente à des facteurs de risque comportementaux (tabagisme, alcoolisme...), et environnementaux (pollution)². En France, depuis 2004, le cancer se place au premier rang des causes de mortalité devant les maladies cardio-vasculaires et est à l'origine d'un décès sur trois chez l'homme et un décès sur quatre chez la femme³. Les cancers les plus fréquents chez l'homme sont le cancer de la prostate, le cancer du poumon et le cancer colorectal. Chez la femme il s'agit du cancer du sein, du cancer colorectal et du cancer du poumon (données ARC pour la France en 2012).

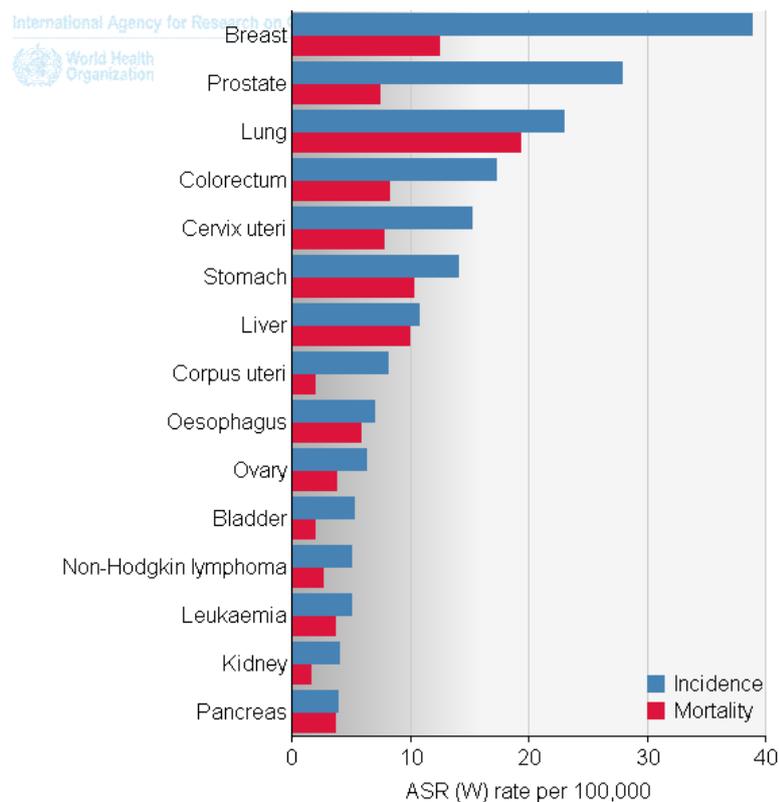


Fig. 1 : Incidence et mortalité des cancers les plus fréquents dans le monde pour l'année 2008⁴

Si les cas de cancer sont de plus en plus nombreux, ils sont cependant mieux pris en charge par le corps médical. Grâce aux avancées remarquables dans le domaine médical tant sur la

connaissance en biologie des tumeurs qu'en diagnostic et dépistage, le taux de mortalité dû au cancer a reculé de 1,6% chez l'homme et 0,8% chez la femme par an depuis 1991 en France (Fig. 2)³. A ce jour, le taux de survie à 5 ans après diagnostic de la maladie est de 50-60%⁵.

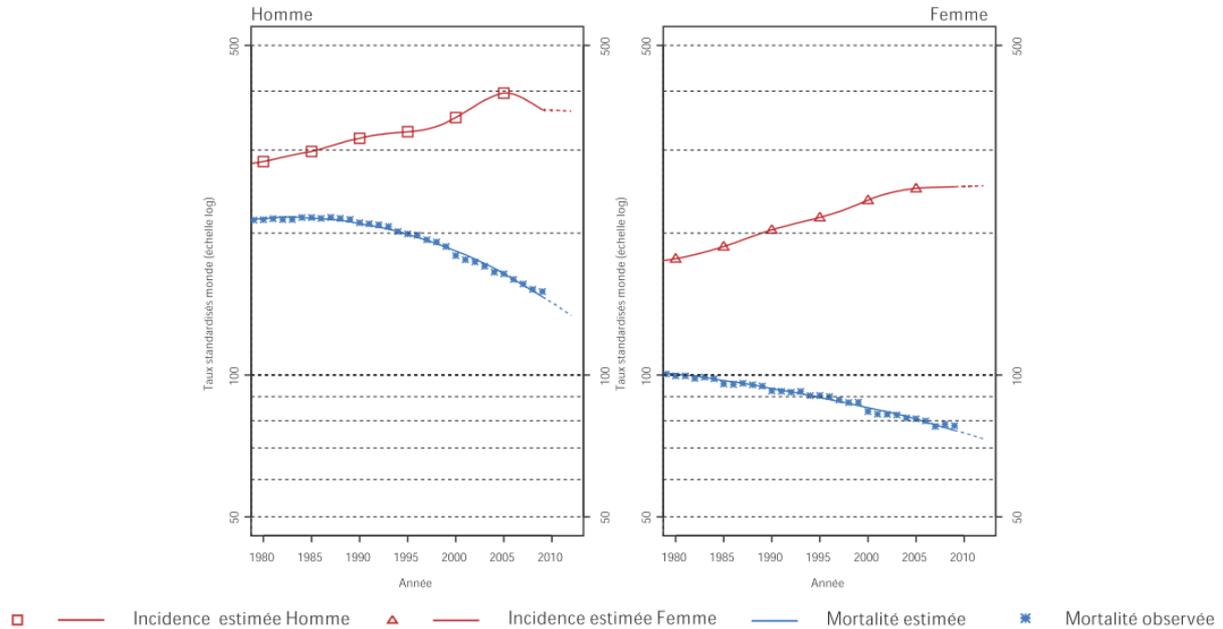


Fig. 2 : Tendance chronologique de l'incidence et la mortalité pour tous les cancers en France⁶

Le traitement du cancer repose sur trois approches principales : la chirurgie pour l'exérèse de la tumeur, la radiothérapie visant à détruire localement les cellules cancéreuses et la chimiothérapie permettant d'éliminer les cellules cancéreuses isolées et les métastases par diffusion de l'agent thérapeutique dans l'ensemble de l'organisme. Certains types de cancer nécessitent le recours à des traitements plus spécialisés tels que l'hormonothérapie ou l'immunothérapie. Selon les cas, ces différentes approches peuvent être prescrites seules, successivement ou en association, afin de réduire les risques de récurrences. En ce qui concerne la chimiothérapie, les régimes cliniques standards associent plusieurs agents anticancéreux en concomitance afin de potentialiser l'efficacité de chacune des molécules. Le traitement s'effectue sur plusieurs séances d'injections quotidiennes espacées par des périodes de repos nécessaires à la régénération des tissus sains affectés par la thérapie.

Certains cancers sont néanmoins incurables, ne répondant pas à l'arsenal des thérapies disponibles en clinique. Ils représentent 1/3 des cancers aujourd'hui et restent associés à un pronostic sombre. Parmi les cancers les plus agressifs figurent notamment les cancers du sein

triple négatif et les tumeurs du cerveau. Ces deux types de cancers seront décrits plus en détail dans les paragraphes suivants.

Le cancer du sein est le plus répandu et le plus meurtrier des cancers féminins. Grâce aux récents progrès thérapeutiques et diagnostiques ainsi qu'au développement du dépistage précoce, le taux de mortalité lié au cancer du sein a diminué sur les 20 dernières années⁷. Aujourd'hui, le taux de survie à 5 ans après diagnostic est de 85% chez les patientes atteintes de cancer du sein⁸. Le traitement de première intention est généralement la chirurgie qui, lorsque le diagnostic est suffisamment précoce, peut se limiter à une tumorectomie ou, dans les cas plus avancés, une mastectomie partielle ou totale. La chirurgie est généralement associée à un traitement complémentaire défini selon le type et le stade du cancer.

Dans 60% des cas, le cancer est de type hormono-dépendant, signifiant que la croissance des cellules tumorales est stimulée par les hormones (œstrogènes et/ou progestérones)^{9,10}. Cette catégorie de cancer s'identifie par la présence de récepteurs hormonaux et se traite par hormonothérapie via des anti-œstrogènes ou des anti-aromatases. Les anti-œstrogènes empêchent l'hormone de se fixer aux récepteurs, bloquant ainsi leur action. La molécule anti-œstrogénique de référence est le tamoxifène commercialisé, entre autre, sous le nom de Nolvadex[®]. Concernant les inhibiteurs de l'aromatase, leur mécanisme consiste à empêcher la synthèse d'œstrogène et sont uniquement prescrits aux femmes ménopausées. Le médecin peut également avoir recours à la suppression ovarienne, technique plus radicale qui permet d'ôter l'organe producteur des hormones.

Les avancées en génétique humaine ont permis d'identifier un second type de cancer caractérisé par une surexpression du récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain (HER2) qui favorise la prolifération des cellules. Ces cancers représentent 15 à 20% des cancers du sein et bénéficient depuis peu d'une thérapie ciblée par le trastuzumab (Herceptin[®]), un anticorps monoclonal bloquant le récepteur HER2^{11,12}.

Certains cancers ne possèdent aucun de ces trois marqueurs (récepteur à l'œstrogène, récepteur à la progestérone et HER2) et sont connus sous le nom de cancer du sein triple négatif (CSTN). Le CSTN représente 10 à 15% de la totalité des cancers du sein et figure parmi les cancers les plus agressifs^{13,14}. En raison de leur statut triple négatif, les CSTN ne répondent ni à l'hormonothérapie, ni la thérapie ciblée par trastuzumab. Ils se caractérisent également par une grande hétérogénéité au sein de leur propre groupe et sont associés à un

haut risque de récurrence et envahissement métastatique conduisant à une mort précoce. Par conséquent, le pronostic pour les patientes atteintes du CSTN est le plus sombre parmi tous les cancers du sein.

Bien qu'aucun protocole n'ait à ce jour été standardisé, la chimiothérapie constituée d'anthracyclines et de taxanes demeure la forme de traitement principale¹⁵. Les recherches actuelles se concentrent sur la découverte de marqueurs moléculaires spécifiques permettant de mieux définir cette catégorie de cancer du sein. Il a été démontré récemment que la plupart des CSTN présente un dysfonctionnement du gène BRCA 1 (BRest CAncer 1) impliquée dans la réparation de l'ADN. Cette défaillance ouvre la possibilité d'utiliser les agents alkylants de l'ADN tels que les molécules de la famille du cisplatine, qui font actuellement l'objet d'études cliniques pour le traitement du CSTN¹⁶. D'autres traitements alternatifs sont en cours d'investigation tel que l'irinotecan, un inhibiteur de PARP (poly(adénosine diphosphate-ribose) polymérase) impliqué également dans la réparation de l'ADN, qui, combiné à la chimiothérapie, a significativement prolongé la survie de femmes atteintes de CSTN lors d'une étude clinique de phase II¹⁷.

Dans le même contexte de défi médical figurent les tumeurs primaires du cerveau. Les tumeurs cérébrales représentent 1,3% de l'ensemble des cancers diagnostiqués annuellement et 20% des cancers pédiatriques¹⁸. Parmi les différents types de tumeurs, les gliomes, issus des cellules gliales, cellules de soutien des neurones, représentent 40 à 60% des tumeurs primaires du cerveau⁷. Selon la classification histologique de l'Organisation mondiale de la santé, les gliomes sont définis par leur grade de sévérité, du grade I pour les tumeurs bénignes au grade IV pour les tumeurs les plus agressives également appelées glioblastomes. Il est important de noter que les tumeurs bénignes peuvent être aussi dangereuses que les tumeurs malignes de par leur localisation qui peut mettre en jeu le pronostic vital.

Les glioblastomes constituent les tumeurs malignes primitives cérébrales les plus fréquentes chez l'adulte. Leur caractère hétérogène et leur capacité à infiltrer le tissu sain et à proliférer rapidement entraînent un pronostic sombre. Le traitement du glioblastome débute par une exérèse de la tumeur aussi large que possible permettant de réduire les symptômes provoqués par la masse tumorale. La chirurgie est ensuite complétée par radiothérapie et chimiothérapie. Malgré ce protocole agressif, le risque de récurrence est quasi-systématique et relié à la présence de cellules souches insensibles aux différentes attaques thérapeutiques¹⁹ ainsi qu'aux cellules infiltrées dans le parenchyme⁷. L'introduction du témozolomide (TMZ) en clinique pour le

traitement du glioblastome a permis un progrès dans la prise en charge de la maladie. Le témozolomide a été développé dans les années 80 suite à une méthode de conception rationnelle de médicament entreprise par le centre national de recherche anglais (UK Cancer Research Campaign)²⁰. Le TMZ est un agent alkylant de l'ADN²⁰. Son mécanisme d'action repose sur une première étape d'activation spontanée de la molécule en milieu aqueux et à pH physiologique conduisant au MTIC (5-(3-méthyl)1-triazén-1-yl-imidazole-4-carboxamide). Le métabolite actif agit ensuite par alkylation de la guanine en position O⁶ entraînant une réparation aberrante de l'ADN méthylé²⁰. Au cours des études précliniques et cliniques, le TMZ a fait preuve d'une très bonne pénétration dans tous les tissus, incluant le cerveau. Il a démontré également une excellente biodisponibilité par voie orale, restant intact après absorption grâce à sa stabilité à pH acide²¹. Par conséquent le TMZ, offre la possibilité d'une thérapie confortable pour le patient par sa prise orale et efficace en termes de ralentissement de la progression tumorale. Des études précliniques ont, par ailleurs, mis en évidence une activité synergique entre le TMZ et la radiothérapie (RT)²². Ces résultats prometteurs ont stimulé la mise en place d'une étude de phase III en 2005 réalisée sur des patients atteints de glioblastomes nouvellement diagnostiqués, traités par administration de TMZ concurrente et adjuvante à la RT en comparaison à une RT seule. Les motifs de ce protocole sont fondés sur le constat que l'administration prolongée de TMZ entraîne une radiosensibilité impliquant une augmentation des catastrophes mitotiques²³ et une auto-chimiosensibilité induite par la déplétion en MGMT (O⁶-méthylguanine DNA méthyltransférase), enzyme de réparation de l'ADN²⁴. Les résultats de cet essai clinique ont conclu à une amélioration significative de la survie passant de 12,1 mois à 14,6 mois avec 9,8% de survie à 5 ans post-diagnostic comparé à 1,9% pour la radiothérapie seule²⁵. C'est à partir de cette étude que le protocole de référence actuellement appliqué pour le traitement du glioblastome multiforme nouvellement diagnostiqué, appelé protocole Stupp, a été établi.

Les recherches sur le glioblastome demeurent très actives avec un nombre considérable d'essais cliniques (849 en octobre 2013) témoignant du grand investissement du corps scientifique dans la lutte contre cette maladie désastreuse. Compte tenu de l'hétérogénéité intratumorale et de la variabilité inter-patients des gliomes malins, diverses voies de recherche sont développées pour concevoir des thérapies ciblées et personnalisées²⁶. Parmi les thérapies ciblées à l'étude actuellement figurent le traitement anti-angiogénique par le bevacizumab, un anticorps monoclonal anti-VEGF (vascular endothelial growth factor) et des thérapies dirigées

contre les récepteurs à tyrosine kinase (RTK) tels que l'EGFR (epidermal growth factor receptor) et le PDGFR (platelet derived-growth factor receptor).

2. Les composés bioorganométalliques à base de ferrocène : les ferrocifènes

Le concept de chimiothérapie a été introduit par Paul Ehrlich en 1908 suite à la découverte de l'activité anti-syphilitique du salvarsan, un composé métallique à base d'arsenic²⁷. Dans les années 60, Rosenberg et son équipe découvrent de façon fortuite les propriétés antiprolifératives du cisplatine, une autre molécule métallique à base de platine²⁸. Aujourd'hui le cisplatine, de la famille des alkylants de l'ADN, figure parmi les molécules anticancéreuses les plus révolutionnaires. Depuis son arrivée en clinique en 1978, il a considérablement modifié le pronostic de certains cancers, notamment le cancer des testicules avec 90% de guérison. Les complexes de coordination du platine représentent des produits majeurs de chimiothérapie anticancéreuse et sont fréquemment utilisés dans divers régimes thérapeutiques, notamment pour le cancer de l'ovaire, de la vessie et colorectal²⁹. Le mécanisme d'action du cisplatine repose sur une première étape d'activation intracellulaire par remplacement d'un ligand Cl⁻ par de l'eau (aquation) puis coordination du platine avec deux guanines voisines de l'ADN. Cette fixation occasionne une distorsion du brin d'ADN conduisant à la mort cellulaire par apoptose³⁰. Malgré les exploits thérapeutiques du cisplatine, son utilisation en clinique est associée à des effets secondaires, en particulier des phénomènes de toxicité ainsi que l'acquisition de résistance limitant son efficacité^{31,32}.

Néanmoins, les succès du cisplatine et du salvarsan ont attiré l'attention sur les propriétés que peut conférer la présence d'un groupement métallique sur l'activité biologique d'une molécule. En effet, l'introduction d'un métal offre la triple possibilité d'une activité redox, d'un choix structurel varié lié à la chimie de coordination ainsi que d'une cinétique d'échange de ligand³³. Par conséquent, les chimistes se sont orientés vers la synthèse de molécules à base métallique pour une nouvelle réactivité médicinale. A ce jour, plusieurs métallocomplexes ont atteint les essais cliniques. Une phase I est actuellement en cours pour l'étude de l'effet de doses croissantes d'un complexe de ruthénium NKP-1339, sur des patients atteints de tumeurs solides avancées (NCT01415297). De même, l'auranofine, un composé à base d'or, commercialisé sous le nom Ridaura[®] contre l'arthrite rhumatoïde, est actuellement en phase II pour le traitement de la leucémie lymphoïde chronique (NCT01419691). Le mécanisme

d'action du NKP-1339 implique la réduction du Ru (III) en Ru (II) favorisée par une condition hypoxique, suivi d'une perturbation de la balance redox cellulaire et induction de l'apoptose par la voie mitochondriale³⁴. L'activité anticancéreuse de l'auranofine impliquerait le système thiorédoxine/thiorédoxine reductase (Txr) avec inhibition de la Txr suivie du déclenchement de l'apoptose également induite par la voie mitochondriale³⁵.

Les exemples de ces deux complexes métalliques soulignent l'apparition d'une approche alternative de traitement du cancer non basée sur une attaque de l'ADN. Cette chimie ouvre donc la perspective d'une nouvelle classe de composés thérapeutiques possédant un mode d'action spécifique au métal. C'est dans ce contexte que s'inscrivent les travaux de l'équipe du Pr. Gérard Jaouen et du Dr. Anne Vessières sur la synthèse de molécules organométalliques dérivées du ferrocène pour des applications médicales³⁶. Cette thématique appelée chimie bioorganométallique, développée au sein de l'ENSCP, résulte de la fusion de la chimie organométallique avec la biologie. La base de leur approche consiste à développer des dérivés ferrocéniques de l'hydroxytamoxifène, métabolite actif du tamoxifène, en substituant un groupement phényle par le ferrocène. Les molécules résultantes sont appelées ferrocifènes (Fig. 3).

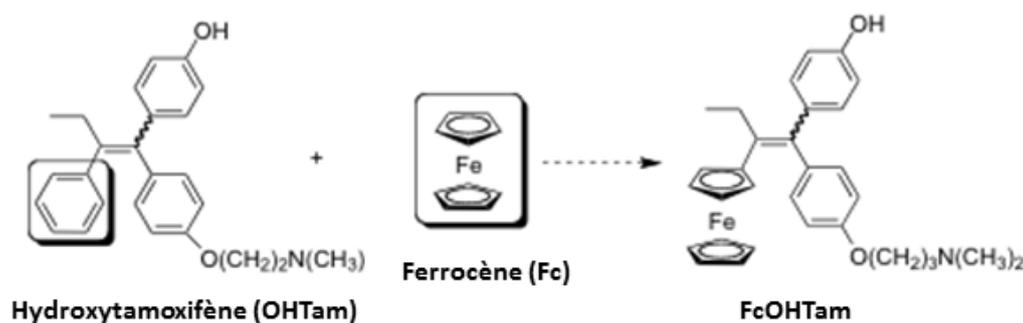


Fig. 3 : Synthèse schématique du FcOHTAM issu de la combinaison de l'hydroxytamoxifène et du ferrocène

Le premier complexe ferrocénique à avoir été étudié est le FcOHTam (Fig. 3). Ce tamoxifène hybride conserve une activité similaire à celle du produit d'origine sur les cellules de cancer du sein œstrogène-dépendant, mais démontre également un effet cytotoxique inattendu sur des cellules de cancer du sein triple négatif. La présence du groupe ferrocénique jouerait le rôle de catalyseur d'oxydation intramoléculaire qui induirait un effet antiprolifératif associé à une

production de dérivés réactifs de l'oxygène et l'entrée en sénescence (mécanisme d'arrêt de la multiplication cellulaire)³⁷. Suite à ce résultat encourageant, l'équipe a développé une série de molécules organométalliques à base de ferrocène, en déclinant différents groupements chimiques greffés sur le squelette du tamoxifène. Une étude de relation structure/activité réalisée sur un large panel de molécules ferrociféniques a permis d'identifier 3 composés « leaders » nommés FcOHTam, FcdiOH et ansa-FcdiOH (Fig. 4). Ces complexes ont été sélectionnés d'après leurs valeurs faibles d'IC₅₀ (concentration inhibant la croissance cellulaire à 50%) obtenus sur différentes lignées de cancers du sein, du micromolaire pour FcOHTam et FcdiOH au nanomolaire pour ansa-FcdiOH³⁸.

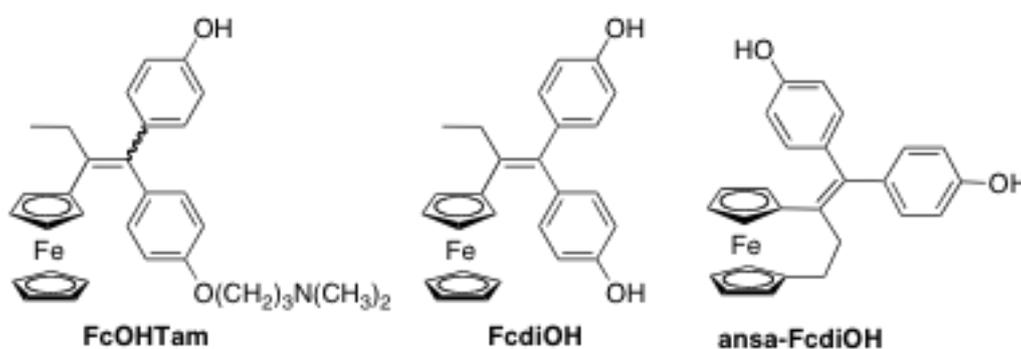


Fig. 4 : Les 3 composés ferrocéniques « leaders » : FcOHTam, FcdiOH et ansa-FcdiOH

Le ferrociphénol (FcdiOH) a déjà fait ses preuves en termes d'activité thérapeutique sur un modèle de gliome expérimental. En effet, le traitement d'animaux porteurs de gliome sous-cutané par le FcdiOH, encapsulé dans les nanocapsules lipidiques, a entraîné un arrêt de la prolifération des cellules cancéreuses et une disparition de la masse tumorale³⁹. De plus, l'administration de ces LNC-FcdiOH pour le traitement de gliomes intracérébraux a permis d'obtenir des augmentations de survie modestes mais significatives, prouvant le potentiel thérapeutique de ce complexe ferrocénique⁴⁰.

En ce qui concerne le complexe ansa-FcdiOH, il diffère des deux autres par une liaison entre les deux cyclopentadiènes. Les deux complexes diphénoliques (ansa-FcdiOH et FcdiOH) ont été testés sur un panel de 60 lignées de cellules cancéreuses du National Cancer Institute (NCI). Une cytotoxicité plus forte a été mise en évidence pour le complexe à cycle fermé, avec un IC₅₀ moyen de 0,18µM par rapport à 0,53µM pour FcdiOH⁴¹. Il semblerait que cette contrainte structurelle potentialise l'effet cytotoxique d'ansa-FcdiOH. De plus, son mode

d'action ne correspond à aucune des 171 molécules de référence provenant de la base de données du NCI. Ces différentes considérations laissent présager une activité prometteuse pour ce nouveau complexe.

3. La vectorisation et les nanocapsules lipidiques

Le caractère hydrophobe de ces organométalliques nécessite le recours à une stratégie de formulation pour permettre leur administration. Les nanomédecines, application des nanotechnologies à la médecine, apparaissent aujourd'hui comme un outil thérapeutique prometteur pour tenter de surmonter les obstacles rencontrés en oncologie grâce à leur dimension mésoscopique. La nanotechnologie est un domaine multidisciplinaire qui allie des principes et techniques avancés en chimie, biologie, physique et ingénierie pour la conception d'objets nanométriques performants. Les nanomédecines se rapportent à des structures de tailles s'échelonnant du nanomètre à quelques centaines de nanomètres. Sur les 20 dernières années, de nombreux systèmes nanoparticulaires organiques ou inorganiques ont été développés pour des applications en oncologie^{42,43}. Selon le système, l'agent actif peut être dissout, piégé, encapsulé dans la nanostructure ou encore adsorbé ou attaché à sa surface.

Les catégories de nanoparticules en thérapie cancéreuse incluent les liposomes, les nanoparticules polymériques, les micelles, les nanoparticules inorganiques et les nanosystèmes lipidiques. La diversité des systèmes particuliers existants offre un large choix de tailles, de formes, de structures et de compositions permettant de concevoir l'objet adéquat à l'application envisagée. Ces systèmes sont du même ordre de taille que les anticorps, les récepteurs membranaires et les protéines. Cette caractéristique biomimétique associée à leur importante surface développée ainsi qu'à des possibilités de modification de surface leur confèrent des propriétés uniques. Les nanomédecines représentent donc des outils puissants pour des applications thérapeutiques, diagnostiques et d'imagerie, portant l'espoir d'une nouvelle approche de lutte contre le cancer. Les principaux avantages à utiliser ces systèmes pour la vectorisation d'agents actifs comprennent une meilleure solubilité dans les milieux biologiques, un profil pharmacocinétique modifié, une protection contre les dégradations physiologiques et une réduction des effets toxiques.

Grâce à une recherche active, certains nanosystèmes sont aujourd'hui utilisés en clinique et d'autres sont en cours d'investigation en préclinique. Dans la gamme de nanoparticules approuvées par la FDA figurent, entre autres, les formes liposomales de la doxorubicine avec

le Myocet^{®44} et le Caelyx[®]/Doxil^{®45}, les nanoparticules d'albumine pour le paclitaxel (Abraxane[®]) ainsi que la solution micellaire de paclitaxel Genexol-PM.

Parmi les systèmes au stade préclinique figurent les nanocapsules lipidiques (LNC), un nanovecteur biomimétique à cœur huileux mis au point et breveté par notre laboratoire (Fig. 5)⁴⁶. L'obtention des LNC repose sur la méthode d'inversion de phase par la température. Leur procédé sans solvant et peu coûteux en énergie leur confère un avantage par rapport aux autres nanosystèmes et permet une transposition industrielle relativement aisée. La structure de la nanocapsule est constituée par un cœur de triglycérides à chaînes moyennes autour duquel s'organisent un surfactant hydrophile majoritaire à base de polyéthylène glycol (PEG) responsable de l'inversion de phase, et un surfactant lipophile composé principalement de phosphatidylcholine (lécithine) qui participe à la rigidité de la coque. Le rapport entre chaque constituant des LNC est le paramètre clé qui gouverne la taille des particules obtenues. L'étude approfondie du diagramme de phase a permis d'établir différentes compositions, permettant de formuler des nanovecteurs de taille ajustable s'échelonnant de 20 à 100 nm⁴⁷.

Depuis leur développement, les LNC ont montré leur capacité à encapsuler différents agents thérapeutiques avec succès tels que le paclitaxel⁴⁸, le docétaxel⁴⁹, l'étoposide⁵⁰, du matériel génétique⁵¹ et des complexes du rhénium⁵², ainsi que leur performance à délivrer l'agent actif aux tumeurs solides⁴⁹. Ces nano-objets ont également prouvé être un vecteur adéquat pour le ferrociphénol³⁹ et représentent donc un candidat intéressant pour les autres composés de la famille des ferrocifènes.

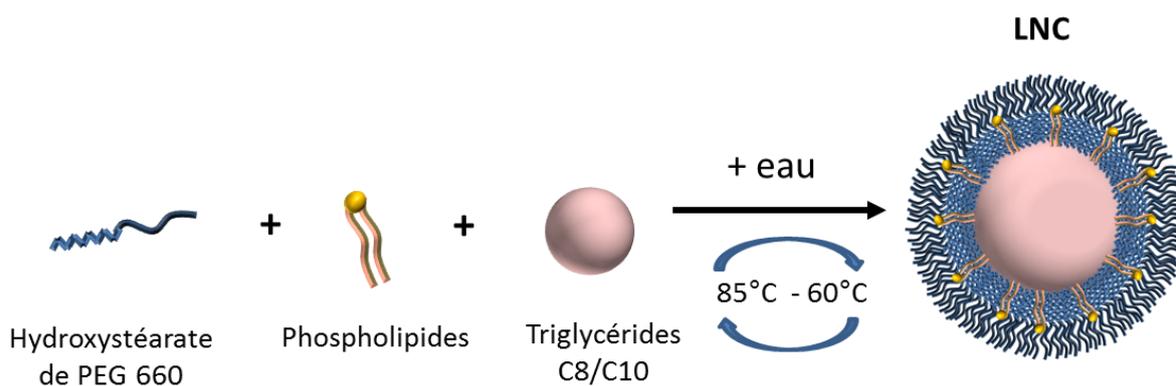


Fig. 5 : Représentation schématique de la nanocapsule lipidique

L'architecture des LNC offre la possibilité de modifier leur surface, permettant d'adapter le comportement pharmacologique du vecteur à l'application envisagée. Un exemple de modification couramment utilisée dans le domaine des nanomédecines est le recouvrement des LNC par des longues chaînes de PEG par post-insertion de phospholipides PEGylés dans la coque des LNC⁵³. La couronne de PEG forme une barrière stérique hydrophile contre les protéines du système immunitaire permettant ainsi une circulation plasmatique prolongée. Un tel profil cinétique favorise l'accumulation des LNC dans les tumeurs grâce à la perméabilité accrue des vaisseaux tumoraux, appelé effet EPR (Enhanced Permeability and Retention effect)⁵¹. Il est également possible de décorer la surface des LNC par des ligands en vue d'un ciblage actif. Le greffage peut se faire, par exemple, à l'extrémité des phospholipides PEGylés possédant un groupement terminal fonctionnel⁵⁴.

4. Objectifs de thèse

Les ferrocifènes sont des molécules inorganiques aux propriétés innovantes qui présentent un intérêt dans la thérapie du cancer du sein et du gliome malin. Mes travaux de thèse s'inscrivent donc dans le cadre d'un développement préclinique de nanomédicaments associant les complexes ferrocéniques aux nanocapsules lipidiques, vecteur performant pour la délivrance de principes actifs. Les 3 objectifs principaux sont :

- L'évaluation de nouveaux composés de la famille des ferrocifènes (le FcOHTam et l'ansa-FcdiOH) dans la thérapie de ces cancers *via* leur encapsulation dans les LNC.
- L'optimisation du procédé d'obtention de LNC furtives et leur devenir *in vivo*.
- L'évaluation de différentes modalités d'administration des LNC pour une délivrance cérébrale.

Ce manuscrit rapporte les résultats de ces travaux, organisés autour de 3 chapitres.

Le premier chapitre de thèse s'intitule « Nouvelle stratégie de traitement du cancer : Les LNC de ferrocifène ». En préambule de ce chapitre, une revue bibliographique expose les différentes stratégies galéniques développées pour remédier aux problèmes pharmacologiques rencontrés avec l'émergence des métallocomplexes (publication n°1). La publication n°2 présente l'étude de l'effet thérapeutique du FcOHTam encapsulé dans les LNC sur un modèle de cancer du sein triple négatif.

Le titre du second chapitre est « Optimisation du procédé de formulation de LNC furtives (LNC OS) et évaluation de l'efficacité des LNC OS d'ansa-FcdiOH *in vivo* ». L'objectif de la première étude présentée (publication n°3) a pour intention de consolider les connaissances sur la formulation et l'interaction des LNC avec le milieu vivant *via* la technique de FRET. La publication suivante (publication n°4) décrit l'évaluation du nouveau composé ferrocénique (ansa-FcdiOH) encapsulé au sein de ces LNC furtives sur un modèle de gliome intradermique.

Le dernier chapitre « Stratégies d'administration pour la délivrance cérébrale des LNC » s'intéresse aux différentes voies d'injection permettant de délivrer les LNC dans le cerveau. Une description physiologique des barrières cérébrales est présentée en introduction. Puis, les résultats de survie d'animaux porteurs de gliomes obtenus suite à l'injection intracérébrale ou intra-carotidienne de LNC fonctionnalisées sont détaillés dans la publication n°5. Enfin, d'autres tentatives d'approches pour une délivrance cérébrale sont développées dans une partie rédigée en français.

Références bibliographiques

1. OMS | Cancer <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/fr/> (accessed Oct 7, 2013).
2. Jemal, A.; Bray, F.; Center, M. M.; Ferlay, J.; Ward, E.; Forman, D. Global Cancer Statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **2011**, *61*, 69–90.
3. Le Cancer En Chiffres | Face Au Cancer - Fondation ARC Pour La Recherche Sur Le Cancer <http://www.arc-cancer.net/Face-au-cancer/le-cancer-en-chiffres.html> (accessed Oct 7, 2013).
4. GLOBOCAN: Country Fast Stat <http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=900> (accessed Oct 7, 2013).
5. NACRe Rapports InVS INCa incidence et survie <http://www6.inra.fr/nacre/Actualites/Rapports-InVS-INCa-incidence-et-survie> (accessed Oct 7, 2013).
6. Estimation Nationale de L'incidence et de La Mortalité Par Cancer En France Entre 1980 et 2012 / 2013 / Maladies Chroniques et Traumatismes / Rapports et Synthèses / Publications et Outils / Accueil <http://www.invs.sante.fr/Publications-et-outils/Rapports-et-syntheses/Maladies-chroniques-et-traumatismes/2013/Estimation-nationale-de-l-incidence-et-de-la-mortalite-par-cancer-en-france-entre-1980-et-2012> (accessed Oct 7, 2013).
7. Boyle, P.; Levin, B.; International Agency for Research on Cancer *World Cancer Report 2008*; IARC Press: Lyon, 2008.
8. Cancer Du Sein <http://www.inserm.fr/thematiques/cancer/dossiers/cancer-du-sein> (accessed Oct 7, 2013).
9. Eroles, P.; Bosch, A.; Pérez-Fidalgo, J. A.; Lluch, A. Molecular Biology in Breast Cancer: Intrinsic Subtypes and Signaling Pathways. *Cancer Treat. Rev.* **2012**, *38*, 698–707.
10. Hanstein, B.; Djahansouzi, S.; Dall, P.; Beckmann, M. W.; Bender, H. G. Insights into the Molecular Biology of the Estrogen Receptor Define Novel Therapeutic Targets for Breast Cancer. *Eur. J. Endocrinol.* **2004**, *150*, 243–255.
11. Izumi, Y.; Xu, L.; Tomaso, E. di; Fukumura, D.; Jain, R. K. Tumour Biology: Herceptin Acts as an Anti-angiogenic Cocktail. *Nature* **2002**, *416*, 279–280.
12. Slamon, D.; Eiermann, W.; Robert, N.; Pienkowski, T.; Martin, M.; Press, M.; Mackey, J.; Glaspy, J.; Chan, A.; Pawlicki, M.; *et al.* Adjuvant Trastuzumab in HER2-Positive Breast Cancer. *New England Journal of Medicine* **2011**, *365*, 1273–1283.
13. Lehmann, B. D.; Bauer, J. A.; Chen, X.; Sanders, M. E.; Chakravarthy, A. B.; Shyr, Y.; Pietenpol, J. A. Identification of Human Triple-negative Breast Cancer Subtypes and Preclinical Models for Selection of Targeted Therapies. *J. Clin. Invest.* **2011**, *121*, 2750–2767.
14. Laurentiis, M. De; Cianniello, D.; Caputo, R.; Stanzione, B.; Arpino, G.; Cinieri, S.; Lorusso, V.; Placido, S. De Treatment of Triple Negative Breast Cancer (TNBC): Current Options and Future Perspectives. *Cancer Treatment Reviews* **2010**, *36*, Supplement 3, S80–S86.
15. Engebraaten, O.; Vollan, H. K. M.; Børresen-Dale, A.-L. Triple-negative Breast Cancer and the Need for New Therapeutic Targets. *Am. J. Pathol.* **2013**, *183*, 1064–1074.
16. Oakman, C.; Viale, G.; Leo, A. Di Management of Triple Negative Breast Cancer. *The Breast* **2010**, *19*, 312–321.

17. O'Shaughnessy, J.; Osborne, C.; Pippen, J. E.; Yoffe, M.; Patt, D.; Rocha, C.; Koo, I. C.; Sherman, B. M.; Bradley, C. Iniparib Plus Chemotherapy in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *New England Journal of Medicine* **2011**, *364*, 205–214.
18. Les Cancers Du Cerveau | Les Cancers Du Cerveau - Fondation ARC Pour La Recherche Sur Le Cancer <http://www.arc-cancer.net/Les-cancers-du-cerveau/le-cancer-du-cerveau.html?gclid=CImp37jRhLkCFbLMtAodjEIAbA> (accessed Oct 7, 2013).
19. Altaner, C. Glioblastoma and Stem Cells. *Neoplasma* **2008**, *55*, 369–374.
20. Stupp, R.; Gander, M.; Leyvraz, S.; Newlands, E. Current and Future Developments in the Use of Temozolomide for the Treatment of Brain Tumours. *The Lancet Oncology* **2001**, *2*, 552–560.
21. Newlands, E. S.; Stevens, M. F.; Wedge, S. R.; Wheelhouse, R. T.; Brock, C. Temozolomide: a Review of Its Discovery, Chemical Properties, Pre-clinical Development and Clinical Trials. *Cancer Treat. Rev.* **1997**, *23*, 35–61.
22. Rijn, J. van; Heimans, J. J.; Berg, J. van den; Valk, P. van der; Slotman, B. J. Survival of Human Glioma Cells Treated with Various Combination of Temozolomide and X-rays. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2000**, *47*, 779–784.
23. Kil, W. J.; Cerna, D.; Burgan, W. E.; Beam, K.; Carter, D.; Steeg, P. S.; Tofilon, P. J.; Camphausen, K. In Vitro and in Vivo Radiosensitization Induced by the DNA Methylating Agent Temozolomide. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 931–938.
24. Nishikawa, R. Standard Therapy for Glioblastoma--a Review of Where We Are. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)* **2010**, *50*, 713–719.
25. Stupp, R.; Hegi, M. E.; Mason, W. P.; Bent, M. J. van den; Taphoorn, M. J. B.; Janzer, R. C.; Ludwin, S. K.; Allgeier, A.; Fisher, B.; Belanger, K.; *et al.* Effects of Radiotherapy with Concomitant and Adjuvant Temozolomide Versus Radiotherapy Alone on Survival in Glioblastoma in a Randomised Phase III Study: 5-year Analysis of the EORTC-NCIC Trial. *Lancet Oncol.* **2009**, *10*, 459–466.
26. Arko, L.; Katsyv, I.; Park, G. E.; Luan, W. P.; Park, J. K. Experimental Approaches for the Treatment of Malignant Gliomas. *Pharmacol. Ther.* **2010**, *128*, 1–36.
27. Strebhardt, K.; Ullrich, A. Paul Ehrlich's Magic Bullet Concept: 100 Years of Progress. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 473–480.
28. Rosenberg, B.; VanCamp, L.; Trosko, J. E.; Mansour, V. H. Platinum Compounds: a New Class of Potent Antitumour Agents. *Nature* **1969**, *222*, 385–386.
29. Kelland, L. The Resurgence of Platinum-based Cancer Chemotherapy. *Nat Rev Cancer* **2007**, *7*, 573–584.
30. Siddik, Z. H. Cisplatin: Mode of Cytotoxic Action and Molecular Basis of Resistance. *Oncogene* **2003**, *22*, 7265–7279.
31. Pabla, N.; Dong, Z. Cisplatin Nephrotoxicity: Mechanisms and Renoprotective Strategies. *Kidney Int.* **2008**, *73*, 994–1007.
32. Dempke, W.; Voigt, W.; Grothey, A.; Hill, B. T.; Schmoll, H. J. Cisplatin Resistance and Oncogenes--a Review. *Anticancer Drugs* **2000**, *11*, 225–236.
33. Rijt, S. H. van; Sadler, P. J. Current Applications and Future Potential for Bioinorganic Chemistry in the Development of Anticancer Drugs. *Drug Discov. Today* **2009**, *14*, 1089–1097.
34. Trondl, R.; Heffeter, P.; Jakupec, M. A.; Berger, W.; Keppler, B. K. NKP-1339, a First-in-class Anticancer Drug Showing Mild Side Effects and Activity in Patients Suffering from Advanced Refractory Cancer. *BMC Pharmacology and Toxicology* **2012**, *13*, A82.

35. Barnard, P. J.; Berners-Price, S. J. Targeting the Mitochondrial Cell Death Pathway with Gold Compounds. *Coordination Chemistry Reviews* **2007**, *251*, 1889–1902.
36. Vessières, A. Metal Carbonyl Tracers and the Ferrocifen Family: Two Facets of Bioorganometallic Chemistry. *Journal of Organometallic Chemistry* **2013**, *734*, 3–16.
37. Vessières, A.; Corbet, C.; Heldt, J. M.; Lories, N.; Jouy, N.; Laïos, I.; Leclercq, G.; Jaouen, G.; Toillon, R.-A. A Ferrocenyl Derivative of Hydroxytamoxifen Elicits an Estrogen Receptor-independent Mechanism of Action in Breast Cancer Cell Lines. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2010**, *104*, 503–511.
38. Nguyen, A.; Vessières, A.; Hillard, E. A.; Top, S.; Pigeon, P.; Jaouen, G. Ferrocifens and Ferrocifenols as New Potential Weapons Against Breast Cancer. *CHIMIA International Journal for Chemistry* **2007**, *61*, 716–724.
39. Huynh, N. T.; Morille, M.; Bejaud, J.; Legras, P.; Vessieres, A.; Jaouen, G.; Benoit, J.-P.; Passirani, C. Treatment of 9L Gliosarcoma in Rats by Ferrociphenol-loaded Lipid Nanocapsules Based on a Passive Targeting Strategy via the EPR Effect. *Pharm. Res.* **2011**, *28*, 3189–3198.
40. Huynh, N. T. APPLICATION DES NANOCAPSULES LIPIDIQUES CHARGEES EN FERROCIPHENOL DANS LE TRAITEMENT DU GLIOBLASTOME, Université d'Angers, 2011.
41. Görmén, M.; Pigeon, P.; Top, S.; Hillard, E. A.; Huché, M.; Hartinger, C. G.; Montigny, F. de; Plamont, M.-A.; Vessières, A.; Jaouen, G. Synthesis, Cytotoxicity, and COMPARE Analysis of Ferrocene and [3]ferrocenophane Tetrasubstituted Olefin Derivatives Against Human Cancer Cells. *ChemMedChem* **2010**, *5*, 2039–2050.
42. Alexis, F.; Pridgen, E. M.; Langer, R.; Farokhzad, O. C. Nanoparticle Technologies for Cancer Therapy. *Handb Exp Pharmacol* **2010**, 55–86.
43. Nazir, S.; Hussain, T.; Ayub, A.; Rashid, U.; Macrobert, A. J. Nanomaterials in Combating Cancer: Therapeutic Applications and Developments. *Nanomedicine* **2013**.
44. Swenson, C. E.; Perkins, W. R.; Roberts, P.; Janoff, A. S. Liposome Technology and the Development of MyocetTM (liposomal Doxorubicin Citrate). *The Breast* **2001**, *10*, Supplement 2, 1–7.
45. Barenholz, Y. Doxil[®]--the First FDA-approved Nano-drug: Lessons Learned. *J Control Release* **2012**, *160*, 117–134.
46. Huynh, N. T.; Passirani, C.; Saulnier, P.; Benoit, J. P. Lipid Nanocapsules: a New Platform for Nanomedicine. *Int J Pharm* **2009**, *379*, 201–209.
47. Heurtault, B.; Saulnier, P.; Pech, B.; Venier-Julienne, M.-C.; Proust, J.-E.; Phan-Tan-Luu, R.; Benoît, J.-P. The Influence of Lipid Nanocapsule Composition on Their Size Distribution. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2003**, *18*, 55–61.
48. Lacoëuille, F.; Hindre, F.; Moal, F.; Roux, J.; Passirani, C.; Couturier, O.; Cales, P.; Jeune, J. J. Le; Lamprecht, A.; Benoit, J. P. In Vivo Evaluation of Lipid Nanocapsules as a Promising Colloidal Carrier for Paclitaxel. *International Journal of Pharmaceutics* **2007**, *344*, 143–149.
49. Khalid, M. N.; Simard, P.; Hoarau, D.; Dragomir, A.; Leroux, J.-C. Long Circulating Poly(ethylene Glycol)-decorated Lipid Nanocapsules Deliver Docetaxel to Solid Tumors. *Pharm. Res.* **2006**, *23*, 752–758.
50. Saliou, B.; Thomas, O.; Lautram, N.; Clavreul, A.; Hureauux, J.; Urban, T.; Benoit, J.-P.; Lagarce, F. Development and in Vitro Evaluation of a Novel Lipid Nanocapsule Formulation of Etoposide. *Eur J Pharm Sci* **2013**.

51. Morille, M.; Montier, T.; Legras, P.; Carmoy, N.; Brodin, P.; Pitard, B.; Benoît, J.-P.; Passirani, C. Long-circulating DNA Lipid Nanocapsules as New Vector for Passive Tumor Targeting. *Biomaterials* **2010**, *31*, 321–329.
52. Vanpouille-Box, C.; Lacoeyille, F.; Belloche, C.; Lepareur, N.; Lemaire, L.; LeJeune, J.-J.; Benoît, J.-P.; Menei, P.; Couturier, O. F.; Garcion, E.; *et al.* Tumor Eradication in Rat Glioma and Bypass of Immunosuppressive Barriers Using Internal Radiation with 188Re-lipid Nanocapsules. *Biomaterials* **2011**, *32*, 6781–6790.
53. Perrier, T.; Saulnier, P.; Fouchet, F.; Lautram, N.; Benoît, J.-P. Post-insertion into Lipid NanoCapsules (LNCs): From Experimental Aspects to Mechanisms. *International Journal of Pharmaceutics* **2010**, *396*, 204–209.
54. Béduneau, A.; Saulnier, P.; Hindré, F.; Clavreul, A.; Leroux, J.-C.; Benoit, J.-P. Design of Targeted Lipid Nanocapsules by Conjugation of Whole Antibodies and Antibody Fab' Fragments. *Biomaterials* **2007**, *28*, 4978–4990.

Chapitre I

Chapitre I

Nouvelle stratégie de traitement du cancer : les LNC de ferrocifène

Le cancer demeurant une des premières causes de décès chez l'homme, de nouvelles approches thérapeutiques sont nécessaires pour faire face à ce fardeau. Depuis quelques années, les métallocomplexes ont fait leur retour sur la scène médicale, après la découverte du cisplatine dans les années 80, portant l'espoir d'offrir une diversité thérapeutique face aux composés organiques conventionnels.

Le laboratoire Charles Friedel de l'ENSCP propose une nouvelle chimie médicinale basée sur des complexes organométalliques de ferrocène. En raison des résultats préliminaires favorables obtenus *in vitro*, l'évaluation de ces composés sur des modèles expérimentaux a constitué la nouvelle étape à franchir. Pour des études précliniques, ces molécules à caractère hydrophobe requièrent le développement d'une forme galénique permettant leur administration chez l'animal. Les nanocapsules lipidiques ont prouvé être un vecteur adapté à ces molécules puisqu'elles ont déjà permis d'obtenir des taux d'encapsulation satisfaisants de ferrociphénol, le premier ferrocifène à avoir été étudié *in vivo* lors de précédents travaux de thèse.

Cette partie expose, au sein d'une revue bibliographique, les différentes stratégies galéniques mises en oeuvre pour surmonter les faiblesses pharmacologiques rencontrées avec les molécules anticancéreuses à base de métal (publication n°1). La publication n°2 décrit l'évaluation du FcOHTam, un dérivé métallique du tamoxifène nouvellement encapsulé dans les LNC, sur un modèle de xénogreffe de cancer du sein triple négatif.

Publication n°1

**Novel metal-based anticancer drugs: a new challenge in
drug delivery**



Novel metal-based anticancer drugs: a new challenge in drug delivery

Anne-Laure Lainé^{1,2} and Catherine Passirani^{1,2}

Since the serendipitous discovery of the cisplatin antiproliferative activity, many efforts have focused on the design of potent metal-based drugs for oncology therapies. A large number of these complexes have been evaluated *in vitro* and *in vivo* and some have reached clinical trials. However, while metallodrug chemistry has developed to an advanced level, these emerging therapeutics have encountered new hurdles including poor water solubility and pharmacological deficiencies. Today, solutions to overcome these issues do not lie in synthesizing new anticancer drugs but in finding suitable drug delivery strategies. Over the past decades, various delivery systems have been developed including prodrug, ligand design and nanocarriers aimed at enhancing the performance profile of these novel metallodrugs.

Addresses

¹ LUNAM Université – Ingénierie de la vectorisation particulière in Macro et nanomédecines biomimétiques, F-49933 Angers, France

² Inserm – U1066 IBS-CHU, F-49933 Angers, France

Corresponding author: Passirani, Catherine
(catherine.passirani@univ-angers.fr)

Current Opinion in Pharmacology 2012, 12:420–426

This review comes from a themed issue on **Cancer**

Edited by **Marilena Loizidou**

For a complete overview see the [Issue](#) and the [Editorial](#)

Available online 18th May 2012

1471-4892/\$ – see front matter, © 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2012.04.006>

Introduction

Despite markedly progresses in cancer diagnosis and therapy over the past decades, cancer remains the second most common cause of death (American Cancer Society). Since the discovery of its antiproliferative activity by Rosenberg [1] in 1965 and its subsequent FDA approval as a chemotherapeutic agent in 1978, cisplatin (Figure 1) used alone or in combination with other drugs, has proven high efficacy against various types of cancers, such as ovarian, head and neck, bladder, testicular and lung cancers [2,3]. Regardless of the great achievements of cisplatin, its clinical use suffers from some major drawbacks such as severe toxic side effects including neurotoxicity, hepatotoxicity, and nephrotoxicity [4,5] and drug resistance phenomenon leading to unsuccessful treatment [6]. Nevertheless, the high cisplatin potency in

oncology has raised the interest in metal-based drugs as potential chemotherapeutics. Interestingly, metals offer diverse chemistries for the design of anticancer agents over organic compounds, including a wide range of coordination numbers, accessible redox state and ligand substitution kinetic. Those properties confer a wide structural diversity that can be exploited for oncology treatment. Current research is focused on metallodrugs that either interact with DNA differently as classical platinum drugs do, or whose mode of action involve other targets such as proteins and enzymes leading to efficient alternative tumor cell death pathways. In this context, it is worth mentioning the two ruthenium drugs that have exhibited very promising antiproliferative activity, NAMI-A and KP1019 (Figure 1) and that are now in phase II and III clinical trials [7,8]. Gold compounds have also gained growing interest as their cytotoxic activity is not associated to DNA but to mitochondria and thioredoxin reductase [9•]. Other emerging examples are iron complexes with, among others, ferrociphenol (Figure 1) which exhibits cytotoxic properties via ROS generation [10]. Furthermore, the growing importance of metal complexes has stimulated the development of metal-based drugs that were neglected up to now such as titanium [11], iridium [12], cobalt, rhodium, copper and silver [13•,14,15].

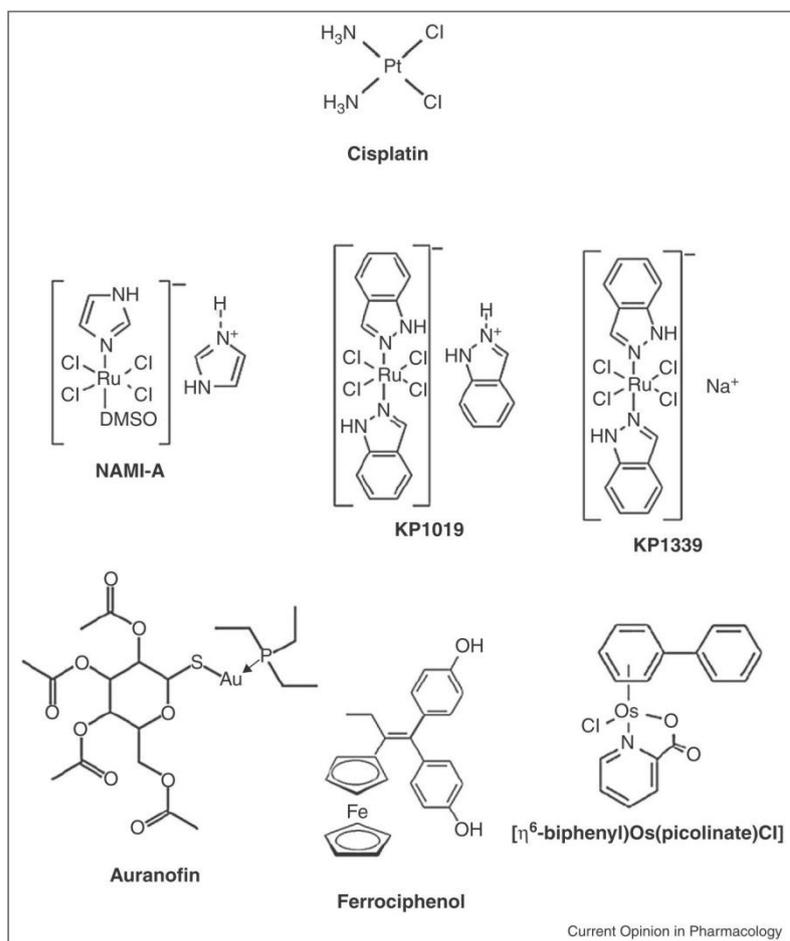
The fast development of these novel metal complexes has raised new difficulties related to pharmacological deficiencies such as poor water solubility, low bioavailability and short circulating time. Therefore, there is an emerging challenge in designing drug delivery systems that are capable of addressing the aforementioned issues while keeping the potent efficacy of the drug. Different approaches have been developed in this respect. The present review aims at reporting recent advances concerning the two main drug delivery strategies based either on structural optimization including ligand design and prodrug, or on drug-delivering vehicle.

Structural optimization

Ligand design

The great structural variety conferred by the metal center allows a large range of ligand design. This characteristic has been exploited to enhance the drug pharmacological properties and to make them safe for administration. As previously mentioned, a representative example is the ruthenium-based anticancer drug which, compared to platinum drug, exhibits lower toxicity and is better tolerated *in vivo*, rendering it very

Figure 1



Chemical structure of the various metal-based drugs discussed in this review.

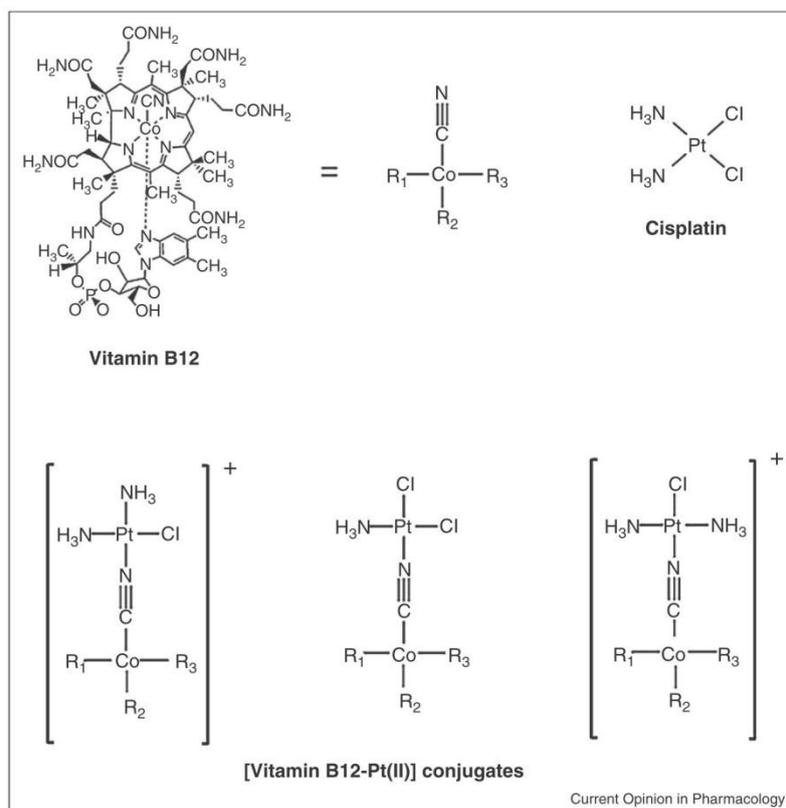
promising as a chemotherapeutic agent [8]. However, ruthenium complexes are barely soluble in aqueous solution, thus limiting the therapeutic dose for *in vivo* administration. Ríos-Luci *et al.* have overcome the solubility issue via the coordination of the water soluble ligand dmoPTA, 3,7-dimethyl-1,3,7-triaza-5-phosphabicyclo[3.3.1]nonane to the drug [16]. The conjugation between the Ru metal and the P atom of the ligand provides better solubility properties and high antiproliferative activity. Indeed, this Ru complex bearing dmoPTA ligand showed greater ability to inhibit *in vitro* proliferation of a colon cancer cell line (WiDr) which is known to exhibit resistance to cisplatin exposure.

Another strategy to increase water solubility consists of forming a salt from an active compound. KP1019, a highly potent ruthenium anticancer drug currently under clinical investigation, suffers from poor water solubility.

To overcome this issue, a sodium salt KP1339 (Figure 1) exhibiting a 35-fold higher solubility is able to reconstitute the active KP1019 upon indazolium chloride addition to the salt solution. Thereby, KP1339 is used in clinical trials for extemporaneous preparation of KP1019 [17].

Beyond improved solubility properties, a major challenge of innovative metal-containing complexes is to increase the selectivity for tumor cells over healthy cells for a higher therapeutic index. Specific delivery can be supplied by the use of targeting ligands that drive the drug to the cells of interest. The targeted delivery relies on the ability of a molecule to be recognized by specific membrane receptors onto the tumor cells leading to effective accumulation into the tumor tissue. This accumulation can also stem from the high demand for a particular molecule by tumor cells that are not or less required by normal cells such as sugar and vitamins [18,19]. Using

Figure 2



Chemical structure of the vitamin B12 conjugated to the cisplatin drug.

this strategy, Ruiz-Sánchez *et al.* have built their work on the basis that certain cancer cells require increased uptake of vitamin B12 [19]. Taking advantage of this, they conjugated the vitamin to cisplatin by switching one of its Cl-ligands or NH₃-ligands with the B12 via the cyanide group of the vitamin (Figure 2) [20]. To exert its cytotoxic activity, the Pt(II)-drug is released from the [B12-CN-Pt(II)] conjugates upon intracellular enzymatic conversion. However, cisplatin is not regenerated after release and a cisplatin-like Pt(II) complex coordinated to CN ligand is likely formed.

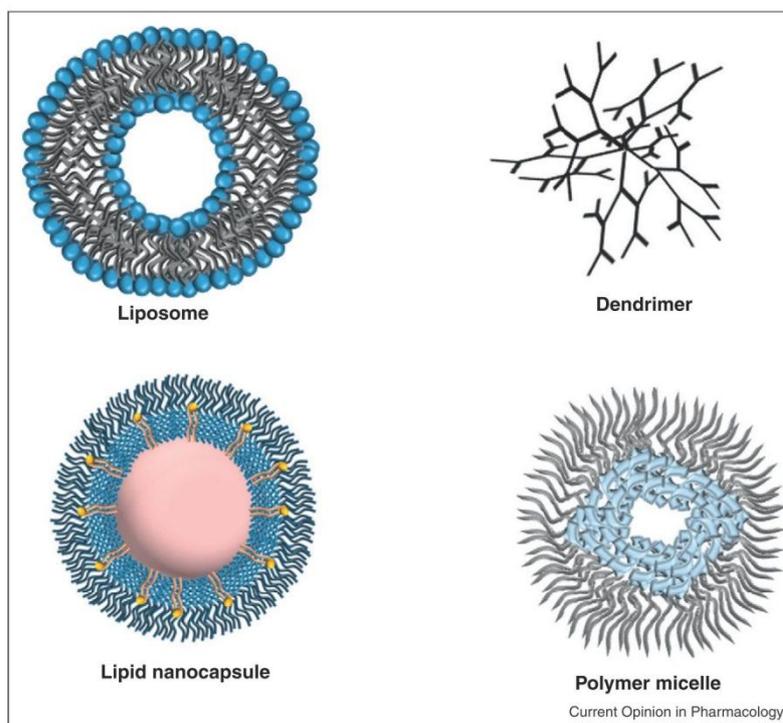
An additional feature that can be attributed to the complex via ligands is favored cellular uptake. van Rijt *et al.* have synthesized a cell-penetrating peptide conjugated to organometallic osmium complexes [21]. The cytotoxic activity of the osmium-(II) complexes has been demonstrated previously on the A2780 human ovarian cancer cell line (IC₅₀ = 4.2 μM) [22]. The conjugation of a peptide composed of eight arginine molecules to the osmium drug allowed a 10-fold uptake increase into A2780 ovarian cells compared to the unconjugated complex. However, its cytostatic activity appeared to be

significantly lower (IC₅₀ = 33 μM) than the unconjugated parent one [21]. The authors suggested a quenching of activity due to the positive charge of peptide chains leading to interactions with other cellular components. The lower activity could also be related to differences in binding to DNA compared to the parent complex also stemming from the cationic nature of the arginine chain.

Prodrug strategy

An alternative approach for an efficient drug delivery consists of designing prodrugs. Prodrugs are inert drug derivatives that undergo *in vivo* metabolism to release the active forms. Forming prodrugs presents several advantages including low toxicity and improved physicochemical and pharmacokinetic properties. For metal-based drugs, the inactive form can be converted into the active agent by different processes including redox activation, ligand substitution or more recently by photoactivation [23]. Interestingly, a site-specific conversion can be achieved upon a particular pH, a reducing environment of certain cells or a local light stimulus. Thereby, prodrug can be a useful tool that provides a targeted delivery via a

Figure 3



Schematic representations of the nanocarriers mentioned in the review.

precise and temporal location for conversion into its active analogue.

Designing cisplatin prodrug was firstly thought as an alternative strategy to circumvent dose-limiting toxicities of the active drug. The idea was to turn active platinum (II) drug into an inert platinum (IV) substitute in order to form a non-toxic but equally efficient cisplatin prodrug. The octahedral geometry of platinum (IV) allowing two extra ligands offers the possibility to adjust properties such as redox potential, hydrophilicity and ligand substitution rate [24,25,26*,27].

Drug-delivering vehicle

Despite the great advances in the field of prodrug and ligand design, some delivery drawbacks cannot be sufficiently addressed with these approaches such as dose-limiting solubility and toxicity. Moreover, all these strategies affect the primary structure of the metal complexes which may alter its activity profile. A promising drug delivery strategy able to overcome most of those limitations is the use of nanocarriers. Nanocarriers have been already commonly and widely used in chemotherapy [28–30]; for an in depth review on organic nanocarriers in cancer drug delivery see [31]. Because of great progress in nanotechnology, various kinds of carriers have been designed over

the past decades such as liposomes, dendrimers and lipid nanocapsules (LNCs) (Figure 3), offering many drug delivery advantages, in particular increased water solubility and enhanced pharmacokinetic properties. Contrary to free drug solution, drug carrier systems are able to allow a safe transport to the desired site considering they provide drug protection against elimination and *in vivo* degradation while minimizing toxicity to healthy cells.

An important example of this specific application concerns the cisplatin drug. In an attempt to prevent the severe ototoxicity encountered with high-dose therapy, cisplatin loaded polymer micelles (NC-6004) as potential non-toxic nanocarriers have been evaluated *in vivo* in guinea pigs in comparison with non-encapsulated cisplatin [32]. Polymer micelles (Figure 3) are composed of self-assembled-polymer chains resulting in a core-shell structure capable of carrying drugs [33]. This study demonstrated that systemic administration of NC-6004 reduced considerably the cisplatin ototoxicity. A phase I/II trial is currently ongoing for the evaluation of these micelles.

Recently, a liposomal formulation of cisplatin, called Lipoplatin [34], has also reached clinical trials. Previous preclinical studies showed markedly reduced Lipoplatin toxicity compared to that of cisplatin [35,36]. At the

beginning of 2011, a 3 year phase III outcome concerning the use of Lipoplatin in combination with paclitaxel in non-small cell lung cancer was published [37]. The results exposed a 2-fold higher response rate after 18 months for patients treated with Lipoplatin and paclitaxel compared to patients treated with conventional cisplatin and paclitaxel, proving the very promising therapeutic activity of the Lipoplatin.

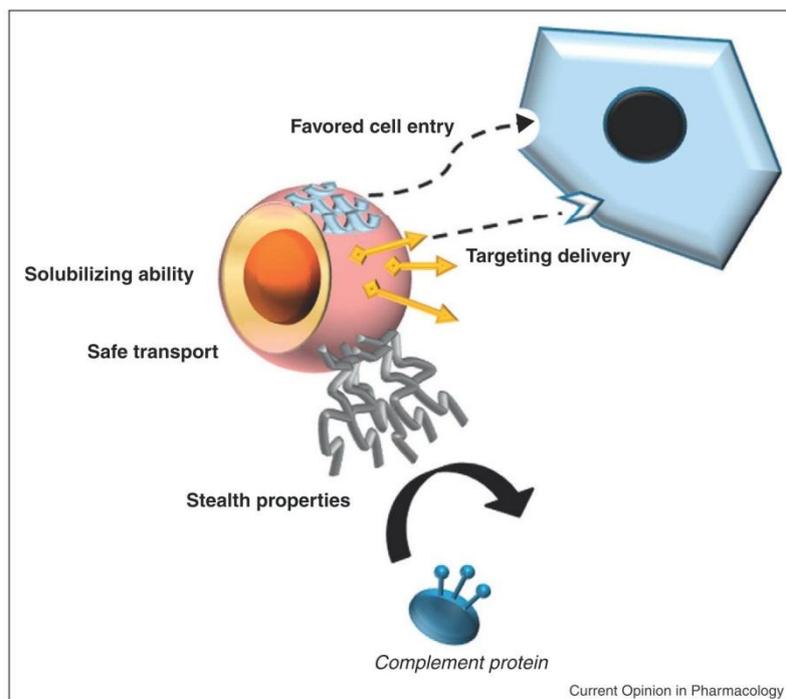
Considering the high toxicity of cisplatin, various nanotechnologies and encapsulation strategies have been developed to make it safe for administration. Examples are documented in the following articles and reviews [27,38,39].

A common situation where the use of nanocarrier is required concerns poorly water-soluble therapeutics. Indeed, solubility issue leads to low bioavailability *in vivo* and ultimately to a poor response to treatment. The organometallic ferrociphenol (FcdiOH), a ferrocene derivative of the breast cancer drug tamoxifen, exhibits potent efficacy against both estrogen-dependent and estrogen-independent breast cancer cells [10,40]. This iron-based drug belongs to the fast-growing organometallic family and to the 70% of newly discovered drugs exhibiting poor water solubility (according to some

industry estimates). Recently, FcdiOH showed promising *in vitro* antiproliferative activity on 9L glioma cells at low concentration with an IC50 of 0.6 μM [41]. Therefore, *in vivo* experiments were conducted via the use of injectable FcdiOH-LNCs developed in our laboratory, in order to confirm its therapeutic activity. Thanks to their oily core, these LNCs allow the encapsulation of various lipophilic compounds and represent a potential platform for drug delivery in cancer therapy [42^{*}]. Lipid nanocapsules are prepared according to an original method based on a phase inversion phenomenon of an emulsion in function of the temperature. *In vitro* proliferation assay showed that LNCs did not alter FcdiOH activity profile as evidenced by the unchanged IC50 value. Furthermore, FcdiOH-LNC treatment showed increased survival median time for intracranial gliosarcoma bearing rats [43] and a greater LNC accumulation into the tumor tissue when long polyethylene glycol chains were post-inserted on FcdiOH-LNCs, increasing vascular circulation time [44^{**}].

This latter result illustrates the last but not least advantage of nanocarriers which is surface functionalization. Indeed, nanocarrier architecture offers the possibility to tune its pharmacological behavior leading to a longer half-life circulation time in body fluids. Additionally, targeting agents can be attached onto

Figure 4



Ideal elaborated delivery system.

the carrier surface governing the drug transport selectively to the designated tumor site. In regard to this strategy, biotinylated PAMAM dendrimers loaded with cisplatin have been developed in order to target ovarian cancer cells [45]. Other entities have been grafted onto nanocarriers and investigated for targeting purpose such as various peptides, monoclonal antibodies and proteins [46–48].

Conclusion

In recent years, metal-based anticancer drugs have undergone a tremendous development due to their intriguing structural properties conferred by the metal. The growing interest in designing metallodrugs is accompanied by pharmacological deficiencies such as poor aqueous solubility, systemic toxicity and non-specific tumor delivery. These have prompted scientists to develop drug delivery strategies capable of addressing those problems while maintaining drug efficacy. Ideally, elaborated delivery systems would be non-toxic and would exhibit different abilities including solubilizing property, tumor targeting agent, cell entry favoring entity and suitable pharmacokinetic properties allowing a safe drive to the drug (Figure 4). To date, nanocarriers appear to be the most advanced systems capable of fulfilling that request and metal-based drug in combination with nanomedicine is expected to become a potent anticancer therapy.

However, there is a need to better define the pharmacologic (pharmacokinetic and pharmacodynamic) properties of the [drug-nanocarrier] complex. Special attention must also be paid on the drug mechanism of action through the carrier. Does the drug need to be released from the confine of the cargo to be active or should the complex drug-loaded carrier be considered as a unique therapeutic entity? Finally, it is of great interest to be able to predict the interactions between the organs involved in the elimination process of foreign materials and the drug-carrier complex. Indeed, an inadequate biodistribution profile could lead to a lack of therapy performance. Taking those elements into consideration would certainly allow elaborating highly efficient anticancer metallodrug-delivering nanocarriers.

Acknowledgements

The authors would like to thank Anne Vessières and Gérard Jaouen for the helpful discussions about metal-based drugs.

References and recommended reading

Papers of particular interest, published within the period of review, have been highlighted as:

- of special interest
- of outstanding interest

1. Rosenberg B, VanCamp L, Trosko JE, Mansour VH: **Platinum compounds: a new class of potent antitumor agents.** *Nature* 1969, **222**:385-386.

2. Galanski M, Jakupec MA, Keppler BK: **Update of the preclinical situation of anticancer platinum complexes: novel design strategies and innovative analytical approaches.** *Curr Med Chem* 2005, **12**:2075-2094.
 3. Sandler A, Graham C, Baggstrom M, Herbst R, Zergebel C, Saito K, Jones D: **An open-label, multicenter, three-stage, phase II study of s-1 in combination with cisplatin as first-line therapy for patients with advanced non-small cell lung cancer.** *J Thorac Oncol* 2011, **6**:1400-1406.
 4. Jung Y, Lippard SJ: **Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage.** *Chem Rev* 2007, **107**:1387-1407.
 5. Pabla N, Dong Z: **Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies.** *Kidney Int* 2008, **73**:994-1007.
 6. Dempke W, Voigt W, Grothey A, Hill BT, Schmolli HJ: **Cisplatin resistance and oncogenes — a review.** *Anticancer Drugs* 2000, **11**:225-236.
 7. Hartinger CG, Jakupec MA, Zorbas-Seifried S, Groessl M, Egger A, Berger W, Zorbas H, Dyson PJ, Keppler BK: **KP1019, a new redox-active anticancer agent — preclinical development and results of a clinical phase I study in tumor patients.** *Chem Biodivers* 2008, **5**:2140-2155.
 8. Kostova I: **Ruthenium complexes as anticancer agents.** *Curr Med Chem* 2006, **13**:1085-1107.
 9. Rubbiani R, Kitanovic I, Alborzina H, Can S, Kitanovic A, Onambele LA, Stefanopoulou M, Geldmacher Y, Sheldrick WS, Wolber G *et al.*: **Benzimidazol-2-ylidene gold(II) complexes are thioredoxin reductase inhibitors with multiple antitumor properties.** *J Med Chem* 2010, **53**:8608-8618.
- An intriguing article about gold-based anticancer drugs and their promising biological activity through the inhibition of the thioredoxin reductase. This new anticancer mode of action is encouraging given current treatment limitations we are facing.
10. Hillard E, Vessières A, Thouin L, Jaouen G, Amatore C: **Ferrocene-mediated proton-coupled electron transfer in a series of ferrocifen-type breast-cancer drug candidates.** *Angew Chem Int Ed Engl* 2005, **45**:285-290.
 11. Claffey J, Müller-Bunz H, Tacke M: **Benzyl-substituted titanocene dichloride anticancer drugs: from lead to hit.** *J Organomet Chem* 2010, **695**:2105-2117.
 12. Liu Z, Habtemariam A, Pizarro AM, Fletcher SA, Kisova A, Vrana O, Salassa L, Bruijninx PCA, Clarkson GJ, Brabec V *et al.*: **Organometallic half-sandwich iridium anticancer complexes.** *J Med Chem* 2011, **54**:3011-3026.
 13. van Rijjt SH, Sadler PJ: **Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the development of anticancer drugs.** *Drug Discov Today* 2009, **14**:1089-1097.
- A comprehensive review dealing with recent progress in the field of metallodrugs. This review lists all the metals currently under investigation for the design of new anticancer drugs.
14. Tan SJ, Yan YK, Lee PPF, Lim KH: **Copper, gold and silver compounds as potential new anti-tumor metallodrugs.** *Future Med Chem* 2010, **2**:1591-1608.
 15. Gasser G, Ott I, Metzler-Nolte N: **Organometallic anticancer compounds.** *J Med Chem* 2011, **54**:3-25.
 16. Rjos-Luci C, León LG, Mena-Cruz A, Pérez-Roth E, Lorenzo-Luis P, Romerosa A, Padrón JM: **Antiproliferative activity of dmoPTA-Ru(II) complexes against human solid tumor cells.** *Bioorg Med Chem Lett* 2011, **21**:4568-4571.
 17. Hartinger CG, Zorbas-Seifried S, Jakupec MA, Kynast B, Zorbas H, Keppler BK: **From bench to bedside — preclinical and early clinical development of the anticancer agent indazolium trans-[tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate(III)] (KP1019 or FFC14A).** *J Inorg Biochem* 2006, **100**:891-904.
 18. Calvo MB, Figueroa A, Pulido EG, Campelo RG, Aparicio LA: **Potential role of sugar transporters in cancer and their relationship with anticancer therapy.** *Int J Endocrinol* 2010, **2010**:1-14.

19. Russell-Jones G, McTavish K, McEwan J: **Preliminary studies on the selective accumulation of vitamin-targeted polymers within tumors.** *J Drug Target* 2011, **19**:133-139.
 20. Ruiz-Sánchez P, König C, Ferrari S, Alberto R: **Vitamin B₁₂ as a carrier for targeted platinum delivery: in vitro cytotoxicity and mechanistic studies.** *J Biol Inorg Chem* 2011, **16**:33-44.
 21. van Rijt SH, Kosthunova H, Brabec V, Sadler PJ: **Functionalization of osmium arene complexes with (poly)arginine: effect on cellular uptake, internalization, and cytotoxicity.** *Bioconjug Chem* 2011, **22**:218-226.
 22. Peacock AFA, Parsons S, Sadler PJ: **Tuning the hydrolytic aqueous chemistry of osmium arene complexes with N,O-chelating ligands to achieve cancer cell cytotoxicity.** *J Am Chem Soc* 2007, **129**:3348-3357.
 23. Cubo L, Pizarro AM, Quiroga AG, Salassa L, Navarro-Ranninger C, Sadler PJ: **Photoactivation of trans diamine platinum complexes in aqueous solution and effect on reactivity towards nucleotides.** *J Inorg Biochem* 2010, **104**:909-918.
 24. Dhar S, Kolishetti N, Lippard SJ, Farokhzad OC: **Targeted delivery of a cisplatin prodrug for safer and more effective prostate cancer therapy in vivo.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**:1850-1855.
 25. Shi Y, Liu S-A, Kerwood DJ, Goodisman J, Dabrowiak JC: **Pt(IV) complexes as prodrugs for cisplatin.** *J Inorg Biochem* 2012, **107**:6-14.
 26. Xiao H, Qi R, Liu S, Hu X, Duan T, Zheng Y, Huang Y, Jing X: **Biodegradable polymer-cisplatin(IV) conjugate as a pro-drug of cisplatin(II).** *Biomaterials* 2011, **32**:7732-7739.
- An interesting study which relates the combination of the two main strategies presented in this review: the design of a Pt-prodrug and the use of micelles to carry the prodrug.
27. Harper BW, Krause-Heuer AM, Grant MP, Manohar M, Garbutcheon-Singh KB, Aldrich-Wright JR: **Advances in platinum chemotherapeutics.** *Chemistry* 2010, **16**:7064-7077.
 28. Misra R, Acharya S, Sahoo SK: **Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy.** *Drug Discov Today* 2010, **15**:842-850.
 29. Kunjachan S, Blauž A, Möckel D, Theek B, Kiessling F, Etrych T, Ulbrich K, van Bloois L, Storm G, Bartosz G, Rychlik B, Lammers T: **Overcoming cellular multidrug resistance using classical nanomedicine formulations.** *Eur J Pharm Sci* 2012, **45**:421-428.
 30. Mirtsching B, Cosgriff T, Harker G, Keaton M, Chidiac T, Min M: **A phase II study of weekly nanoparticle albumin-bound paclitaxel with or without trastuzumab in metastatic breast cancer.** *Clin Breast Cancer* 2011, **11**:121-128.
 31. López-Dávila V, Seifalian AM, Loizidou M: **Organic nanocarriers for cancer drug delivery.** *Curr Opin Pharmacol* 2012, **12**:414-419.
 32. Baba M, Matsumoto Y, Kashio A, Cabral H, Nishiyama N, Kataoka K, Yamasoba T: **Micellization of cisplatin (NC-6004) reduces its ototoxicity in guinea pigs.** *J Control Rel* 2012, **157**:112-117.
 33. Kedar U, Phutane P, Shidhaye S, Kadam V: **Advances in polymeric micelles for drug delivery and tumor targeting.** *Nanomed: Nanotechnol Biol Med* 2010, **6**:714-729.
 34. Stathopoulos GP, Boulikas T: **Lipoplatin formulation review article.** *J Drug Deliv* 2012, **2012**:581363.
 35. Boulikas T: **Low toxicity and anticancer activity of a novel liposomal cisplatin (Lipoplatin) in mouse xenografts.** *Oncol Rep* 2004, **12**:3-12.
 36. Devarajan P, Tarabishi R, Mishra J, Ma Q, Kourvetaris A, Vougiouka M, Boulikas T: **Low renal toxicity of Lipoplatin compared to cisplatin in animals.** *Anticancer Res* 2004, **24**:2193-2200.
 37. Stathopoulos GP, Antoniou D, Dimitroulis J, Stathopoulos J, Marosis K, Michalopoulou P: **Comparison of liposomal cisplatin versus cisplatin in non-squamous cell non-small-cell lung cancer.** *Cancer Chemother Pharmacol* 2011, **68**:945-950.
 38. Cheng L, Jin C, Lv W, Ding Q, Han X: **Developing a highly stable PLGA-mPEG nanoparticle loaded with cisplatin for chemotherapy of ovarian cancer.** *PLoS One* 2011, **6**:e25433.
 39. Kirkpatrick GJ, Plumb JA, Sutcliffe OB, Flint DJ, Wheate NJ: **Evaluation of anionic half generation 3.5-6.5 poly(amidoamine) dendrimers as delivery vehicles for the active component of the anticancer drug cisplatin.** *J Inorg Biochem* 2011, **105**:1115-1122.
 40. Vessières A, Top S, Pigeon P, Hillard E, Boubeker L, Spera D, Jaouen G: **Modification of the estrogenic properties of diphenols by the incorporation of ferrocene. Generation of antiproliferative effects in vitro.** *J Med Chem* 2005, **48**:3937-3940.
 41. Allard E, Huynh NT, Vessières A, Pigeon P, Jaouen G, Benoit J-P, Passirani C: **Dose effect activity of ferrocifen-loaded lipid nanocapsules on a 9L-glioma model.** *Int J Pharm* 2009, **379**:317-323.
 42. Huynh NT, Passirani C, Saulnier P, Benoit JP: **Lipid nanocapsules: a new platform for nanomedicine.** *Int J Pharm* 2009, **379**:201-209.
- A thorough review about lipid nanocapsules, the formulation process and their application.
43. Huynh NT, Passirani C, Allard-Vannier E, Lemaire L, Roux J, Garcion E, Vessieres A, Benoit J-P: **Administration-dependent efficacy of ferrociphenol lipid nanocapsules for the treatment of intracranial 9L rat gliosarcoma.** *Int J Pharm* 2012, **423**:55-62.
 44. Huynh NT, Morille M, Bejaud J, Legras P, Vessieres A, Jaouen G, Benoit J-P, Passirani C: **Treatment of 9L gliosarcoma in rats by ferrociphenol-loaded lipid nanocapsules based on a passive targeting strategy via the EPR effect.** *Pharm Res* 2011, **28**:3189-3198.
- An outstanding study relating the full eradication of an ectopic gliosarcoma via ferrociphenol-loaded lipid nanocapsules and demonstrating the efficiency of nanocarrier pegylation for a passive targeting.
45. Yellepeddi VK, Kumar A, Maher DM, Chauhan SC, Vangara KK, Palakurthi S: **Biotinylated PAMAM dendrimers for intracellular delivery of cisplatin to ovarian cancer: role of SMVT.** *Anticancer Res* 2011, **31**:897-906.
 46. Huynh NT, Roger E, Lautram N, Benoît J-P, Passirani C: **The rise and rise of stealth nanocarriers for cancer therapy: passive versus active targeting.** *Nanomedicine (Lond)* 2010, **5**:1415-1433.
 47. Mishra B, Patel BB, Tiwari S: **Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery.** *Nanomed: Nanotechnol Biol Med* 2010, **6**:9-24.
 48. Laine A-L, Huynh NT, Clavreul A, Balzeau J, Béjaud J, Vessieres A, Benoit J-P, Eyer J, Passirani C: **Brain tumour targeting strategies via coated ferrociphenol lipid nanocapsules.** *Eur J Pharm Biopharm* 2012, **81**:690-693.

Publication n°2

The *in vivo* performance of ferrocenyl tamoxifen lipid nanocapsules in xenografted triple negative breast cancer



The *in vivo* performance of ferrocenyl tamoxifen lipid nanocapsules in xenografted triple negative breast cancer



Anne-Laure Lainé^{a,b}, Eric Adriaenssens^{c,d}, Anne Vessières^e, Gérard Jaouen^e, Cyril Corbet^{d,f}, Emilie Desruelles^{d,f}, Pascal Pigeon^e, Robert-Alain Toillon^{d,f}, Catherine Passirani^{a,b,*}

^a LUNAM Université – Micro et Nanomédecines biomimétiques, F-49933 Angers, France

^b Inserm – U1066 IBS-CHU, F-49933 Angers, France

^c CNRS UMR 8527, Lille F-59021, France

^d Université Lille 1, Villeneuve d'Ascq F-59655, France

^e CNRS, UMR 7576, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris, F-75231, France

^f Inserm U908, Villeneuve d'Ascq F-59655, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 May 2013

Accepted 24 May 2013

Available online 15 June 2013

Keywords:

Ferrocene

Nanoparticle

Triple negative breast cancers

Bioluminescence

ABSTRACT

Triple-negative breast cancers (TNBC) represent the most aggressive form of breast cancers and their treatment are challenging due to the tumor heterogeneity. The high death rate and the limited systemic treatment options for TNBC necessitate the search for alternative chemotherapeutics. We previously found that FcOHTAM, an organometallic derivative of hydroxytamoxifen, showed *in vitro* a strong antiproliferative effect on various breast cancer cell lines, including MDA-MB-231 cells, the archetype of TNBC. In this study, we developed stealth FcOHTAM loaded lipid nanocapsules (LNCs) to further evaluate this novel drug on a TNBC xenografted model. Cell cycle analysis of MDA-MB-231 cells confirmed the preservation of the drug activity through LNCs causing a cycle arrest in phase S after 48 h exposure at the IC₅₀ concentration (2 μM). Two intraperitoneal injections of FcOHTAM loaded LNCs (20 mg/kg) administered to luciferase-transfected MDA-MB-231 tumors bearing mice led to a marked delay in tumor growth. As a consequence, a significantly lower tumor volume was obtained at the end of the experiment with a difference of 36% at day 38 compared to the untreated group. These results represent the first evidence of an *in vivo* effect of FcOHTAM and ferrocenyl derivatives in general on xenografted breast tumors.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Breast cancer (BC) is the most frequently diagnosed cancer in women worldwide accounting for 23% of the total cancer cases [1]. Thanks to medical progress in cancer diagnosis and therapy including earlier detection, increased awareness and improved treatment, breast cancer survival has been increasing since about 1990. However, despite these advances, breast cancer remains the principle cause of death from cancer among women, representing 14% of global cancer deaths (worldwildbreastcancer.com).

Among the different BC subtypes, triple negative breast cancer (TNBC) defined by the absence of estrogen receptor alpha (ERα),

progesterone receptor (PR) and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), accounts for 15–20% of all breast cancer cases and is responsible for a high rate of mortality [2,3]. TNBC generally occurs in younger women and represents the most aggressive form associated with a high risk of recurrence, visceral and central nervous system metastases and early death. The lack of standard therapeutic receptors makes TNBC insensitive to endocrine therapy such as tamoxifen (Nolvadex®) used in ERα (+) cancer treatment [4] or to trastuzumab (Herceptin®) commonly used for HER2 (+) tumors. Additionally, TNBC is further characterized by a biological heterogeneity within its own subgroup. Consequently, there is currently no targeted therapy for TNBC and no treatment protocol (schedule and choice of chemotherapeutics) has been standardized so far, making TNBC a major challenge for breast oncologists.

Current researches focus on the development of innovative therapeutics with alternative biological activity such as PARP (polyadenosine diphosphate ribose polymerase) inhibitor,

* Corresponding author. INSERM U1066, IBS-CHU Angers, 4 rue Larrey, 49933 Angers Cedex 9, France. Tel.: +33 (0)2 44 68 85 34; fax: +33 (0)2 44 68 85 46.

E-mail address: Catherine.passirani@univ-angers.fr (C. Passirani).

antiangiogenic agent or tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand [5]. In this context and with the growing interest in metal-based drug [6], Jaouen's group has synthesized a range of ferrocenyl tamoxifen derivatives called ferrocifenes resulting of the combination of a ferrocene moiety with the tamoxifen (TAM) scaffold (Fig. 1) [7].

Since its FDA approval in 1998, TAM has been the oldest and most prescribed SERM (selective estrogen receptor modulator) and it plays the role of antagonist of the estrogen receptor via its active metabolite 4-hydroxytamoxifen (OH-TAM). TAM has been used for the management of advanced or metastatic estrogen dependent breast cancer, but also as adjuvant therapy, preoperative treatment and chemoprevention [8,9]. Despite its great achievements, 30% of ER α (+) breast cancer displays a *de novo* resistance to TAM [10] while 40% of ER α (+) tumors acquire resistance over the treatment period [11]. Besides this resistance, TAM efficacy is impeded with severe side effects caused by the lack of selectivity of the drug against tumor cells such as endometrial cancers [12] and ovarian cyst [13]. Finally, as aforementioned, TAM is inefficient on ER α (–) breast cancer cases which includes TNBC [14]. The strategy of coupling a ferrocene to the hydroxytamoxifen was therefore meant to supplement TAM with a redox entity in order to overcome the therapeutic limitation encountered with the organic analogue.

Interestingly, previous *in vitro* studies demonstrated that FcOHTAM induced cell growth arrest and senescence of both hormone-dependent and independent breast cancer cells at low doses. This original effect is not related to tamoxifen-induced apoptosis which can be observed with high doses of TAM [15,16]. This first result proved the efficient contribution of the ferrocenyl moiety in potentiating the anticancer mechanism of the complex. To conduct *in vivo* evaluations, it was necessary to address the water solubility issue of this lipophilic molecule. Today, nanomedicines have appeared as a compelling system to develop an injectable formulation of FcOHTAM offering great benefits such as increased bioavailability, protection against *in vivo* degradation and enhancement of pharmacokinetic properties. Among the manifold types of nanovehicles, lipid nanocapsules (LNCs) [17], composed of an oily core and a surfactant-made shell, already proved their efficiency to entrap and transport the ferrociphenol (FcOH) drug, another member of the ferrocifen family. The anticancer activity of FcOH was widely investigated on brain tumor models through lipid nanocapsules and favorable outcomes showed the promising efficiency of this ferrocenyl based drug [18–20], encouraging the preclinical FcOHTAM evaluation via LNCs.

The aim of the present work was therefore to develop a suspension of stealth FcOHTAM-LNCs and, thereafter, to assess the response of mice bearing MDA-MB-231 xenografted tumors, a TNBC model resistant to tamoxifen treatment.

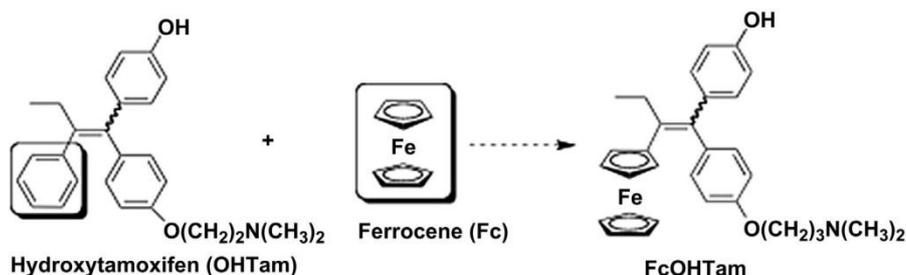


Fig. 1. Schematic coupling between a hydroxytamoxifen and a ferrocene resulting in the ferrocenyl tamoxifen derivative.

2. Materials and methods

2.1. Chemical materials

Fc-OH-TAM was prepared by a McMurry cross-coupling reaction as previously described [21]. The lipophilic Labrafac[®] WL1349 (caprylic-capric acid triglycerides) was purchased from Gattefosse S.A. (Saint-Priest, France). Lipoid[®] S75-3 (soybean lecithin at 69% of phosphatidylcholine) provided by Lipoïd GmbH (Ludwigshafen, Germany); Solutol[®] HS15 (a mixture of free polyethylene glycol 660 and polyethylene glycol 660 hydroxystearate) by BASF (Ludwigshafen, Germany) and NaCl by Prolabo (Fontenay-sous-bois, France). Deionized water was acquired from a Milli-Q plus system (Millipore, Paris, France) and sterile water from Cooper (Melun, France). 1,2-DiStearoyl-sn-glycero-3-PhosphoEthanolamine-N-[methoxy-(polyethylene glycol)-2000] (DSPE-mPEG2000) (Mean Molecular Weight (MMW) = 2805 g/mol) was purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA).

2.2. Preparation of Fc-OH-TAM-loaded lipid nanocapsules

The LNC vehicle was prepared according to a phase inversion method as previously described [2]. Briefly, the preparation process involved 2 steps. Step I consisted of mixing all the excipients (Solutol[®] HS15 (17.2% w/w), Lipoid[®] (1.5% w/w), Labrafac[®] (20.8% w/w), NaCl (0.5% w/w) and water (60% w/w)) under magnetic stirring and heating from room temperature to 90 °C. Three cycles of progressive cooling and heating between 90 and 60 °C were then carried out. Step II was an irreversible shock induced by sudden dilution with water (28.5% (v/v)) applied to the mixture at 70–72 °C. Slow magnetic stirring was then applied to the suspension for 5 min.

Fc-OH-TAM loaded LNCs were prepared according to this above-mentioned process with drug addition as a solid powder at step 1 to the other excipients in order to obtain a final concentration of 8 mg/mL (2.8% w/w). The drug was solubilized during the heating step and ultimately encapsulated over the last cooling step.

2.3. Post-insertion of DSPE-mPEG(2000) at the LNC surface

To design stealth LNCs, DSPE-mPEG2000 was grafted onto the surface of LNCs at the concentration of 10 mM by the post-insertion technique as previously described [22]. Briefly, DSPE-mPEG2000 was added to the LNC suspension preheated at 60 °C. The mixture was placed under magnetic stirring for 2 h at 60 °C, and, finally the insertion was quenched in an ice bath for 1 min. This technique is commonly called PEGylation, referred to as the insertion of PEG chains on the carrier surface.

2.4. LNC characterization

The determination of the drug loading was achieved by spectrophotometry at 254 nm after dissolving 10 μ L of LNCs into 5 mL of methanol (Fisher chemical). The calibration curve, ranged from 10 μ M to 100 μ M, was also prepared in methanol.

The average hydrodynamic diameter of nanocapsules were determined at 25 °C, in triplicate, by using a Malvern Zetasizer[®] (Nano Series DTS 1060, Malvern Instruments S.A., Worcestershire, UK). For the measurement, the LNCs were diluted at 1:100 (v/v) in deionised water.

2.5. Tumour cell line and culture

MDA-MB-231 breast cancer cell line was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) and routinely grown in Dulbecco modified Minimal Essential Medium (DMEM) supplemented with 10% inactivated FBS (Fetal Bovine Serum) (Invitrogen Corporation, Cergy-Pontoise, France), 2 mM L-glutamine, 1% non-essential amino acids, 40 UI/ml penicillin, 40 μ g/ml streptomycin at 37 °C in 5% CO₂-humidified atmosphere.

MDA-MB-231 cells used in SCID mice experiment harbored stable transfection of Renilla hRLuc (Renilla reniformis) reporter gene. Cell transfections were done using pGL4 Luciferase receptor vector (promega) and the Cell Line Nucleofector Kit V (Lonza) according to the manufacturer's instructions. Cells were selected with hygromycin B (800 µg/ml, Invitrogen), the resulting hygromycin resistant cell populations were stored as frozen stocks and used for all the experiments within 20 passages.

2.6. In vitro cell viability

A suspension of MDA-MB-231 cells (0.95×10^4 cells/mL) was put on every well of the 24-well plates for 48 h. On day 2, the culture media was removed and cells were treated with increasing concentrations of FcOHTAM (0.01–100 µmol/L) from the various dosage form including free FcOHTAM, conventional LNCs and stealth LNCs. The free FcOHTAM (non-encapsulated drug) was solubilized in absolute ethanol at a concentration of 20 mg/mL and then diluted in the culture media to obtain the highest concentration (100 µmol/L). The different types of LNC suspensions were diluted likewise in the culture media in order to obtain a concentration of 100 µmol/L. The other low concentrations were obtained by 1:10 cascade dilution from the 100 µmol/L concentration. The toxicity of the two kinds of unloaded LNCs was also evaluated with this antiproliferative assay by carrying out the same dilutions as for the loaded LNCs.

After 72 h incubation at 37 °C, the media containing treatments were replaced by fresh media. Cell survival percentage was estimated by the MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) survival assay (Promega, Lyon, France). MTS solution (100 µl) was added into each well, and the plates were incubated at 37 °C for 2 h 30. The optical density values (OD) were measured at 490 nm for dark purple intensity and at 750 nm for subtraction of background using a multiwell-scanning spectrophotometer (Multiskan Ascent, Labsystems SA, Cergy-pontoise, France). The maximal absorbance was determined by incubating cells with culture media and was considered as 100% survival. All experiments were performed in triplicate and presented as Mean ± SD.

2.7. Cell cycle analysis

1×10^5 MDA-MB-231 cells were plated in 60 mm dishes in DMEM with phenol red supplemented with 10% stripped foetal bovine serum for 24 h. Cells were then treated with increasing concentration of free FcOHTAM and with LNC and stealth-LNC containing FcOHTAM. Cell cycle analyses were then process after 24, 48 and 72 h of treatment. At the end of the experiment, the cells were trypsinized and washed twice with PBS. They were subsequently incubated in PBS containing RNase A (50 µg/ml, 15 min, 20 °C) and then in PBS containing propidium iodide (20 µg/ml, 4 h, 20 °C, in the dark). Cell cycle was analyzed with Cyan LX9 cytometer (Beckman Coulter, France) and data were analyzed by a multicycle software (phoenix Flow systems, San Diego, USA).

2.8. In vitro complement activation

The complement consumption was evaluated in normal human serum (NHS) (provided by the Etablissement Français du Sang, CHU, Angers, France) by measuring the residual haemolytic capacity of the serum complement after contact with the different particles. The technique, according to the procedure described elsewhere [23], consisted in dosing the amount of serum able to haemolyse 50% of a fixed number of sensitized sheep erythrocytes with rabbit anti-sheep erythrocyte antibodies (CH50 unit). Complement activation was presented as a function of the nanoparticle surface area which was calculated as previously described [24]. All experiments were performed in triplicate.

2.9. Animals and implantation of tumor cells

Six-week-old female severe combined immunodeficient (SCID) mice were purchased from Pasteur Institute of Lille and acclimatized for at least two weeks. Mice were maintained under a 12 h light/dark cycle at a temperature of 20 °C–22 °C. Food and water were available *ad libitum*. Mice were maintained in accordance with the Institutional Animal Care and Use Committee procedures and guidelines. The protocol used was approved by the regional ethic committee according to legislation. MDA-MB-231 cells were harvested and resuspended in PBS before subcutaneous injection into flanks (3×10^6 cells per mice). At day 14 and 19, treatments (PBS, unloaded stealth LNCs, stealth FcOHTAM-LNCs) were applied intraperitoneally (20 mg/kg). To determine the tumor volume, each mouse was monitored at the indicated time using a bioluminescence imager (IVIS Lumina XR – CaliperLS).

2.10. Statistical analysis

Results were expressed as a mean ± SEM. Statistical significance between control and treated groups was evaluated using Mann and Withney test.

3. Results

3.1. Physicochemical properties of LNC suspensions

The FcOHTAM concentration into LNCs was settled at 8 mg/mL in order to deliver the desired dose. At this concentration, the entrapment efficiency reached 100% (data not shown). The physicochemical characteristics of the LNC suspensions including hydrodynamic diameter and zeta potential are summarized in Table 1.

Regarding the cargo size, the FcOHTAM entrapment into LNCs did not alter the size compared to unloaded LNCs as similar sizes were obtained. Stealth LNCs (unloaded and loaded with FcOHTAM) obtained after PEGylation showed a slight increase in size compared to conventional LNCs.

The apparent surface charge was evaluated through zeta potential measurement. As pointed out in Table 1, FcOHTAM entrapment markedly increased the zeta potential from –6.6 mV to +22.7 mV. After DSPE-PEG insertion, both unloaded and loaded LNCs showed a dramatic decrease of zeta potential.

3.2. In vitro antiproliferative activity

The antiproliferative activity of FcOHTAM loaded LNCs was assessed comparatively to free FcOHTAM using the MTS assay after exposure of MDA-MB-231 cells to different drug concentrations ranging from 0.01 µM to 100 µM for 72 h. The cell survival profiles of the various treatments were illustrated in Fig. 2.

As shown in Fig. 2, the FcOHTAM concentrations which inhibit the cell growth at 50% (IC₅₀) remain unchanged after entrapment into LNCs whatever the types of LNCs (conventional or stealth), reaching an interesting low value around 2 µM. At this dilution, vehicles did not show any toxicity.

3.3. Cell cycle distribution

We have previously described that growth inhibitory effect of FcOHTAM is characterized by modification of cell cycle distribution of MDA-MB-231 [15]. In order to evaluate the impact of the drug encapsulation into LNCs on this effect, cell cycle distribution analyses were conducted at IC₅₀ value (2 µM) and results were gathered in Fig. 3. Similar cell cycle profiles and cell cycle kinetics were observed for FcOHTAM free or formulated in LNCs or stealth-LNCs. Whatever the formulation, FcOHTAM led to a slight increased of MDA-MB-231 cells in S-phase fraction after 24 h of treatment. After 48 h, the cells were stacked mainly in S phase. Then, after 72 h, cells entered in G2/M phase then went back to G0/G1 phase. A sub-G0 population was also detectable indicating that a fraction of the treated cells were dead.

3.4. In vitro complement activation

Upon intraperitoneal injections, the drug-loaded LNCs are expected to be absorbed into the systemic circulation where they can experience a clearance phenomenon due to the immune system. Accordingly, the complement activation was evaluated *in vitro* by

Table 1
Physico-chemical characteristics (size and charge) of conventional and stealth LNCs unloaded and loaded with FcOHTAM.

Formulation	Hydrodynamic diameter (nm)	Zeta potential (mV)
LNCs	51.2 ± 0.7	–6.6 ± 0.5
Stealth LNCs	54.9 ± 0.9	–24.8 ± 1.3
FcOHTAM-LNCs	51.3 ± 0.4	+22.7 ± 0.4
Stealth FcOHTAM-LNCs	53.9 ± 0.6	–13.0 ± 1.9

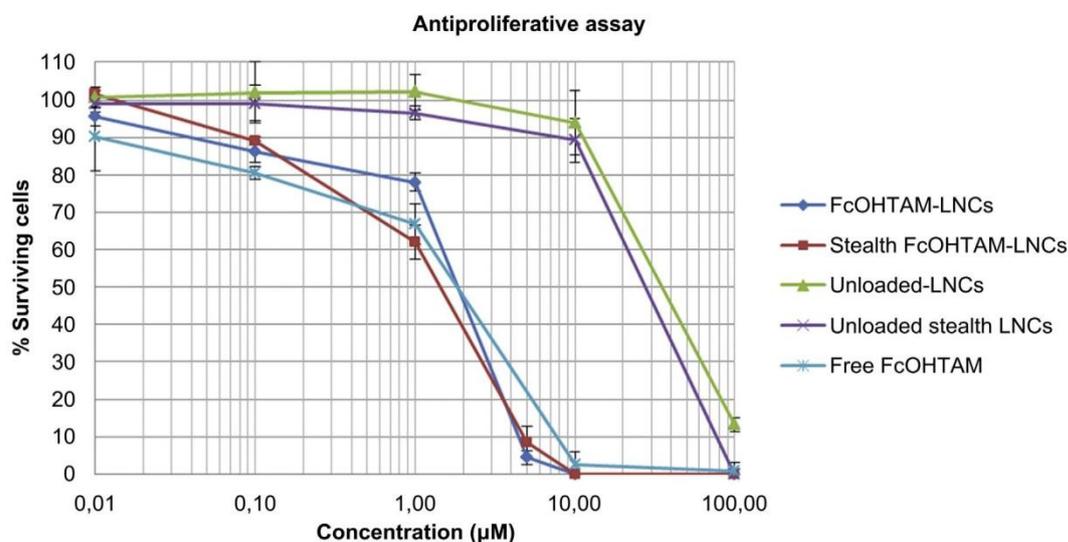


Fig. 2. MDA-MB-231 cell survival curve after 72 h exposure to various treatments (Free FcOHTAM, FcOHTAM-LNCs, stealth FcOHTAM-LNCs, Unloaded LNCs and Unloaded stealth LNCs) at increasing drug concentration ranging from 0.01 μM –100 μM . The results are expressed as the mean \pm SD.

the CH50 method, which measures the complement system activation due to the LNCs [25]. This method consists in determining the residual haemolytic capacity of a fixed amount of normal human serum towards 50% of antibody-sensitized sheep erythrocytes in the presence of an increasing nanoparticle surface area. As presented in Fig. 4, all types of tested LNCs, namely unloaded LNCs, stealth unloaded LNCs, FcOHTAM-LNCs and stealth FcOHTAM-LNCs, demonstrated weak complement activation compared to the positive control, polymethyl methacrylate (PMMA) nanoparticles, which were considered as strong complement activators [23].

3.5. *In vivo* antitumor activity of FcOHTAM-LNCs on mice bearing TNBC xenografted tumors

The antitumor activity of FcOHTAM was assessed *in vivo* on a TNBC model subcutaneously xenografted into SCID mice. In order to monitor the tumor growth, MDA-MB-231 cells expressing luciferase gene were injected. Intraperitoneal (i.p) route was chosen for drug dosing considering that, for repeated injections, i.p. is more convenient and less invasive than intravenous injection while similar plasma distribution is obtained with both routes. The tumor evolution for each group was plotted in Fig. 5.

Tumor volumes increased dramatically for both untreated control group and unloaded LNC treated group with similar tumor evolutions. Interestingly, FcOHTAM-LNC treatment markedly delayed the tumor growth compared to the two previously mentioned groups. As a result, the hampered tumor growth rate led to an impressive low tumor volume at day 38 with 36% tumor volume reduction compared to that of control groups ($P < 0.01$) (Fig. 5A) as evidenced by the pictures of tumor luminescence (Fig. 5B).

4. Discussion

Triple negative breast cancer, defined by the absence of estrogen receptor alpha, progesterone receptor and HER2 expression, is characterized by a high rate of relapse and widespread metastases reflected in a poorer prognosis and a higher mortality number than other BC subtypes. As the current therapies with conventional cytotoxics fail to hamper its aggressive evolution, TNBC treatment remains a great clinical challenge.

Since the discovery of cisplatin, one of the most potent anti-cancer drugs, albeit ineffective to cure breast cancer, the interest in metal-based drugs has been growing in an attempt to overcome the therapeutic limitations encountered with available organic compounds [26]. In this context, a ferrocenyl-based tamoxifen has been synthesized to confer additional properties to the tamoxifen drug alone including accessible redox state. Whereas tamoxifen shows an antiproliferative effect on hormone-dependent cell lines only, the ferrocene moiety extended its anticancer activity to ER α (–) cell lines and TNBC cell lines. Considering this hopeful result, this paper aimed to evaluate the antitumor activity of this metal-based drug in a TNBC xenograft model. The poor water solubility of this lipophilic drug required the use of a dosage form for its *in vivo* injection. Lipid nanocapsules were suitable candidates as they already achieved great outcomes in terms of loading capacity of FcdiOH, another ferrocenyl based drug, and successful transport toward the site of interest [20].

Regarding FcOHTAM, its encapsulation into LNCs turned out to be readily feasible at suitable concentration (8 mg/mL). FcOHTAM-LNCs displayed a high positive zeta potential probably due to the positively charged amino moiety of FcOHTAM, suggesting that the compound was entrapped within the shell of the LNCs and exposed at the interface water/oil. This drug anchorage at the surface might prevent its escape into an undesired site on its way toward the tumor. However, positively charged nanoparticles have shown to exhibit high systemic toxicity [27,28]. To render the nanocapsules safe for animal injection, a PEGylation was performed providing a negatively charged hairy surface. This DSPE-mPEG insertion effect on zeta potential is consistent with previous reports and could be explained through the following two considerations. Firstly, the slipping plane is moved further away from the nanocapsule surface due to the 45 ethylene oxide units composing the phospholipid PEG [29]. In addition, the reduction of the charge can also be due to the negatively charged phosphate groups of DSPE-mPEG [30].

Beside a surface charge modification, the grafting of PEGylated phospholipids is also used to provide nanoparticles with stealth properties [29,31]. Upon intraperitoneal injection and after absorption into the systemic circulation, the LNCs are subjected to elimination phenomena due to the immune system. To avoid a rapid clearance and increase the drug accumulation into the tumor,

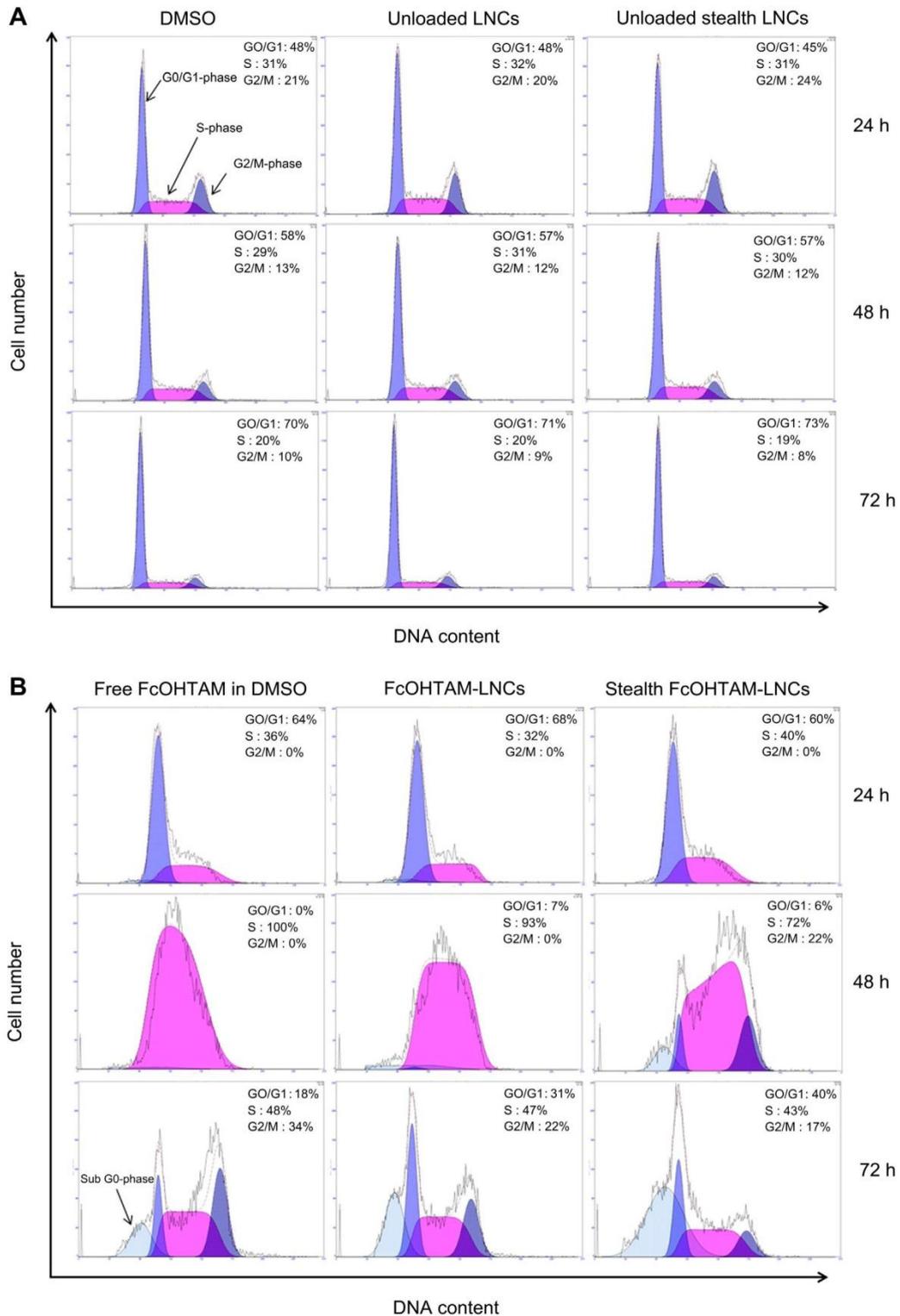


Fig. 3. Typical flow cytometric analysis profile. Breast cancer cells were treated with A) DMSO, LNCs, stealth-LNCs, B) Free FcOHTAM in DMSO, FcOHTAM-LNCs or stealth FcOHTAM-LNCs for 24, 48 h or 72 h, then analyzed by flow cytometry. An example of G0/G1, S and G2/M phase was annotated in A (DMSO at 24 h) and an example of sub-G0 peak was visualized in B (free OH-TAM at 72 h). The results are representative of two independent experiments.

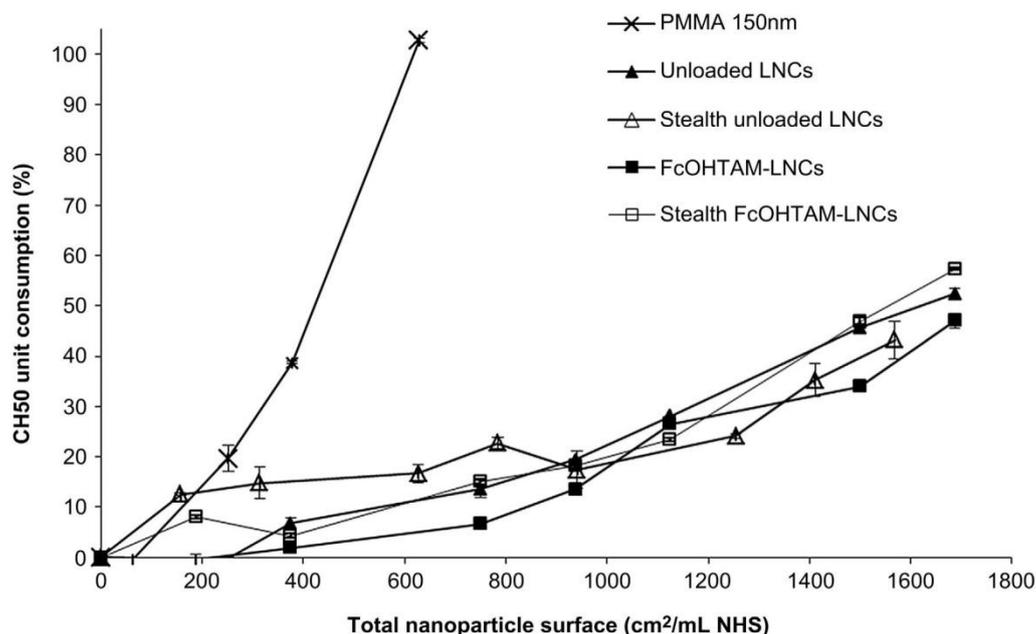


Fig. 4. Complement activation of unloaded LNCs, stealth unloaded LNCs FcOHTAM-LNCs and stealth-FcOHTAM-LNCs expressed by % consumption of CH50 unit at 37 °C in function of the nanoparticle surface area. The results are represented as mean \pm SEM.

galenists made use of PEGylation techniques, referred to as the coating of nanoparticles surface with polyethylene glycol resulting in the formation of a hydrodynamic layer. The DSPE-mPEG2000 post-insertion method already proved to be efficient, permitting a significant extension of LNCs circulation time in plasma [22,32]. Here, FcOHTAM-LNCs post-inserted with DSPE-mPEG showed low *in vitro* complement activation predicting stealth properties upon *in vivo* injection.

In order to make sure that the FcOHTAM activity was not hampered by the lipid nanocapsules, *in vitro* antiproliferative assay and cell cycle distribution were run. Equivalent activity profiles were obtained for free FcOHTAM and stealth FcOHTAM-LNCs on a TNBC cell line with low IC₅₀ values of 2 μ M and, as previously described, an S phase cell cycle arrest after a two day treatment at this IC₅₀ values, [15]. This indicated that LNC did not significantly modify the FcOHTAM biological effects on cells. It is worth noting that the IC₅₀ of free OH-TAM for the same cells (MDA-MB-231) is above 30 μ M [33]. By comparison to the literature, FcOHTAM-LNCs showed 10–20-fold lower IC₅₀ value compared to other drugs under investigation on this cell line such as curcumin (\sim 20 μ M) [34] and noscapine (\sim 36 μ M) [35] but remains higher than those of the first-line drugs used for the management of hormone independent breast cancer including doxorubicin (0.04 μ M) or paclitaxel (5 nM) [36]. However, the cell cycle analysis of FcOHTAM-LNCs and previous studies proving the absence of DNA alteration with FcOHTAM treatment [37] seemed to reveal an original cell death pathway mediated by senescence. Although low doses of doxorubicin were shown to induce senescence [38,39], its major effect is related to the apoptosis cell death. Thus, FcOHTAM effects occurred by an alternative cell death pathway different from the DNA intercalating activity of doxorubicin [40,41] and from the microtubule-stabilizing effect ascribed to paclitaxel [42]. This might bring a new strategy to overcome the resistance developed in clinics by the cells treated with either drug.

To further assess the antitumor effects of FcOHTAM-LNCs, *in vivo* study was performed on mice bearing luciferase-transfected MDA-MB-231 cancer cells, a TNBC model resistant to OH-TAM. The use of

this kind of cancer model allows a rapid and non-invasive monitoring of the tumor via the bioluminescent imaging technique.

Whereas control groups including untreated animals and unloaded LNC treatment showed an impressive fast tumor growth, treatment with stealth FcOHTAM-LNCs led to a marked delay of the tumor growth. Two main areas can be distinguished according to the curve slopes, one between D19 and D34 and the second one from D34. In the first area, the FcOHTAM-LNCs curve slope does not parallel the control slope, evidencing the cytostatic effect of the treatment on cell proliferation. Consequently, at D34 the tumor volume of stealth FcOHTAM-LNCs treated group was half that of the control group. On the contrary, the equivalent slopes between the treated and control groups in the second part of the graph demonstrate the cell metabolism recovery for the FcOHTAM-LNC-treated tumors. This recovery led to a reduced gap estimated at 36% between the tumor volumes of treated and control groups. This result suggests that, in order to curtail the tumor regrowth, additional injections may be necessary.

This result represents the first evidence of an *in vivo* effect of a ferrocenyl derivative on xenografted breast cancer tumors and to the best of our knowledge, it is also the first novel chemical molecule proving activity on MDA-MB-231 cell lines. As previously shown, the anticancer biological mechanism of FcOHTAM involves ROS production, oxidation of iron (+2) in iron (+3), and generation of quinone methide [43] which is ultimately associated with S-phase cell cycle arrest and senescence. The current therapies used in clinics to treat TNBC include anthracyclines and taxane. Although certain TNBC cases positively respond to these molecules, the overall survival remained poor and is referred to as "TNBC paradox" [3]. Consequently, with its original mechanism of action, FcOHTAM might represent a promising treatment option for TNB cancers.

The next step for the evaluation of this drug would be to assess its efficiency in a metastatic breast cancer model. Metastatic breast cancer is the most advanced stage and the main cause of mortality for breast cancer patients [44]. While current researches are focusing on the elucidation of metastasis process [45–47], to date,

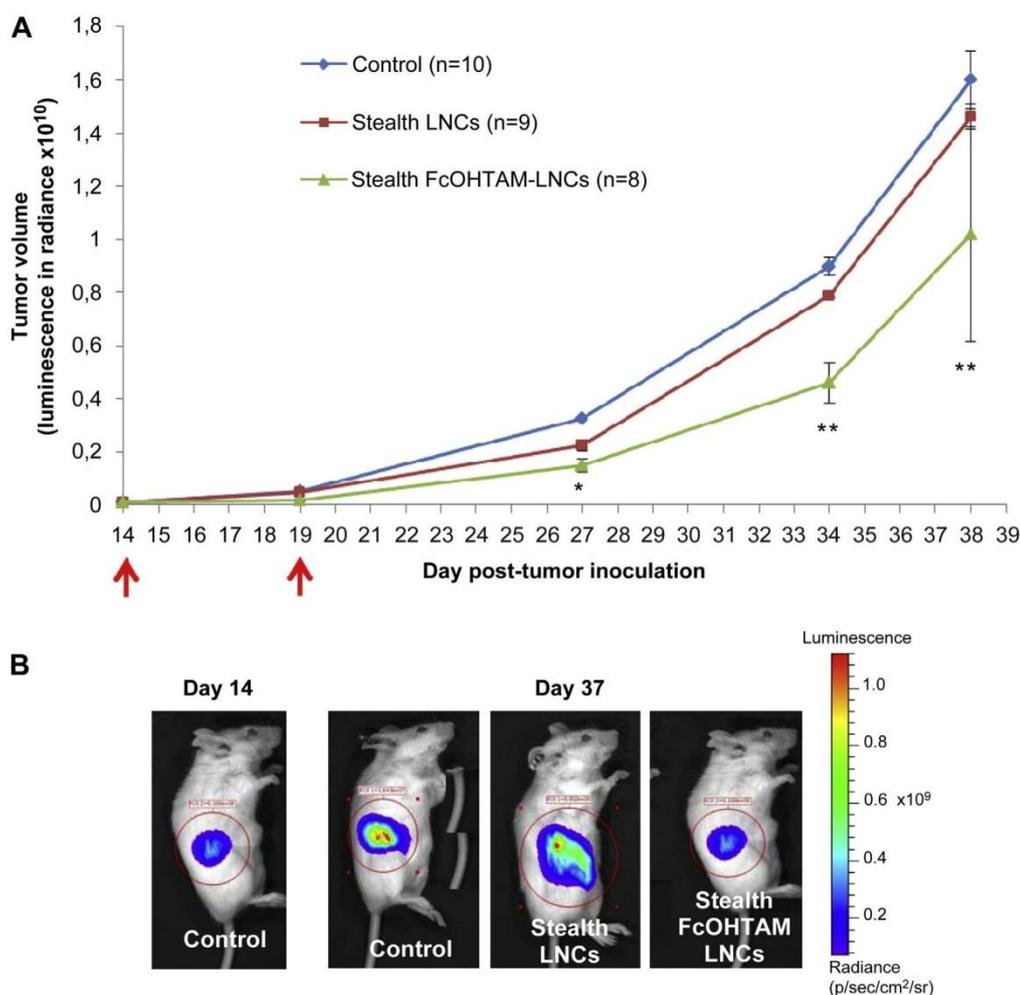


Fig. 5. A/ Tumor volume evolution of xenografted MDA-MB-231. SCID mice were injected with MDA-MB-231 breast cancer cells expressing luciferase gene (D0). At day 14 and day 19, mice were injected with indicated treatments. To monitoring tumoral volume, mice were subjected to *in vivo* imaging at day 0, 14, 19, 27, 34 and 38. Luminescence was measured in radiance (pixels/second/cm²/square). The number of animals used for each group is indicated on the figure. Mann–Withney test was performed between control group and treated groups. The red arrows correspond to the treatment days. The values are expressed as mean \pm SEM * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with the untreated control. B/ Photographic demonstration of comparative tumor size after treatment. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

there is no curable solution and treatments merely aim to relieve symptoms and extending a woman's life expectancy. Generally, systemic chemotherapy is used in metastatic cancer treatment ensuring the drug distribution through the whole body in order to reach most of the tumor sites. Stealth LNCs are specially designed to escape the immune system, thus prolonging the circulation time in body fluids and would be really adapted to the evaluation of FcOHTAM in a metastatic breast cancer model.

Finally, the dual antagonist/agonist action displayed by TAM may increase the probability of developing endometrial cancer among other side effects. Thanks to LNC, it would be possible to attach targeting agents onto their surface in order to carry the drug selectively to the designated tumor site without harming healthy cells.

5. Conclusion

This work has evidenced the potent anticancer activity of the ferrocenyl tamoxifen on a xenografted breast cancer. Even if

additional studies are needed to further evidence this observed anticancer activity, FcOHTAM-LNCs could represent an alternative and efficient strategy to fight this so far incurable cancer.

Acknowledgment

The authors would like to thank Nolwenn Lautram (Inserm U1066) for her technical assistance in complement activation assay. This work was supported by the ANRBlanc program Mecafferrol.

References

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011;61:69–90.
- [2] Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest* 2011;121:2750–67.
- [3] De Laurentis M, Cianniello D, Caputo R, Stanzione B, Arpino G, Cinieri S, et al. Treatment of triple negative breast cancer (TNBC): current options and future perspectives. *Cancer Treat Rev* 2010;36(Suppl. 3):S80–6.

- [4] Clemons M, Danson S, Howell A. Tamoxifen ("Nolvadex"): a review: anti-tumour treatment. *Cancer Treat Rev* 2002;28:165–80.
- [5] Oakman C, Viale G, Di Leo A. Management of triple negative breast cancer. *Breast* 2010;19:312–21.
- [6] Lainé A-L, Passirani C. Novel metal-based anticancer drugs: a new challenge in drug delivery. *Curr Opin Pharmacol* 2012;12:420–6.
- [7] Nguyen A, Vessières A, Hillard EA, Top S, Pigeon P, Jaouen G. Ferrocifens and ferrocifenols as new potential weapons against breast cancer. *Chimia* 2007;61:716–24.
- [8] Jordan VC. Tamoxifen (ICI46,474) as a targeted therapy to treat and prevent breast cancer. *Br J Pharmacol* 2006;147(Suppl. 1):S269–76.
- [9] Ameller T, Legrand P, Marsaud V, Renoir J- M. Drug delivery systems for estrogenic hormones and antagonists: the need for selective targeting in estradiol-dependent cancers. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004;92:1–18.
- [10] Riggins RB, Schrecengost RS, Guerrero MS, Bouton AH. Pathways to tamoxifen resistance. *Cancer Lett* 2007;256:1–24.
- [11] Ring A, Dowsett M. Mechanisms of tamoxifen resistance. *Endocr Relat Cancer* 2004;11:643–58.
- [12] Tergas AI, Buell-Gutbrod R, Gwin K, Kocherginsky M, Temkin SM, Fefferman A, et al. Clinico-pathologic comparison of type II endometrial cancers based on tamoxifen exposure. *Gynecol Oncol* 2012;127:316–20.
- [13] Metindir J, Aslan S, Bilir G. Ovarian cyst formation in patients using tamoxifen for breast cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2005;35:607–11.
- [14] Hanstein B, Djahansouzi S, Dall P, Beckmann MW, Bender HG. Insights into the molecular biology of the estrogen receptor define novel therapeutic targets for breast cancer. *Eur J Endocrinol* 2004;150:243–55.
- [15] Vessières A, Corbet C, Heldt JM, Lories N, Jouy N, Laiós I, et al. A ferrocenyl derivative of hydroxytamoxifen elicits an estrogen receptor-independent mechanism of action in breast cancer cell lines. *J Inorg Biochem* 2010;104:503–11.
- [16] Mandlekar S, Kong AN. Mechanisms of tamoxifen-induced apoptosis. *Apoptosis* 2001;6:469–77.
- [17] Huynh NT, Passirani C, Saulnier P, Benoit JP. Lipid nanocapsules: a new platform for nanomedicine. *Int J Pharm* 2009;379:201–9.
- [18] Lainé A-L, Huynh NT, Clavreul A, Balzeau J, Béjaud J, Vessières A, et al. Brain tumour targeting strategies via coated ferrociphenol lipid nanocapsules. *Eur J Pharm Biopharm* 2012;81:690–3.
- [19] Allard E, Huynh NT, Vessières A, Pigeon P, Jaouen G, Benoit J-P, et al. Dose effect activity of ferrocifen-loaded lipid nanocapsules on a 9L-glioma model. *Int J Pharm* 2009;379:317–23.
- [20] Huynh NT, Morille M, Béjaud J, Legras P, Vessières A, Jaouen G, et al. Treatment of 9L gliosarcoma in rats by ferrociphenol-loaded lipid nanocapsules based on a passive targeting strategy via the EPR effect. *Pharm Res* 2011;28:3189–98.
- [21] Top S, Vessières A, Leclercq G, Quivy J, Tang J, Vaissermann J, et al. Synthesis, biochemical properties and molecular modelling studies of organometallic specific estrogen receptor modulators (SERMs), the ferrocifens and hydroxyferrocifens: evidence for an antiproliferative effect of hydroxyferrocifens on both hormone-dependent and hormone-independent breast cancer cell lines. *Chemistry* 2003;9:5223–36.
- [22] Morille M, Montier T, Legras P, Carmoy N, Brodin P, Pitard B, et al. Long-circulating DNA lipid nanocapsules as new vector for passive tumor targeting. *Biomaterials* 2010;31:321–9.
- [23] Vonarbourg A, Passirani C, Saulnier P, Simard P, Leroux JC, Benoit JP. Evaluation of pegylated lipid nanocapsules versus complement system activation and macrophage uptake. *J Biomed Mater Res A* 2006;78:620–8.
- [24] Passirani C, Barratt G, Devissaguet JP, Labarre D. Interactions of nanoparticles bearing heparin or dextran covalently bound to poly(methyl methacrylate) with the complement system. *Life Sci* 1998;62:775–85.
- [25] Vonarbourg A, Passirani C, Saulnier P, Benoit J-P. Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems. *Biomaterials* 2006;27:4356–73.
- [26] Gasser G, Ott I, Metzler-Nolte N. Organometallic anticancer compounds. *J Med Chem* 2011;54:3–25.
- [27] Kedmi R, Ben-Arie N, Peer D. The systemic toxicity of positively charged lipid nanoparticles and the role of Toll-like receptor 4 in immune activation. *Biomaterials* 2010;31:6867–75.
- [28] Naahidi S, Jafari M, Edalat F, Raymond K, Khademhosseini A, Chen P. Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery. *J Control Release* 2013;166:182–94.
- [29] Kim J-Y, Kim J-K, Park J-S, Byun Y, Kim C-K. The use of PEGylated liposomes to prolong circulation lifetimes of tissue plasminogen activator. *Biomaterials* 2009;30:5751–6.
- [30] Hinrichs WJ, Manceñido FA, Sanders NN, Braeckmans K, De Smedt SC, Demeester J, et al. The choice of a suitable oligosaccharide to prevent aggregation of PEGylated nanoparticles during freeze thawing and freeze drying. *Int J Pharm* 2006;311:237–44.
- [31] Jokerst JV, Lobovkina T, Zare RN, Gambhir SS. Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. *Nanomedicine (Lond)* 2011;6:715–28.
- [32] Hoarau D, Delmas P, David S, Roux E, Leroux J-C. Novel long-circulating lipid nanocapsules. *Pharm Res* 2004;21:1783–9.
- [33] Zhang F, Fan PW, Liu X, Shen L, van Breeman RB, Bolton JL. Synthesis and reactivity of a potential carcinogenic metabolite of tamoxifen: 3,4-dihydroxytamoxifen-o-quinone. *Chem Res Toxicol* 2000;13:53–62.
- [34] Sun S-H, Huang H-C, Huang C, Lin J-K. Cycle arrest and apoptosis in MDA-MB-231/Her2 cells induced by curcumin. *Eur J Pharmacol* 2012;690:22–30.
- [35] Chougule MB, Patel AR, Jackson T, Singh M. Antitumor activity of noscapine in combination with doxorubicin in triple negative breast cancer. *PLoS One* 2011;6:e17733.
- [36] Kirson ED, Schneiderman RS, Dbalý V, Tovarys F, Vymazal J, Itzhaki A, et al. Chemotherapeutic treatment efficacy and sensitivity are increased by adjunct alternating electric fields (TFields). *BMC Med Phys* 2009;9:1.
- [37] Osella D, Mahboobi H, Colangelo D, Caviglioglio G, Vessières A, Jaouen G. FACS analysis of oxidative stress induced on tumour cells by SERMs. *Inorganica Chim Acta* 2005;358:1993–8.
- [38] Roninson IB. Tumor cell senescence in cancer treatment. *Cancer Res* 2003;63:2705–15.
- [39] Eom Y-W, Kim MA, Park SS, Goo MJ, Kwon HJ, Sohn S, et al. Two distinct modes of cell death induced by doxorubicin: apoptosis and cell death through mitotic catastrophe accompanied by senescence-like phenotype. *Oncogene* 2005;24:4765–77.
- [40] Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J Pharm Pharmacol* 2013;65:157–70.
- [41] Bar-On O, Shapira M, Hershko DD. Differential effects of doxorubicin treatment on cell cycle arrest and Skp2 expression in breast cancer cells. *Anti-cancer Drugs* 2007;18:1113–21.
- [42] Flores ML, Castilla C, Ávila R, Ruiz-Borrego M, Sáez C, Japón MA. Paclitaxel sensitivity of breast cancer cells requires efficient mitotic arrest and disruption of Bcl-xL/Bak interaction. *Breast Cancer Res Treat* 2011;133:917–28.
- [43] Hillard E, Vessières A, Thouin L, Jaouen G, Amatore C. Ferrocene-mediated proton-coupled electron transfer in a series of ferrocifen-type breast-cancer drug candidates. *Angew Chem Int Ed Engl* 2006;45:285–90.
- [44] Weigelt B, Peterse JL, van't Veer LJ. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer* 2005;5:591–602.
- [45] Liang Z, Yoon Y, Votaw J, Goodman MM, Williams L, Shim H. Silencing of CXCR4 blocks breast cancer metastasis. *Cancer Res* 2005;65:967–71.
- [46] Fantozzi A, Christofori G. Mouse models of breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res* 2006;8:212.
- [47] Dewan MZ, Terunuma H, Ahmed S, Ohba K, Takada M, Tanaka Y, et al. Natural killer cells in breast cancer cell growth and metastasis in SCID mice. *Biomed Pharmacother* 2005;59(Suppl. 2):S375–9.

Chapitre II

Chapitre II

Optimisation du procédé de formulation des LNC furtives (LNC OS) et évaluation de l'efficacité des LNC OS d'ansa-FcdiOH *in vivo*

La voie d'administration la plus courante pour la chimiothérapie reste la voie intraveineuse (iv) qui, par définition, permet d'obtenir une biodisponibilité maximale. Transporté dans la circulation systémique, le principe actif est distribué à travers l'ensemble des organes permettant d'atteindre la tumeur primaire ainsi que tous les sites métastatiques, cause première de mortalité par cancer. Les nanocapsules, issues de constituants tous autorisés pour une administration parentérale, ont montré à de nombreuses reprises être efficaces pour la vectorisation d'anticancéreux par injection intraveineuse. Compte tenu de leur taille se situant autour de 50 nm, les LNC ne peuvent pas traverser les vaisseaux sanguins irrigant les tissus sains, limitant ainsi leur distribution à des sites à perméabilité accrue tels que les tumeurs. Cette taille leur permet également d'échapper à la filtration rénale. D'autre part, les techniques permettant d'augmenter le temps de circulation plasmatique ont donné un nouvel essor aux nanomédecines. Parmi les différentes stratégies, la PEGylation, consistant à décorer la surface des nanoparticules par des chaînes de PEG (polyéthylène glycol), est la technique la plus communément utilisée et a déjà été bénéfique pour de nombreux agents thérapeutiques. Concernant les nanocapsules lipidiques, la PEGylation standard s'effectue par post-insertion impliquant une première étape de formulation des LNC puis une seconde étape d'incubation avec une solution micellaire de phospholipides PEGylés.

En vue d'un futur développement clinique, une nouvelle technique de PEGylation des LNC (LNC OS) a été développée ici permettant de s'affranchir de l'étape supplémentaire d'incubation pour faciliter la transposition industrielle. Par ailleurs, la perspective d'une application clinique ne peut être envisagée sans une connaissance et maîtrise du devenir du vecteur après administration afin de s'assurer de son profil « safe » et efficace. Dans le but de répondre à ces interrogations, les profils de biodistribution des LNC conventionnelles et des

LNC OS ont été évalués par imagerie FRET. Cette technique, basée sur le signal émis par transfert d'énergie entre 2 molécules fluorescentes, permet d'évaluer l'intégrité de la nanocapsule (publication n°3).

Dans la publication n°4, la performance de vectorisation tumorale de ces LNC OS a été étudiée à travers la vectorisation de l'ansa-FcdiOH. L'objectif de ce travail était d'évaluer l'activité de ce nouveau complexe sur un modèle de gliome intradermique. L'effet anti-prolifératif du complexe phénolique a été tout d'abord investigué *in vitro* puis approfondi par le suivi de la progression des tumeurs *in vivo* et de leur analyse histologique.

Publication n°3

**Conventional *vs* stealth lipid nanocapsules: formulation
and *in vivo* fate prediction through FRET monitoring**

Conventional vs stealth lipid nanocapsules: formulation and *in vivo* fate prediction through FRET monitoring

A-L Laine^{1,2}, M. Henry^{3,4}, J. Béjaud^{1,2}, E. Pancani^{1,2}, M. Wiber^{1,2}, J.P Benoit^{1,2}, J-L Coll^{3,4},
C. Passirani^{1,2}

¹ LUNAM Université – Micro et Nanomédecines biomimétiques, F-49933 Angers, France

² Inserm – U1066 IBS-CHU, F-49933 Angers, France

³ INSERM U823, Institut Albert Bonniot, 38 706 Grenoble, France

⁴ Université Joseph Fourier, Grenoble, France

Abstract :

The determination of the nanocarrier fate in preclinical models is required before any translation from laboratory to clinical trials. Modern fluorescent imaging techniques have gained considerable advances becoming a powerful technology for non-invasive visualization in living subject. Among them, Förster resonance energy transfer (FRET) is a particular fluorescence imaging which involves energy transfer between 2 fluorophores in a distance-dependent manner. Considering this feature, the encapsulation of an acceptor/donor pair in LNC allowed the carrier integrity to be tracked. Accordingly, we used this FRET technique to evaluate the behavior of conventional LNCs and newly designed stealth LNCs. We firstly assessed *in vitro* guest exchange dynamics and release kinetics and secondly *in vivo* biodistribution of both LNCs. Results showed enhanced stability of encapsulation in stealth LNCs in comparison to conventional LNCs. Additionally, the presence of the long PEG chains on the LNC surface altered the biodistribution pattern. Besides showing extended blood circulation time, stealth LNCs mostly accumulated in the skin at 24h whereas a residual FRET signal coming from conventional LNCs could be observed in bones. Both LNC type showed great structure stability over several hours.

Key words: Biodistribution, Fluorescence imaging, Nanomedicine, Encapsulation stability

Introduction

Lipid nanocapsules (LNCs) have been taking an active part in the nanomedicine landscape for the past decade. Their fairly simple preparation process is based on the well-known phase inversion temperature method of an emulsion. LNCs are structured as an oily core composed of medium chain triglycerides, and surrounded by a surfactant shell made of a polyethylene glycol based surfactant and phospholipids. A comprehensive study of the ternary diagram permitted to define a LNC feasibility area and settled precise ratio between excipients. Accordingly, LNC size is tunable depending on the composition allowing the achievement of stable and monodispersed nanoparticles ranging from 20 to 100 nm [1]. Lipid nanocapsules have represented a great tool to develop injectable dosage forms for lipophilic drugs and have already shown promising vectorisation ability for various anticancer drugs including paclitaxel [2], docetaxel [3], rhenium complexes [4], metal-based drugs [5] and polyphenols [6]. Firstly developed as hydrophobic drug delivery system, they can also entrap hydrophilic agent such as doxorubicin [7], etoposide [8] and nucleic acids as DNA [9] and siRNA [10].

Today, LNCs have reached an advanced level in term of preparation as well as characterization and showed promising performance as drug delivery system. With an organic solvent free and low energy consumer process and composed of only FDA-approved excipients, LNCs meet all the requirements to make it a clinically relevant nanocarrier. However, the translation to the clinic can only be considered if the nano-object fate *in vivo* is perfectly mastered including biodistribution, interactions with biological barriers, elimination and toxicity profile.

Whereas *in vivo* distribution of inorganic nanoparticle such as gold nanoparticles, iron oxide nanoparticles and carbon nanotubes can be easily monitored thank to their imaging properties, tracking organic nanocarriers face some difficulties. Common methods used to assess the biodistribution of nanocarrier involve a radionuclide, fluorescent or magnetic agent while the labeled element can be either a particle component or an entrapped probe. However, the pharmacokinetic (PK) profile obtained through those methods is highly and solely dependent on the distribution and elimination profile of the tracked element. Consequently, depending on the tracers used, it can conduct to discrepancy depending on the metabolization pathway of the probe. This phenomenon was observed with LNCs. Various techniques has been used over the years to evaluate their biodistribution. Ballot *et al.* used radiolabelled complex composed of Technetium-99m or Rhenium-188 encapsulated into LNCs to monitor the biodistrution and

pharmacokinetics parameters of the carrier [11]. Similar PK profiles were obtained for both radionuclides with a half-life of around 20 min. Few years later, Lacoeyille *et al.* performed biodistribution studies through the radiolabelling of either the oily core with ^{14}C -trimyristin or the shell with ^{14}C -phosphatidylcholine resulting in a $t_{1/2}$ of 2.4 h and 2.9 h respectively [2]. More recently, PK study was carried out through fluorescence analysis by the encapsulation of DiI probe into LNCs [12]. The $t_{1/2}$ achieved by these DiI-LNCs was 2 h. The different PK parameters obtained with these various tracers highlight a tracer-dependent tracking not representative of the LNC distribution pattern. In light of these considerations, none of these techniques was able to appropriately track the entire LNC structure.

Modern fluorescent imaging has gained considerable advances becoming a powerful technology for non-invasive visualization in living subject. Fluorescent tool is commonly used in rodents but also in clinics for image-guided surgery. Förster resonance energy transfer (FRET) is a particular fluorescence imaging which involves energy transfer between 2 fluorophores, from an excited donor to an acceptor molecule. Since the energy transfer is highly dependent on the distance between the donor and acceptor pairs which can only occur in the 1-10 nm range, this technique is widely used for biological phenomenon investigation such as protein conformational change, protein interaction and enzyme activity [13]. This distance-dependent FRET signal makes it a suitable technique to monitor nanoparticle integrity through the encapsulation of FRET pairs. This technique has been recently used to monitor the stability of polymeric nanoparticles in serum [14] as well as the interaction with cell membrane [15]. *In vivo* imaging can be more challenging due to strong tissue auto-fluorescence and weak photon penetration in living tissue. In order to overcome these issues, near infrared (NIR) fluorescent probe should be used as recently performed for *in vivo* imaging of polymeric nanoparticles [16].

For cancer therapy, nanocarriers are often endowed with stealth properties in order to promote the EPR effect and ultimately increase the drug accumulation in the cancer site. Consequently, such stealth LNCs might be more relevant for clinical transfer. Whereas conventional stealth LNCs are obtained through a post-insertion (PI) technique, we designed in this work an alternative PEGylation approach based on a one-step (OS) process permitting to simplify the whole formulation phase. In order to gain better insight into the stability of encapsulation in conventional LNCs and stealth LNCs, guest exchange dynamics and release kinetics were followed by FRET fluorescence. We assessed thereafter the *in vivo* biodistribution of both types of FRET LNCs.

1 Materials and Methods

1.1 Chemical materials

The lipophilic Labrafac® WL1349 (caprylic-capric acid triglycerides) was purchased from Gattefosse S.A. (Saint-Priest, France). Lipoïd® S75-3 (soybean lecithin at 69% of phosphatidylcholine) provided by Lipoïd GmbH (Ludwigshafen, Germany); Solutol® HS15 (a mixture of free polyethylene glycol 660 and polyethylene glycol 660 hydroxystearate) by BASF (Ludwigshafen, Germany) and NaCl by Prolabo (Fontenay-sous-bois, France). Deionised water was acquired from a Milli-Q plus system (Millipore, Paris, France) and sterile water from Cooper (Melun, France). 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy-(polyethyleneglycol)-2000] (DSPE-mPEG2000) (Mean Molecular Weight (MW)=2805 g/mol) was purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA). Octadecylamine was acquired from Sigma. DiD (1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine perchlorate) and FP730-NHS were obtained from Invitrogen (Cergy, Pontoise, France) and from Interchim (Montluçon, France), respectively.

1.2 Animals

In vivo experiments were carried out on female NMRI nude mice (6–8 weeks old, Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France) Animal care was performed in strict accordance with French Ministry of Agriculture regulations.

1.3 Synthesis of FP730-C18

4 mg of FP730-NHS were dissolved in 3 mL of MeOH (Fisher) and added with 2.85 mg octadecylamine (2 eq). The reaction mixture was stirred in dark at room temperature overnight, and the reaction advancement was monitored by thin layer chromatography. The final product FP730-C18 was purified on a silica gel column chromatography. A mixture of CH₂Cl₂/MeOH was used as mobile phase through a gradient elution from 100% CH₂Cl₂ (Fisher) to 80/20 CH₂Cl₂/MeOH.

1.4 LNC formulation

Conventional LNC formulation

LNCs were prepared according to a phase inversion temperature method as previously described [2]. Briefly, the preparation process consisted in mixing all the excipients (Solutol®

HS15 (16.9 % w/w), Lipoid® (1.5 % w/w), Labrafac® (20.6 % w/w), NaCl (1.8 % w/w) and water (59.2 % w/w)) under magnetic stirring. Three to four cycles of progressive heating and cooling between 90 and 60 °C were then carried out. At the last cooling step, the LNC suspension was diluted with water (71.4 % w/w).

Design of a “one-step” (OS) stealth LNC process

In order to evaluate the feasibility of generating stealth nanocapsules via the phase inversion method, PEG-based phospholipids (DSPE-mPEG) were added to the LNC mixture in various concentrations ranging from 0.1 % to 8.1 % ($W_{\text{DSPE-mPEG}}/W_{[\text{Solutol}^{\text{®}} + \text{Lipoid}^{\text{®}} + \text{Labrafac}^{\text{®}} + \text{DSPE-mPEG}]}$).

FRET LNCs

A hydrophobic FRET pair, DiD (donor) and FP730-C18 (acceptor) was used for this purpose. FRET LNCs were obtained by labeling the LNCs with the DiD probe at 1.2 mmol/ L_{Labrafac} . Fluorescent stealth LNC were achieved by adding DiD and DSPE-mPEG 2000 (1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy-(polyethyleneglycol)-2000], 4.8% w/w) in the LNC mixture. The amount of dilution water added at the last cooling step was reduced to 28.6% v/v in order to be able to perform the FP730-C18 encapsulation thereafter. Then, FP730-C18 (3 mmol/ L_{Labrafac}) was incorporated to DiD-LNCs and stealth DiD-LNCs by overnight stirring at room temperature and protected from light. The resulting FRET LNCs were purified through a dialysis against water for 8 hr using a Spectra/Por® dialysis bag with MWCO of 15,000 D. The resulting suspension was diluted in water (42.8 % v/v) and passed through a 0.2 µM filter.

1.5 LNC characterisation

The average hydrodynamic diameter and the zeta potential of nanocapsules were determined at 25 °C, in triplicate, using a Malvern Zetasizer® (Nano Serie DTS 1060, Malvern Instruments S.A., Worcestershire, UK). For the measurement, the LNCs were diluted in MilliQ water (50µL LNC in 2.95mL water). All comparison experiments were carried out with similar conductivity values.

1.6 Physico-chemical stability studies

The stability of conventional LNCs and OS LNCs (DSPE-mPEG = 4.8% w/w) were assessed at 4 °C (storage condition) and 37 °C (physiological temperature). Each formulation was done

in triplicate and split into two parts; one was stored at 4 °C and the second one at 37 °C. The stability study was carried out over 28 days *via* zeta potential and size measurements

1.7 LNC stability in plasma

The physical stability in plasma of the various LNC types was also assessed. For this purpose, 170 µL of LNCs were diluted into 2.83 mL of plasma (equivalent to *in vivo* dilution) and put into a moving water bath with a temperature control set at 37°C. Samples (10 µL) were withdrawn at 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 24 h up to 5 days, diluted in water (990µL) and the whole suspension was passed through a 0.22 µM filter in order to remove large proteins that could hamper the size measurement.

1.8 Studies of FRET stability and exchange dynamics

For the FRET stability studies, conventional FRET LNCs or OS FRET LNCs were diluted at 1/200 in FBS (Lonza) and kept at 37°C in a moving plate for 24hrs. Emission spectra were recorded at 1h, 3h, 5h and 24h using a Perkin-Elmer LS50B fluorimeter. The excitation wavelength was set at 620nm.

For the guest exchange dynamic studies, DiD and FP730-C18 were independently encapsulated into conventional LNCs or OS LNCs. DiD-LNCs and FP730-C18 LNCs were then mixed together (one mixture per LNC type) at a dilution of 1/200 in PBS (Lonza) and kept at 37°C in a moving plate for 24hrs. Emission spectra were recorded at 1h, 3h, 5h and 24h.

1.9 *In vivo* biodistribution study

Mice were injected in the tail vein with 200 µL of FRET LNCs or stealth FRET LNCs (6 animals per group). Fluorescence images were acquired at 1 h, 3 h, 5 h and 24 h using the IVIS kinetic (Caliper Life Science, Hopkinton, USA). Three mice per group were sacrificed at 3 h and 24 h in order to image the organs and analyze the plasma. Image display and analysis were performed using the Living image software (Perkin-Elmer, Waltham, USA).

2 Results and discussion

2.1 Design of a one-step (OS) stealth LNC process

The first step of the study consisted in evaluating the feasibility of a direct stealth LNC formulation based on the phase inversion method. For this purpose, increasing concentrations of DSPE-mPEG ranging from 0.1% to 8.1% (w/w) were added to the LNC mixture.

The physical characteristics of the obtained LNCs are summarized in Fig. 1. The formation of OS LNCs was successful up to a concentration of 6 % w/w and the increased addition of DSPE-mPEG led to a gradual increase in LNC diameter from 51.9 ± 0.8 nm to 61.8 ± 1.5 nm. This resulting larger size is consistent with previous reports on other PEGylated nanocarriers such as liposomes (+5 nm, +10 nm) [17,18] and solid lipid nanoparticles (+10 nm) [19]. It was also the case with the post-insertion technique [20]. The size modification may have resulted from two factors. Firstly, the addition of PEGylated phospholipids into the shell composition may have altered its structure and thus the radius of curvature. Secondly, this DSPE-mPEG is composed of 45 PEG units which is much longer than the 15 units of the PEG hydroxystearate making the standard LNC formulation. These extended chains may have played a part in the increase in hydrodynamic diameter.

The DSPE-mPEG presence into the shell was further evidenced by a greater negative surface charge detected *via* the zeta measurement. This is typical of PEG coating onto nanoparticle surfaces as previously described for other nanocarriers such as polymeric micelles [21], and liposomes [22]. This negative charge might be due to dipole interactions between PEG chain and water molecules as reported by Vonarbourg *et al.* [23] and to the negatively charged phosphate groups of the DSPE-mPEG 2000, concordant with the results reported in the literature [24].

Despite the limited amount of DSPE-mPEG that can be grafted compared to that of the post-insertion technique [25], this one-step process provide a convenient and efficient method to obtain stealth LNCs. For the following studies, the DSPE-mPEG concentration was set at 4.8% (w/w).

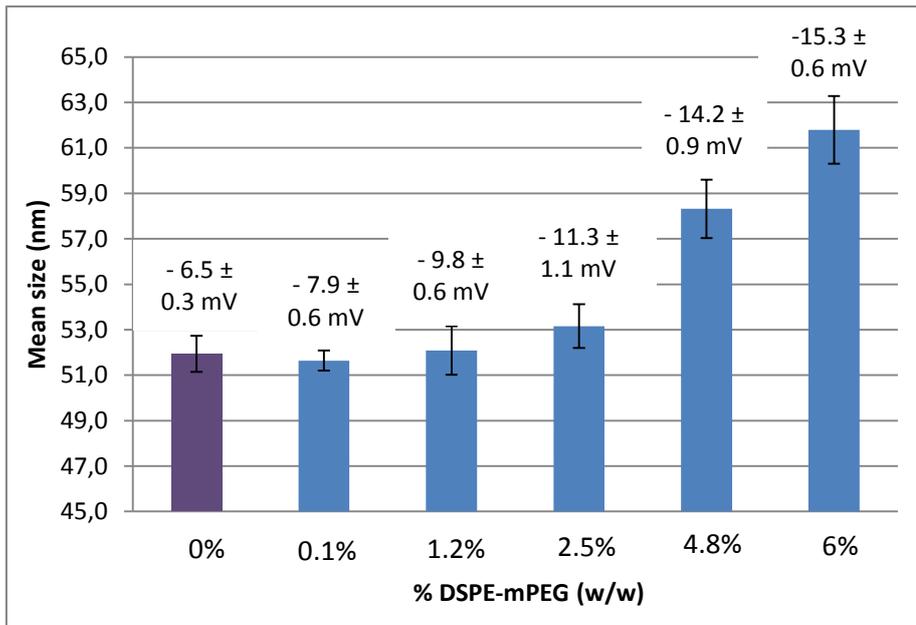


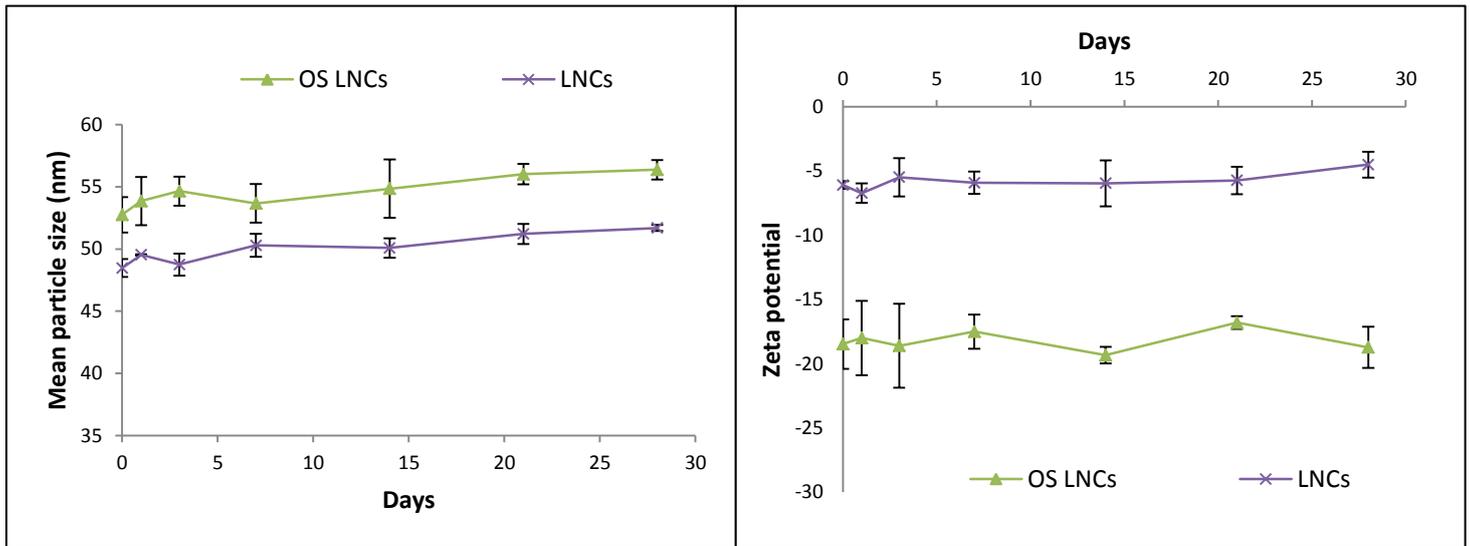
Figure 1: Size and zeta potential of resulting one-step PEGylated-LNCs with increasing concentrations of DSPE-mPEG

2.2 Physico-chemical stability studies

In a previous study, a formulation of one-step stealth LNCs was attempted through the addition of PEG 1500 based surfactant. However, the resulting LNCs showed increasing size over time [26].

Therefore, stability studies at 4°C (storage condition) and 37°C (physiological condition) were carried out over 28 days for OS LNCs in comparison to native LNCs. Size and zeta potential were monitored at different time points and the results were plotted in Fig. 2. Conventional LNCs and OS LNCs proved to be stable whatever the temperature condition. Interestingly, the DSPE-PEG grafting through the OS process did not alter the physico-chemical stability of the blank nanocapsules.

T = 4 °C



T = 37 °C

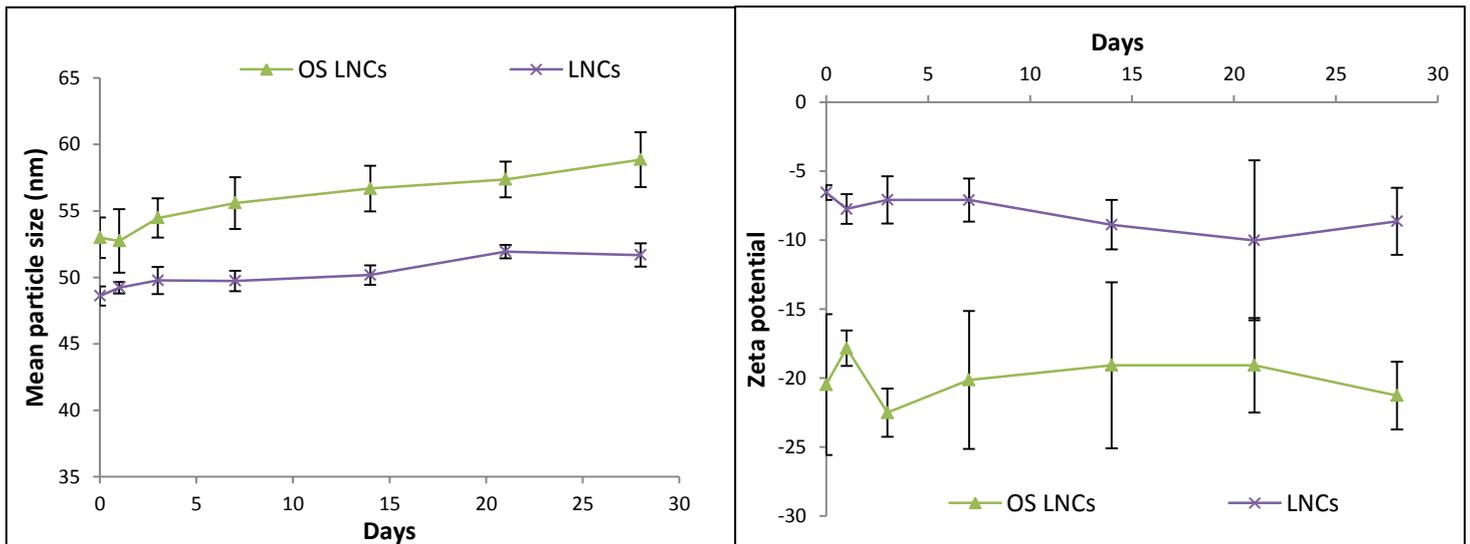


Figure 2: Physico-chemical stabilities of conventional and OS LNCs at 4 °C and 37 °C over 28 days

2.3 Plasma stability

The drug carrier fate upon intravenous injection is mostly governed by plasma protein interactions. These interactions depend on the physicochemical properties of the carrier [27] and their nature affect the cell internalization process and the overall distribution throughout the body. In respect to this, the most investigated phenomenon is the opsonisation effect referred to as the deposition of opsonins onto the carrier surface triggering carrier phagocytosis. This effect results in enhanced clearance of nanosystems. In order to reduce the

recognition by the mononuclear phagocyte system, nanocarrier PEGylation is often applied preventing the protein adsorption and leading to extended circulation time. Besides altering trafficking of carriers, protein interactions can influence their stability which might induce early release of their payload. For a representative example of this consideration, the transfer of phospholipid from liposome to high-density lipoprotein led to leakage of their contents [28].

The assessment of protein – nanoparticle interactions can be performed through nanoparticle incubation with plasma. This requires isolating the nanoparticle-protein complex from the excess proteins without disrupting or disturbing the complex, which is commonly achieved through a centrifugation step. However, centrifugation of LNC is challenging and still need further optimizations. Consequently, we envisaged to preliminary assess the potential interaction between LNC and proteins, through the monitoring of the LNC size during incubation with plasma. The rationale of this study is based on the consideration that if proteins interact with LNC through exchange or insertion in their structure, LNC diameter would be affected. Accordingly, both conventional and stealth LNCs were incubated with plasma to mimic *vivo* conditions and sizes were monitored at different time points (Fig. 3). Remarkably, both LNCs showed stable size over 24hours. After five incubation days, conventional LNCs displayed a larger hydrodynamic diameter whereas stealth LNCs preserved their size emphasizing the role of long PEG chains in the LNC structure stability.

Although, the LNC structure did not seem to be affected by plasma proteins, their content might leak from the LNC core toward a more favorable protein medium. This leakage phenomenon from LNC has been recently pointed out by Bastiat et al [29]. In an *in vitro* study, the authors investigated the impact of the fluorochrome nature on its stability within the LNC after mixing the probe loaded LNC suspension with oil. It was shown that lipophilic indocarbocyanines (i.e. DiO, DiI and DiD) anchored into the LNC shell did not leak from the LNC whereas a transfer occurred from the cargo to the oil for other probes such as Nile red and 6-coumarin encapsulated in the oily. This result highlights the possibility of content unloading without any LNC disassembly. This statement is a matter of concern since it might impair the drug delivery performance of a carrier. Consequently, the drug loaded LNC stability should be assessed in biologically relevant media. Again, the separation between the released component and the encapsulated one remains challenging. FRET monitoring can cope with this issue by permitting to follow the release kinetics without the need of any separation step.

Indeed, as FRET signal can occur only through a precise distance between the two probes, any leak of one of them reduces the emitted signal.

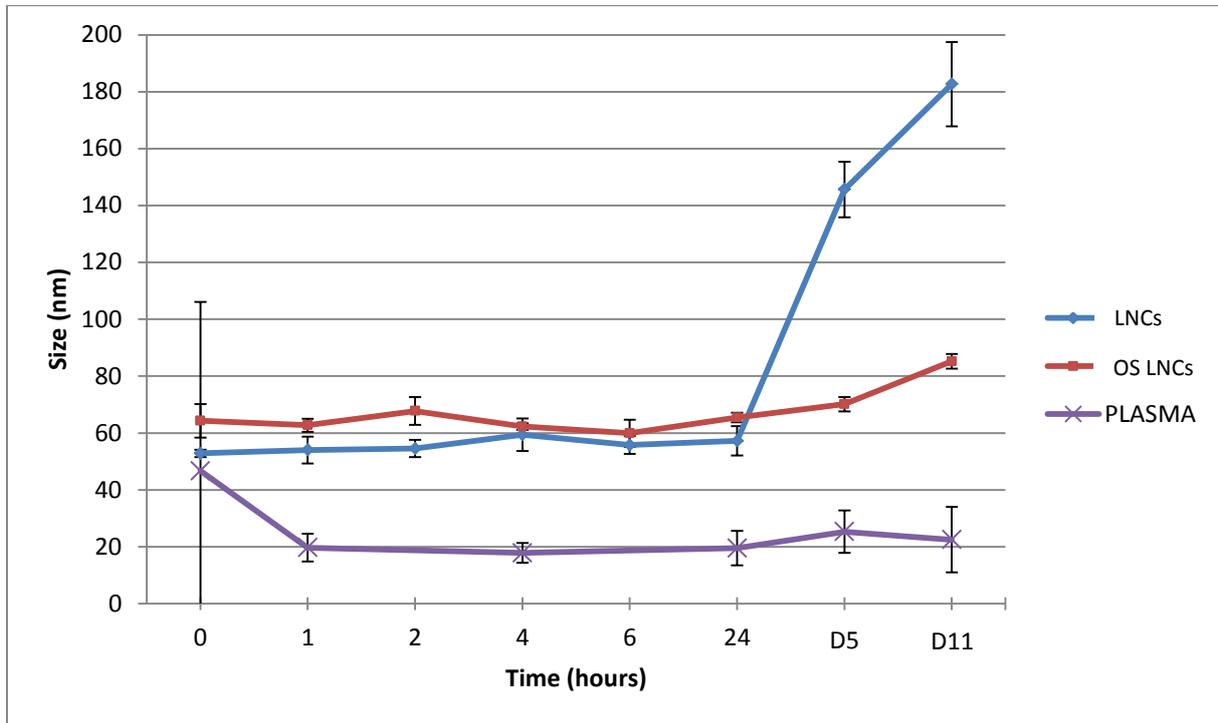


Figure 3 : LNC size stability in plasma

Consequently, to gain greater insight into LNC stability, FRET LNCs were incubated with plasma (Fig 4). The fluorescence emission spectra for the conventional LNC revealed a progressive reduction of the FRET signal intensity whereas the DiD donor signal increased over incubation time. As far as the stealth FRET LNCs are concerned, the FRET emission spectra appeared more stable. Accordingly, OS LNCs showed higher content stability in plasma over conventional LNC. This might be owed to the steric barrier imposed by the PEGylated phospholipid which maintains a distance between proteins and LNCs subsequently preventing transfer to the biological medium, whereas intimate interaction can happen with conventional LNCs favoring content leakage. Additionally, these stealth LNCs exhibited higher stability of encapsulation than polymeric micelles made of monomethoxy poly(ethylene glycol)-block-poly(D,L-lactide) [30]. These micelles had been shown to experience a fast release within 15 min after intravenous injection and further *in vitro* studies proved that α - and β -globulins were responsible for this effect.

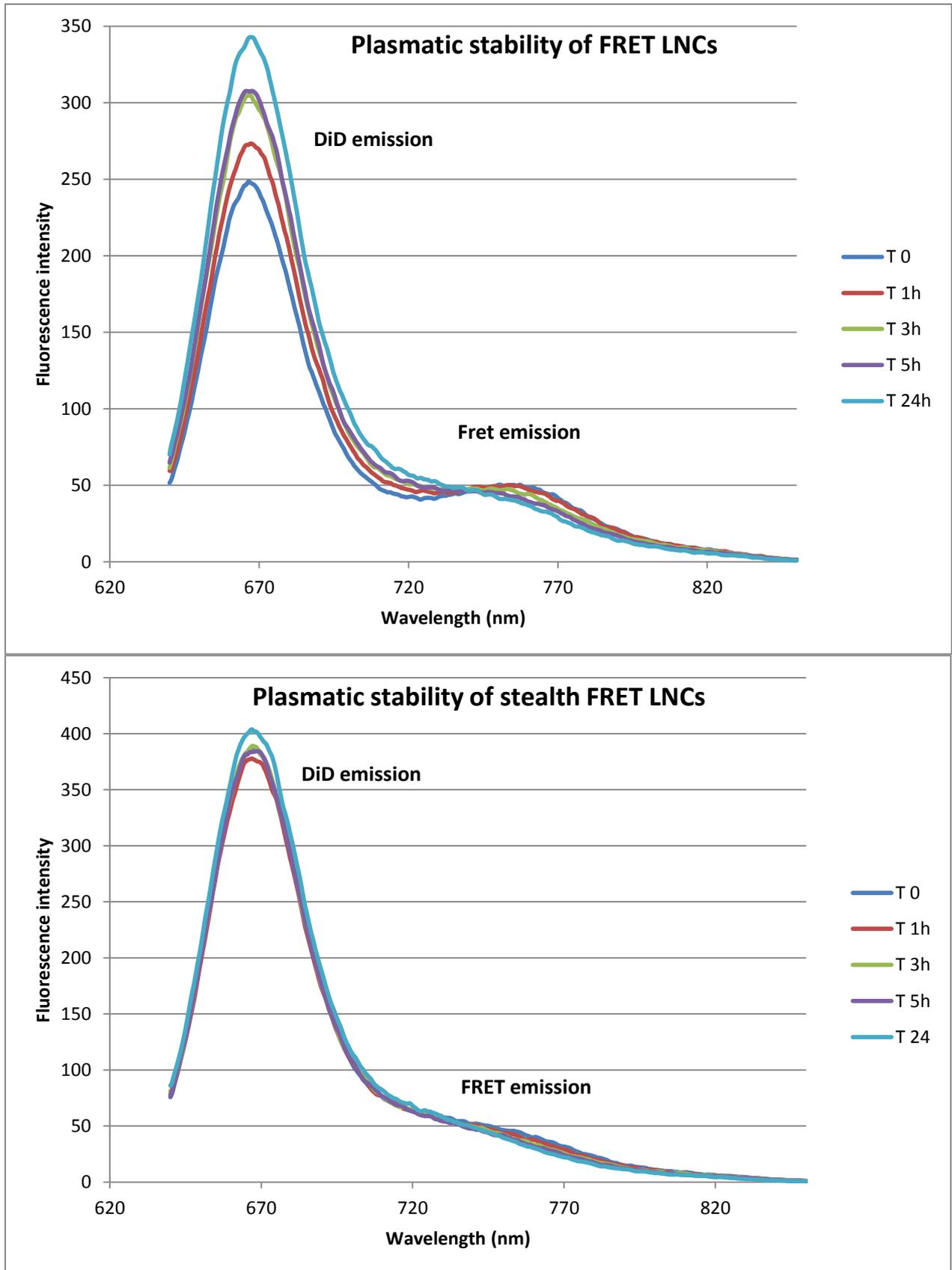


Fig 4 Plasmatic stability of encapsulation in conventional LNCs and stealth LNCs

2.4 Exchange dynamics

To further evaluate the stability of encapsulation in LNCs, we assessed the guest exchange dynamics in an aqueous medium based on a method developed by Jiwpanich *et al* [31]. This method consists in encapsulating the donor and acceptor independently, then mixing DiI-LNCs and FP730-C18- LNCs and evaluating the occurrence of FRET signal implying transfer between the two carriers (Fig. 5). It is worth noting that the formulation of FRET LNCs is based on the capacity of preformulated DiD LNCs to incorporate the hydrophobic FP730-C18 probe upon overnight stirring. This highlights the ability of LNCs to act as acceptor compartment.

At T0, no FRET could be observed since the distance between the two dye molecules was too high. Then, a slight exchange of guest molecules between DiD-LNCs and FP730-C18-LNCs occurred as indicated by the slight increase of the FRET signal. According to the fluorescence spectra evolution registered over 24hrs, conventional LNCs showed a higher propensity to be leaky over stealth LNCs. This result is consistent with the former one regarding the stability of the FRET encapsulation in LNCs compared to FRET in stealth LNCs, and confirm the enhancement of stability through insertion of PEGylated phospholipids.

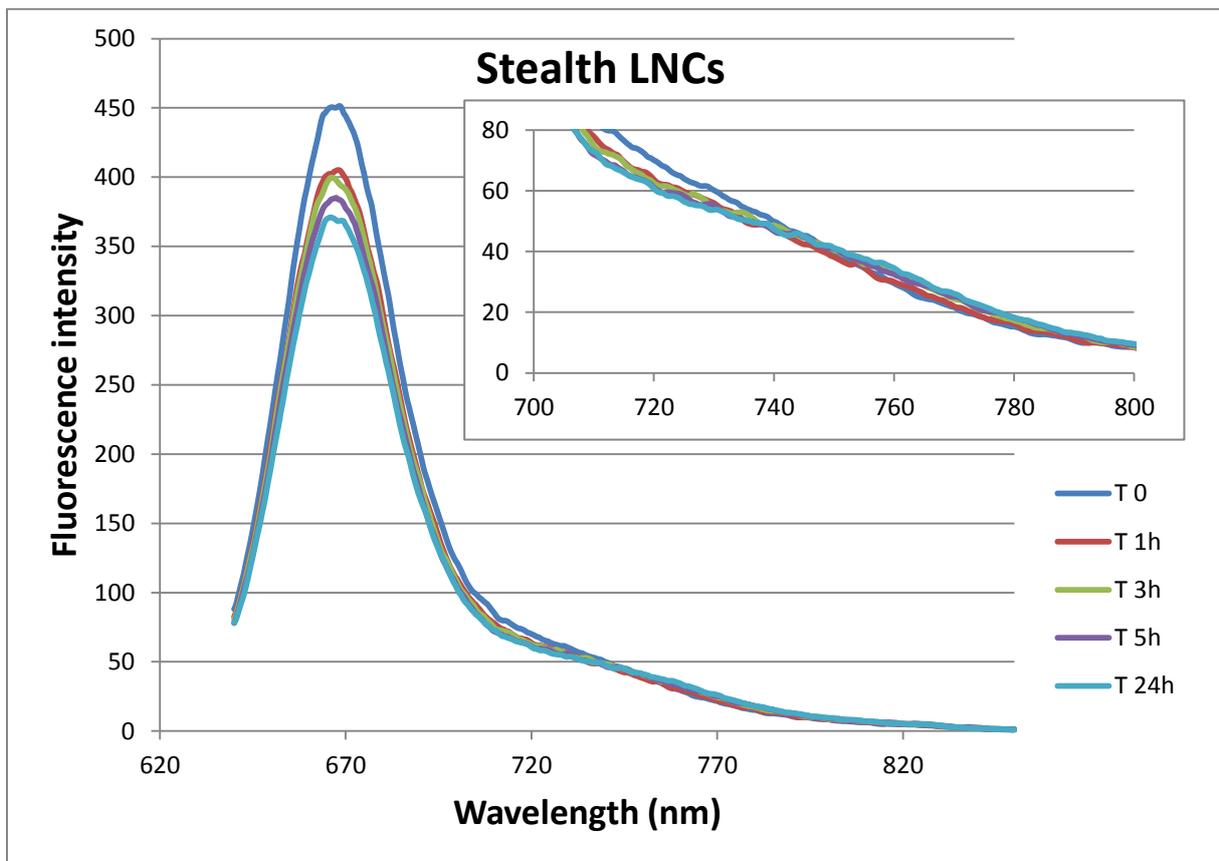
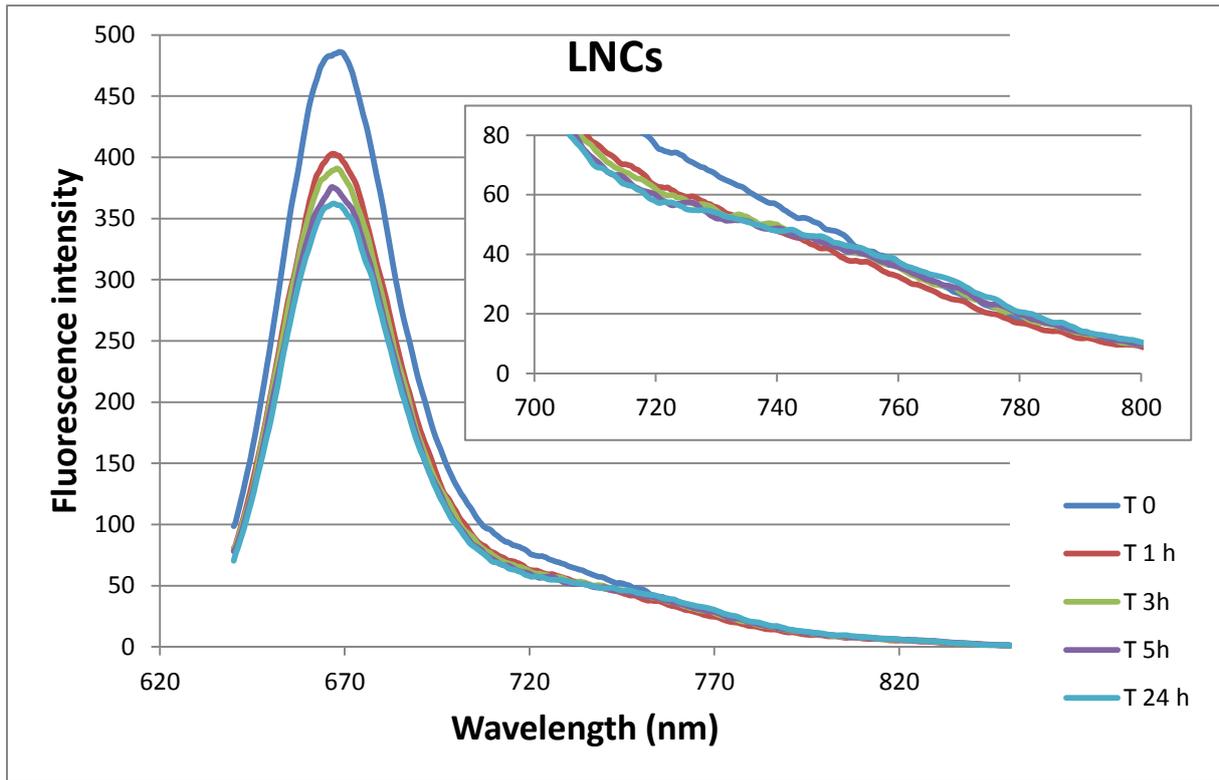


Fig 5 Guest exchange dynamic studies of conventional LNC and stealth LNCs

2.5 FRET biodistribution

The determination of nanoparticle distribution and accumulation in animal models is required before any application in humans. In this regard, various techniques had been applied in order to monitor the LNC fate and some discrepancies could be observed depending on the tracer used. A first attempt to monitor the LNC integrity was carried out through the co-labelling of the LNC shell with ^{125}I and LNC core with $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -oxine [32]. However, both radionuclides showed distinct distributions which did not permit to evaluate the LNC integrity. In this work, we have intended to track the LNC integrity through a FRET technique. Accordingly, an acceptor/donor pair (DiD and FP730-C18) was entrapped into the LNCs and the resulting FRET signal was monitored and considered as the LNC signal. The biodistribution of FRET-LNCs were studied upon intravenous injection and compared to that of stealth FRET-LNCs. *In vivo* fluorescence images were acquired at 1h, 3h, 5h and 24h post injection and *ex vivo* organs were excised at 3h and 24h (Fig. 6).

Regarding the conventional LNCs, one hour post-injection, a homogeneous FRET signal can be observed with a rather large distribution throughout the body highlighting the stability of the FRET LNC structure. At 3 h, the FRET signal was less diffuse and the preferential sites for LNC accumulation were liver, sternum, pelvic bones and backbone, suggesting a major uptake by Kupffer cells in liver and macrophages in bone marrow. The retention in the liver was not surprising since it is the major nanoparticle elimination organ whereas the uptake in bones was more intriguing at first glance but has already been observed for silica nanoparticles [33]. *Ex vivo* organ images confirmed an intense FRET emission in the liver and a weaker signal in the spleen, another key organ responsible for nanoparticle clearance. Furthermore, DiD signal appeared in intestine, skin (purple signal in the living animal) and lung whereas FP730-C18 arose from the kidney and the liver. In addition, the white plasma color was attributed to the superposition of the FRET signal and both free probe signals. The presence of this FRET in blood provided evidenced of the integrity of the particles 3h post injection. However, the two distinct probe signals highlighted a partial release of the dyes either due to leakage from the LNCs or owed to the LNC disassembly.

Based on the fluorescence localization, the two probed showed distinct elimination pathway with a major biliary excretion for DiD and renal filtration associates with biliary excretion for FP730-C18. In consequence to this independent clearance pattern, the FRET signal

undoubtedly did originate from the LNC rather than attributed to the forming of a plasmatic dye complex.

At 24 h, FRET from LNCs was mainly emitted from the intestine, indicative of a biliary excretion pathway. A signal could also be perceived from the heart and from the adrenal gland. In addition, DiD was mainly found in blood circulation whereas FP730-C18 remained in the kidney and the liver.

In respect to the stealth LNCs, the presence of the long PEG chain on the carrier surface markedly altered its biodistribution. Whereas an extensive FRET signal could be noticed at 1h with conventional LNC, such green emission could not be observed on the living animals except for a small green area coming from the liver. The green fluorescence from the plasma at 3h confirmed the integrity of the stealth FRET LNCs circulating through the blood network without peripheral distribution. This depth localization explained the apparent absence of FRET emission from the living animals. On the other hand, it showed the extended circulation time of stealth LNC over conventional FRET. Besides blood, FRET appeared in the spleen, the liver and the lung. As for conventional LNC, a distinct signal from DID alone was observed with an accumulation in lung, intestine and skin. The latest is responsible for the general blue color of the living animal hampering deeper visualization. In contrast, FP730-C18 could hardly be noticed which might underlie a more stable FRET particle over conventional LNCs. At 24 h, stealth LNCs were substantially located in skin and partly in intestine, likely due to biliary excretion. Conversely, FRET was no longer found in liver nor in rate. As previously observed, DiD remained in the blood circulation whereas FP730-C18 was mostly, if not only, stuck in the liver.

This strong stealth LNC accumulation in the skin is the major biodistribution difference in comparison to conventional ones. This cutaneous phenomenon has already been observed for PEGylated liposome [34] and lipid nanoemulsion composed of long PEG chains [26]. It is worth noting that neither non-PEGylated liposome [34] nor conventional LNCs achieved such a distribution. Moreover, the skin accumulation is not size-dependent since it had been observed whatever the size of the stealth liposomes from 80nm to 240nm, with a slightly lesser extent for 240nm liposomes. Consequently, long circulation property is the only requirement for the phenomenon to occur which is indicative of a time-consuming phenomenon.

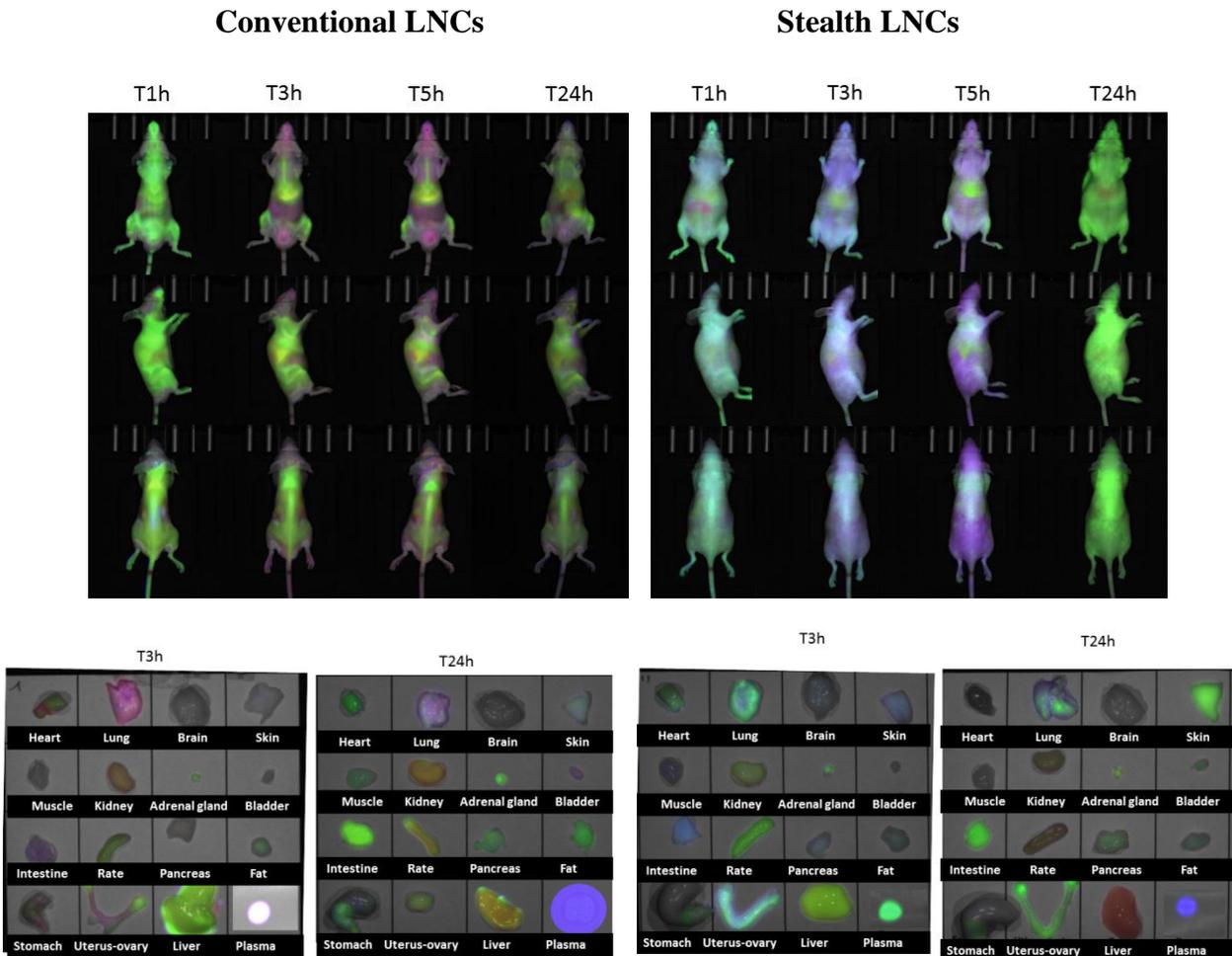


Fig 6: *In vivo* and *ex vivo* biodistributions of FRET-LNCs (A) and stealth FRET LNCs (B). *In vivo* images were acquired at 1 h, 3 h, 5 h, 24 h post i.v. injection and *ex vivo* organ at 3 h and 24 h.

Conclusion

FRET imaging is a non-invasive and convenient technique allowing the integrity of the LNCs to be monitored. Although it is not a quantitative method, a suitable global picture of the LNC biodistribution could be acquired permitting to compare conventional LNCs to stealth ones. The stability of encapsulation in LNCs appeared to be enhanced through the insertion of PEGylated phospholipids. Regarding the biodistribution, the most striking difference lies in the skin accumulation of stealth LNCs which was not observed for classical LNCs. The extended blood circulation lifetime via DSPE-mPEG grafting could also be confirmed, revealing the correct incorporation of the surfactant via the one-step method.

Further studies have been planned in order to assess the biodistribution of these stealth and conventional LNCs in a subcutaneous glioma model. It would be interesting to determine the influence of the tumor on the distribution pattern and to evaluate the delivery performance of stealth LNCs which is expected to be improved in comparison to the conventional LNCs due to the EPR effect.

Acknowledgments

The authors would like to thank Isabelle Texier (CEA Leti) for her technical support. This work was supported by the ANR Blanc Program Mecaferron.

References

- [1] Huynh NT, Passirani C, Saulnier P, Benoit JP. Lipid nanocapsules: a new platform for nanomedicine. *Int J Pharm* 2009;379:201–9.
- [2] Lacoeyille F, Hindre F, Moal F, Roux J, Passirani C, Couturier O, et al. In vivo evaluation of lipid nanocapsules as a promising colloidal carrier for paclitaxel. *International Journal of Pharmaceutics* 2007;344:143–9.
- [3] Khalid MN, Simard P, Hoarau D, Dragomir A, Leroux J-C. Long circulating poly(ethylene glycol)-decorated lipid nanocapsules deliver docetaxel to solid tumors. *Pharm Res* 2006;23:752–8.
- [4] Vanpouille-Box C, Lacoeyille F, Belloche C, Lepareur N, Lemaire L, LeJeune J-J, et al. Tumor eradication in rat glioma and bypass of immunosuppressive barriers using internal radiation with ¹⁸⁸Re-lipid nanocapsules. *Biomaterials* 2011;32:6781–90.
- [5] Laine A-L, Huynh NT, Clavreul A, Balzeau J, Béjaud J, Vessieres A, et al. Brain tumour targeting strategies via coated ferrociphenol lipid nanocapsules. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2012;81:690–3.
- [6] Barras A, Mezzetti A, Richard A, Lazzaroni S, Roux S, Melnyk P, et al. Formulation and characterization of polyphenol-loaded lipid nanocapsules. *Int J Pharm* 2009;379:270–7.
- [7] Vrignaud S, Anton N, Gayet P, Benoit J-P, Saulnier P. Reverse micelle-loaded lipid nanocarriers: A novel drug delivery system for the sustained release of doxorubicin hydrochloride. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2011;79:197–204.
- [8] Saliou B, Thomas O, Lautram N, Clavreul A, Hureaux J, Urban T, et al. Development and in vitro evaluation of a novel lipid nanocapsule formulation of etoposide. *Eur J Pharm Sci* 2013.
- [9] Morille M, Montier T, Legras P, Carmoy N, Brodin P, Pitard B, et al. Long-circulating DNA lipid nanocapsules as new vector for passive tumor targeting. *Biomaterials* 2010;31:321–9.
- [10] David S, Resnier P, Guillot A, Pitard B, Benoit J-P, Passirani C. siRNA LNCs – A novel platform of lipid nanocapsules for systemic siRNA administration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2012;81:448–52.
- [11] Ballot S, Noiret N, Hindré F, Denizot B, Garin E, Rajerison H, et al. ^{99m}Tc/¹⁸⁸Re-labelled lipid nanocapsules as promising radiotracers for imaging and therapy: formulation and biodistribution. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2006;33:602–7.
- [12] Huynh NT, Morille M, Bejaud J, Legras P, Vessieres A, Jaouen G, et al. Treatment of 9L gliosarcoma in rats by ferrociphenol-loaded lipid nanocapsules based on a passive targeting strategy via the EPR effect. *Pharm Res* 2011;28:3189–98.
- [13] Jares-Erijman EA, Jovin TM. FRET imaging. *Nat Biotechnol* 2003;21:1387–95.
- [14] Lu J, Owen SC, Shoichet MS. Stability of Self-Assembled Polymeric Micelles in Serum. *Macromolecules* 2011;44:6002–8.
- [15] Chen H, Kim S, Li L, Wang S, Park K, Cheng J-X. Release of hydrophobic molecules from polymer micelles into cell membranes revealed by Förster resonance energy transfer imaging. *PNAS* 2008;105:6596–601.
- [16] Wagh A, Qian SY, Law B. Development of Biocompatible Polymeric Nanoparticles for in Vivo NIR and FRET Imaging. *Bioconjugate Chem* 2012;23:981–92.
- [17] Hong R-L, Huang C-J, Tseng Y-L, Pang VF, Chen S-T, Liu J-J, et al. Direct Comparison of Liposomal Doxorubicin with or without Polyethylene Glycol Coating in C-26 Tumor-bearing Mice Is Surface Coating with Polyethylene Glycol Beneficial? *Clin Cancer Res* 1999;5:3645–52.

- [18] Abreu AS, Castanheira EM, Queiroz M-JR, Ferreira PM, Vale-Silva LA, Pinto E. Nanoliposomes for encapsulation and delivery of the potential antitumoral methyl 6-methoxy-3-(4-methoxyphenyl)-1H-indole-2-carboxylate. *Nanoscale Research Letters* 2011;6:482.
- [19] Fundarò A, Cavalli R, Bargoni A, Vighetto D, Zara GP, Gasco MR. Non-stealth and stealth solid lipid nanoparticles (SLN) carrying doxorubicin: pharmacokinetics and tissue distribution after i.v. administration to rats. *Pharmacological Research* 2000;42:337–43.
- [20] Perrier T, Saulnier P, Fouchet F, Lautram N, Benoît J-P. Post-insertion into Lipid NanoCapsules (LNCs): From experimental aspects to mechanisms. *International Journal of Pharmaceutics* 2010;396:204–9.
- [21] WANG J, MONGAYT D, TORCHILIN VP. Polymeric Micelles for Delivery of Poorly Soluble Drugs: Preparation and Anticancer Activity In Vitro of Paclitaxel Incorporated into Mixed Micelles Based on Poly(ethylene Glycol)-Lipid Conjugate and Positively Charged Lipids. *J Drug Target* 2005;13:73–80.
- [22] Hinrichs WLJ, Manceñido FA, Sanders NN, Braeckmans K, De Smedt SC, Demeester J, et al. The choice of a suitable oligosaccharide to prevent aggregation of PEGylated nanoparticles during freeze thawing and freeze drying. *Int J Pharm* 2006;311:237–44.
- [23] Vonarbourg A, Saulnier P, Passirani C, Benoit J-P. Electrokinetic properties of noncharged lipid nanocapsules: influence of the dipolar distribution at the interface. *Electrophoresis* 2005;26:2066–75.
- [24] Yang T, Cui F-D, Choi M-K, Cho J-W, Chung S-J, Shim C-K, et al. Enhanced solubility and stability of PEGylated liposomal paclitaxel: in vitro and in vivo evaluation. *Int J Pharm* 2007;338:317–26.
- [25] Hoarau D, Delmas P, David S, Roux E, Leroux J-C. Novel long-circulating lipid nanocapsules. *Pharm Res* 2004;21:1783–9.
- [26] Hirsjärvi S, Dufort S, Gravier J, Texier I, Yan Q, Bibette J, et al. Influence of size, surface coating and fine chemical composition on the in vitro reactivity and in vivo biodistribution of lipid nanocapsules versus lipid nanoemulsions in cancer models. *Nanomedicine* 2013;9:375–87.
- [27] Aggarwal P, Hall JB, McLeland CB, Dobrovolskaia MA, McNeil SE. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Adv Drug Deliv Rev* 2009;61:428–37.
- [28] Allen TM. A study of phospholipid interactions between high-density lipoproteins and small unilamellar vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1981;640:385–97.
- [29] Bastiat G, Pritz CO, Roeder C, Fouchet F, Lignières E, Jesacher A, et al. A new tool to ensure the fluorescent dye labeling stability of nanocarriers: A real challenge for fluorescence imaging. *J Control Release* 2013;170:334–42.
- [30] Chen H, Kim S, He W, Wang H, Low PS, Park K, et al. Fast release of lipophilic agents from circulating PEG-PDLLA micelles revealed by in vivo forster resonance energy transfer imaging. *Langmuir* 2008;24:5213–7.
- [31] Jiwanich S, Ryu J-H, Bickerton S, Thayumanavan S. Non-covalent Encapsulation Stabilities in Supramolecular Nanoassemblies. *J Am Chem Soc* 2010;132:10683–5.
- [32] Cahouet A, Denizot B, Hindré F, Passirani C, Heurtault B, Moreau M, et al. Biodistribution of dual radiolabeled lipidic nanocapsules in the rat using scintigraphy and γ counting. *International Journal of Pharmaceutics* 2002;242:367–71.
- [33] Chen H, Zhen Z, Tang W, Todd T, Chuang Y-J, Wang L, et al. Label-free luminescent mesoporous silica nanoparticles for imaging and drug delivery. *Theranostics* 2013;3:650–7.

- [34] Charrois GJR, Allen TM. Rate of biodistribution of STEALTH® liposomes to tumor and skin: influence of liposome diameter and implications for toxicity and therapeutic activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 2003;1609:102–8.

Publication n°4

Inhibition of ectopic glioma tumor growth by a potent ferrocenyl drug loaded into stealth lipid nanocapsules

Inhibition of ectopic glioma tumor growth by a potent ferrocenyl drug loaded into stealth lipid nanocapsules

A.L. Laine ^{a,b}, Dr. A. Clavreul ^{b,c}, Pr. A. Rousseau ^d, C Tétaud ^{b,c}, Dr. A Vessieres ^e, Dr. E. Garcion ^{a,b}, Pr. G. Jaouen ^e, L. Aubert ^f, M. Guilbert ^f, Pr. J.P Benoit ^{a,b}, Pr. R.A. Toillon ^f, Pr. C Passirani ^{a,b}, *

^a LUNAM Université – Micro et Nanomédecines biomimétiques, F-49933 Angers, France

^b Inserm – U1066 IBS-CHU, F-49933 Angers, France

^c Département de neurochirurgie- CHU, Angers, F-49100 France,

^d Département de pathologie cellulaire et tissulaire- CHU, Angers, F-49100 France ,

^e CNRS, UMR 7576, ENSCP, F-75231 France,

^f Inserm U908, Université Lille 1, Villeneuve d'Ascq, F-59655 France

Abstract

In this work, a novel ferrocenyl complex (ansa-FcdiOH) was assessed for brain tumor therapy through stealth lipid nanocapsules (LNCs). Stealth LNCs, prepared according to a one-step process, showed rapid uptake by cancer cells and extended blood circulation time. The ferrocenyl complex was successfully encapsulated into these LNCs measuring 40 nm with a high loading capacity (6.4 %). *In vitro* studies showed a potent anticancer effect of ansa-FcdiOH on 9L cells with a low IC50 value (0.1 μ M) associated with an oxidative stress and a dose-dependent alteration of the cell cycle. Repeated intravenous injections of stealth ansa-FcdiOH LNCs in ectopic glioma bearing rats induced a significant tumor growth inhibition, supported by a reduced number of proliferative cells in tumors compared to control group. Additionally, no liver damage manifestation was observed in treated animals. These results indicated that stealth ansa-FcdiOH LNCs might be considered as a potential new approach for cancer chemotherapy.

Keywords: ansa-FcdiOH, nanomedicine, cell cycle, EPR effect

Soumis à Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine

Background

Malignant brain tumor remains one of the main medical challenges for scientists as no life-saving treatment has been found to date despite aggressive therapy modalities (Stupp protocol) [1]. Consequently, alternative strategies are needed to tackle this dismal tumor.

Over the past few years, Pr. Jaouen and his team have struggled to develop potent bioorganometallic complexes for anticancer application. Their chemistry is based on the coupling between a ferrocen moiety and a tamoxifen-like skeleton, and the resulting complex belongs to the ferrociphen family [2,3]. Several molecules from their collection have already showed strong antiproliferative activities on experimental glioma and breast cancer models [4,5,6,7]. Recently, a new ferrocenyl complex, ansa-FcdiOH (Figure 1) has emerged, and turned out to be the most effective agent according to *in vitro* antiproliferative assays. Interestingly, ansa-FcdiOH was tested on 60 cancer cell lines of the National Cancer Institute (NCI) and showed to be strongly active on CNS (Central Nervous System) cancer cells. In addition, its cytotoxic behavior did not match with any of the 171 reference molecules from the NCI database (COMPARE analysis) [2]. So far, its mechanism of action is not fully understood although the role played by its redox properties has been already underlined [8]. Therefore, ansa-FcdiOH was selected in this work to further study its anticancer activity *in vitro* and *in vivo* on 9L brain tumors.

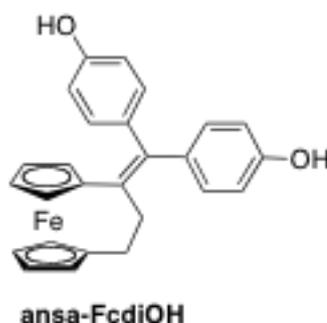


Fig 1: The ansa-FcdiOH molecule

Due to the hydrophobic characteristic of this molecule, the use of a dosage form was required for its *in vivo* evaluation. Currently, nanocarriers represent the most promising and most investigated delivery systems for cancer therapy. The discovery of the enhanced permeability and retention (EPR) phenomenon has prompted galenists to develop long circulating nanocarriers (also called stealth nanocarriers) to promote the EPR effect and ultimately to achieve an enhanced drug accumulation into tumors [9]. A widely used technique to obtain

such nanocarriers consists in coating nanoparticles with a polyethylene glycol (PEG) based molecule [10,11].

Our laboratory have developed and patented a nanodelivery system based on a phase inversion temperature method and called lipid nanocapsules (LNCs) [12]. Standard PEGylation of LNCs is achieved *via* the post-insertion (PI) technique [13] of DSPE-mPEG 2000 (1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy-(polyethyleneglycol)-2000]) involving a prior LNC formulation step and a subsequent incubation step as performed on liposomes. [14] The main drawback with this method concerns the additional 2 to 4 hour incubation step extending the complete formulation process time. An alternative PEGylation method was approached by Hoarau et al consisting in incorporating the DSPE-PEG in the initial LNC mixture [15], but had not been subjected to further evaluation so far. Because this latter technique provides a simple while efficient PEGylation process, we designed for this study “one-step” (OS) stealth drug-loaded LNCs. In an attempt to determine their pharmacological behavior, 9L cell uptake, blood circulation profile and accelerated blood clearance (ABC) were assessed through fluorescent stealth OS LNCs.

The anticancer activity of ansa-FcdiOH was investigated thereafter on 9L rat glioma model, firstly *in vitro* with cell cycle analyses and, secondly, *in vivo* through stealth ansa-FcdiOH-LNC injections in ectopic glioma bearing rats. To further decipher the ferrocenyl drug mechanism of action, cancer cell proliferation and intratumoral immune reaction were evaluated on tumor sections.

Method

Stealth ansa-FcdiOH-LNC formulation

Stealth LNCs were prepared according to the “one-step process” based on a phase inversion temperature method [12,15] Briefly, the preparation process consisted in mixing all the excipients [Solutol® HS15 (15.9 % w/w), Lipoid® (1.4 % w/w), Labrafac® (19.4 % w/w), NaCl (3.0 % w/w), water (55.8 % w/w), the drug as powder (2.6% w/w) and DSPE-mPEG 2000 (1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy-(polyethyleneglycol)-2000], 1.9% w/w) under magnetic stirring. Three cycles of progressive heating and cooling between 90 and 50°C were then performed. At the last cooling step, the ansa-FcdiOH LNC suspension was diluted with water (71.4 % w/w). The resulting suspension was passed

through a 0.2 μM filter to remove the non-entrapped drug. The final ansa-FcdiOH concentration was 8 mg/mL (19 mM).

Fluorescent stealth LNCs were obtained by labeling the LNCs with the fluorescent DiI probe at 4 mmol/L_{Labrafac} or with DiD at 2.5 mmol/L_{Labrafac}.

LNC characterisation

The determination of the drug loading was achieved by spectrophotometry (UV 2600, Shimadzu, Champs sur Marne, France) at 254 nm after dissolving 30 μL of LNCs into 5 mL of methanol (Fisher chemical).

The average hydrodynamic diameter and the zeta potential of nanocapsules were determined at 25°C, in triplicate, using a Malvern Zetasizer® (Nano Serie DTS 1060, Malvern Instruments S.A., Worcestershire, UK). For the measurement, the LNCs were diluted in MilliQ water (50 μL LNC in 2.95 mL water).

Osmolarity measurement was performed in triplicate on a Vapro Osmometer (ELITECH group, Signes, France).

Tumor cell line and culture

Rat 9L gliosarcoma cells were obtained from the European Collection of Cell Culture (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France). The cells were cultured at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ in Eagle's minimal essential medium (EMEM) (Lonza, Verviers, Belgium) supplied with 1 % non essential amino acids (Lonza), 10 % foetal calf serum (FCS) (Lonza) and 1 % antibiotic and antimycotic solution (Sigma).

In vitro cell uptake

9L cells were seeded in 6-well plates for 72h. Cells were then treated with DiD-LNCs, OS stealth DiD-LNCs and PI stealth DiD, diluted at 1/500 in a serum-free culture medium, for 2 hr at 37 °C or 4 °C. At the end of the incubation period, cells were fixed in 2% formaldehyde and analyzed using a FACScan flow cytometer with CellQuest Software (BD Biosciences). All experiments were performed in triplicate and presented as mean \pm SD.

In vitro cell viability

A suspension of 9L cells (1.9×10^4 cells/mL) was put in each well of 24-well plates for 48 h. On day 2, the culture medium was removed and cells were treated with increasing concentrations (0.01 to 10 $\mu\text{mol/L}$) of various formulations. After 72 h of incubation at 37°C, the medium containing samples was replaced by fresh medium. Cell survival percentage was estimated by the MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) survival assay according to the supplier's instructions (Promega, Lyon, France).

In vitro reactive oxygen species (ROS) generation

In order to assess the ROS involvement in the ansa-FcdiOH mechanism of action, cells were co-treated with ansa-FcdiOH at the IC50 concentration and an antioxidant agent (ascorbic acid (Sigma) at 200 μM). The test was performed through the MTS assay in the same conditions (seeding, treatment schedule, measurement) as described above. As controls, cells were treated with ascorbic acid alone. This experiment was performed in triplicate and presented as mean \pm SD.

Cell cycle analysis

Cell cycle analysis was performed as previously described [4]. Briefly, cells were treated with free ansa-FcDiOH at increasing concentration (0.05 μM to 0.5 μM) for 24, 48 and 72 h of treatment. At the end of the experiment, cells were trypsinized, washed twice with PBS and fixed (ice cold EtOH 70% v/v, 1h, -20°C). Cells were subsequently incubated in PBS containing RNase A (50 $\mu\text{g/mL}$, 15 min, 20°C) and then in PBS containing propidium iodide (20 $\mu\text{g/mL}$, 4 h, 20°C, in the dark). Cell cycle was analyzed with Cyan LX9 cytometer (Beckman Coulter, France) and data were processed by a multicycle software (Phoenix Flow systems, San Diego, USA).

Determination of apoptotic cells

100,000 cells were seeded in 35-mm dishes and treated for 24h with ansa-FcDiOH. Cells were then fixed in cold methanol (-20 °C, 10 min) and stained with 1 $\mu\text{g/ml}$ Hoechst 33258 (30 min, 20°C, in the dark). Apoptotic cells exhibiting condensed and fragmented nuclei were counted under a Nikon Eclipse fluorescence microscope. At least, 200 cells in randomly selected fields were examined.

Animals

In vivo efficacy experiments were carried out on 10–11-week-old Syngeneic Fischer F344 female rats (Charles River Laboratories France, L'Arbresle, France), weighing 160–180 g. Animal care was performed in strict accordance with French Ministry of Agriculture regulations. The animal procedures were approved by the Animal Experimentation Ethic Committee of Pays de la Loire, protocol number CEEA.2012.32.

For accelerated blood clearance experiments, 10–11-week-old female Sprague rats (SCAHU, service commun d'animalerie hospitalo-universitaire, Angers, France) were used weighing 260-300g.

ABC phenomenon evaluation

Female Sprague rats were randomly divided into 2 groups. The ABC phenomenon was investigated after a second injection of LNCs. The initial injection used stealth LNCs and conventional LNCs for comparison, and was administered *via* the tail vein (400 μ L/rats). For the second injection, stealth DiI-labeled LNCs and DiI-LNCs were injected intravenously (400 μ L/rats) at day 7.

Blood samples were collected by cardiac puncture at designated time intervals (5 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h and 6 h, 8 rats per group) in a blood collection heparin tube (Microtube, 1.3 mL, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Germany). DiI fluorescence contained in plasma was measured at the emission wavelength of 544 nm with an excitation wavelength of 590 nm by a Fluoroscanner[®] (Ascent FL, Thermo Fisher Scientific, Cergy- Pontoise, France). One hundred percent of fluorescence was considered as the value counted at 5 min post-injection. The blood circulation profiles after the second injection were compared to the original profiles obtained through a distinct experiment with one single injection.

In vivo antitumor efficacy

In vivo anticancer activity was evaluated against 9L tumor-bearing fisher rats. Animals were manipulated under isoflurane/oxygen anaesthesia. After shaving and disinfection, rats were intradermally implanted with 1.5×10^6 9L cells on the right flank. At day 7 post tumor implantation, animals were homogeneously divided into three groups physiological saline solution (0.9% NaCl), unloaded stealth LNCs and stealth ansa-FcdiOH-LNCs (ansa-FcdiOH dose: 20 mg/kg), with 9 rats per group. The treatments, administered *via* the lateral tail vein,

were started at day 7 and had been administered daily for 2 weeks with a mid-term break of 2 days (10 injections in total). Tumour growth was followed by regularly measuring the length and width of tumours with a calliper. The tumour volume (V) was estimated by the mathematical ellipsoid formula:

$$V = (\pi/6) \times (\text{width})^2 \times (\text{length})$$

At day 21 post-tumor inoculation, rats were sacrificed in a CO₂ chamber, and tumors and livers were excised and immediately fixed in 4% formaldehyde solution to be embedded in paraffin.

Tumor and liver slide histology

The embedded tissues were sectioned (4 µm) along the longitudinal axis of the tumor. The liver and tumor sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) for histological analysis and were observed by an anatomopathologist.

Tumor immunostaining

Tumor tissues were subjected to immunohistochemical staining against OX6 and CD3 to analyse macrophage and T lymphocyte infiltration, respectively. Cell proliferation was also assessed through PCNA immunofluorescence. Briefly, tumor slides were deparaffinised and subsequently subjected to antigen retrieval using a citrate buffer pH 6 for 40 min at 90°C. In order to block nonspecific binding, sections were incubated in PBS containing 4% BSA and 10% normal goat serum. Incubations with primary antibodies (anti-rat OX6 (1/50), anti-rat CD3 (1/50) and anti-rat PCNA (1/1000)) were performed overnight at 4°C. Anti-OX6 and anti-CD3 primary antibodies were detected using a biotinylated secondary antibody followed by the avidin-biotin complex method according to the supplier's directions (Vector). Sections were revealed with 3,3-diaminobenzidine (Sigma) counterstained with hematoxylin and permanently mounted. Anti-PCNA primary antibody was detected using a biotinylated secondary antibody amplified with streptavidin-FITC (Dako). Nuclei were counterstained with DAPI (Sigma). Sections of three rats of each group (control and stealth ansa-FcdiOH-LNCs) were analysed under a microscope (Axioscope[®] 2 optical, Zein, Le Pecq, Germany). PCNA⁺ cell counting was performed in three tumor sections per rat using the Metaview computerized image-analysis system (Roper scientific, Evry, France). Six fields per sections

taken at $\times 200$ magnification were randomly chosen in the tumor. Results were expressed as the mean number of PCNA⁺ cells / mm² for each group \pm SEM.

Statistical analysis

For *in vitro* experiments, the results were expressed as the mean \pm SD and Student t-test was performed between treated and control groups.

Statistical significance between control and treated groups for *in vivo* experiments was evaluated using Mann and Withney test and was considered as significant with $p < 0.05$. Results were expressed as a mean \pm SEM.

Results

Formulation and characterization of the stealth ansa-FcdiOH-loaded LNCs

Stealth ansa-FcdiOH loaded LNCs were successfully prepared at 8mg/mL (6.4 % w/w) (Table 1). The direct incorporation of DSPE-PEG into the LNC mixture slightly increased the carrier size in comparison to conventional LNCs (50 nm) in consistence with previous studies [15]. On the contrary, the drug encapsulation markedly decreased the diameter compared to stealth LNCs, reaching a size of 40 nm. The zeta potential measurement revealed similar negatively charged surfaces for both stealth LNCs, indicative of the DSPE-PEG sheathing. As the formulations were intended for intravenous delivery, the osmolarity was settled at approximately 300mOsm.

	Hydrodynamic diameter (nm)	PdI	Zeta potential (mV)	Osmolarity (mOsm)	Drug payload (%w/w)
Stealth LNCs	60.3 \pm 0.8	0.08	-18.8 \pm 0.7	327 \pm 4	-
Stealth ansa-FcdiOH-LNCs	40.1 \pm 0.1	0.03	-14.1 \pm 1.1	370 \pm 3	6.4

Table 1: Physico-chemical characteristics of unloaded stealth LNCs and stealth ansa-FcdiOH-LNCs

***In vitro* cell uptake**

The glioma cell uptake of stealth DiD-labeled LNCs obtained via the OS process were measured and compared to uncoated LNCs at an early time point (2 h) and at 4°C and 37°C (Figure 2). Additionally, in order to further assess the PEG corona influence on the cell internalization, LNCs with higher DSPE-PEG coating density were analyzed as a control with the two other formulations. These LNCs were prepared through the PI technique, as it allowed a higher DSPE-PEG coating than with the OS one, as previously described [13]. Accordingly, the DSPE-PEG content for PI DiD-LNCs (9 % w/w) was almost twice as much as that of OS DiD-LNCs (4.8 % w/w).

High DSPE-PEG coating density hampered the LNC cell uptake (Geo mean = 33.5) in comparison to low PEG density, whose uptake was similar to conventional LNCs (Geo mean = 66.5 and 63.2, respectively). 4°C condition, which usually permits to turn off cell metabolic activities including active cell internalisation, allowed the assessment of passive uptake. For each LNC batch, a weaker internalisation was observed at 4 °C in comparison to 37 °C, revealing a major contribution from the active uptake. In addition, DSPE-PEG coating tended to inhibit the passive LNC internalisation with the strongest effect observed for PI LNCs.

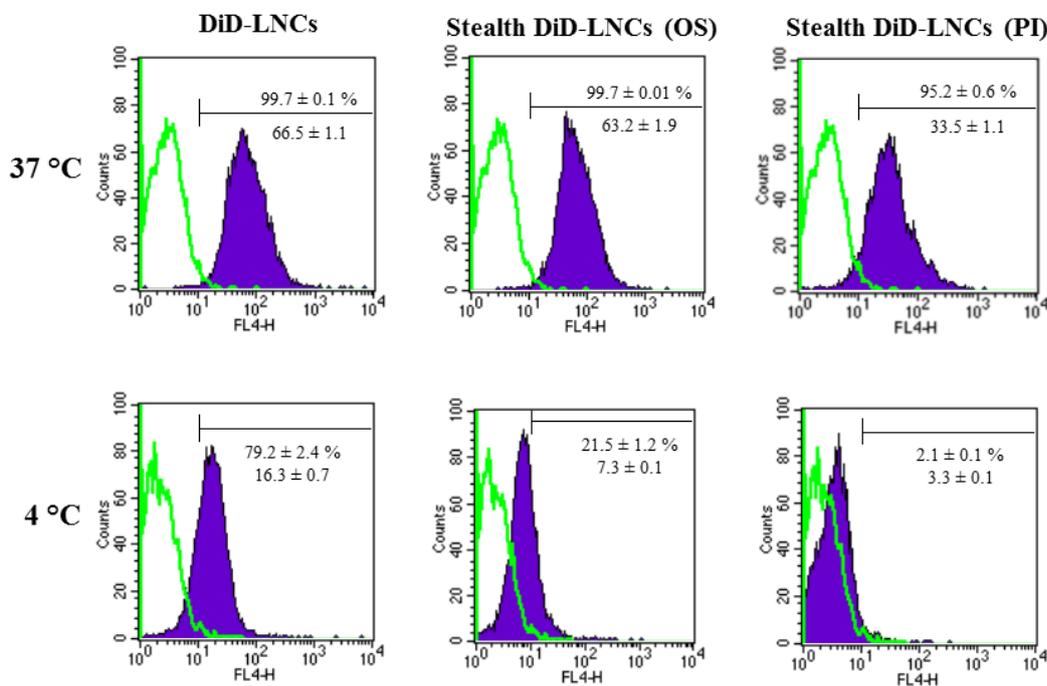


Figure 2 : PEG coating density influence on 9L cell uptake. The percentage of positive cells and the Geo mean are indicated on the figure. (DiD-LNCs: no PEG coating, Stealth DiD-LNCs (OS): low PEG coating, Stealth DiD-LNCs (PI): high PEG coating)

In vitro antiproliferative assay

After 72h cell exposure, ansa-FcdiOH was able to reach an IC50 value of 0.1 μM (Figure 3 A). Similar profiles were obtained for free and encapsulated drug which proved that ansa-FcdiOH was still pharmacologically active despite its entrapment in LNCs. Moreover, the co-treatment with an antioxidant agent partially inhibited the activity of ansa-FcdiOH (Figure 3B).

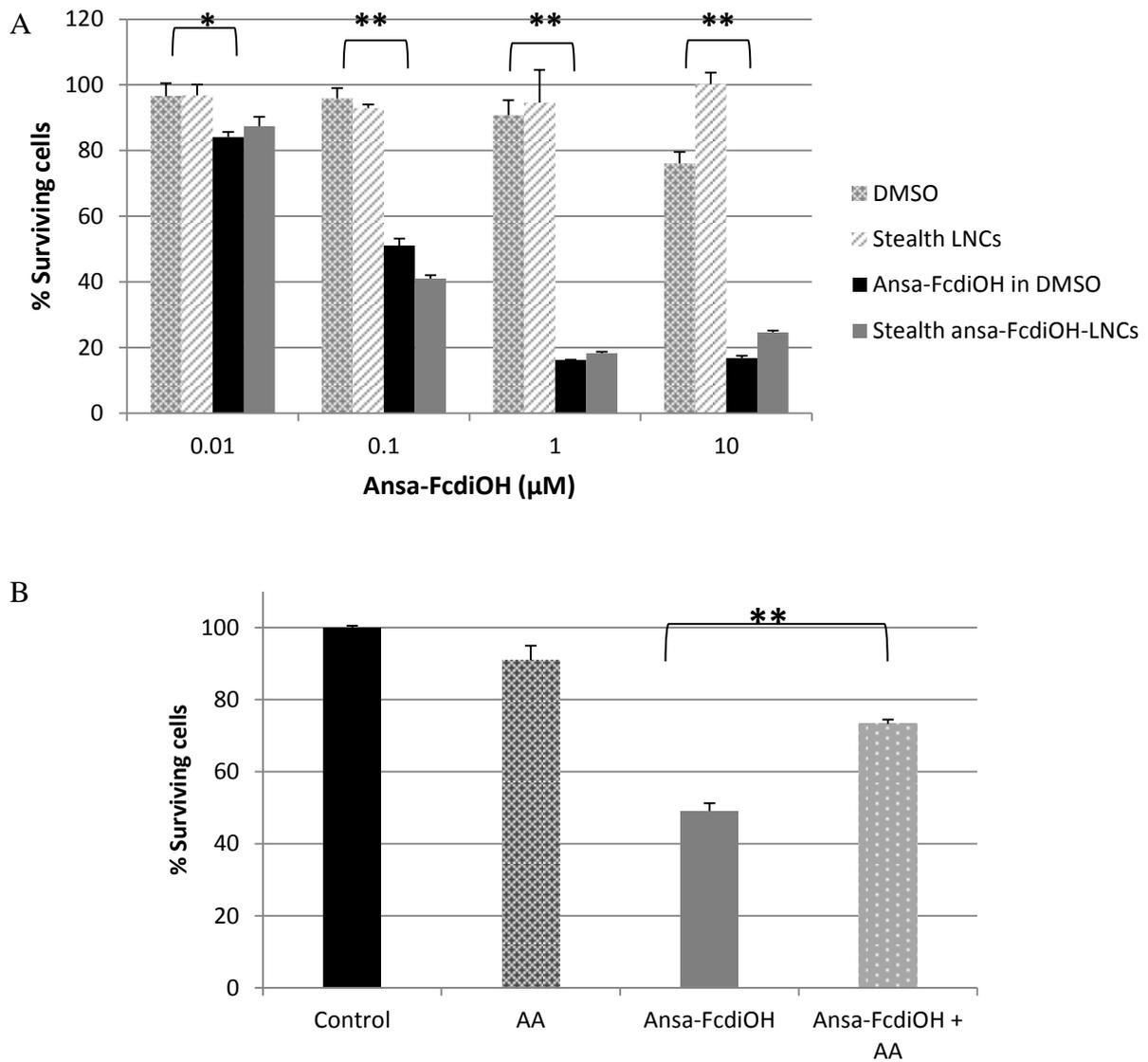


Figure 3: Antiproliferative activity of ansa-FcdiOH A/ 9L cell survival after 72 h exposure to various treatments. B/ Co-treatment with ascorbic acid (AA) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Cell cycle analysis

Two major dose-dependent effects on the cell cycle distribution could be distinguished (Figure 4). At low dose (50 nM), ansa-FcdiOH treatment induced an increase of 9L cells in S phase fraction (Figure 4A). This effect was detectable from 24 h treatment, subsequently leading to a prolonged S phase blockade up to 72 h with a slight increase of sub G0/G1 population at 0.1 μ M. For higher concentrations (0.5 μ M), cells were rapidly stacked in G0/G1 phase and cell cycles were no longer analyzed because of a massive increase of sub G0/G1 population at 48 and 72 h (Figure 4 B). Such sub G0/G1 cell population revealed a degradation of DNA within the treated cells which could occur by necrosis or apoptosis. Therefore, Hoechst staining determination of apoptosis was performed after 24 h treatment. As shown in Figure 4 C, apoptotic nuclei increased in a dose dependent manner under ansa-FcdiOH treatment indicating that sub G0/G1 fraction observed by flow cytometry was due to apoptosis induction.

Accelerated Blood Clearance (ABC) phenomenon investigation

ABC phenomenon was investigated at the second stealth DiI LNC injection administered 7 days after pretreatment with unloaded stealth LNCs. The blood circulation profiles of the stealth LNCs are displayed in Figure 5 A and compared to conventional LNCs (without DSPE-mPEG coating) as short circulating LNC control. A slight decrease in stealth LNC blood circulation time was observed at the second injection. However the whole plasmatic profile remained extended compared to uncoated LNCs.

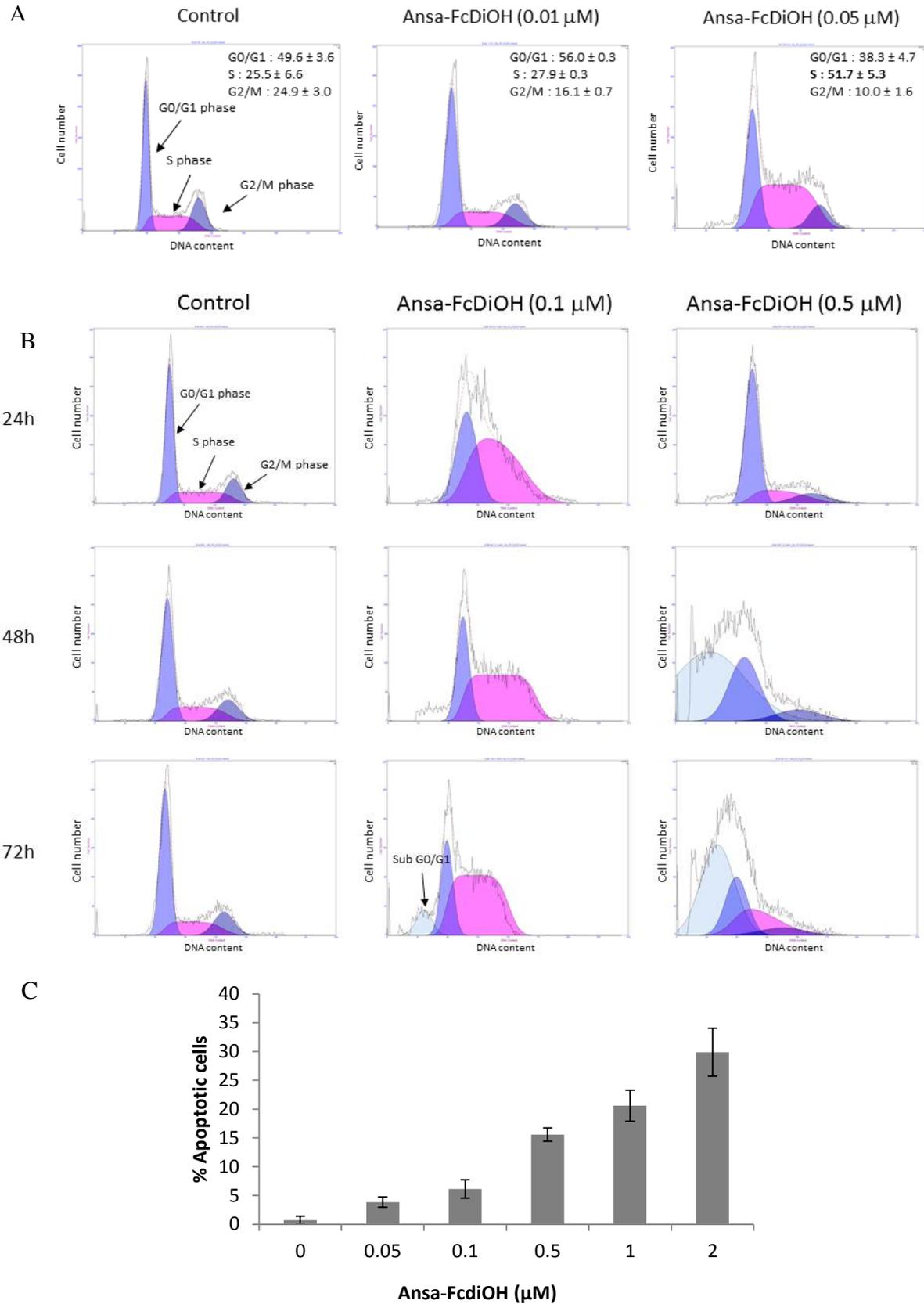


Figure 4: Cell cycle distribution and apoptosis counting A / Concentration dependent effects B/ Time dependent effects C/ Percentage of Hoechst - stained apoptotic cells after 24 h exposure to increasing ansa-FcDiOH dose.

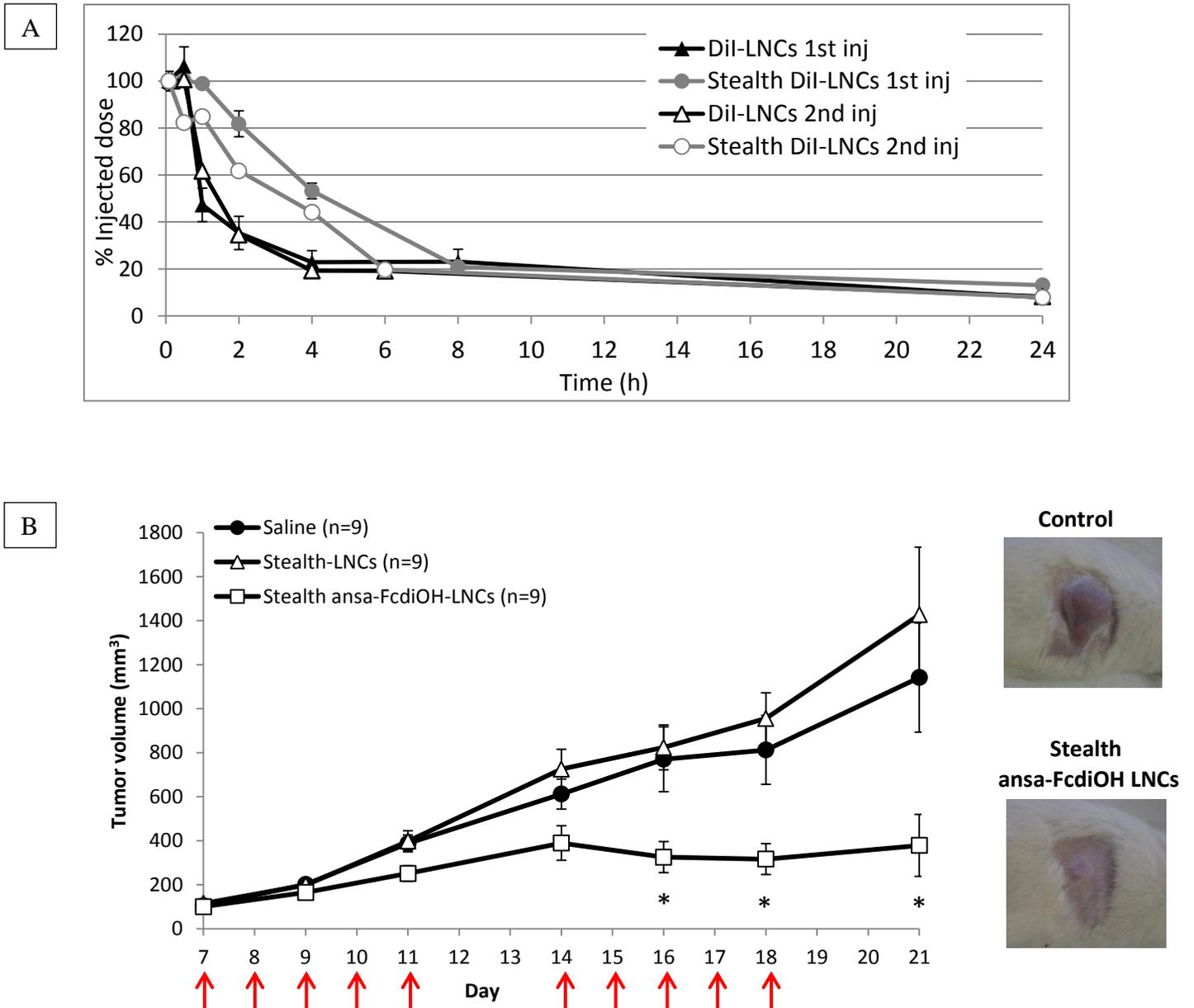


Figure 5: *In vivo* study A/ABC phenomenon evaluation (1st inj : first injection, 2nd inj.: second injection) B/ *In vivo* antitumor efficacy. Treatment days are indicated by red arrows. n = number of animals per group. * p < 0.05

***In vivo* tumor growth inhibition study**

Interestingly, stealth ansa-FcdiOH-LNC treatment slowed down the tumor growth from day 11 compared to the two control groups (Figure 5 B). From day 14, the tumor volume curve plateaued meaning that ansa-FcdiOH inhibited the tumor growth.

To determine whether ansa-FcdiOH affects 9L tumor growth at the level of cell proliferation, a PCNA immunofluorescent analysis was performed (Figure 6 A). The number of positively responding cells was estimated at 1553 +/- 105 PCNA⁺ cells / mm² for the drug treated group, which was significantly lower comparatively to that of the saline group with 2025 +/- 123 PCNA⁺ cells / mm².

Anti-tumor immune response analysis

In an attempt to evaluate whether the tumor growth inhibition could stem from an intratumoral immune response, macrophage and T lymphocyte infiltrations were immunohistologically stained (Figure 6 B). Both tumor sections of stealth ansa-FcdiOH-LNCs and saline groups displayed similar macrophage and lymphocyte infiltration.

Liver histology

Considering the aggressive protocol involving repeated injections of stealth ansa-FcdiOH LNCs, it seems necessary to take an interest in the rat livers. Specimen sections of the control groups and ansa-FcdiOH treated groups (Figure 6 B) showed normal histological appearance of the organ meaning that, no damage manifestation was detected within ansa-FcdiOH groups.

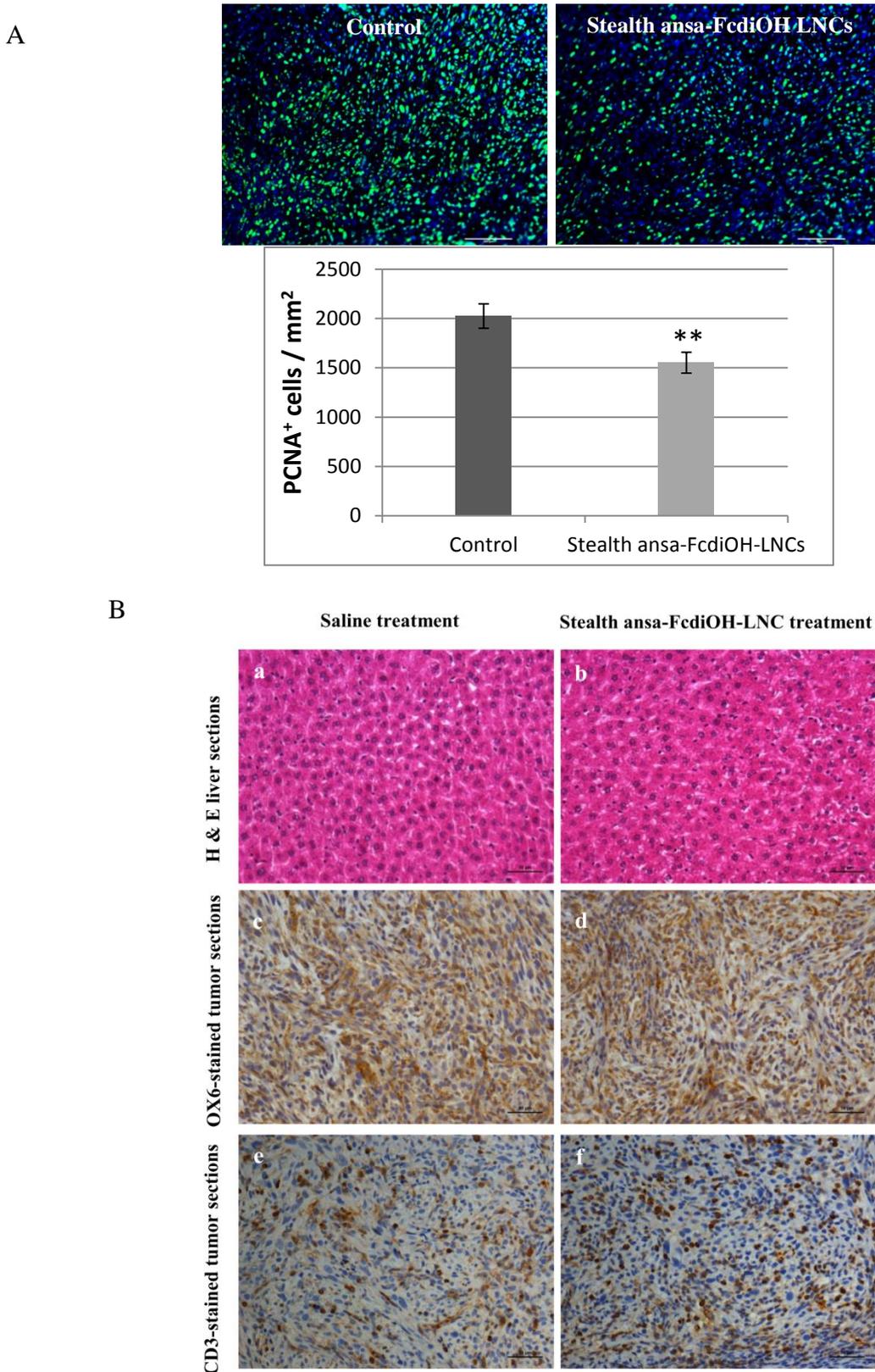


Figure 6: Immunohistological analyses A/ PCNA-stained proliferating cells in tissue sections. Green: PCNA⁺ cells, blue: nuclei stained by DAPI ** p < 0.01. B/ Effect of stealth ansa-FcdiOH-LNCs treatment on liver (b) and on tumor (d, f) compared to saline treatment (a and c, e respectively).

Discussion

Despite intensive research efforts, the diagnosis of a malignant brain cancer remains associated with a grim prognosis. Current available drug therapies are insufficiently effective to treat this aggressive disease, mainly attributed to tumor-cell resistance, and ultimately leading to ineluctable recurrence. Consequently, innovative treatments are urgently needed to improve the outcome for patients.

The drug of interest in this work is a ferrocenyl molecule (ansa-FcdiOH) which can be described as a dyphenol metallo-complex. Polyphenol are currently under considerable investigation due to their cytotoxic effect on cancer cells. Among them, curcumin is subject to great interest in particular in glioblastoma treatment and has already shown promising outcome [16,17]. Besides a potential polyphenolic activity, ansa-FcdiOH can also take advantage of its metallic part which may confer an unique and alternative activity over organic compound.

Considering the poorly water soluble property of this ferrocenyl complex, a drug delivery system was required for further evaluation. As LNCs have already proved to be a suitable tumor-delivery nanosystem for other ferrocenyl compounds [4,5], we obviously selected this carrier for the development of injectable ansa-FcdiOH dosage form. As above-mentioned, the *in vivo* drug delivery performance of nanoparticles is commonly boosted through the addition of PEG onto their surface. While conventional LNC PEGylation is achieved through a post-insertion technique, we designed for this study alternative stealth LNCs via a one-step process intended to facilitate a future transposition in clinic. Stealth ansa-FcdiOH-LNCs were successfully prepared by the one-step phase inversion temperature method with a satisfactory size of 40 nm, high drug loading and stealth features, making them suitable for intravenous delivery.

It could be noticed that drug loaded stealth LNCs showed smaller hydrodynamic size than unloaded stealth LNCs. This phenomenon may be induced by the ansa-FcdiOH entrapment into the LNC shell structure as previously reported with the encapsulation of another polyphenol molecule, the quercetin [18]. As a matter of fact, polyphenols are able to interact with membrane bilayers and can bind to the lipid-water interface [19]. Based on these considerations, the size alteration is assumed to result from the drug arrangement between the HS-PEG chains at the LNC interface.

Proper PEGylated phospholipid anchorage onto the LNC surface was evidenced by the high negative surface charge stemming from the PEG dipoles [4] as well as from the negatively charged phosphate groups of DSPE-mPEG. Additionally, the stealth ansa-FcdiOH-LNCs displayed a narrow size distribution (PDI =0.05), which is a critical parameter controlling the biodistribution.

As nanocarrier stability is an important factor to consider, a stability study at 37°C was performed on stealth ansa-FcdiOH-LNCs in comparison to uncoated ansa-FcdiOH LNCs. Surprisingly, stealth ansa-FcdiOH-LNCs exhibited enhanced physical stability over regular FcdiOH-LNCs. The latter displayed indeed a dramatic increase in size probably originating from the interface destabilization by the drug (data not shown). This result emphasized the capacity of PEGylation to ensure the physical LNC stability.

It was previously demonstrated that conventional LNCs were rapidly internalized by glioma cells through endocytic pathway [20]. However, the influence of DSPE-PEG coating on LNC uptake had not been evaluated so far. Although PEG coating create a hydrophilic corona able to prevent LNCs from the opsonisation phenomenon, it might also hinder nanoparticle internalisation by cells. Accordingly, we assessed the LNC uptake by 9L glioma cells depending on the level of PEG coating density. Highly PEG coated-LNCs obtained through the PI technique showed reduced cell uptake compared to LNCs with a lower OS PEG coating. Interestingly, the later displayed similar internalization to uncoated LNCs. This study highlighted the fact that hydrophilic PEG corona could reduce cell interactions, likely owing to steric repulsions and lack of affinity. These observations further supported our choice of a simple OS process for the design of stealth LNCs, achieving a low while adequate PEG coating over the PI technique. Additionally, these OS stealth LNCs exhibited the capacity to deliver their loading at the intracellular level mostly through active uptake.

In vitro antiproliferative assay demonstrated strong ansa-FcdiOH effect against 9L glioma cells achieving an IC50 of 0.1µM. In comparison to FcdiOH, an analogous drug to ansa-FcdiOH which has already shown promising activity on brain tumor [5], ansa-FcdiOH displayed a lower IC50 value on 9L cell line demonstrating its hopeful potent activity. Remarkably, ansa-FcdiOH showed also a lower IC50 value against glioma cell lines in comparison to curcumin with 25µM [16] or to gold compounds reaching 3 µM [21]. The partial inhibition of the drug activity when associated with an antioxidant supported a ROS-

mediated cell death. This is commonly encountered with metallodrugs such as ruthenium compounds [22] and gold-based compounds [21] and polyphenol drugs [23,24].

In order to get a deeper insight into the ansa-FcdiOH mechanism of action, cell cycle analyses were performed. As a result, ansa-FcdiOH altered the 9L cell cycle in a dose dependent manner with the arrest in S-phase at low dose (50nM) and in G0/G1 phase at higher dose associated with apoptosis induction.

Based on clinical settings, we planned for the *in vivo* efficacy study a treatment protocol composed of multiple doses. Repeated injections indeed aimed to increase the drug concentration in tumor tissue as demonstrated in the literature with multiple injections of chitosan-based nanoparticles [25]. However, it has been reported that multiple injections of PEGylated nanocarriers induced an immune reaction with M immunoglobulin production against PEG which, as consequence, led to an accelerated blood clearance phenomenon as soon as the second injection of PEGylated nanocarriers was given [26]. Additionally, the second dose was shown to preferentially end up in Kupffer cells of the liver [27]. This consideration is a matter of concern, as, besides affecting the passive targeting ability of the cargo, it also can cause severe liver damage in the case of toxic anticancer drugs. Consequently, ABC phenomenon was investigated at the second stealth DiI LNC injection administered 7 days after pretreatment with unloaded stealth LNCs. As reported in the literature, this 7 day - interval corresponds to the maximum magnitude of ABC effect [26]. Comfortingly, no dramatic decrease in LNC blood circulation time was observed in comparison to PEG liposomes which lose their entire stealth properties at the second dose [26]. Additionally, the extended circulation time for stealth LNCs over conventional LNCs was confirmed. This ABC effect seems to be highly dependent on the type of nanocarrier used and, to date, no parameter can help in predicting the potential induction of antibodies upon injections of PEGylated nanosystems.

In vivo antitumor studies showed that repeated injection of stealth ansa-FcdiOH-LNCs could significantly inhibit 9L tumor growth compared to controls. This observed anticancer activity was further evidenced by a significant reduced number of intratumoral proliferating cells upon ansa-FcdiOH treatment. This could be due to the cell blockade in G0/G1 phase but also in S-phase since prolonged S-phase arrest is associated with decrease of S phase related cell cycle protein like PCNA [28,29].

It must be pointed out that 9L tumor has been shown to be highly immunogenic [30] which might mislead about the drug-induced tumor treatment. However, macrophage and T lymphocyte infiltration staining suggested that ansa-FcdiOH activity did not seem to be related to a distinct activation of an intratumoral immune response.

Hepatotoxicity is one of the major issue encountered with patients undergoing chemotherapy [31]. Interestingly, the repeated injections of stealth ansa-FcdiOH-LNCs did not induce apparent liver damage. This is intriguing since metal-based drugs especially cisplatin [32], often induced hepatic adverse effects. This non-toxicity to liver may also be ascribed to the drug confinement into the LNCs protecting healthy tissue which is one of the crucial advantages of nanocarriers permitting to overcome dose-limiting toxicity encountered with several drugs [33].

Taken all together, these results have proved that stealth ansa-FcdiOH-LNCs may represent an alternative approach to treat cancer and may comply with the current need in oncology. Further studies have been planned in order to assess the performance of these stealth ansa-FcdiOH-LNCs in an orthotopic glioma model.

Acknowledgments

The authors would like to thank Pascal Pigeon (ENSCP) for ansa-FcdiOH synthesis. This work was supported by the ANR Blanc Program Mecaferrol.

References

1. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJB, Janzer RC, Ludwin SK, Allgeier A, Fisher B, Belanger K, et al.: **Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial.** *Lancet Oncol.* 2009, **10**:459–466.
2. Vessières A: **Metal carbonyl tracers and the ferrocifen family: Two facets of bioorganometallic chemistry.** *Journal of Organometallic Chemistry* 2013, **734**:3–16.
3. Görmen M, Pigeon P, Top S, Hillard EA, Huché M, Hartinger CG, de Montigny F, Plamont M-A, Vessières A, Jaouen G: **Synthesis, cytotoxicity, and COMPARE analysis of ferrocene and [3]ferrocenophane tetrasubstituted olefin derivatives against human cancer cells.** *ChemMedChem* 2010, **5**:2039–2050.
4. Lainé A-L, Adriaenssens E, Vessières A, Jaouen G, Corbet C, Desruelles E, Pigeon P, Toillon R-A, Passirani C: **The in vivo performance of ferrocenyl tamoxifen lipid nanocapsules in xenografted triple negative breast cancer.** *Biomaterials* 2013, **34**:6949–6956.
5. Laine A-L, Huynh NT, Clavreul A, Balzeau J, Béjaud J, Vessieres A, Benoit J-P, Eyer J, Passirani C: **Brain tumour targeting strategies via coated ferrociphenol lipid nanocapsules.** *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2012, **81**:690–693.
6. Huynh NT, Passirani C, Allard-Vannier E, Lemaire L, Roux J, Garcion E, Vessieres A, Benoit J-P: **Administration-dependent efficacy of ferrociphenol lipid nanocapsules for the treatment of intracranial 9L rat gliosarcoma.** *Int J Pharm* 2012, **423**:55–62.
7. Roger M, Clavreul A, Huynh NT, Passirani C, Schiller P, Vessières A, Montero-Menei C, Menei P: **Ferrociphenol lipid nanocapsule delivery by mesenchymal stromal cells in brain tumor therapy.** *International Journal of Pharmaceutics* 2012, **423**:63–68.
8. Plazuk D, Vessières A, Hillard EA, Buriez O, Labbé E, Pigeon P, Plamont M-A, Amatore C, Zakrzewski J, Jaouen G: **A [3]ferrocenophane polyphenol showing a remarkable antiproliferative activity on breast and prostate cancer cell lines.** *J. Med. Chem.* 2009, **52**:4964–4967.
9. Prabhakar U, Maeda H, Jain RK, Sevick-Muraca EM, Zamboni W, Farokhzad OC, Barry ST, Gabizon A, Grodzinski P, Blakey DC: **Challenges and key considerations of the enhanced permeability and retention effect for nanomedicine drug delivery in oncology.** *Cancer Res.* 2013, **73**:2412–2417.
10. Jokerst JV, Lobovkina T, Zare RN, Gambhir SS: **Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy.** *Nanomedicine (Lond)* 2011, **6**:715–728.
11. Huynh NT, Roger E, Lautram N, Benoît J-P, Passirani C: **The rise and rise of stealth nanocarriers for cancer therapy: passive versus active targeting.** *Nanomedicine (Lond)* 2010, **5**:1415–1433.
12. Huynh NT, Passirani C, Saulnier P, Benoit JP: **Lipid nanocapsules: a new platform for nanomedicine.** *Int J Pharm* 2009, **379**:201–209.
13. Perrier T, Saulnier P, Fouchet F, Lautram N, Benoît J-P: **Post-insertion into Lipid NanoCapsules (LNCs): From experimental aspects to mechanisms.** *International Journal of Pharmaceutics* 2010, **396**:204–209.
14. Uster PS, Allen TM, Daniel BE, Mendez CJ, Newman MS, Zhu GZ: **Insertion of poly(ethylene glycol) derivatized phospholipid into pre-formed liposomes results in prolonged in vivo circulation time.** *FEBS Letters* 1996, **386**:243–246.

15. Hoarau D, Delmas P, David S, Roux E, Leroux J-C: **Novel long-circulating lipid nanocapsules.** *Pharm. Res.* 2004, **21**:1783–1789.
16. Purkayastha S, Berliner A, Fernando SS, Ranasinghe B, Ray I, Tariq H, Banerjee P: **Curcumin Blocks Brain Tumor Formation.** *Brain Res.* 2009, doi:10.1016/j.brainres.2009.01.066.
17. Zanotto-Filho A, Coradini K, Braganhol E, Schröder R, de Oliveira CM, Simões-Pires A, Battastini AMO, Pohlmann AR, Guterres SS, Forcelini CM, et al.: **Curcumin-loaded lipid-core nanocapsules as a strategy to improve pharmacological efficacy of curcumin in glioma treatment.** *Eur J Pharm Biopharm* 2012, doi:10.1016/j.ejpb.2012.10.019.
18. Barras A, Mezzetti A, Richard A, Lazzaroni S, Roux S, Melnyk P, Betbeder D, Monfilliette-Dupont N: **Formulation and characterization of polyphenol-loaded lipid nanocapsules.** *Int J Pharm* 2009, **379**:270–277.
19. Oteiza PI, Erlejman AG, Verstraeten SV, Keen CL, Fraga CG: **Flavonoid-membrane Interactions: A Protective Role of Flavonoids at the Membrane Surface?** *Clin Dev Immunol* 2005, **12**:19–25.
20. Paillard A, Hindré F, Vignes-Colombeix C, Benoit J-P, Garcion E: **The importance of endo-lysosomal escape with lipid nanocapsules for drug subcellular bioavailability.** *Biomaterials* 2010, **31**:7542–7554.
21. Illán-Cabeza NA, García-García AR, Martínez-Martos JM, Ramírez-Expósito MJ, Peña-Ruiz T, Moreno-Carretero MN: **A potential antitumor agent, (6-amino-1-methyl-5-nitrosouracilato-N3)-triphenylphosphine-gold(I): Structural studies and in vivo biological effects against experimental glioma.** *European Journal of Medicinal Chemistry* 2013, **64**:260–272.
22. Vidimar V, Meng X, Klajner M, Licon C, Fetzer L, Harlepp S, Hébraud P, Sidhoum M, Sirlin C, Loeffler J-P, et al.: **Induction of caspase 8 and reactive oxygen species by ruthenium-derived anticancer compounds with improved water solubility and cytotoxicity.** *Biochem. Pharmacol.* 2012, **84**:1428–1436.
23. Sharma V, Joseph C, Ghosh S, Agarwal A, Mishra MK, Sen E: **Kaempferol induces apoptosis in glioblastoma cells through oxidative stress.** *Mol. Cancer Ther.* 2007, **6**:2544–2553.
24. Thayyullathil F, Chathoth S, Hago A, Patel M, Galadari S: **Rapid reactive oxygen species (ROS) generation induced by curcumin leads to caspase-dependent and -independent apoptosis in L929 cells.** *Free Radical Biology and Medicine* 2008, **45**:1403–1412.
25. Kim K, Kim JH, Park H, Kim Y-S, Park K, Nam H, Lee S, Park JH, Park R-W, Kim I-S, et al.: **Tumor-homing multifunctional nanoparticles for cancer theragnosis: Simultaneous diagnosis, drug delivery, and therapeutic monitoring.** *Journal of Controlled Release* 2010, **146**:219–227.
26. Ishida T, Kiwada H: **Accelerated blood clearance (ABC) phenomenon upon repeated injection of PEGylated liposomes.** *International Journal of Pharmaceutics* 2008, **354**:56–62.
27. Knop K, Hoogenboom R, Fischer D, Schubert US: **Poly(ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives.** *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2010, **49**:6288–6308.
28. Tinnemans MMFJ, Lenders M-HJH, ten Velde GPM, Blijham GH, Ramaekers FCS, Schutte B: **S-phase arrest of nutrient deprived lung cancer cells.** *Cytometry* 1995, **19**:326–333.
29. Borel F, Lacroix FB, Margolis RL: **Prolonged arrest of mammalian cells at the G1/S boundary results in permanent S phase stasis.** *J Cell Sci* 2002, **115**:2829–2838.

30. Barth RF, Kaur B: **Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the C6, 9L, T9, RG2, F98, BT4C, RT-2 and CNS-1 gliomas.** *J. Neurooncol.* 2009, **94**:299–312.
31. Floyd J, Mirza I, Sachs B, Perry MC: **Hepatotoxicity of Chemotherapy.** *Seminars in Oncology* 2006, **33**:50–67.
32. Lu Y, Cederbaum AI: **Cisplatin-Induced Hepatotoxicity Is Enhanced by Elevated Expression of Cytochrome P450 2E1.** *Toxicol. Sci.* 2006, **89**:515–523.
33. Lainé A-L, Passirani C: **Novel metal-based anticancer drugs: a new challenge in drug delivery.** *Curr Opin Pharmacol* 2012, **12**:420–426.

Chapitre III

Chapitre III

Stratégies d'administration pour la délivrance cérébrale des LNC

Le cerveau est isolé du reste de l'organisme par la barrière hématoencéphalique (BHE) qui restreint l'entrée aux molécules vitales à son bon fonctionnement. Par conséquent, le gliome, confiné au sein du système nerveux central, bénéficie de cette barrière qui le rend difficilement accessible voire hors d'atteinte pour les molécules thérapeutiques. Cette barrière physiologique associée au phénomène de résistance aux anticancéreux fait de la thérapie du gliome un réel défi médical.

Pour mieux comprendre l'ampleur de la difficulté du traitement des tumeurs cérébrales, un préambule sur la physiologie du cerveau et les différentes stratégies d'administration pour une délivrance cérébrale est présenté en première partie.

Lors de sa thèse, le Dr. Huynh a évalué différentes voies d'injection visant à atteindre le cerveau pour le traitement de gliomes orthotopiques ainsi que l'efficacité de la délivrance des LNC-FcdiOH par la survie des animaux. Les deux voies principalement testées étaient une voie locale par convection (CED) et en périphérie par injection intra-carotidienne. Ces deux voies ont permis de gagner quelques jours de survie significatifs par rapport aux contrôles. Afin d'améliorer les performances de délivrance des LNC et favoriser la distribution au sein du tissu tumoral, les LNC ont été fonctionnalisées pour réaliser un ciblage actif. Deux types de ligands ont été évalués : l'anticorps anti-OX26 ciblant les récepteurs à la transferrine surexprimés à la surface des cellules cancéreuses de cerveau ainsi que sur la BHE et le peptide NFL-TBS interagissant avec la tubuline et favorisant l'entrée dans les cellules tumorales. Les LNC fonctionnalisées encapsulant le FcdiOH ont été injectées par CED ou par la carotide sur des animaux porteurs de gliomes. Les résultats de cette étude sont présentés dans la publication n°5.

En continuité des travaux de thèse du Dr. Huynh, de nouvelles modalités d'administration ont été testées, toujours pour le traitement du gliome, avec pour objectif d'évaluer des voies cliniquement applicables et transposables. Ainsi, nous avons dans un premier temps étudié l'infusion continue des LNC par voie intraventriculaire puis intracérébrale via des pompes osmotiques. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux injections intraveineuses multiples. Ces résultats sont présentés en français en dernière partie de ce chapitre.

**Notions physiologiques sur le cerveau et stratégies
d'administration pour une délivrance cérébrale**

1 Notion anatomique et physiologique sur le cerveau

Le cerveau est l'organe qui régule et contrôle l'ensemble de notre organisme. Cette fonction centrale en fait un système délicat qui nécessite une protection exclusive instaurée par la barrière hémato-encéphalique (BHE) et la barrière hémato-liquidienne (BHL). Ces deux principales interfaces régissent les échanges entre le sang et le système nerveux central (SNC).

L'isolement du cerveau du reste de l'organisme a été mis en évidence pour la première fois par Paul Ehrlich en 1885 lors de son doctorat suite à l'injection d'un colorant par voie systémique, constatant une coloration de tous les organes à l'exception du cerveau et de la moelle épinière¹. Inversement, 30 ans plus tard, un de ses étudiants Erwin Goldmann remarque le phénomène contraire après injection de bleu de trypan dans le liquide céphalorachidien, colorant uniquement le SNC sans affecter les organes périphériques². Ces deux observations ont permis de mettre en avant la présence de barrières entre le cerveau et le système sanguin.

1.1 La BHE

La BHE est une structure séparant le parenchyme cérébral du compartiment sanguin et est formée par un système complexe de cellules endothéliales des microcapillaires cérébraux (CEMC), d'une membrane basale, de cellules microgliales, d'astrocytes et de péricytes (Fig. 1)³. L'intime interaction fonctionnelle entre ces différents types cellulaires contribue à l'intégrité de la BHE et l'ensemble de ces éléments associés aux neurones forme l'unité neurovasculaire. La membrane ou lame basale enveloppe les CEMC et les péricytes et est recouverte de pieds astrocytaires. Elle est constituée par différentes molécules telles que des protéines structurelles (collagène et élastine), des protéines spécialisées (fibronectine et laminine) et des protéoglycanes. La microglie, défense immunitaire spécifique du SNC, inspecte le microenvironnement local et contribue aux propriétés de la BHE⁴.

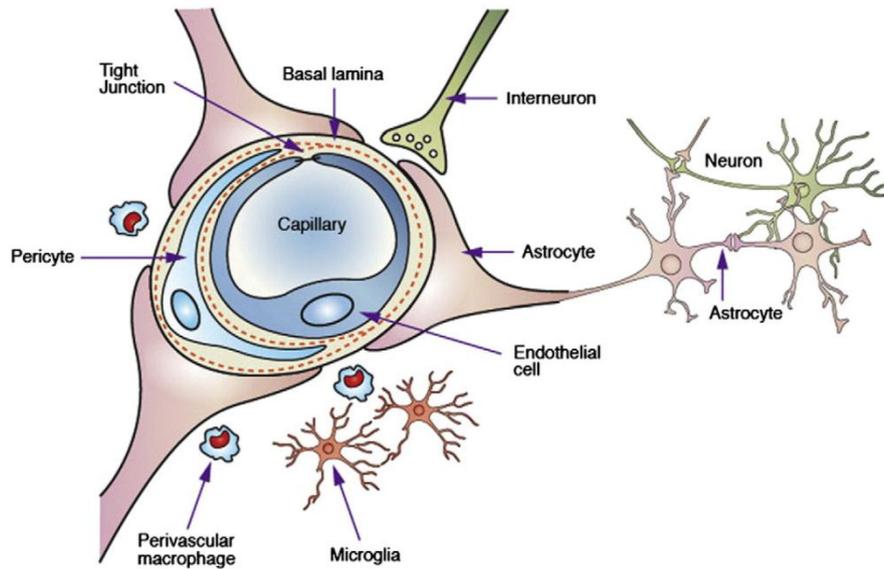


Fig. 1 : Représentation schématique de la BHE et de l'unité neurovasculaire⁵

L'imperméabilité de la barrière est principalement établie par les CEMC qui régulent le métabolisme des substances et le transport bidirectionnel sélectif du sang vers le cerveau et inversement, du parenchyme dans la circulation sanguine (Fig. 2). Leur fonction consiste à faciliter le passage aux éléments nutritifs essentiels et limiter l'entrée aux xénobiotiques. Par conséquent, ces CEMC diffèrent des cellules endothéliales du reste de l'organisme par la présence de jonctions serrées limitant la diffusion paracellulaire de molécules hydrophiles^{6,7}.

En ce qui concerne les nutriments essentiels à la survie du cerveau (glucose et acides aminés), leur passage dans le SNC est régulé par des transporteurs spécifiques de la famille des SLC (Solute Carrier, ex : GLUT 1, LAT1). Les protéines vitales telles que l'insuline et la transferrine traversent la BHE par le biais de récepteurs pour un passage par endocytose ou transcytose⁷. D'autres molécules à haut poids moléculaire peuvent pénétrer au sein du parenchyme cérébral par transcytose par adsorption (également appelée pinocytose). Cependant, les CEMC sont caractérisées par une faible activité pinocytique limitant l'entrée aux peptides et protéines circulants⁸. La régulation de la perméabilité aux solutés est également assurée par des canaux aqueux (aquaporine) et ioniques permettant le maintien de l'homéostasie cérébrale.

Les molécules telles que le CO₂ et l'O₂ peuvent rejoindre le SNC par diffusion passive à travers la membrane lipidique de l'endothélium⁹. Ce mode d'entrée est également accessible à certaines petites molécules liposolubles telles que l'éthanol ou les agents barbituriques⁴.

Cependant, toute molécule liposoluble étant parvenue à pénétrer la membrane des CEMC est exposée aux pompes à efflux. Ces transporteurs localisés dans la membrane des CEMC appartiennent à la famille ABC (ATP-binding cassette) telles que la P-glycoprotéine (P-gp), la protéine 1 de multidrug resistance (MRP), et la BRCP (breast cancer resistance protein)¹⁰. En refoulant les xénobiotiques à l'entrée du SNC, ils sont responsables de l'inefficacité d'un grand nombre de thérapies. Cette activité protectrice et détoxifiante est renforcée par la présence d'enzymes de dégradation intra- et extracellulaires édifiant une barrière métabolique⁴. Par ailleurs, le cytoplasme des CEMC est riche en mitochondries, ce qui intensifie cette activité métabolique⁸.

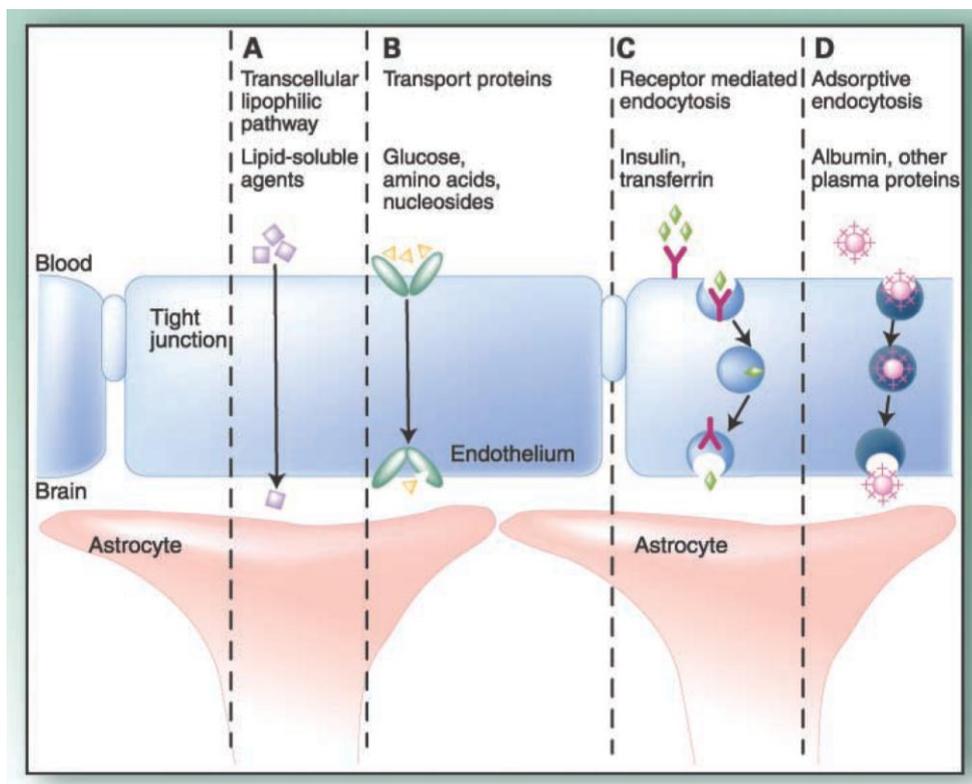


Fig. 2 : Les différents modes de passage à travers la BHE¹⁰

L'ensemble de ces caractéristiques édifie une BHE aux fonctions multiples intégrant une barrière physique, une barrière au transport, une barrière enzymatique/métabolique et une barrière immunologique. Par conséquent, la BHE représente un obstacle majeur à l'entrée des agents thérapeutiques, empêchant le passage de la quasi-totalité des molécules à haut poids moléculaire (protéines, peptides et matériel génétique) et 98% des petites molécules¹¹.

1.2 La BHL

La seconde barrière qui maintient l'homéostasie cérébrale est la barrière hémato-liquidienne séparant le sang du liquide céphalo-rachidien (LCR) (Fig. 3). Cette barrière est localisée au niveau des plexus choroïdes (PC) situés au sein des ventricules (Fig. 4). Les PC sont les organes majoritairement responsables de la synthèse du LCR et disposent d'une vascularisation importante. Tout comme la BHE, les échanges à travers l'épithélium des PC sont strictement régulés et l'entrée paracellulaire est limitée par la présence de jonctions serrées. Les cellules épithéliales du PC possèdent également des systèmes de transporteurs transcellulaires contrôlant les flux bidirectionnels.

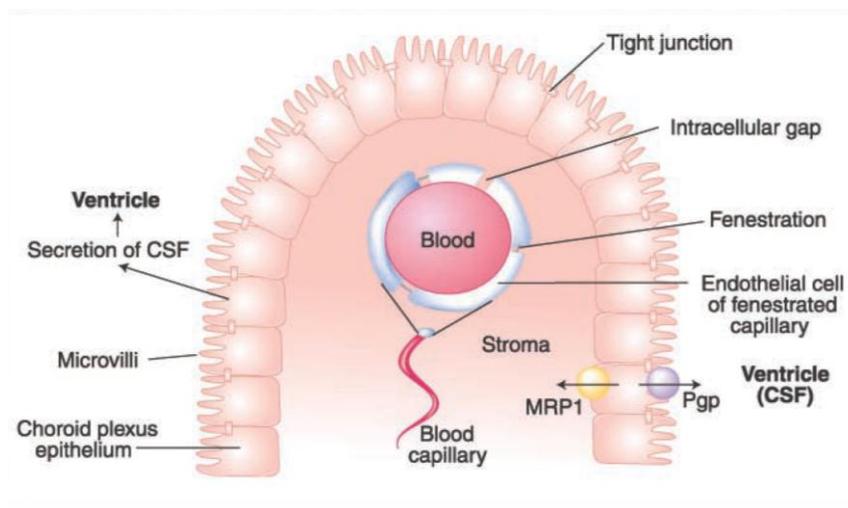


Fig. 3 : Représentation schématique de la BHL¹⁰

Le LCR est un fluide essentiel au bon fonctionnement du SNC. Il assure un rôle mécanique en réduisant le poids effectif du cerveau et en amortissant les chocs. Il contribue à l'échange nutritif avec le cerveau et permet d'évacuer les produits du catabolisme cérébral¹².

La circulation du LCR s'effectue à travers les ventricules latéraux, le 3^{ème} ventricule, le 4^{ème} ventricule puis dans l'espace sub-arachnoïdien cranial et spinal (Fig. 4). Il est finalement résorbé par le sinus veineux sagittal supérieur au niveau des villosités arachnoïdiennes¹³. Le volume de LCR chez l'homme représente 140 mL (chez le rat 90 µL) et est renouvelé 4 à 5 fois par jour, soit toutes les 4 à 5 heures. Les échanges entre le LCR des ventricules et le parenchyme cérébral se produisent au niveau des cellules épendymaires bordant les ventricules. Ces cellules sont de type fenestrées permettant les échanges avec le fluide interstitiel cérébral (Fig. 5).

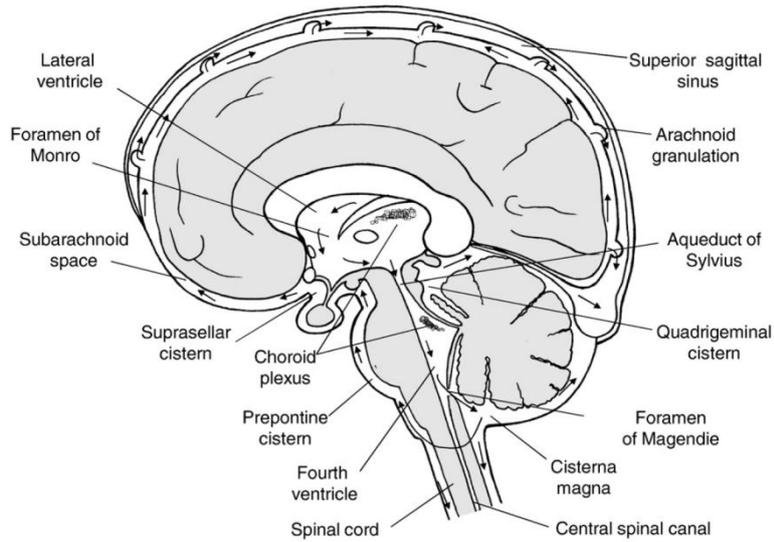


Fig. 4 : Circulation du LCR¹²

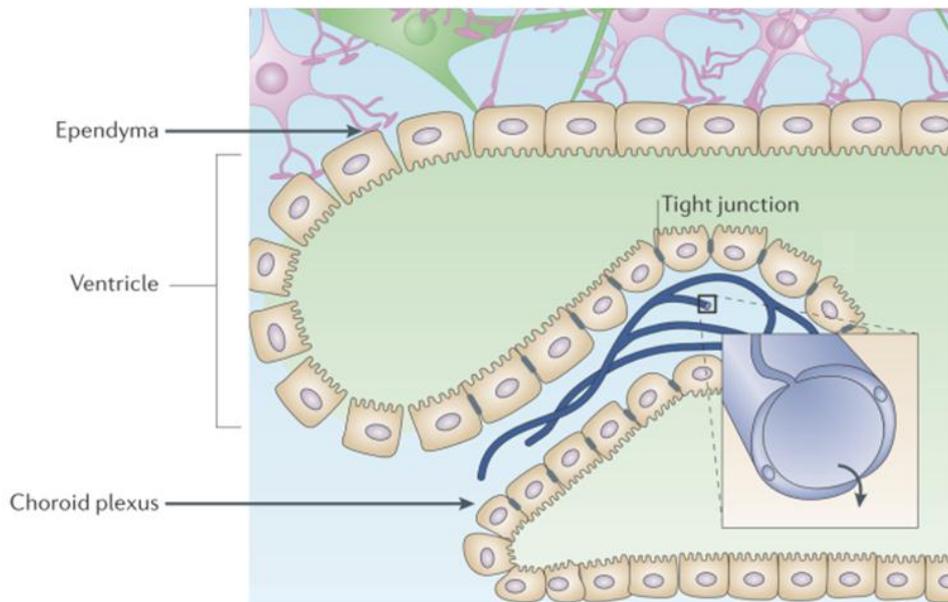


Fig. 5 : Cellules épendymaires : interface LCR / parenchyme⁴

Malgré de nombreuses similarités entre les deux barrières, la BHL est décrite comme moins étanche que la BHE en raison de différences au niveau des expressions de claudines, protéines en partie responsable de la sélectivité de la barrière¹⁴.

Les caractéristiques structurelles et fonctionnelles de ces deux barrières entraînent la faible biodisponibilité cérébrale de nombreux médicaments, ce qui constitue l'un des facteurs limitant l'efficacité des traitements.

1.3 Statut de la BHE en présence de tumeur cérébrale

La structure des vaisseaux sanguins des tumeurs cérébrales est fréquemment décrite comme morphologiquement et fonctionnellement altérée, conduisant à une perte de l'étanchéité de la BHE¹⁵. Ce constat n'est cependant pas vérifié pour les tumeurs de bas grade (I et II) telles que les astrocytomes et les oligodendrogliomes, pour lesquels la BHE est préservée¹⁶. Pour les tumeurs plus agressives, lorsque la masse tumorale primaire ou métastatique dépasse une taille de 1 à 2 mm de diamètre dans le parenchyme cérébral, l'intégrité de la BHE se trouve compromise¹⁵. Cette perméabilité est provoquée par la perte d'expression de protéines impliquées dans les jonctions serrées, la présence de fenestrations et l'augmentation de l'activité pinocytaire¹⁰. Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire VEGF, facteur pro-angiogénique surexprimé par les tumeurs cérébrales, est en partie à l'origine de la perte d'intégrité au cours de la croissance tumorale¹⁵. Cependant, cette hyper-perméabilité de la BHE est non uniforme et le transport à travers les vaisseaux tumoraux est hétérogène au cours du temps et dans l'espace.

Par ailleurs, une conséquence directe de ce manque d'étanchéité est l'accumulation intra et péri-tumorale de fluide physiologique et de protéines plasmatiques entraînant une augmentation de la pression interstitielle (PI) et provoquant l'apparition d'œdème vasogénique, une cause majeure de morbidité. D'autre part, la hausse de la PI intratumorale représente une barrière à la délivrance de principe actif au sein de la tumeur¹⁵.

Concernant les transporteurs d'efflux, l'expression de la P-gp à la surface de CEMC tumoraux est parfois (mais pas toujours) décrite comme diminuée par rapport au vaisseau sain. Outre son expression à la surface des CEMC, la P-gp est également surexprimée par les cellules cancéreuses cérébrales, s'imposant comme une des principales causes de résistance à la chimiothérapie. En ce qui concerne les protéines de type MRP, une augmentation de leur expression a été observée à la surface des vaisseaux péri-tumoraux¹⁰.

Malgré une perméabilité constatée, la BHE tumorale, parfois appelée barrière tumeur/cerveau, peut demeurer un obstacle au franchissement d'agent thérapeutique au sein de la tumeur lié à l'augmentation de la PI et la présence des transporteurs d'efflux.

2 Délivrance cérébrale d'agents thérapeutiques

Certaines molécules, telle que le témozolomide¹⁷ (molécule de référence dans le traitement du glioblastome) ou le Gliolan[®] (acide 5-aminolévulinique, utilisé en chirurgie pour la visualisation par fluorescence du gliome malin¹⁸) ont la capacité de traverser la BHE. Cependant, comme indiqué précédemment, la biodisponibilité cérébrale de la majorité des agents thérapeutiques reste très faible. Par conséquent, différentes stratégies d'administration ont été développées pour tenter de surmonter ces barrières cérébrales telles que des approches locales ou artérielles.

Plus récemment, l'émergence des nanoparticules semblent offrir de nouvelles possibilités de vectorisation cérébrale grâce à l'amélioration des propriétés pharmacologiques des agents anticancéreux.

Les stratégies d'administration cérébrale les plus courantes sont détaillées dans le paragraphe suivant. Des exemples d'applications aux nanovecteurs sont également présentés, le cas échéant.

2.1 Stratégie invasive

2.1.1 La voie Intracérébroventriculaire

Compte tenu du libre-échange entre les ventricules et le fluide interstitiel cérébral, il a été envisagé qu'une administration intra cérébro-ventriculaire (ICV) conduirait à la distribution de la molécule active dans tout le parenchyme cérébral baignant dans le liquide interstitiel¹⁹. Par conséquent, cette voie d'injection a fait l'objet d'études en préclinique et clinique pour diverses maladies neurologiques. Un dispositif a été développé spécifiquement pour la délivrance ventriculaire appelé réservoir Ommaya en référence au nom de son inventeur²⁰. Ce réservoir en plastique est implanté en sous-cutané dans le cuir chevelu et connecté à un ventricule par un cathéter. Disposé ainsi, l'agent thérapeutique peut être introduit dans le réservoir par injection sous-cutanée puis délivré au ventricule par compression manuelle exercée sur le réservoir (Fig. 6). Cette approche permet de contourner la BHE et résulte en une concentration élevée et immédiate du principe actif dans le LCR²¹. Etant donné la perméabilité du compartiment ventriculaire, les échanges entre le LCR des ventricules et le SNC peuvent se faire librement conduisant théoriquement à une distribution de l'agent dans le SNC.

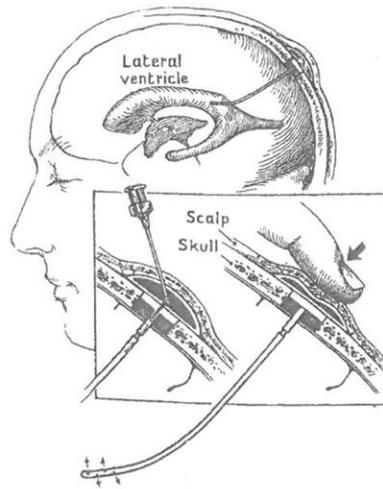


Fig. 6 : Représentation du réservoir Ommaya²²

Cependant, le succès de cette approche est limité par la barrière diffusionnelle érigée par la matrice extracellulaire. La distance d'une molécule parcourue par diffusion dépend de son poids moléculaire, de son affinité avec les surfaces des cellules cérébrales, des efflux à travers la BHE et des activités métaboliques²³. Par ailleurs, compte tenu de la vitesse de renouvellement du LCR, la concentration en actif dans le ventricule décroît très rapidement. Par conséquent et étant donné la résorption du LCR dans le système veineux, l'ICV s'apparenterait plutôt à une infusion systémique lente²³.

Malgré ces limitations, Thakker *et al.* se sont intéressés à l'infusion continue de siRNA ciblant l'EGFP (Enhanced green fluorescence protein) chez la souris par le biais de pompes osmotiques (Fig. 7), situées en sous-cutané et connectées au 3^{ème} ventricule. L'utilisation de pompes osmotiques permet de mimer le réservoir Ommaya à une échelle préclinique avec, pour seule différence, une infusion continue comparativement à des injections répétées pour le réservoir. Ces pompes sont constituées d'une membrane semi-perméable, enveloppant une couche osmotique, elle-même recouvrant un réservoir imperméable. En s'imprégnant des fluides physiologiques, la couche osmotique exerce une pression sur le réservoir, forçant la libération de son contenu. La distribution cérébrale du siRNA a été déterminée par l'étendue de l'extinction de l'EGFP. L'infusion sur 2 semaines de siRNA a conduit à l'inhibition de l'expression de la protéine sur une grande partie du parenchyme, jusque dans des régions distantes du site d'injection²⁴. Cette étude justifie donc l'application de la voie ICV comme approche intracérébrale.

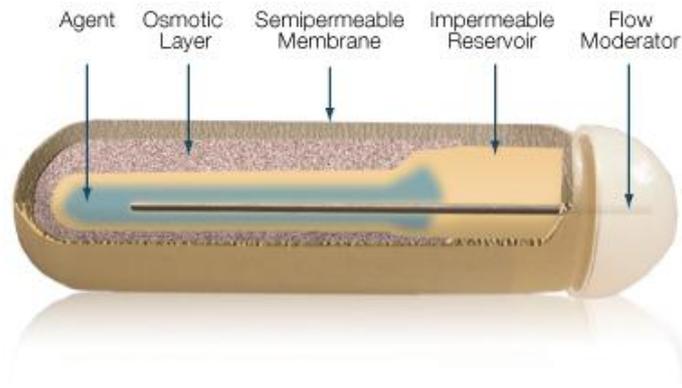


Fig. 7 : Composition d'une pompe osmotique²⁵

L'étude de Thakker a inspiré les travaux du neurochirurgien Florence Lefranc. En 2008, son équipe a conduit une étude visant à utiliser cette approche ICV sur des animaux porteurs d'une tumeur cérébrale pour diminuer l'expression de la galectine 1 (gal 1), un facteur pro-angiogénique participant à la migration des cellules de glioblastome, par un siRNA anti-Gal-1. Pour renforcer l'action du siRNA infusé par ICV, des injections intratumorales de siRNA ont également été réalisées. L'association à une administration concomitante de témozolomide a conduit à une amélioration significative de la survie par rapport au groupe recevant un siRNA contrôle²⁶.

La limite de l'infusion ICV réside dans l'exposition de la surface épendymaire du ventricule à une concentration importante d'actif pouvant conduire à des effets toxiques. Dans la littérature certains effets indésirables ont été décrits se produisant lors d'injections intraventriculaires de facteurs de croissance²³.

En clinique, l'ICV est préconisé pour le traitement de méningiomes et pour les cas de métastases dans le LCR en raison de la distribution subarachnoïdienne du fluide²⁷.

Par ailleurs, il est intéressant de noter que la voie ICV pour l'injection de particules est actuellement appliquée chez l'homme avec l'utilisation approuvée du DepoCyte[®], une suspension liposomale de cytarabine (taille 3 à 30 μ m)²⁸ pour le traitement intrathécal de la méningite lymphomateuse (Vidal 2013). Cette approche thérapeutique fait également l'objet actuellement d'une étude clinique pour le traitement de glioblastomes récurrents (NCT01044966).

2.1.2 Administration intratumorale

Convection enhanced delivery (CED)

Une des techniques de délivrance intracrânienne les plus étudiées est la CED. Cette technique, initiée en 1994 par Bobo²⁹, consiste à introduire un cathéter au sein de la tumeur par stéréotaxie, le cathéter étant relié à un système de pompe permettant d'infuser l'agent thérapeutique dans le parenchyme cérébral sous une pression constante et positive (Fig. 8). Par cette approche, la distribution se fait par convection et non par simple diffusion permettant d'imprégner plus largement le tissu tumoral. La description de cette technique est développée dans un chapitre de livre présenté en annexe 1.

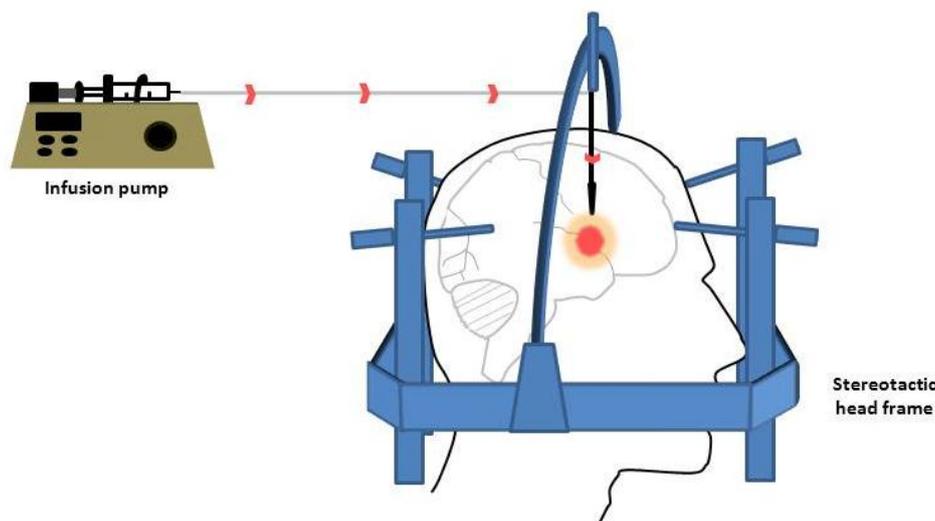


Fig. 8 : Représentation schématique d'une CED composée d'un cadre de stéréotaxie et d'une pompe d'infusion

La CED est une approche fréquemment adoptée en pré-clinique pour l'administration intratumorale de nanoparticules variées³⁰. Elle a été notamment utilisée récemment pour la délivrance locale de nanoparticules polymériques co-chargées en témozolomide (TMZ) et oxyde de fer. La présence de l'oxyde de fer a permis de visualiser la répartition des particules dans le parenchyme par IRM confirmant un volume de distribution plus important en CED qu'en bolus. De plus, l'administration des nanoparticules de TMZ par CED a permis de prolonger significativement la survie des animaux porteurs de glioblastome U87MG³¹. Une amélioration de survie a également été observée après administration par CED de liposomes PEGylés de doxorubicine sur deux modèles de gliomes U87MG et U251MG³².

La technique de CED est également évaluée en phases cliniques en tant que modalité alternative d'administration d'agents thérapeutiques³³ tels que le carboplatine, le paclitaxel, le topotecan³⁴ ou encore de l'exotoxine l'IL13-PE38QRR³⁵. Malgré des résultats précliniques encourageants, la transposition à l'homme a démontré les limites des modèles animaux avec la manifestation de phénomènes de reflux et de distribution limitée et/ou non prévisible de l'agent, nécessitant des études d'optimisations³⁶.

Les implants polymériques et l'infusion intratumorale par le réservoir Ommaya

La libération lente d'agents thérapeutiques dans la cavité tumorale est une technique appliquée en clinique avec l'introduction de Gliadel[®], un implant de polymère biodégradable contenant la carmustine, dans le compartiment de l'exérèse (Fig. 9)^{37,38}. L'objectif est d'atteindre les cellules infiltrées et isolées qui ne peuvent être traitées par chimiothérapie iv. L'utilisation du Gliadel est indiquée pour les patients atteints de glioblastome multiforme récurrent. Les résultats sur la survie des patients restent néanmoins modestes probablement dû à une diffusion limitée de la carmustine à travers le parenchyme cérébral³⁹.

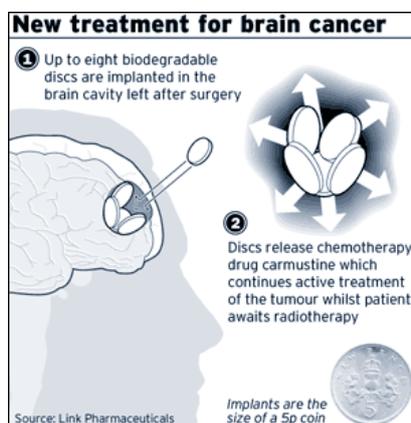


Fig 9 : les implants Gliadel^{®40}

L'utilisation du réservoir Ommaya a également été évalué pour l'infusion intratumorale de bléomycine⁴¹ ou doxorubicine⁴² par positionnement au sein de la tumeur du cathéter relié au réservoir (Fig. 10), avec obtention de résultats encourageants chez l'homme.

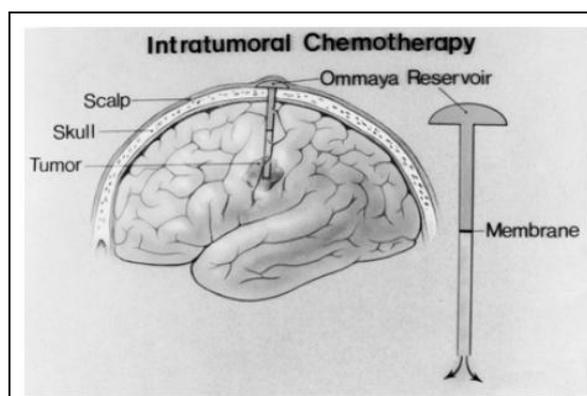


Fig. 10 : Implantation du réservoir Ommaya en intratumorale⁴¹

2.1.3 La voie carotidienne

L'administration intra-artérielle à travers la carotide pourrait permettre l'accès direct au cerveau, évitant la distribution préalable dans les organes périphériques. Cette stratégie d'administration a été évaluée sur des animaux sains pour des nanoparticules polymériques chargées en fluorochrome et l'analyse histologique des cerveaux a permis de montrer un passage de la barrière endothéliale avec un marquage localisé dans le parenchyme cérébral^{43,44}. De même, l'administration intracarotidienne d'une suspension liposomale de cisplatine (LipoplatinTM) sur des animaux porteurs de gliomes orthotopiques F98 a conduit à une augmentation de survie significative (30 jours vs 22 jours)⁴⁵.

Cette voie d'entrée, bien que délicate, fait l'objet d'investigations pour des essais cliniques sous le nom de « Superselective Intra-arterial Cerebral Infusion (SIACI) » dans différentes applications et, en particulier, pour le traitement du glioblastome⁴⁶. La stratégie développée consiste à ouvrir de façon transitoire la BHE par injection d'une solution de mannitol hyperosmolaire suivie de l'injection de l'agent thérapeutique. En effet, l'injection d'une solution hyperosmolaire provoque une rétractation réversible des cellules endothéliales cérébrales, entraînant l'altération des jonctions serrées⁴⁷. Différentes molécules anticancéreuses ont été évaluées par cette modalité d'injection telles que le méthotrexate⁴⁸ et le bevacizumab^{49,50}. Des réponses positives aux traitements ont pu être observées, encourageant la continuité des essais notamment avec le témozolomide (NCT01180816). Néanmoins, l'ouverture de la BHE comporte certains risques tels que l'opportunité pour des molécules toxiques présentes dans la circulation systémique d'atteindre le parenchyme et ainsi de générer des dommages irréversibles sur les neurones et tissus sains. D'autre part, la

carotide représente une artère majeure et donc un enjeu vital lors de sa perfusion pouvant entraîner des complications⁴⁸.

2.2 Stratégie non-invasive : Le challenge de la voie intraveineuse

Les différentes stratégies d'administration présentées précédemment constituent des approches invasives présentant des risques vitaux. La voie intraveineuse (iv) représente une voie « pratique » pour le médecin et relativement confortable pour le patient. Elle permet également l'administration d'une dose importante d'agents anticancéreux. Compte tenu de la vascularisation conséquente du SNC ($\sim 20\text{m}^2$ chez l'homme¹⁰), une approche par voie systémique peut donc être intéressante. Cependant, comme évoqué, la biodisponibilité cérébrale des principes actifs conventionnels injectés par voie systémique reste relativement faible et ne permet pas d'atteindre une dose thérapeutiquement active.

Les nanomédecines apparaissent comme un nouvel outil pouvant offrir des solutions à ces limitations et ainsi permettre l'amélioration de la délivrance cérébrale d'agent thérapeutique par voie iv⁵¹. Des exemples d'études précliniques sont décrits dans la littérature démontrant le bénéfice apporté par les nanovecteurs pour accroître la biodisponibilité cérébrale incluant des nanoparticules polymériques⁵², des nanoparticules lipidiques⁵³, des liposomes⁵⁴ ou encore des dendrimères⁵⁵. Les nanoliposomes de topotécan ont, par exemple, permis d'augmenter la concentration cérébrale du principe actif, résultant en une augmentation de l'activité antitumorale⁵⁴. De la même façon, des nanoparticules polymériques recouvertes de polysorbate 80 et chargées en doxorubicine a permis d'obtenir plus de 20 % d'animaux « long survivants »⁵⁶.

Il est difficile de définir les caractéristiques précises que devrait posséder le vecteur pour surmonter la BHE au vue de la diversité des formulations ainsi que la diversité des modèles expérimentaux utilisés. Il semblerait cependant, qu'une circulation prolongée favorise l'accumulation cérébrale en cas de tumeur, comme démontré par des nanosphères de poly(hexadécylcyanoacrylate) PEGylées comparées à leurs analogues conventionnels⁵⁷. Les propriétés de surface joueraient également un rôle important. En effet, le traitement du 9L par ces mêmes nanosphères chargées en doxorubicine n'a pas abouti à un effet thérapeutique, probablement suite à une biodistribution altérée comparativement aux nanosphères non

chargées⁵⁸. Ce phénomène serait dû à l'agrégation de protéines plasmatiques à la surface des nanosphères rendues positives par le principe actif.

En revanche, il est possible de favoriser le passage des vecteurs dans le SNC (voire leur internalisation par les cellules cancéreuses) en greffant à la surface des particules un ligand ciblant un récepteur ou un transporteur exprimé par la BHE^{59,60,61}. Parmi les récepteurs les plus investigués figurent le récepteur à l'insuline (RI) et le récepteur à la transferrine (RTf) à travers le greffage d'anticorps qui leur sont spécifiques. Cette stratégie a été exploitée notamment par l'équipe de Pardridge avec le développement d'immunoliposomes et appelée technologie du « cheval de Troie »⁶².

Le revêtement par des « cell penetrating peptides » peut également favoriser la traversée de la BHE. Il a été notamment montré que des micelles polymériques greffées avec des peptides TAT (trans-acting activator of transcription) étaient capables de rejoindre le SNC⁶³. Pour augmenter le ciblage tumoral, il a été reporté que le peptide chlorotoxine, issu du venin de scorpion, se liait sélectivement aux gliomes en épargnant les cellules cérébrales saines. Il a donc été utilisé comme agent ciblant pour des liposomes chargés en siRNA permettant d'améliorer leur internalisation cellulaire sur un modèle intracranial de gliome U87MG⁶⁴.

Le cas de ciblage actif « *in situ* » a également été démontré avec les nanoparticules polymériques. Ces particules sont certainement celles qui ont été les plus étudiées pour l'approche cérébrale et pour lesquelles de nombreuses informations sont disponibles, en particulier celles concernant le mécanisme de transport à travers la BHE. Des expériences *in vitro* et *in vivo* ont permis d'identifier l'adsorption d'apolipoprotéines E et/ou A-I à la surface des nanoparticules polymériques recouvertes de Tween 80. Ces apolipoprotéines permettent des interactions avec les récepteurs LDL (low density lipoprotein) exprimés à la surface de la BHE, conduisant à l'endocytose et transcytose des particules. Ainsi, ces nanoparticules mimeraient des particules de lipoprotéines et bénéficieraient de leur mode de transport⁵². Ce phénomène ne peut se produire en l'absence d'un revêtement des nanoparticules par un polymère polysorbate (20, 40, 60 ou 80) ou encore le poloxamer 188, qui servent d'ancre aux apolipoprotéines. Ce mécanisme de transport par les récepteurs des lipoprotéines a également été vérifié dans le cas de particules d'albumine sur lesquelles étaient greffées des apolipoprotéines^{65, 66}.

Un dernier avantage des nanovecteurs repose sur la possibilité de co-encapsuler un agent thérapeutique et un agent d'imagerie (théranostique) permettant alors une détection et un

monitoring de l'évolution tumorale⁶⁷. Un exemple illustrant ces nanoparticules multifonctionnelles correspond aux nanoparticules polymériques chargées en photofrine et oxyde de fer puis recouvertes d'un peptide F3 ciblant le système vasculaire tumoral⁶⁸. La photofrine est un agent photosensibilisateur utilisé pour la thérapie photodynamique. Ces nanoparticules administrées en iv à des animaux porteurs de gliome 9L intracérébral ont pu être détectées au sein de la tumeur et ont conduit à l'obtention de longs survivants.

Enfin, il est intéressant de noter qu'une étude de phase I (étude à dose croissante NCT00313599) est actuellement en cours pour l'évaluation de nanoparticules d'albumine contenant du paclitaxel (Abraxane[®]) administrées en iv à des patients porteurs de tumeurs solides, dont des tumeurs cérébrales, après chimiosensibilisation par administration orale de lapatinib, un inhibiteur de tyrosine kinase. Cette étude est motivée par les résultats positifs obtenus lors d'une première étude clinique démontrant une amélioration de la délivrance des nanoparticules grâce à un effet du lapatinib sur le système vasculaire tumoral⁶⁹. Des suspensions liposomales de doxorubicine sont également en cours d'investigation clinique (NCT00944801) dans le traitement du glioblastome nouvellement diagnostiqué.

Conclusion

Un des obstacles majeurs au traitement du glioblastome est l'incapacité de délivrer les agents thérapeutiques à la tumeur à une dose thérapeutiquement active. L'émergence des nanoparticules donne un nouvel essor à la délivrance cérébrale des actifs. En effet, de par leur taille, leur multifonctionnalité (protection, furtivité, ciblage, imagerie..) et leur capacité à vectoriser une charge importante d'anticancéreux, les nanoparticules pourraient être capables de surmonter les difficultés rencontrées avec les traitements conventionnels, en tirant profit des caractéristiques pathophysiologiques des tumeurs. L'utilisation des nanomédecines semble donc prometteuse, permettant de potentialiser les stratégies d'approches cérébrales actuellement étudiées et plus particulièrement la voie intraveineuse.

Références bibliographiques

1. Ehrlich, P. Das Sauerstoff-bedürfnis Des Organismus. Eine Farbenanalytische Studie. Habilitation thesis, Berlin, 1885.
2. Goldmann, E. Vitalfarbung Am Zentralnervensystem. *Abhandl Konigl preuss Akad Wiss* **1913**, *1*, 1–60.
3. Cardoso, F. L.; Brites, D.; Brito, M. A. Looking at the Blood-brain Barrier: Molecular Anatomy and Possible Investigation Approaches. *Brain Res Rev* **2010**, *64*, 328–363.
4. Abbott, N. J.; Rönnebeck, L.; Hansson, E. Astrocyte-endothelial Interactions at the Blood-brain Barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* **2006**, *7*, 41–53.
5. Chen, Y.; Liu, L. Modern Methods for Delivery of Drugs Across the Blood–brain Barrier. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2012**, *64*, 640–665.
6. Engelhardt, B.; Sorokin, L. The Blood-brain and the Blood-cerebrospinal Fluid Barriers: Function and Dysfunction. *Semin Immunopathol* **2009**, *31*, 497–511.
7. Ballabh, P.; Braun, A.; Nedergaard, M. The Blood-brain Barrier: An Overview: Structure, Regulation, and Clinical Implications. *Neurobiol. Dis.* **2004**, *16*, 1–13.
8. Copin, J. ; Gasche, Y. Morphologie et Physiologie de La Barrière Hématoencéphalique. *Annales Françaises d’Anesthésie et de Réanimation* **2003**, *22*, 202–214.
9. Abbott, N. J. Astrocyte-endothelial Interactions and Blood-brain Barrier Permeability. *J. Anat.* **2002**, *200*, 629–638.
10. Deeken, J. F.; Löscher, W. The Blood-Brain Barrier and Cancer: Transporters, Treatment, and Trojan Horses. *Clin Cancer Res* **2007**, *13*, 1663–1674.
11. Pardridge, W. M. Blood-brain Barrier Delivery. *Drug Discov. Today* **2007**, *12*, 54–61.
12. Orešković, D.; Klarica, M. The Formation of Cerebrospinal Fluid: Nearly a Hundred Years of Interpretations and Misinterpretations. *Brain Research Reviews* **2010**, *64*, 241–262.
13. Gherzi-Egea, J.-F.; Mönkkönen, K. S.; Schmitt, C.; Honnorat, J.; Fèvre-Montange, M.; Strazielle, N. Blood–brain Interfaces and Cerebral Drug Bioavailability. *Revue Neurologique* **2009**, *165*, 1029–1038.
14. Redzic, Z. Molecular Biology of the Blood-brain and the Blood-cerebrospinal Fluid Barriers: Similarities and Differences. *Fluids Barriers CNS* **2011**, *8*, 3.
15. Jain, R. K.; Tomaso, E. di; Duda, D. G.; Loeffler, J. S.; Sorensen, A. G.; Batchelor, T. T. Angiogenesis in Brain Tumours. *Nat Rev Neurosci* **2007**, *8*, 610–622.
16. Schneider, S. W.; Ludwig, T.; Tatenhorst, L.; Braune, S.; Oberleithner, H.; Senner, V.; Paulus, W. Glioblastoma Cells Release Factors That Disrupt Blood-brain Barrier Features. *Acta Neuropathol.* **2004**, *107*, 272–276.
17. Stupp, R.; Gander, M.; Leyvraz, S.; Newlands, E. Current and Future Developments in the Use of Temozolomide for the Treatment of Brain Tumours. *The Lancet Oncology* **2001**, *2*, 552–560.
18. Tykocki, T.; Michalik, R.; Bonicki, W.; Nauman, P. Fluorescence-guided Resection of Primary and Recurrent Malignant Gliomas with 5-aminolevulinic Acid. Preliminary Results. *Neurol. Neurochir. Pol.* **2012**, *46*, 47–51.
19. Blasberg, R. G.; Patlak, C.; Fenstermacher, J. D. Intrathecal Chemotherapy: Brain Tissue Profiles after Ventriculocisternal Perfusion. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1975**, *195*, 73–83.
20. Ommaya, A. SUBCUTANEOUS RESERVOIR AND PUMP FOR STERILE ACCESS TO VENTRICULAR CEREBROSPINAL FLUID. *The Lancet* **1963**, *282*, 983–984.
21. Misra, A.; Ganesh, S.; Shahiwala, A.; Shah, S. P. Drug Delivery to the Central Nervous System: a Review. *J Pharm Pharm Sci* **2003**, *6*, 252–273.

22. Ratcheson, R. A.; Ommaya, A. K. Experience with the Subcutaneous Cerebrospinal-Fluid Reservoir. *New England Journal of Medicine* **1968**, *279*, 1025–1031.
23. Pardridge, W. M. Drug Transport in Brain via the Cerebrospinal Fluid. *Fluids Barriers CNS* **2011**, *8*, 7.
24. Thakker, D. R.; Natt, F.; Hüsken, D.; Maier, R.; Müller, M.; Putten, H. van der; Hoyer, D.; Cryan, J. F. Neurochemical and Behavioral Consequences of Widespread Gene Knockdown in the Adult Mouse Brain by Using Nonviral RNA Interference. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 17270–17275.
25. ALZET® Osmotic Pumps - Implantable Pumps for Research <http://www.alzet.com/> (accessed Oct 14, 2013).
26. Mercier, M. Le; Mathieu, V.; Haibe-Kains, B.; Bontempi, G.; Mijatovic, T.; Decaestecker, C.; Kiss, R.; Lefranc, F. Knocking down Galectin 1 in Human Hs683 Glioblastoma Cells Impairs Both Angiogenesis and Endoplasmic Reticulum Stress Responses. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2008**, *67*, 456–469.
27. Alam, M. I.; Beg, S.; Samad, A.; Baboota, S.; Kohli, K.; Ali, J.; Ahuja, A.; Akbar, M. Strategy for Effective Brain Drug Delivery. *Eur J Pharm Sci* **2010**, *40*, 385–403.
28. Kripp, M.; Hofheinz, R.-D. Treatment of Lymphomatous and Leukemic Meningitis with Liposomal Encapsulated Cytarabine. *Int J Nanomedicine* **2008**, *3*, 397–401.
29. Bobo, R. H.; Laske, D. W.; Akbasak, A.; Morrison, P. F.; Dedrick, R. L.; Oldfield, E. H. Convection-enhanced Delivery of Macromolecules in the Brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, *91*, 2076–2080.
30. Allard, E.; Passirani, C.; Benoit, J.-P. Convection-enhanced Delivery of Nanocarriers for the Treatment of Brain Tumors. *Biomaterials* **2009**, *30*, 2302–2318.
31. Bernal, G. M.; Lariviere, M. J.; Mansour, N.; Pytel, P.; Cahill, K. E.; Voce, D. J.; Kang, S.; Spretz, R.; Welp, U.; Noriega, S. E.; *et al.* Convection-enhanced Delivery and in Vivo Imaging of Polymeric Nanoparticles for the Treatment of Malignant Glioma. *Nanomedicine* **2013**.
32. Kikuchi, T.; Saito, R.; Sugiyama, S.; Yamashita, Y.; Kumabe, T.; Krauze, M.; Bankiewicz, K.; Tominaga, T. Convection-enhanced Delivery of Polyethylene Glycol-coated Liposomal Doxorubicin: Characterization and Efficacy in Rat Intracranial Glioma Models. *J. Neurosurg.* **2008**, *109*, 867–873.
33. Barua, N. U.; Gill, S. S.; Love, S. Convection-Enhanced Drug Delivery to the Brain: Therapeutic Potential and Neuropathological Considerations. *Brain Pathol.* **2013**.
34. Bruce, J. N.; Fine, R. L.; Canoll, P.; Yun, J.; Kennedy, B. C.; Rosenfeld, S. S.; Sands, S. A.; Surapaneni, K.; Lai, R.; Yanes, C. L.; *et al.* Regression of Recurrent Malignant Gliomas with Convection-enhanced Delivery of Topotecan. *Neurosurgery* **2011**, *69*, 1272–1279; discussion 1279–1280.
35. Kunwar, S.; Chang, S.; Westphal, M.; Vogelbaum, M.; Sampson, J.; Barnett, G.; Shaffrey, M.; Ram, Z.; Piepmeier, J.; Prados, M.; *et al.* Phase III Randomized Trial of CED of IL13-PE38QQR Vs Gliadel Wafers for Recurrent Glioblastoma. *Neuro-oncology* **2010**, *12*, 871–881.
36. Raghavan, R.; Brady, M. L.; Rodríguez-Ponce, M. I.; Hartlep, A.; Pedain, C.; Sampson, J. H. Convection-enhanced Delivery of Therapeutics for Brain Disease, and Its Optimization. *Neurosurg Focus* **2006**, *20*, E12.
37. Lin, S. H.; Kleinberg, L. R. Carmustine Wafers: Localized Delivery of Chemotherapeutic Agents in CNS Malignancies. *Expert Rev Anticancer Ther* **2008**, *8*, 343–359.

38. Nagpal, S. The Role of BCNU Polymer Wafers (Gliadel) in the Treatment of Malignant Glioma. *Neurosurgery Clinics of North America* **2012**, *23*, 289–295.
39. Niyazi, M.; Siefert, A.; Schwarz, S. B.; Ganswindt, U.; Kreth, F.-W.; Tonn, J.-C.; Belka, C. Therapeutic Options for Recurrent Malignant Glioma. *Radiotherapy and Oncology* **2011**, *98*, 1–14.
40. Editor, B. C. H., Medical Drug “Wafers” Bring Hope to Brain Cancer Sufferers. *Telegraph.co.uk* **2005**.
41. Patchell, R. A.; Regine, W. F.; Ashton, P.; Tibbs, P. A.; Wilson, D.; Shappley, D.; Young, B. A Phase I Trial of Continuously Infused Intratumoral Bleomycin for the Treatment of Recurrent Glioblastoma Multiforme. *J. Neurooncol.* **2002**, *60*, 37–42.
42. Voulgaris, S.; Partheni, M.; Karamouzis, M.; Dimopoulos, P.; Papadakis, N.; Kalofonos, H. P. Intratumoral Doxorubicin in Patients with Malignant Brain Gliomas. *Am. J. Clin. Oncol.* **2002**, *25*, 60–64.
43. Reimold, I.; Domke, D.; Bender, J.; Seyfried, C. A.; Radunz, H.-E.; Fricker, G. Delivery of Nanoparticles to the Brain Detected by Fluorescence Microscopy. *Eur J Pharm Biopharm* **2008**, *70*, 627–632.
44. Tahara, K.; Miyazaki, Y.; Kawashima, Y.; Kreuter, J.; Yamamoto, H. Brain Targeting with Surface-modified poly(D,L-lactic-co-glycolic Acid) Nanoparticles Delivered via Carotid Artery Administration. *Eur J Pharm Biopharm* **2011**, *77*, 84–88.
45. Charest, G.; Sanche, L.; Fortin, D.; Mathieu, D.; Paquette, B. Glioblastoma Treatment: Bypassing the Toxicity of Platinum Compounds by Using Liposomal Formulation and Increasing Treatment Efficiency with Concomitant Radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2012**, *84*, 244–249.
46. Shin, B. J.; Burkhardt, J.-K.; Riina, H. A.; Boockvar, J. A. Superselective Intra-arterial Cerebral Infusion of Novel Agents after Blood-brain Disruption for the Treatment of Recurrent Glioblastoma Multiforme: a Technical Case Series. *Neurosurg. Clin. N. Am.* **2012**, *23*, 323–329, ix–x.
47. Weiss, N.; Miller, F.; Cazaubon, S.; Couraud, P.-O. Barrière Hématoencéphalique Partie III : Approche Thérapeutique Pour Franchir La Barrière Hématoencéphalique. *Revue Neurologique* **2010**, *166*, 284–288.
48. Doolittle, N. D.; Miner, M. E.; Hall, W. A.; Siegal, T.; Jerome, E.; Osztie, E.; McAllister, L. D.; Bubalo, J. S.; Kraemer, D. F.; Fortin, D.; *et al.* Safety and Efficacy of a Multicenter Study Using Intraarterial Chemotherapy in Conjunction with Osmotic Opening of the Blood-brain Barrier for the Treatment of Patients with Malignant Brain Tumors. *Cancer* **2000**, *88*, 637–647.
49. Riina, H. A.; Fraser, J. F.; Fralin, S.; Knopman, J.; Scheff, R. J.; Boockvar, J. A. Superselective Intraarterial Cerebral Infusion of Bevacizumab: a Revival of Interventional Neuro-oncology for Malignant Glioma. *J. Exp. Ther. Oncol.* **2009**, *8*, 145–150.
50. Riina, H. A.; Knopman, J.; Greenfield, J. P.; Fralin, S.; Gobin, Y. P.; Tsiouris, A. J.; Souweidane, M. M.; Boockvar, J. A. Balloon-assisted Superselective Intra-arterial Cerebral Infusion of Bevacizumab for Malignant Brainstem Glioma. A Technical Note. *Interv Neuroradiol* **2010**, *16*, 71–76.
51. Craparo, E. F.; Bondi, M. L.; Pitarresi, G.; Cavallaro, G. Nanoparticulate Systems for Drug Delivery and Targeting to the Central Nervous System. *CNS Neurosci Ther* **2011**, *17*, 670–677.
52. Kreuter, J. Drug Delivery to the Central Nervous System by Polymeric Nanoparticles: What Do We Know? *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**.

53. Zanotto-Filho, A.; Coradini, K.; Braganhol, E.; Schröder, R.; Oliveira, C. M. de; Simões-Pires, A.; Battastini, A. M. O.; Pohlmann, A. R.; Guterres, S. S.; Forcelini, C. M.; *et al.* Curcumin-loaded Lipid-core Nanocapsules as a Strategy to Improve Pharmacological Efficacy of Curcumin in Glioma Treatment. *Eur J Pharm Biopharm* **2012**.
54. Serwer, L. P.; Noble, C. O.; Michaud, K.; Drummond, D. C.; Kirpotin, D. B.; Ozawa, T.; Prados, M. D.; Park, J. W.; James, C. D. Investigation of Intravenous Delivery of Nanoliposomal Topotecan for Activity Against Orthotopic Glioblastoma Xenografts. *Neuro-oncology* **2011**, *13*, 1288–1295.
55. Sarin, H.; Kanevsky, A. S.; Wu, H.; Brimacombe, K. R.; Fung, S. H.; Sousa, A. A.; Auh, S.; Wilson, C. M.; Sharma, K.; Aronova, M. A.; *et al.* Effective Transvascular Delivery of Nanoparticles Across the Blood-brain Tumor Barrier into Malignant Glioma Cells. *Journal of Translational Medicine* **2008**, *6*, 80.
56. Steiniger, S. C. J.; Kreuter, J.; Khalansky, A. S.; Skidan, I. N.; Bobruskin, A. I.; Smirnova, Z. S.; Severin, S. E.; Uhl, R.; Kock, M.; Geiger, K. D.; *et al.* Chemotherapy of Glioblastoma in Rats Using Doxorubicin-loaded Nanoparticles. *Int. J. Cancer* **2004**, *109*, 759–767.
57. Brigger, I.; Morizet, J.; Aubert, G.; Chacun, H.; Terrier-Lacombe, M.-J.; Couvreur, P.; Vassal, G. Poly(ethylene Glycol)-coated Hexadecylcyanoacrylate Nanospheres Display a Combined Effect for Brain Tumor Targeting. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, *303*, 928–936.
58. Brigger, I.; Morizet, J.; Laudani, L.; Aubert, G.; Appel, M.; Velasco, V.; Terrier-Lacombe, M.-J.; Desmaële, D.; Angelo, J. d'; Couvreur, P.; *et al.* Negative Preclinical Results with Stealth Nanospheres-encapsulated Doxorubicin in an Orthotopic Murine Brain Tumor Model. *J Control Release* **2004**, *100*, 29–40.
59. Gabathuler, R. Approaches to Transport Therapeutic Drugs Across the Blood-brain Barrier to Treat Brain Diseases. *Neurobiol. Dis.* **2010**, *37*, 48–57.
60. Wong, H. L.; Wu, X. Y.; Bendayan, R. Nanotechnological Advances for the Delivery of CNS Therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 686–700.
61. Jain, K. K. Nanobiotechnology-based Strategies for Crossing the Blood-brain Barrier. *Nanomedicine (Lond)* **2012**, *7*, 1225–1233.
62. Boado, R. J.; Pardridge, W. M. The Trojan Horse Liposome Technology for Nonviral Gene Transfer Across the Blood-Brain Barrier. *Journal of Drug Delivery* **2011**, *2011*, 1–12.
63. Liu, L.; Guo, K.; Lu, J.; Venkatraman, S. S.; Luo, D.; Ng, K. C.; Ling, E.-A.; Mochhala, S.; Yang, Y.-Y. Biologically Active Core/shell Nanoparticles Self-assembled from Cholesterol-terminated PEG–TAT for Drug Delivery Across the Blood–brain Barrier. *Biomaterials* **2008**, *29*, 1509–1517.
64. Costa, P. M.; Cardoso, A. L.; Mendonça, L. S.; Serani, A.; Custodia, C.; Conceicao, M.; Simoes, S.; Moreira, J. N.; Pereira de Almeida, L.; Pedroso de Lima, M. C. Tumor-targeted Chlorotoxin-coupled Nanoparticles for Nucleic Acid Delivery to Glioblastoma Cells: A Promising System for Glioblastoma Treatment. *Mol Ther Nucleic Acids* **2013**, *2*, e100.
65. Zensi, A.; Begley, D.; Pontikis, C.; Legros, C.; Mihoreanu, L.; Wagner, S.; Büchel, C.; Briesen, H. von; Kreuter, J. Albumin Nanoparticles Targeted with Apo E Enter the CNS by Transcytosis and Are Delivered to Neurones. *J Control Release* **2009**, *137*, 78–86.
66. Wagner, S.; Zensi, A.; Wien, S. L.; Tschickardt, S. E.; Maier, W.; Vogel, T.; Worek, F.; Pietrzik, C. U.; Kreuter, J.; Briesen, H. von Uptake Mechanism of ApoE-Modified Nanoparticles on Brain Capillary Endothelial Cells as a Blood-Brain Barrier Model. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e32568.
67. Cheng, Y.; Morshed, R. A.; Auffinger, B.; Tobias, A. L.; Lesniak, M. S. Multifunctional Nanoparticles for Brain Tumor Imaging and Therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**.

68. Reddy, G. R.; Bhojani, M. S.; McConville, P.; Moody, J.; Moffat, B. A.; Hall, D. E.; Kim, G.; Koo, Y.-E. L.; Woolliscroft, M. J.; Sugai, J. V.; *et al.* Vascular Targeted Nanoparticles for Imaging and Treatment of Brain Tumors. *Clin Cancer Res* **2006**, *12*, 6677–6686.
69. Chien, A. J.; Illi, J. A.; Ko, A. H.; Korn, W. M.; Fong, L.; Chen, L.; Kashani-Sabet, M.; Ryan, C. J.; Rosenberg, J. E.; Dubey, S.; *et al.* A Phase I Study of a 2-day Lapatinib Chemosensitization Pulse Preceding Nanoparticle Albumin-bound Paclitaxel for Advanced Solid Malignancies. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 5569–5575.

Publication n°5

**Brain tumor targeting strategies via coated ferrociphenol
lipid nanocapsules**



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejpb

Note

Brain tumour targeting strategies via coated ferrociphenol lipid nanocapsules

Anne-Laure Laine^{a,b,1}, Ngoc Trinh Huynh^{a,b,1}, Anne Clavreul^{a,b,c}, Julien Balzeau^d, Jérôme Béjaud^{a,b}, Anne Vessieres^e, Jean-Pierre Benoit^{a,b}, Joël Eyer^d, Catherine Passirani^{a,b,*}^a Ingénierie de la Vectorisation Particulaire in Micro et Nanomédecines Biomimétiques, LUNAM Université, Angers, France^b Inserm – U1066 IBS-CHU, Angers, France^c Département de Neurochirurgie, CHU, Angers, France^d Laboratoire Neurobiologie et Transgenèse, Inserm, Angers, France^e CNRS, UMR 7223, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris, Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 December 2011

Accepted in revised form 18 April 2012

Available online 26 April 2012

Keywords:

OX26-MAb

NFL-TBS peptide

Intra-carotid injection

LNCs

Brain tumour

CED

ABSTRACT

In this study, a new active targeting strategy to favour ferrociphenol (FcdiOH) internalisation into brain tumour cells was developed by the use of lipid nanocapsules (LNCs) coated with a cell-internalising peptide (NFL-TBS.40–63 peptide) that interacts with tubulin-binding sites. In comparison, OX26 murine monoclonal antibodies (OX26-MAb) targeting transferrin receptors were also inserted onto the LNC surface. The incorporation of OX26 or peptide did not influence the *in vitro* antiproliferative effect of FcdiOH-LNCs on the 9L cells since their IC50 values were found in the same range. *In vivo*, intracerebral administration of OX26-FcdiOH-LNCs or peptide-FcdiOH-LNCs by convection enhanced delivery did not enhance the animal median survival time in comparison with untreated rats (25 days). Interestingly, intra-carotid treatment with peptide-FcdiOH-LNCs led to an ameliorated survival time of treated rats with the presence of animals surviving until days 35, 40 and 44. Such results were not obtained with OX26-MABs, demonstrating the benefit of NFL-TBS.40–63 peptide as an active ligand for peripheral drug delivery to the brain tumours.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Nanotechnology has emerged as an interesting field in engineering and designing new systems for drug delivery in oncology such as brain tumour therapy. It can provide medical and pharmaceutical benefits because it enables the control of drug characteristics such as solubility, bioavailability, vascular circulation time, and site-specific delivery [1]. Our laboratory has developed and patented a novel nanoscale system, the so-called lipid nanocapsules (LNCs) [2]. They present an oily core corresponding to medium-chain triglycerides surrounded by tensioactives providing a cohesive membrane made of lecithin and polyethylene glycol 660 hydroxystearate at high density. Thanks to their oily core, these LNCs allow the encapsulation of various lipophilic compounds and represent a potential platform for drug delivery in cancer therapy [2]. Since recently, we have encapsulated into LNCs the organometallic anticancer 2-ferrocenyl-1,1-bis(4-hydroxyphenyl)-but-1-ene (or FcdiOH). These FcdiOH-LNCs were shown to be promising in the 9L rat gliosarcoma model [3]. In order to improve

the drug delivery to the site of interest, i.e. the cancer tissue, further modifications of the LNC surface by coating with longer PEG chains in a context of a passive targeting strategy, or by incorporating specific molecules through an active targeting strategy, can be carried out [2]. Two main targeting agents are of particular interest: OX26 murine monoclonal antibody (OX26-MAb) to the rat transferrin receptor (TfR) and NFL-TBS.40-63 peptide derived from the light neurofilament subunit (NFL).

Since the transferrin receptor is overexpressed at the surface of brain tumour cells but is also present in the blood-brain barrier [4], antibodies against the TfR such as OX26 conjugated to nanoparticles have been widely assessed for brain-specific delivery [5,6]. Furthermore, in a previous study, we assessed the targeting ability of the antibody covalently attached onto the LNC surface, and its beneficial effect on drug delivery into a healthy brain has been demonstrated [7].

NFL-TBS.40-63 peptide that specifically interacts with tubulin-binding sites (TBSs) was shown to enter in multiple cancer cell lines leading to disruption of their microtubule network and reduction of their proliferation [8].

Taking those advantages into consideration, we compared in the present study the effect of peptide-FcdiOH-LNCs and OX26-FcdiOH-LNCs on the proliferation of 9L gliosarcoma cells *in vitro* and *in vivo*. In addition, to favour the drug delivery to the site of

* Corresponding author. Ingénierie de la Vectorisation Particulaire in Micro et Nanomédecines Biomimétiques, LUNAM Université, F-49933 Angers, France. Tel.: +33 244 688534; fax: +33 244 688546.

E-mail address: catherine.passirani@univ-angers.fr (C. Passirani).

¹ These authors contributed equally to this work.

interest, two loco-regional administration routes were assessed, an intra-tumour injection by convection enhanced delivery (CED) and a peripheral injection via the carotid artery.

2. Materials and methods

2.1. Chemical materials

Ferrociphenol was prepared by a McMurry coupling reaction [9]. The lipophilic Labrafac® WL1349 (caprylic-capric acid triglycerides) was purchased from Gattefosse S.A. (Saint-Priest, France). Lipoïd® S75-3 (soybean lecithin at 69% of phosphatidylcholine) came from Lipoïd GmbH (Ludwigshafen, Germany); Solutol® HS15 (a mixture of free polyethylene glycol 660 and polyethylene glycol 660 hydroxystearate) from BASF (Ludwigshafen, Germany) and NaCl from Prolabo (Fontenay-sous-bois, France). Deionised water was acquired from a Milli-Q plus system (Millipore, Paris, France) and sterile water from Cooper (Melun, France). DSPE-mPEG2000-maleimide was kindly provided by Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA).

2.2. Tumour cell line and culture

Rat 9L gliosarcoma cells were obtained from the European Collection of Cell Culture (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France). The cells were cultured at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ in Eagle's minimal essential medium (EMEM) (Lonza, Verviers, Belgium) supplied with 1% non-essential amino acids (Lonza), 10% foetal calf serum (FCS) (Lonza) and 1% antibiotic and antimycotic solution (Sigma).

2.3. Animals

Syngeneic Fischer F344 female rats, weighing 160–180 g, were obtained from Charles River Laboratories France (L'Arbresle, France). All experiments were performed on 10–11-week-old female Fisher rats. Animal care was carried out in strict accordance with French Ministry of Agriculture regulations.

2.4. Preparation of the LNCs

2.4.1. Ferrociphenol-loaded LNCs

LNCs were prepared according to the original described procedure [2]. Briefly, the preparation process involved 2 steps. Step I consisted of mixing all the components (Solutol® HS15 (17% w/w), Lipoïd® S75-3 (1.5% w/w), Labrafac® WL1349 (20% w/w), NaCl (1.75% w/w) and water (59.75% w/w)) under magnetic stirring and heating from room temperature to 85 °C. Three cycles of progressive cooling and heating between 85 and 60 °C were then carried out. Step II was an irreversible shock induced by sudden dilution with cold water (28.5% (v/v)) to the mixture at 70–72 °C. Slow magnetic stirring was then applied to the suspension for 5 min.

To load the anticancer agent into the oily core of LNCs, FcdiOH was firstly dispersed in Labrafac® under ultrasound at 4% (w/w) for 30 min, and the resulting lipophilic phase was then mixed with other components, as described above, to prepare a suspension of FcdiOH-LNCs at a concentration of 6.5 mg of FcdiOH per g of LNC suspension.

2.4.2. Peptide-FcdiOH-LNCs

Prior to incubation with the peptide (sequence: YSSY-SAPVSSLSVRRYSSTSSGS), the FcdiOH-LNC suspension was passed through a PD-10 sephadex column (Amersham Biosciences Europe, Orsay, France) and then concentrated via centrifugations by using a Millipore Amicon 100 kDa centrifugal filter device (Millipore, St.

Quentin-Yvelines, France). The resulting LNC suspension (1 mL) was then incubated for 24 h with 369 µL of 1 mM peptide solution in MilliQ water at room temperature under slow magnetic rotation.

2.4.3. OX26-FcdiOH-LNCs

OX26-FcdiOH-LNCs were prepared following the previously described procedure [7]. Briefly, DSPE-mPEG2000-maleimide was incorporated to the surface of FcdiOH-LNCs 6.5 mg/g at the final concentration of 20 mM by the post-insertion technique at 60 °C for 2 h to formulate functionalized LNCs. The resulting LNC suspension was then passed through a Sepharose CL4-B column, equilibrated with HEPES buffer (pH 7.4, 0.1 M) to separate the functionalized LNCs from micelles composed of free DSPE-mPEG2000-maleimide.

OX26 MAb was purified from a supernatant harvested from cultures of the OX26 hybridoma cell line. The obtained OX26 MAb underwent a thiolation process followed by incubation over night at room temperature with functionalized FcdiOH-LNCs leading to the formation of OX26-FcdiOH-LNCs.

2.5. LNC characterisation

The determination of the drug loading is achieved by spectrophotometry at 450 nm after dilution at 1:10 in a 22/67/11 (v/v/v) Ethanol/THF/water mixture.

The average hydrodynamic diameter and the polydispersity index (PI) of nanocapsules were determined at 25 °C, in triplicate, by using a Malvern Zetasizer® (Nano Serie DTS 1060, Malvern Instruments S.A., Worcestershire, UK). For the measurement, the LNCs were diluted at 1:100 (v/v) in deionised water.

2.6. In vitro cell viability

A suspension of 9L cells (1.9×10^4 cells/mL) was put on each well of 24-well plates for 48 h. On day 2, the culture media was removed, and cells were treated with free FcdiOH or different types of FcdiOH-LNC suspensions in the concentration range from 0.01 to 100 µmol/L.

After 72 h of incubation at 37 °C, the media containing treatments was replaced by new media. Cell survival percentage was estimated by the MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) survival assay (Promega, Lyon, France). Briefly, the MTS solution (100 µL) was added into each well, and the plates were incubated at 37 °C for 2 h 30. The optical density values (OD) were measured at 490 nm for dark purple intensity and at 750 nm for subtraction of background using a multiwell-scanning spectrophotometer (Multiskan Ascent, Labsystems SA, Cergy-pontoise, France). The maximal absorbance was determined by incubating cells with culture media and was considered as 100% survival. All experiments were performed in triplicate and presented as Mean ± SD.

2.7. In vivo studies

2.7.1. Intracranial gliosarcoma cell inoculation

The animals were anaesthetised by intra-peritoneal injection of 1.0 ml/kg of a 1:1 (v/v) mixture of ketamine (100 mg/ml) (Clorke-tam®, Vétotoquinol, Lure, France) and xylazine (20 mg/ml) (Rompun®, Bayer, Puteaux, France). The incision site was shaved, and the head was immobilised in a stereotaxic frame (Lab Standard Stereotaxic; Stoelting, Chicago, IL). A middle scalp incision was made, and a burr hole was drilled into the skull using a small dental drill. Ten microlitres of 10^5 9L cell/mL suspension was injected stereotaxically into the rat right striatum as previously performed [3] with the following coordinates: 1 mm posterior from the bregma,

3 mm lateral from the sagittal suture, and 5 mm below the dura (with the incisor bar set at 0 mm).

2.7.2. Efficacy study

On day 6 after 9L cell implantation, tumour-bearing rats were treated with OX26-FcdiOH-LNCs or peptide-FcdiOH-LNCs by CED administration (60 µL), or intra-carotid injection (400 µL). The procedures of CED and intra-carotid injection were detailed elsewhere [10]. The untreated control group did not receive any treatment. Animals were weighed every day. Rats were sacrificed in a CO₂ chamber when they lost 20% of body weight and/or as soon as any distress symptom appeared. The death was recorded as if it had occurred on the next day of sacrifice and was represented as the survival time of animals on the Kaplan–Meier curves.

2.7.3. Statistical analysis

Statistical comparisons between the control group and the treated groups were estimated from the log-rank test (Mantel–Cox Test) by using StatView software, version 5.0 (SAS Institute Inc.). The level of significance was set at $P < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. Physicochemical properties of LNC suspensions

Blank LNCs presented an average hydrodynamic diameter of 47.6 ± 0.8 nm and a very narrow size dispersion (Pdl = 0.041). As described in a previous study relating the good encapsulation of FcdiOH into the oily core of LNCs [3], its loading did neither alter the particle size nor the Pdl (45.0 ± 2.5 nm and 0.054, respectively). The adsorption of NFL-TBS peptide onto the LNC surface appeared to have no effect on the particle size (45.7 ± 1.4 nm), but increased significantly the Pdl (0.199). With the assumption that all peptides interact with LNCs, the rate of coupled molecules was estimated around 46 peptides per LNC. In contrast to the NFL-TBS.40–63 peptide, the covalent coupling of thiolated OX26 to maleimide functions of PEG chains increased the particle size of about 18 nm (up to 63.7 ± 3.2 nm) as compared to FcdiOH-LNCs. This was in agreement with the study of [7] who reported an increase in the hydrodynamic diameter of the obtained OX26-LNCs between 12 and 30 nm [7]. The final number of bound OX26 Mabs was assessed around 1 per LNC. The drug payloads of peptide-FcdiOH-LNCs and OX26-FcdiOH-LNCs are summarised in Table 1. The decrease in concentration in FcdiOH for OX26-FcdiOH-LNCs compared to non-coated FcdiOH-LNCs resulted from dilutions during incorporation process of active ligands onto the LNC surface.

3.2. Antiproliferative effect in vitro

The MTS assay was used to determine *in vitro* cytostaticity after exposure of nanocarriers to 9L gliosarcoma cells with a cascade concentration range of FcdiOH (0.01–100 µM). The cell survival profiles of the various kinds of FcdiOH-LNCs and free FcdiOH were illustrated in Fig. 1. At low concentrations (0.01–0.1 µM), neither free FcdiOH nor FcdiOH-LNCs altered the cell growth (over 80%). Cell survival was dramatically decreased (below 20%) at the concentration

Table 1
Concentration in FcdiOH encapsulated into peptide-FcdiOH-LNCs and OX26-FcdiOH-LNCs compared to the drug payload of non-coated FcdiOH-LNCs.

Treatment	Concentration (mg/mL)
FcdiOH-LNCs	6
Peptide-FcdiOH-LNCs	6,1 (carotid) – 5,5 (CED)
OX26-FcdiOH-LNCs	3,4

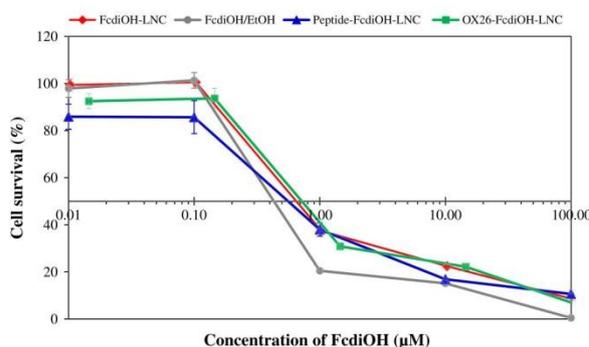


Fig. 1. Cell survival of 9L gliosarcoma cells after 72 h exposure to different treatments with free FcdiOH or with the various kinds of FcdiOH-LNCs at different concentrations of drug (0.01–100 µM). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

of 10 µM, resulting in an IC₅₀ of about 0.4 µM for free FcdiOH and 0.6 µM for FcdiOH-LNCs. Moreover, the incorporation of either peptides or OX26 Mabs did not compromise the cytostatic effect of FcdiOH-LNCs since their IC₅₀ was 0.55 and 0.7 µM, respectively.

3.3. Survival studies

Peptide-FcdiOH-LNCs and OX26-FcdiOH-LNCs were administered through intra-cranial CED or carotid delivery in 9L gliosarcoma-bearing rats. Fig. 2 shows the animal survival time plotted on Kaplan–Meier curves.

We observed that CEDs of OX26-FcdiOH-LNCs and peptide-FcdiOH-LNCs significantly reduced the survival compared to the control group ($P < 0.05$). The median survival time of control rats was 25 days, whereas the medians of OX26-FcdiOH-LNC- and peptide-FcdiOH-LNC-treated rats were 22 and 11 days, respectively.

This toxicity was not observed previously after treatment with non-targeted FcdiOH-LNCs [10]. We could hypothesise that intra-tumour CED of these targeted LNCs with penetrating properties, especially for peptide-FcdiOH-LNCs, induces a large diffusion of LNCs which can affect tumour cells but also healthy cells leading to non-elucidated side effects and morbidity.

In comparison with CED, intra-carotid delivery of OX26-FcdiOH-LNCs and peptide-FcdiOH-LNCs did not induce toxicity. 9L gliosarcoma-bearing rats receiving intra-carotid injection of OX26-FcdiOH-LNCs showed a similar median survival time as control rat one. This unsuccessful treatment could be linked to the low administered dose of FcdiOH as we previously showed that antitumour efficacy of FcdiOH was dose-dependent on an orthotopic gliosarcoma model [3]. Therefore, the FcdiOH concentration

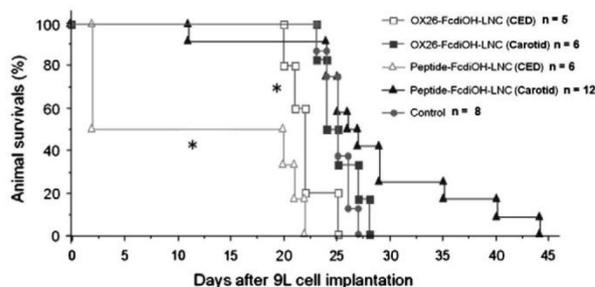


Fig. 2. Kaplan–Meier survival plots for 9L gliosarcoma-bearing rats treated with peptide-FcdiOH-LNCs and OX26-FcdiOH-LNCs by means of CED or intra-carotid injection. *Significantly different from control group ($P < 0.05$) (n = number of rats).

in the OX26–FcdiOH–LNCs might be below the pharmacologically active dose. Furthermore, the low OX26–Mabs amount coupled onto the LNCs may limit the immunonanocapsule delivery across the BBB. However, a high density of Mabs at the surface of nanoparticles is known to reduce their stealth properties [6]. In consequence, an optimal coupling rate must be achieved for a suitable brain delivery balanced with a low clearance phenomenon.

Interestingly, we observed that intra-carotid treatment with peptide–FcdiOH–LNCs increased the survival for almost half of the rats (5/12) up to 44 days. This increase in survival time had never been reached either with CED or intracarotid treatment of non-targeted LNCs [10] and represents an outstanding outcome compared to control group with the longest survival set at 27 days.

In conclusion, the treatment by intra-carotid injection with the peptide–FcdiOH–LNCs demonstrated an interesting efficacy that was strengthened by the presence of a long-term survival rat until 44 days after 9L cell implantation. This new active targeting strategy may offer a promising approach for glioma treatment, and further studies are required to ensure a safe clinical use of peptide–FcdiOH–LNCs.

Acknowledgments

The authors would like to thank Jérôme Roux and Pierre Legras (Service Commun d'Animalerie Hospitalo-Universitaire (SCAHU), Angers, France) and Katy Albertini for their technical assistance

in animal experiments. We are also grateful to Pascal Pigeon for the synthesis of FcdiOH. This work was supported by grants from "La Ligue Nationale Contre le Cancer" and "ANR Mecaferrol".

References

- [1] S.D. Caruthers, S.A. Wickline, G.M. Lanza, Nanotechnological applications in medicine, *Curr. Opin. Biotechnol.* 18 (2007) 26–30.
- [2] N.T. Huynh, C. Passirani, P. Saulnier, J.-P. Benoit, Lipid nanocapsules: a new platform for nanomedicine, *Int. J. Pharm.* 379 (2009) 201–209.
- [3] E. Allard, N.T. Huynh, A. Vessières, P. Pigeon, G. Jaouen, J.-P. Benoit, C. Passirani, Dose effect activity of ferrocifen-loaded lipid nanocapsules on a 9L-glioma model, *Int. J. Pharm.* 379 (2009) 317–323.
- [4] W.A. Hall, Transferrin receptor on glioblastoma multiforme, *J. Neurosurg.* 74 (1991) 313–314.
- [5] K. Ulbrich, T. Hekmatara, E. Herbert, J. Kreuter, Transferrin- and transferrin-receptor-antibody-modified nanoparticles enable drug delivery across the blood–brain barrier (BBB), *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 71 (2009) 251–256.
- [6] J. Huwyler, D. Wu, W.M. Pardridge, Brain drug delivery of small molecules using immunoliposomes, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 93 (1996) 14164–14169.
- [7] A. Béduneau, F. Hindré, A. Clavreul, J.-C. Leroux, P. Saulnier, J.-P. Benoit, Brain targeting using novel lipid nanovectors, *J. Control. Release* 126 (2008) 44–49.
- [8] A. Bocquet, R. Berges, R. Frank, P. Robert, A.C. Peterson, J. Eyer, Neurofilaments bind tubulin and modulate its polymerization, *J. Neurosci.* 29 (2009) 11043–11054.
- [9] G. Jaouen, S. Top, A. Vessières, G. Leclercq, J. Quivy, L. Jin, A. Croisy, The first organometallic antioestrogens and their antiproliferative effects, *C. R. Acad. Sci. Ser. IIC Chem.* 3 (2000) 89–93.
- [10] N.T. Huynh, C. Passirani, E. Allard-Vannier, L. Lemaire, J. Roux, E. Garcion, A. Vessières, J.-P. Benoit, Administration-dependent efficacy of ferrociphenol lipid nanocapsules for the treatment of intracranial 9L rat gliosarcoma, *Int. J. Pharm.* 423 (2012) 55–62.

**Résultats non publiés : étude de différentes
stratégies d'administration des LNC pour une
délivrance cérébrale**

En continuité des travaux de thèse du Dr. Huynh, de nouvelles modalités d'administration ont été testées pour le traitement du gliome. Dans un premier temps, l'infusion continue des LNC par voie intraventriculaire puis intracérébrale via des pompes osmotiques a été évaluée. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux injections intraveineuses multiples. Ces résultats sont présentés dans le paragraphe suivant.

1. Infusion Intracérébroventriculaire (ICV) des LNC chargées en ferrocifènes

En collaboration avec l'équipe du Pr. F. Lefranc (Université libre de Bruxelles), nous avons décidé d'appliquer la stratégie des pompes osmotiques pour l'infusion intraventriculaire de LNC de ferrocifènes sur des rats porteurs de gliomes intracérébraux (9L). Quatre groupes de 10 rats ont été considérés comportant un groupe contrôle recevant du sérum physiologique, un groupe de LNC blanches, un groupe de LNC de FcdiOH et un groupe de LNC d'ansa-FcdiOH. Les caractéristiques des pompes utilisées sont présentées dans le tableau 1. Afin d'atteindre une dose journalière délivrée relativement élevée, les LNC ont été concentrées par réduction de la quantité d'eau. Des études préliminaires ont été menées afin de s'assurer de la stabilité des actifs à 37°C sur deux semaines (durée de l'infusion), de la stabilité physicochimique des LNC et de la libération continue et homogène des pompes.

Caractéristique	ICV
Temps d'infusion	2 semaines
V total	2 mL
Débit	5 µL/h
Dose ferrocifène	225 mg/kg
C LNC	280 mg/mL

Tableau 1 : Caractéristiques des pompes osmotiques

Concernant l'expérimentation animale, les pompes ont été chirurgicalement placées en sous-cutané au 6^{ème} jour post-injection des cellules tumorales (délai standard), avec perfusion du 3^{ème} ventricule via la canule d'infusion (Fig. 1).

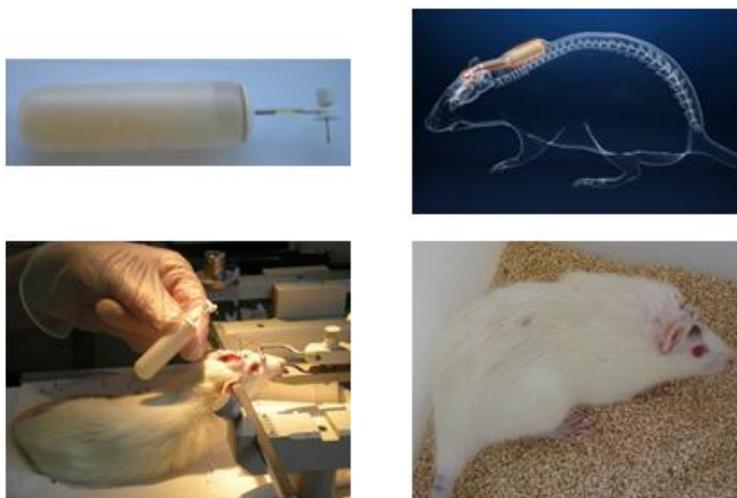


Fig. 1 : Implantation des pompes

Bien que l'infusion ait été prévue pour 2 semaines, à J2, 50% des animaux du groupe LNC blanches et 80% dans chaque groupe de LNC chargées étaient décédés et les rats « survivants » de ces 3 groupes LNC présentaient des signes de détresse. Seuls les rats recevant le sérum physiologique se portaient relativement bien (Fig. 2).

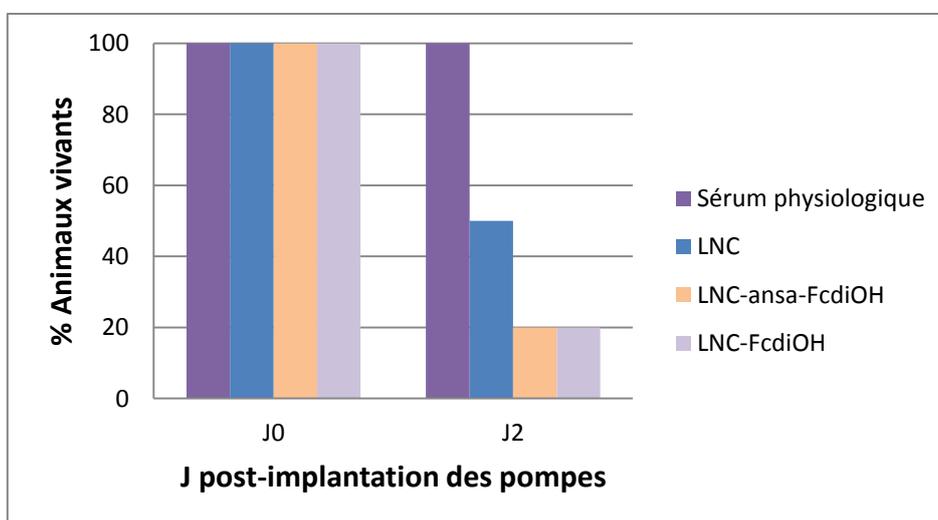


Fig. 2 : Survie des animaux post-implantation des pompes

Afin de déterminer la cause de cette mortalité précoce, tous les animaux des groupes LNC et 5 rats sur 10 du groupe sérum physiologique ont été sacrifiés à J2 et leurs cerveaux ont été prélevés et immergés dans du formol, puis sujets à des analyses histologiques. Les 5 rats du

groupe contrôle salin gardés vivant ont permis d'évaluer l'impact de la pompe sur la survie. Le suivi clinique s'est achevé lorsque ces rats ont présenté une perte de poids de 20 % dans un délai correspondant à l'évolution tumorale (\pm 25-30 jours). L'analyse de leur cerveau a mis en évidence une importante masse tumorale dans l'hémisphère injectée. La pompe ne semble donc pas avoir eu d'incidence sur la survie de ces animaux ni sur la croissance tumorale.

Concernant les rats traités par les LNC, les premières analyses histologiques effectuées par le Pr. Lefranc ont révélé une encéphalite aiguë avec forte activation de la microglie conduisant à l'obstruction du système ventriculaire (Fig. 3). Cette inflammation n'est pas présente sur les coupes de cerveaux de rats traités par sérum physiologique.

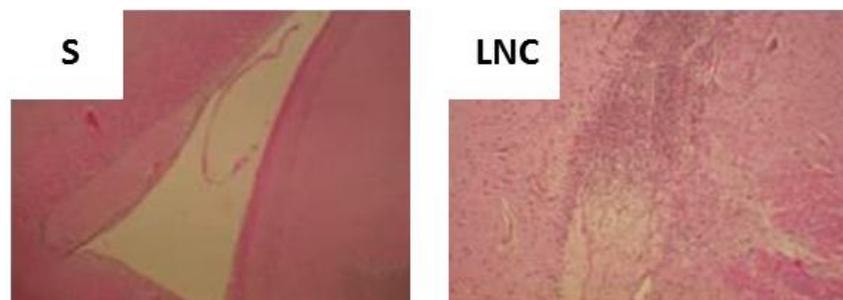


Fig. 3 : Images du système ventriculaire de rats traités par sérum physiologique (S) ou LNC.

Pour une analyse histologique plus approfondie, nous avons collaboré avec le Pr. Rousseau, anatomopathologiste au CHU d'Angers. Suite à l'observation des lames, la présence d'amas de germes a conduit au diagnostic de méningite purulente (Fig. 4). Les conclusions ont également indiqué la présence d'une méningite modérée pour les salins, probablement au niveau du site d'injection mais qui n'a cependant pas conduit à leur décès (5 rats « survivants »).

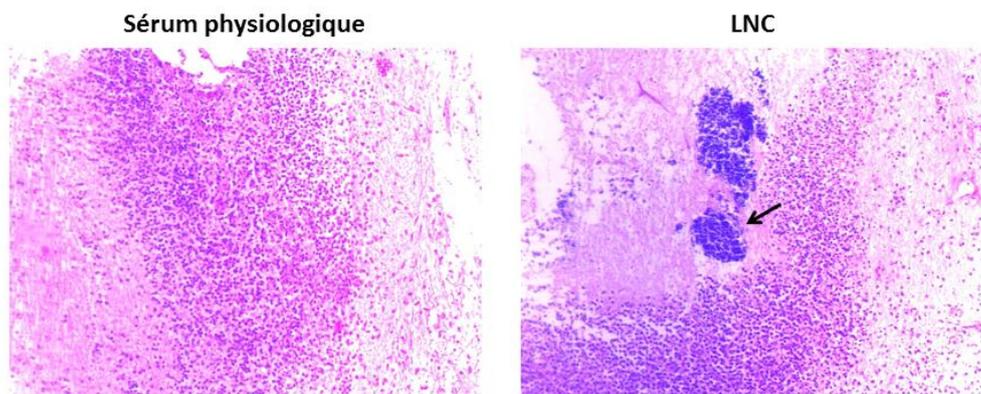


Fig 4 : Images des cerveaux d'animaux traités par sérum physiologique ou LNC. Amas de germe indiqué par une flèche

Au vu de ces résultats, des tests de contamination bactériologique ont été effectués sur les différentes formulations injectées en collaboration avec le département de bactériologie (Dr. Kempf) du CHU. Pour confirmer le retour négatif préalable d'identification d'endotoxines (test LAL), les formulations ont été mises en culture sur différentes géloses (gélose au sang aérobie et anaérobie, gélose chocolat sous CO₂ et gélose UTI) ainsi qu'en bouillon d'enrichissement (BHI cœur-cerveille et Schaedler (anaérobie)). Aucune de ces analyses n'a révélé la présence de bactérie, confirmant la stérilité des formulations.

Afin de mettre au point un modèle de toxicité aiguë, des injections intraventriculaires en bolus ont été effectuées chez la souris (1 injection de LNC de 10 µL ou 20 µL / animal). Cependant aucun signe clinique n'a pu être observé. L'injection répétée ICV pourrait donc être envisagée comme alternative à l'infusion continue. Cette approche nécessite un dispositif adéquat type réservoir Ommaya, pour éviter un acte chirurgical à chaque administration.

Compte tenu de ces différentes observations, deux hypothèses ont été formulées pour expliquer ces décès précoces.

1 – L'infusion continue de LNC provoquerait la stimulation de la microglie et entrainerait la rupture de la BHE¹ en laissant le passage libre aux bactéries circulantes. En effet, l'activation de la microglie est associée à la production de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO)¹ qui, en production excessive, augmente la perméabilité de la BHE². Cette réponse microgliale peut être amplifiée par la présence des ferrocifènes dont le mécanisme d'action impliquerait la production de DRO. Ceci pourrait être à l'origine de la tendance toxique plus prononcée pour les groupes traités par les LNC chargées en actifs. Cette production d'espèce réactives a

également été décrite suite à l'exposition de cellules microgliales à des nanoparticules d'oxyde de titane³. De plus, les LNC peuvent également être à l'origine de la production de DRO, comme récemment démontré pour des liposomes chargés positivement ou négativement lors d'une exposition à des macrophages⁴.

2 – L'introduction du cathéter lors de la chirurgie serait vecteur de bactérie. Le système immunitaire étant accaparé et saturé par les LNC, il ne pourrait lutter contre l'infection bactérienne contrairement aux animaux traités par sérum physiologique.

2. Infusion intratumorale des LNC chargées en ferrocifènes

Bien que la stratégie de perfusion ventriculaire n'ait pas été satisfaisante, la technique d'infusion prolongée nous semble être une approche intéressante pour une délivrance intratumorale, permettant de baigner la tumeur continuellement sous un débit de principe actif et s'apparentant à l'utilisation des implants de Gliadel[®]. De plus, cette localisation confinée du principe actif libéré pourrait limiter la toxicité rencontrée au sein du système ventriculaire.

Nous avons donc envisagé l'utilisation des pompes osmotiques pour une délivrance intratumorale chez l'animal. Cette approche s'apparente à la technique de CED sur le principe d'infusion forcée du principe actif mais l'utilisation des pompes permet une délivrance continue sur plusieurs jours que ne permet pas la CED telle que nous l'avons pratiquée. Par conséquent, alors qu'une injection unique par CED peut être éliminée par les fluides interstitiels, la pompe permet de maintenir une concentration intratumorale constante. De plus, cette stratégie de libération sur une période longue s'avoisine à la pratique de la CED chez l'homme en clinique.

Pour cette expérimentation, le volume délivré et la dose ont été réduits par rapport aux travaux précédents, afin de limiter les risques de toxicité. Les caractéristiques de la pompe sont présentées dans le tableau 2.

Caractéristique	IT
Temps d'infusion	2 semaines
V total	200 µL
Débit	0,5µL/h
Dose ansa-FcdiOH	10 mg/kg
C LNC	120 mg/mL

Tableau 2 : Caractéristiques des pompes osmotiques

Concernant la formulation, il a été récemment montré que le revêtement dense de la surface des nanoparticules par des chaînes de PEG améliorerait la distribution des objets à travers le parenchyme cérébral grâce à la minimisation des interactions adhésives⁵. Par conséquent, l'utilisation de la nouvelle formulation de LNC PEGylées OS a semblé appropriée à l'administration intratumorale de ferrocifènes par les pompes osmotiques. Un groupe traité avec du ferrocifène solubilisé dans des hydroxypropyl-β-cyclodextrines (Kleptose HPB, Roquette) a été ajouté, permettant d'évaluer, le cas échéant, l'effet toxique du principe actif. Grâce à leur cavité centrale hydrophobe, les cyclodextrines ont une grande capacité à encapsuler les molécules peu solubles dans l'eau. Elles sont également recommandées par les fournisseurs des pompes osmotiques dans le cadre de délivrance dans le SNC pour leur profil non toxique⁶. Six groupes ont donc été constitués, un groupe traité par du sérum physiologique, un groupe par des cyclodextrines, un groupe par des LNC OS, un groupe par des cyclodextrines d'ansa-FcdiOH et un groupe par des LNC OS d'ansa-FcdiOH.

Comme précédemment, 6 jours après l'injection des cellules tumorales, les pompes ont été implantées en sous-cutané et connectées à une canule d'infusion positionnée à l'emplacement de l'inoculation tumorale (Fig. 5).

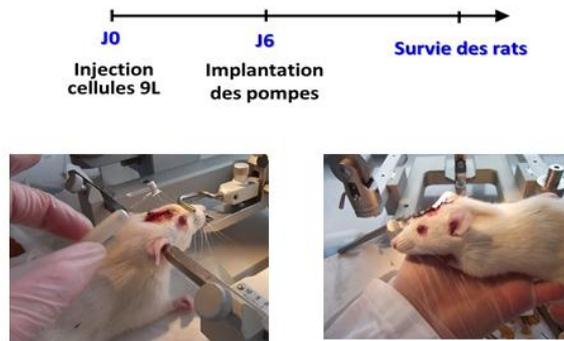


Fig. 5 : Implantation des pompes osmotiques

A J12 post-inoculation tumorale (J6 post implantation des pompes), les animaux des groupes LNC OS, LNC-ansa-FcdiOH OS, et cyclodextrines-ansa-FcdiOH présentaient une forte chute de poids et des signes de souffrance entraînant la nécessité d'une euthanasie (Fig. 6). Tous les animaux incluant les animaux contrôles (à l'exception de 2 rats laissés vivant pour suivre l'évolution tumorale) ont donc été sacrifiés et les cerveaux ont été prélevés. L'anatomopathologiste a décrit à nouveau la présence de foyer abcédé pour tous les animaux. La présence de germe ne peut cependant pas être le seul facteur de mortalité puisque les 2 rats traités avec du sérum physiologique sont décédés à la suite de leur tumeur et non pas suite à l'infection. Les deux hypothèses émises précédemment sont donc également applicables dans le cas présent. Ces travaux ont néanmoins permis de mettre en évidence une toxicité du principe actif indépendante de celle observée pour les LNC.

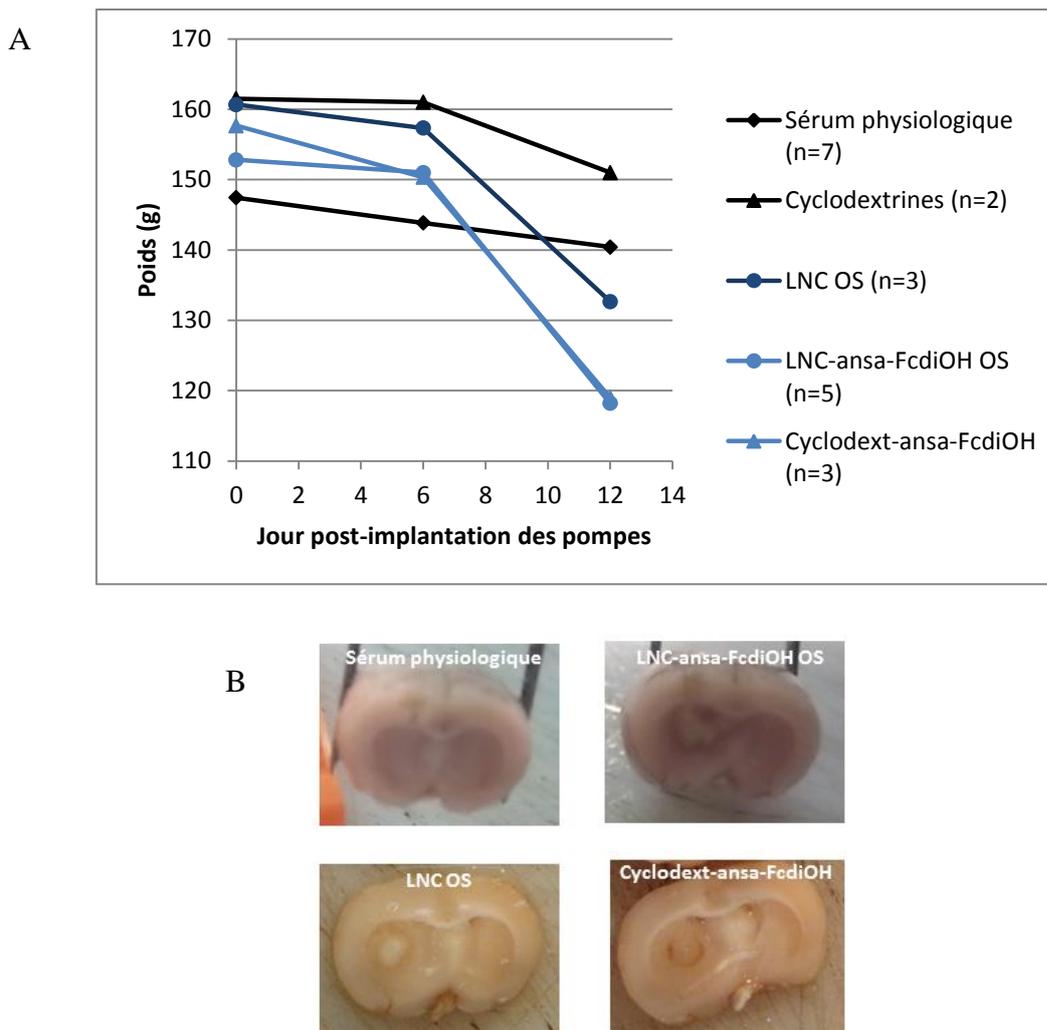


Fig. 6 : Evaluation de la toxicité suite à l'infusion intratumorale de différentes formulations à travers le suivi du poids des animaux (moyenne par groupe) (A) et sur les cerveaux *ex vivo* (B)

Cette toxicité aigüe après infusion cérébrale de nanoparticules n'est pas un phénomène isolé puisqu'il a été reporté récemment dans la littérature la manifestation de neurotoxicités similaires pour la suspension liposomale de cisplatine (LipoplatineTM) après administration par CED⁷. De façon inattendue, l'injection de LipoplatineTM a conduit à une toxicité sévère quelques heures à quelques jours post-injection selon la dose administrée. Ces effets secondaires sont attribués à une toxicité intrinsèque des liposomes ainsi qu'une neurotoxicité du cisplatine. Les auteurs suggèrent d'après les analyses histologiques, la manifestation d'un œdème cérébral aigu pour les fortes doses et des effets toxiques dus à un stress oxydatif pour les doses plus faibles. Il est cependant intéressant de noter que cette même formulation n'a pas montré de tels effets toxiques lors d'une injection par voie carotidienne chez le rat⁸ et a

été bien tolérée par voie intraveineuse chez l'homme au cours d'essais cliniques en thérapie anticancéreuse⁹.

Jusqu'à présent, l'injection intracérébrale (CED ou bolus) de LNC n'avait pas été associée à une telle toxicité. Tout produit thérapeutique possède une fenêtre de concentration pour laquelle son administration est sans risque de toxicité. Au-delà de la dose maximale tolérée, l'injection est associée à des effets indésirables. La poursuite de ces travaux ne pourra donc se faire que lorsque la concentration non toxique d'utilisation des LNC par infusion ICV ou intratumorale aura été déterminée. Cette étape est cependant délicate puisqu'elle demande la mise au point d'un modèle permettant d'évaluer la toxicité des LNC tout en répondant aux critères éthiques d'expérimentation animale. Des études préliminaires en culture cellulaire pourraient être envisagées avec l'évaluation de l'activation de la microglie par les LNC ainsi que l'effet dose des LNC sur l'intégrité d'un modèle cellulaire de BHE.

3. Vectorisation des ferrocifènes par voie intraveineuse

Comme précédemment évoqué, l'application des LNC pour l'injection iv de chimiothérapie est particulièrement bien adaptée puisque ces vecteurs sont constitués de composants biocompatibles et ont été optimisés dans le but d'échapper au système immunitaire et éviter la filtration rénale. De plus, il a été démontré que les LNC ont la capacité d'inhiber la P-gp¹⁰. Cette propriété leur permet d'échapper aux transporteurs d'efflux présents à la surface de la BHE et des cellules tumorales^{11,12}.

La chimiothérapie iv chez l'homme s'effectue généralement sur plusieurs jours par semaine selon un rythme hebdomadaire ou mensuel. Les différents cycles de traitement sont espacés de jours de repos permettant aux tissus sains de se régénérer suite à l'attaque non sélective des agents thérapeutiques. Compte tenu des modalités cliniques, nous avons établi et évalué un protocole d'injections iv (3 fois / semaine sur 3 semaines) pour le traitement d'un gliosarcome cérébral (9L chez le rat). Pour cette étude, nous avons comparé les performances de LNC-FcdiOH conventionnelles aux LNC-FcdiOH furtives formulées par la technique de post-insertion (PI) (la formulation OS n'ayant pas encore été mise au point à ce niveau des travaux). Les conditions de l'étude sont résumées dans la Fig. 7. Une étude de toxicité a également été conduite en parallèle sur des animaux sains par le biais du suivi de leur poids. Les résultats de survies sont présentés sur les courbes de Kaplan Meier (Fig. 8)

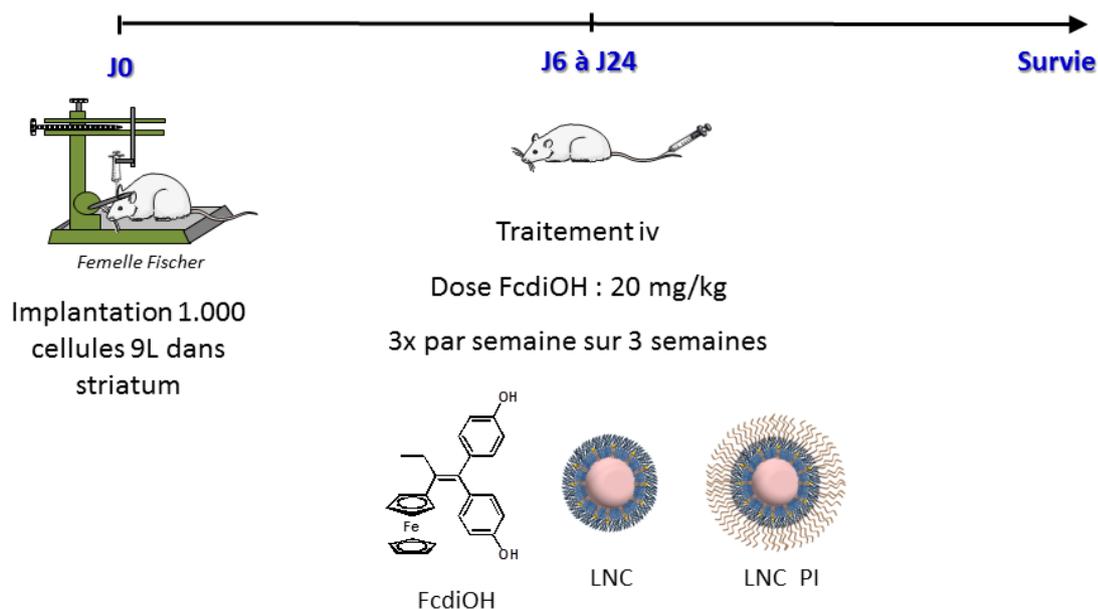


Fig. 7 : Chronogramme de l'étude du traitement de gliome orthotopique par injection iv de LNC chargées en FcdiOH

Comme révélé par la courbe de Kaplan Meier, le traitement par les LNC-FcdiOH conventionnelles n'a pas abouti à un résultat positif. En revanche, la courbe de survie des LNC PI à circulation plasmatique prolongée suggère une légère augmentation de la survie de 7 % comparativement au contrôle traité par sérum physiologique. Cet effet, bien que non significatif, est prometteur puisqu'il résulte d'une stratégie de traitement cliniquement applicable et peut bénéficier d'optimisations.

Cette amélioration du passage dans le cerveau par PEGylation de la nanoparticule a déjà été décrite dans la littérature pour des nanoparticules de cyanoacrylate¹³.

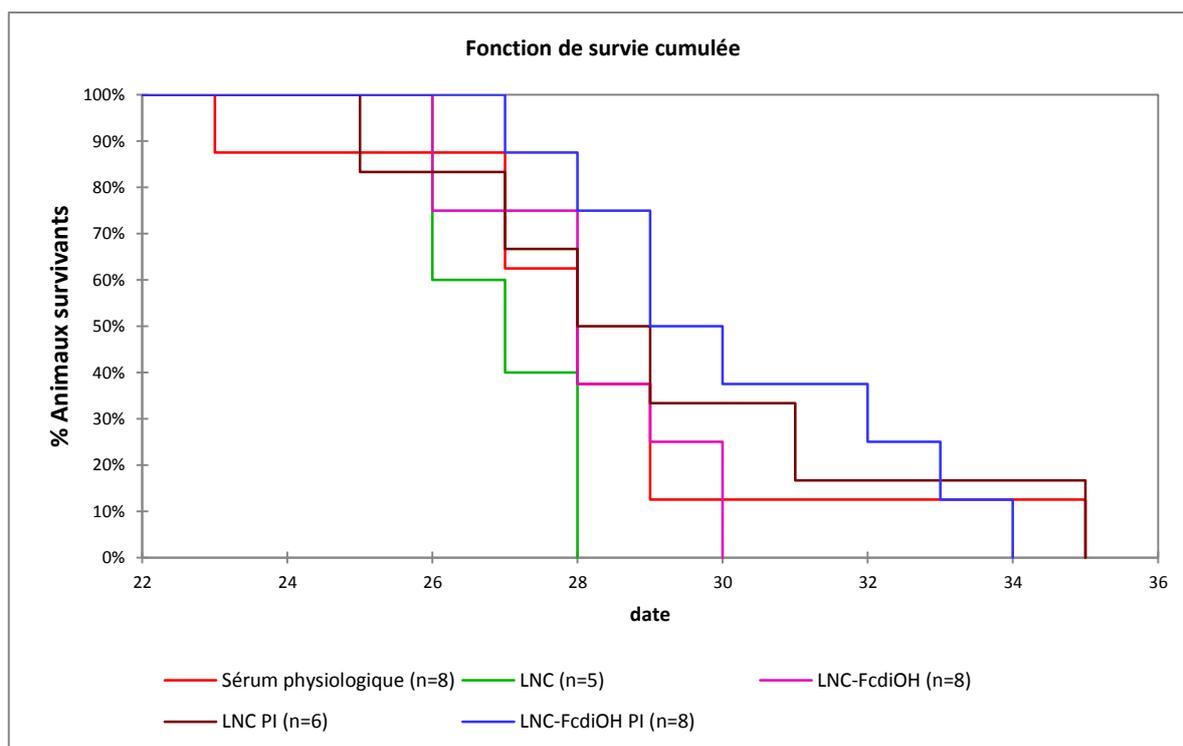


Fig. 8 : Courbes de survie Kaplan-Meier

D'autre part, le suivi de poids des animaux, indicateur d'effets secondaires en cas de perte pondérale, ne révèle aucune toxicité sévère et une reprise de poids est même observée à la fin du traitement (Fig. 9).

Afin d'améliorer le passage cérébral, des optimisations d'ordre galénique peuvent être envisagées avec l'utilisation des LNC OS à la place des LNC PI. Grâce à leur couronne de PEG moins dense, ces LNC pourraient démontrer une meilleure affinité avec les cellules endothéliales de la BHE ainsi qu'avec les cellules tumorales comme démontré dans la publication n°4. De plus, la surface négativement chargée des CE fait office de barrière « électrostatique » repoussant les objets présentant une charge de même signe¹⁴. Une densité moindre en PEG engendrant une charge négative moins importante sera donc plus favorable à l'internalisation.

Nous sommes aujourd'hui capables d'augmenter la charge en FcdiOH contenue dans les LNC. Une dose plus importante pourrait donc être évaluée en efficacité, associée à une étude de toxicité. Enfin, compte tenu des résultats très encourageants de l'ansa-FcdiOH obtenus sur le gliome ectopique, il serait intéressant d'évaluer ce nouvel actif par ce protocole.

D'autres niveaux d'optimisation pourraient être évalués, tels que l'inhibition de la pompe P-gp par le DSPE-PEG qui recouvre les LNC ainsi que la détermination des protéines plasmatiques interagissant avec les LNC, le cas échéant. En effet, une étude réalisée par l'équipe du Pr. J. Kreuter a démontré que l'interaction entre des nanoparticules recouvertes de tween et des apolipoprotéines plasmatiques favorisait le passage des nanovecteurs à travers la BHE grâce aux récepteurs de la famille des LDLR (low density lipoprotein receptor)^{15,16,17}.

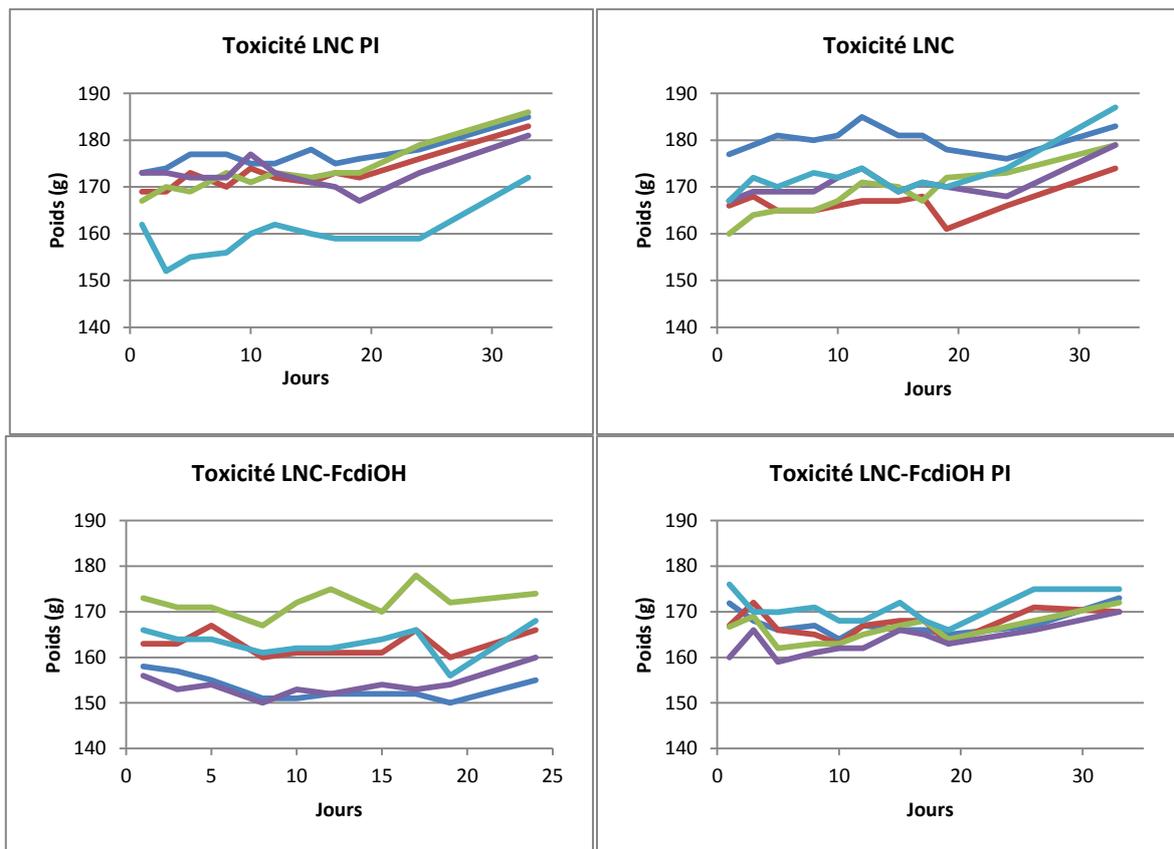


Fig. 9 : Etude de toxicité par suivi du poids des animaux (3 injections iv /semaine sur 3 semaines)

Conclusion

Diverses approches ont été évaluées pour l'optimisation de la délivrance cérébrale des LNC de ferrocifènes. Une majeure partie du travail a été effectuée sur des administrations intracrâniennes. En effet, la délivrance locale a pour avantage de contourner la BHE tout en limitant la toxicité systémique. Dans ce contexte, la CED a longtemps été étudiée et n'a mené qu'à des augmentations de survie modestes. Les infusions intraventriculaire et intratumorale ont, quant à elles, conduit à des effets indésirables inattendus reflétant la fragilité de

l'environnement cérébral. Des études de toxicité sont donc requises pour poursuivre leur évaluation.

Les derniers résultats obtenus par voie systémique avec une tendance positive ouvrent de nouvelles possibilités pour le traitement des tumeurs cérébrales. De plus, les résultats encourageants via la carotide argumentent en faveur de l'utilisation de la voie systémique permettant d'atteindre le cerveau. La voie intraveineuse semble donc être une approche intéressante à approfondir pour optimiser la distribution dans le SNC.

Références bibliographiques

1. Yenari, M. A.; Xu, L.; Tang, X. N.; Qiao, Y.; Giffard, R. G. Microglia Potentiate Damage to Blood-brain Barrier Constituents: Improvement by Minocycline in Vivo and in Vitro. *Stroke* **2006**, *37*, 1087–1093.
2. Imaizumi, S.; Kondo, T.; Deli, M. A.; Gobbel, G.; Joó, F.; Epstein, C. J.; Yoshimoto, T.; Chan, P. H. The Influence of Oxygen Free Radicals on the Permeability of the Monolayer of Cultured Brain Endothelial Cells. *Neurochem. Int.* **1996**, *29*, 205–211.
3. Long, T. C.; Saleh, N.; Tilton, R. D.; Lowry, G. V.; Veronesi, B. Titanium Dioxide (P25) Produces Reactive Oxygen Species in Immortalized Brain Microglia (BV2): Implications for Nanoparticle Neurotoxicity. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, *40*, 4346–4352.
4. Zhong, Z.; Zhai, Y.; Liang, S.; Mori, Y.; Han, R.; Sutterwala, F. S.; Qiao, L. TRPM2 Links Oxidative Stress to NLRP3 Inflammasome Activation. *Nat Commun* **2013**, *4*, 1611.
5. Nance, E. A.; Woodworth, G. F.; Sailor, K. A.; Shih, T.-Y.; Xu, Q.; Swaminathan, G.; Xiang, D.; Eberhart, C.; Hanes, J. A Dense Poly(Ethylene Glycol) Coating Improves Penetration of Large Polymeric Nanoparticles Within Brain Tissue. *Sci Transl Med* **2012**, *4*, 149ra119–149ra119.
6. Yaksh, T. L.; Jang, J. D.; Nishiuchi, Y.; Braun, K. P.; Ro, S. G.; Goodman, M. The Utility of 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin as a Vehicle for the Intracerebral and Intrathecal Administration of Drugs. *Life Sci.* **1991**, *48*, 623–633.
7. Huo, T.; Barth, R. F.; Yang, W.; Nakkula, R. J.; Koynova, R.; Tenchov, B.; Chaudhury, A. R.; Agius, L.; Boulikas, T.; Elleaume, H.; *et al.* Preparation, Biodistribution and Neurotoxicity of Liposomal Cisplatin Following Convection Enhanced Delivery in Normal and F98 Glioma Bearing Rats. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e48752.
8. Charest, G.; Sanche, L.; Fortin, D.; Mathieu, D.; Paquette, B. Glioblastoma Treatment: Bypassing the Toxicity of Platinum Compounds by Using Liposomal Formulation and Increasing Treatment Efficiency with Concomitant Radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2012**, *84*, 244–249.
9. Stathopoulos, G. P.; Antoniou, D.; Dimitroulis, J.; Michalopoulou, P.; Bastas, A.; Marosis, K.; Stathopoulos, J.; Provata, A.; Yiamboudakis, P.; Veldekis, D.; *et al.* Liposomal Cisplatin Combined with Paclitaxel Versus Cisplatin and Paclitaxel in Non-small-cell Lung Cancer: a Randomized Phase III Multicenter Trial. *Ann. Oncol.* **2010**, *21*, 2227–2232.
10. Garcion, E.; Lamprecht, A.; Heurtault, B.; Paillard, A.; Aubert-Pouessel, A.; Denizot, B.; Menei, P.; Benoît, J.-P. A New Generation of Anticancer, Drug-loaded, Colloidal Vectors Reverses Multidrug Resistance in Glioma and Reduces Tumor Progression in Rats. *Mol. Cancer Ther.* **2006**, *5*, 1710–1722.
11. Löscher, W.; Potschka, H. Drug Resistance in Brain Diseases and the Role of Drug Efflux Transporters. *Nat. Rev. Neurosci.* **2005**, *6*, 591–602.
12. Bredel, M.; Zentner, J. Brain-tumour Drug Resistance: The Bare Essentials. *The Lancet Oncology* **2002**, *3*, 397–406.
13. Calvo, P.; Gouritin, B.; Chacun, H.; Desmaële, D.; D'Angelo, J.; Noel, J. P.; Georgin, D.; Fattal, E.; Andreux, J. P.; Couvreur, P. Long-circulating PEGylated Polycyanoacrylate Nanoparticles as New Drug Carrier for Brain Delivery. *Pharm. Res.* **2001**, *18*, 1157–1166.
14. Cardoso, F. L.; Brites, D.; Brito, M. A. Looking at the Blood-brain Barrier: Molecular Anatomy and Possible Investigation Approaches. *Brain Res Rev* **2010**, *64*, 328–363.

15. Kreuter, J.; Shamenkov, D.; Petrov, V.; Ramge, P.; Cychutek, K.; Koch-Brandt, C.; Alyautdin, R. Apolipoprotein-mediated Transport of Nanoparticle-bound Drugs Across the Blood-brain Barrier. *J Drug Target* **2002**, *10*, 317–325.
16. Zensi, A.; Begley, D.; Pontikis, C.; Legros, C.; Mihoreanu, L.; Wagner, S.; Büchel, C.; Briesen, H. von; Kreuter, J. Albumin Nanoparticles Targeted with Apo E Enter the CNS by Transcytosis and Are Delivered to Neurons. *J Control Release* **2009**, *137*, 78–86.
17. Wagner, S.; Zensi, A.; Wien, S. L.; Tschickardt, S. E.; Maier, W.; Vogel, T.; Worek, F.; Pietrzik, C. U.; Kreuter, J.; Briesen, H. von Uptake Mechanism of ApoE-Modified Nanoparticles on Brain Capillary Endothelial Cells as a Blood-Brain Barrier Model. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e32568.

Discussion générale

1. Genèse des travaux

Le cancer se caractérise par de nombreuses propriétés biologiques spécifiques qui sont à l'origine de sa complexité, telles que la résistance aux différents mécanismes de mort cellulaire, la réplication illimitée, l'induction de l'angiogenèse et l'aptitude à développer des métastases¹. Afin d'édifier un microenvironnement riche et impénétrable, les cellules cancéreuses utilisent le stroma, et mobilisent des cellules saines (cellules endothéliales, leucocytes...) pour favoriser leur progression, ajoutant une dimension supplémentaire à cette complexité tumorale². Malgré des avancées considérables en oncologie conduisant au développement de techniques diagnostiques et thérapeutiques variées, certains cancers restent intraitables, parmi lesquels figurent le glioblastome et le cancer du sein triple négatif. Tous les domaines de recherche sont donc mis à contribution afin de contrer ce fardeau meurtrier. Ceci inclue le développement de médicaments innovants par le biais de nouveaux agents thérapeutiques (thérapies ciblées telles que la thérapie génique³ et l'immunothérapie⁴) ainsi que des approches pharmacologiques alternatives pour améliorer la spécificité du traitement et limiter les effets secondaires provoqués par les chimiothérapies anticancéreuses.

La médecine « métallique » a déjà fait ses preuves dans le traitement du cancer avec des chimiothérapies efficaces à base notamment de platine^{5,6}. La chimie fascinante du ferrocène a motivé de nombreux chimistes à développer des entités à visée anticancéreuse autour de ce groupement métallocène. Le potentiel antiprolifératif des dérivés ferrocéniques a été étudié pour la première fois dans les années 70⁷ et a depuis suscité une activité de recherche importante. De nombreux exemples de molécules à base de ferrocène actuellement évaluées pour de potentielles activités cytotoxiques sont détaillés dans la littérature⁸. Il est notamment intéressant de noter la synthèse récente du ferrocène greffé sur le paclitaxel⁹.

Un des complexes ferrocéniques parmi les plus étudiés est probablement le ferrocifène, synthétisé par l'équipe du Dr. Vessières et du Pr. Jaouen qui ont dévoué leur travail à la synthèse de complexes bioorganométalliques anticancéreux toujours plus élaborés et plus puissants^{10,11}. Ces produits, issus de la combinaison avec le tamoxifène, ont été en premier lieu conçus pour une application contre le cancer du sein, mais leur activité impressionnante sur de nombreuses lignées cellulaires a ouvert la voie à de nouvelles possibilités d'application¹².

De la nécessité d'une stratégie de solubilisation de ces complexes ferrocéniques est née une collaboration avec le Pr. Passirani pour l'encapsulation des molécules dans les vecteurs développés au sein du laboratoire, les nanocapsules lipidiques (LNC) et leur évaluation sur des modèles expérimentaux. Cette collaboration a débuté avec la thèse d'Emilie Allard, première doctorante à avoir travaillé sur l'application des nanocapsules lipidiques chargées en férrociphénol (FcdiOH) dans le traitement du glioblastome. Le principal résultat a été la découverte d'un effet synergique entre les radiations et l'activité du FcdiOH, conduisant à des longs survivants¹³. Les travaux du Dr. Trinh Huynh ont suivi ceux du Dr. Allard par l'évaluation de différentes voies d'administration pour une délivrance cérébrale des LNC en local par CED (Convection Enhanced Delivery) ou en périphérie par voie artérielle¹⁴. Ces deux voies ont permis d'obtenir des résultats modestes mais significatifs d'augmentation de survie par traitement avec les LNC de FcdiOH, ainsi qu'une plus grande accumulation tumorale grâce à l'utilisation de LNC furtives.

Mes travaux de thèse, en continuité des deux précédentes, se positionnent face à trois problématiques principales. La première problématique s'inscrit dans une perspective éventuelle de transposition en clinique. La seconde correspond à l'évaluation de nouveaux composés ferrocéniques. Cet axe de recherche s'articule autour d'une étape de formulation, puis d'évaluation de l'efficacité *in vitro* et *in vivo* des LNC de ferrocifènes, en s'efforçant d'approfondir la compréhension de leur mécanisme d'action. Enfin, la troisième problématique concerne la poursuite de l'étude de différentes stratégies d'administration cérébrale des LNC.

2. Problématique 1 : optimisation du procédé d'obtention de LNC furtives et leur devenir *in vivo*

Concernant le premier axe de recherche, pour un transfert réussi d'une innovation à l'échelle du laboratoire à une application clinique, certains aspects concernant le nanomédicament doivent être maîtrisés. Pour cela, nous nous sommes basés sur différents points listés lors d'un workshop organisé par la FDA et « l'Alliance for Nanohealth » (ANH) grâce à l'identification des principaux obstacles scientifiques au passage des produits de nano-ingénierie vers les patients¹⁵. Parmi les différentes priorités listées figurent la détermination de la biodistribution des vecteurs nanoparticulaires dans l'organisme après administration systémique. Cet aspect pharmacologique est lié à un second point correspondant au développement de modalité

d'imagerie permettant de visualiser la distribution dans le temps. En effet, la maîtrise du devenir de la totalité de la dose administrée est capitale pour s'assurer du profil non toxique de la particule. Le troisième point concerne la compréhension des transports à travers les barrières biologiques. Ces recherches se sont inspirées de ces trois priorités essentielles pour continuer à enrichir les connaissances sur les LNC et orienter les études futures.

Une première partie des travaux s'est donc concentrée sur l'optimisation du procédé de formulation de LNC furtives. En vue d'une application en oncologie, l'utilisation de nanocapsules lipidiques à circulation plasmatique prolongée apparaît pertinente pour une vectorisation tumorale d'agents thérapeutiques, tirant profit de l'effet EPR (Enhanced Permeability and Retention). La technique actuellement utilisée pour l'obtention de LNC furtives repose sur une post-insertion (PI) de phospholipides PEGylés (DSPE-mPEG). Elle nécessite deux étapes, une première étape de pré-formulation des LNC puis une étape d'incubation de 2h à 60°C (ou 4h à 37°C) avec une solution micellaire de DSPE-mPEG. L'inconvénient de cette technique réside dans cette étape supplémentaire longue qui favorise la fuite de l'agent encapsulé. Pour une transposition à une échelle plus importante, un procédé simplifié serait plus avantageux. Le protocole que nous avons proposé s'effectue donc en une seule étape (one-step OS) avec incorporation du phospholipide PEGylé directement dans la formulation des LNC. Les LNC furtives sont alors obtenues par le procédé classique d'inversion de phase. La limite de ce procédé est imposée par la quantité de DSPE-mPEG pouvant être greffée aux LNC qui reste plus faible que celle pouvant être ajoutée par PI. Néanmoins, dans un contexte d'application clinique, le rapport agent thérapeutique sur matrice d'excipients doit rester suffisamment élevé pour éviter toute toxicité supplémentaire due aux excipients.

Un second élément à considérer en rapport avec la quantité de DSPE-mPEG greffée aux LNC correspond à la couronne hydrophile édifiée par les PEG qui constitue à la fois une protection contre la clairance par le système immunitaire mais également une barrière stérique s'élevant contre l'internalisation par les cellules cancéreuses. Ce dernier point a été démontré par l'étude d'internalisation de LNC chargées en DiD et recouvertes par différentes densités de DSPE-mPEG (0%, 4,8%, 9% m/m). Les résultats ont mis en évidence une entrave à l'internalisation provoquée par un revêtement dense en PEG qui ne se produit pas lors d'un greffage plus faible. Par ailleurs, cette étude a permis de mettre en avant une internalisation

cellulaire du fluorochrome encapsulé dans les LNC OS majoritairement énergie-dépendante comme préalablement décrite pour des LNC conventionnelles¹⁶.

Afin d'approfondir la connaissance du devenir de ces LNC *in vivo*, une étude de biodistribution a été effectuée par imagerie FRET (Förster Resonance Energy Transfer). Cette technique d'imagerie est couramment utilisée pour des applications biologiques¹⁷. Elle repose sur le transfert d'énergie d'un fluorochrome donneur préalablement excité à un fluorochrome accepteur. Les conditions pour que ce phénomène se produise sont un recouvrement des spectres de fluorescence des molécules et une distance séparant les deux sondes inférieures à 10nm. Cette proximité de localisation se produit lorsque les deux fluorochromes se trouvent encapsulés dans les LNC, émettant alors un signal FRET. Cette technique permet, par conséquent, de suivre l'intégrité structurale du vecteur. La biodistribution des LNC a déjà été évaluée par différentes techniques, en fluorescence classique et en radioactivité. L'avantage lié à l'utilisation de radionucléides repose sur la possibilité de quantifier l'accumulation de LNC par organe permettant ainsi de déterminer la distribution de l'ensemble de la dose injectée, alors que les techniques de fluorescence ne sont que semi-quantitatives mais moins contraignantes. Chaque technique permet néanmoins de renseigner et apporter une information sur le devenir pharmacologique des LNC. Il faut également noter que les biodistributions sont effectuées sur des LNC modifiées par l'ajout de l'agent d'imagerie qui peut influencer son devenir. Ceci peut expliquer les différences parfois observées en termes de profil pharmacocinétique selon la technique utilisée.

La biodistribution des LNC conventionnelles et des LNC OS a été comparée chez la souris par imagerie FRET. Sans surprise, les LNC OS ont montré une circulation plasmatique prolongée par rapport aux LNC conventionnelles, avec conservation de l'intégrité de la capsule sur plusieurs heures, comme en témoigne le signal FRET. Concernant les organes responsables de l'élimination des LNC, il s'agit du foie et du rat pour les deux types de vecteurs. De façon plus inattendue, les LNC OS présentent une biodistribution différente des LNC classiques avec une accumulation importante au niveau de la peau à 24h, par rapport à une accumulation dans les os (moelle osseuse) pour les LNC conventionnelles.

Cette accumulation dans la peau est également observée dans la littérature avec les liposomes PEGylés de doxorubicine (Caelyx[®]/Doxyl[®])^{18,19} et s'avère préoccupante puisqu'elle est à l'origine du syndrome mains-pieds (érythrodysesthésie palmo-plantaire) et d'autres effets toxiques cutanés rencontrés au cours des chimiothérapies²⁰. En effet, bien que la forme

liposomale de la doxorubicine ait permis de contrer certaines toxicités liées à la molécule libre telles que des phénomènes de myélosuppression et de toxicité aigüe sur le myocarde²¹, la dose clinique du Doxyl[®] est, quant à elle, limitée par l'apparition de réactions cutanées indésirables²⁰. Ce syndrome mains-pieds n'est pas un phénomène isolé puisqu'il se produit couramment avec divers anticancéreux²² et notamment lors d'une infusion prolongée de la doxorubicine²³. En revanche, l'injection en bolus de la doxorubicine, tout comme l'administration de liposomes de doxorubicine non PEGylés (Myocet[®]), ne présentent pas une circulation plasmatique suffisamment longue pour s'accumuler dans la peau à des taux toxiques ($T_{1/2}$ de 7h pour Mycoet[®] vs 48h pour Doxil[®])²⁴. L'accumulation cutanée est donc un phénomène chronophage qui s'explique par le renouvellement rapide des kératinocytes, cellules constitutives de l'épiderme¹⁹. Cette accumulation d'agents anticancéreux endommage les cellules de la membrane basale conduisant à une toxicité cutanée qui peut entraîner, selon son niveau de gravité, l'arrêt du traitement avec un risque d'influencer l'efficacité thérapeutique. Par ailleurs, chez l'homme, la paume des mains et la voute plantaire possèdent un réseau riche en capillaires et sont sujets à de nombreuses frictions entraînant une augmentation du flux sanguin qui favorise l'accumulation des cytotoxiques.

Comme indiqué, le syndrome mains - pieds est un effet indésirable couramment rencontré lors de chimiothérapie. Des traitements ont donc été développés pour permettre de soulager les symptômes engendrés et en ralentir la progression. Des mesures préventives ont également été mises en place telles que le refroidissement des poignets et des chevilles lors du traitement et la limitation de l'exposition au soleil et des douches chaudes (pour déclencher une vasoconstriction ou éviter la dilatation des vaisseaux sanguins)²⁵.

D'autre part, il a été démontré chez l'animal que l'accumulation tumorale saturait avant l'accumulation cutanée¹⁹. Par conséquent, un temps de circulation plus faible pourrait réduire ces complications, tout en conservant la concentration tumorale. Cette hypothèse est en faveur de l'utilisation des LNC OS qui, par leur capacité de greffage de PEG restreinte, limite la circulation plasmatique. Des études sont prévues pour évaluer la distribution des LNC OS dans des xénogreffes de glioblastome U87MG implantées en sous-cutané.

3. Problématique 2 : évaluation de nouveaux composés de la famille des ferrocifènes

Dans une seconde partie de la thèse, ces LNC OS ont été utilisées pour vectoriser le composé ferrocénique ansa-FcdiOH qui n'avait pas été étudié *in vivo* jusqu'à présent. Ce complexe s'est avéré être le plus actif en terme d'IC50 comparativement aux autres complexes ferrociféniques, et notamment plus actif que le FcdiOH sur des lignées de cancer du SNC (0,08 μ M vs 0,3 μ M)¹². Pour faire suite à son analogue à cycle ouvert, ansa-FcdiOH a été évalué sur un modèle expérimental de gliome. Les tumeurs primaires malignes du cerveau sont des tumeurs foudroyantes et représentent un réel défi thérapeutique par leur caractère invasif et agressif.

Comme pour les autres composés de la famille, l'activité de l'ansa-FcdiOH est associée à une production d'espèces réactives de l'oxygène. Sa particularité provient de son effet antiprolifératif dose-dépendant avec un arrêt du cycle des cellules de gliome 9L en phase S à faible dose (50nM) et un arrêt en phase G0/G1 à plus forte dose (0,5 μ M) associé à une induction de l'apoptose. Ce polyphénol métallique a pu être aisément encapsulé dans les LNC OS résultant en un taux d'encapsulation et un diamètre hydrodynamique satisfaisants. De plus, les LNC-ansa-FcdiOH OS sont stables à 37°C contrairement aux LNC-ansa-FcdiOH conventionnelles. *In vivo*, l'injection de ces LNC OS chargées en ferrocifène a permis d'inhiber significativement la croissance de la tumeur 9L sous-cutanée.

Conjointement à cette étude, les LNC furtives obtenues par post-insertion (PI) et présentant une forte densité en PEG ont également été évaluées pour la vectorisation de l'ansa-FcdiOH sur le modèle ectopique du 9L. Outre la densité en PEG, ces LNC PI diffèrent des LNC OS par leur concentration en nanocapsules plus élevée. La dose en principe actif administrée était équivalente pour les 2 formulations mais le ratio quantité d'agent actif / quantité de LNC était plus faible pour les LNC PI afin d'être dans les conditions identiques à l'étude menée précédemment par le Dr. Huynh²⁶. De façon surprenante, ces LNC PI n'ont montré qu'une tendance non significative à freiner la croissance tumorale par rapport au contrôle. Ce manque d'efficacité pourrait provenir du problème évoqué précédemment d'internalisation limitée par les cellules tumorales dû au revêtement dense en PEG.

L'administration répétée des LNC-ansa-FcdiOH OS et PI a engendré une légère perte de poids des animaux au cours de la thérapie. Cette perte de poids n'était pas associée à une

toxicité hépatique comme révélé par les sections histologiques. Compte tenu de l'accumulation dans la peau observée en imagerie FRET, une toxicité cutanée pourrait en être à l'origine, bien qu'aucun signe clinique apparent n'ait permis de l'envisager. Néanmoins, l'arrêt du traitement s'est vu accompagné d'une reprise du poids, soulignant un état réversible.

Cette étude a donc permis d'établir la preuve de concept relatif au potentiel anticancéreux de l'ansa-FcdiOH vectorisé par les LNC OS à travers l'inhibition de la croissance tumorale.

En parallèle de ces travaux, le FcOHTAM, un des premiers tamoxifènes ferrocéniques synthétisés, a également été évalué *in vivo* par le biais des LNC sur un modèle de cancer du sein triple négatif (CSTN). Le CSTN présente un profil clinique défavorable associé à un haut risque de rechute métastatique précoce, entraînant un pronostic sombre. Compte tenu de l'absence de thérapie efficace, les recherches actuelles se focalisent sur les traitements ciblés. Le FcOHTAM est le premier complexe qui a permis de mettre en évidence l'effet favorable du greffage du ferrocène sur le tamoxifène. Grâce à cette insertion, le tamoxifène métallique présente une double activité en conservant son effet anti-oestrogénique sur les cellules de cancer du sein hormono-dépendant complétement par une activité inédite sur les cellules CSTN. L'administration des LNC PI chargées en FcOHTAM à des animaux porteurs de CSTN xéno greffés a entraîné un retard significatif de la croissance tumorale, témoignant de l'activité anti-cancéreuse de la molécule. Cette étude a fait l'objet d'un paragraphe dans le journal « Science et Santé » (annexe 2) reflétant l'intérêt et l'espoir suscités par ces résultats. Les nanomédicaments de tamoxifène ferrocéniques sont donc prometteurs pour la thérapie des CSTN.

Par ailleurs, le CSTN a une forte tendance à développer des métastases cérébrales, ce qui diminue considérablement le pronostic vital²⁷. Compte tenu du manque de thérapie efficace pour les tumeurs primaires du cerveau et les métastases cérébrales, il existe une réelle nécessité de pouvoir vectoriser les agents thérapeutiques au SNC.

4. Problématique 3 : évaluation de différentes modalités d'administration des LNC pour une délivrance cérébrale

Le dernier point de cette discussion porte donc sur les stratégies de délivrance cérébrale des LNC. Les tumeurs cérébrales sont confinées au sein du SNC, profitant des barrières protectrices de celui-ci pour se mettre hors d'atteinte. Afin de contourner la barrière hémato-encéphalique (BHE), l'approche qui a été initialement étudiée consistait à délivrer les LNC en intracranial directement au sein de la tumeur. D'abord en injection en bolus, cette approche a évolué vers la CED pour une meilleure distribution dans le tissu cancéreux. Suite aux résultats modestes obtenus, d'autres modalités d'administration intracérébrale ont été évaluées telles que l'infusion prolongée intracérébroventriculaire ou intratumorale. Néanmoins, ces deux voies ont conduit à des effets toxiques aigus inattendus qui nécessiteraient des études plus approfondies sur l'influence des LNC au contact des cellules cérébrales.

Une stratégie d'administration périphérique a également été évaluée avec la voie artérielle. Afin d'améliorer la distribution et l'internalisation du vecteur, les LNC ont été fonctionnalisés par un peptide NFL-TBS s'apparentant à un « cell penetrating peptide » (CPP)²⁸. Les CPP sont couramment utilisés en préclinique pour améliorer la pénétration dans les tumeurs solides et l'internalisation par les cellules cancéreuses de nanoparticules, de gènes et de protéines^{29,30}. Un des exemples les plus documentés et également le premier CPP à avoir été découvert est le peptide TAT (trans-acting activator of transcription) issu du virus VIH-1 et capable de traverser les membranes cellulaires³¹. La fonctionnalisation se fait conventionnellement par greffage chimique du CPP à la surface des vecteurs. Concernant le peptide NFL-TBS, il possède la particularité d'être majoritairement internalisé par les cellules de gliome et plus faiblement par les cellules saines, ce qui en fait un agent ciblant²⁸. A dose élevée, il a également la capacité de se lier aux microtubules en participant à leur désorganisation, ce qui lui confère des propriétés thérapeutiques²⁸.

L'injection intra-carotidienne des LNC de FcdiOH recouvertes par ce peptide et administrées à des rats porteurs de gliome a permis d'obtenir quelques longs survivants. Ce peptide a également été récemment évalué pour la fonctionnalisation de LNC de paclitaxel, induisant un remarquable ralentissement de la progression tumorale après administration intracérébrale³². Dans cette même étude, il a été suggéré que le peptide NFL-TBS se positionnait à la surface des LNC par interaction avec les chaînes polaires de PEG. Par conséquent, la question de l'effet de la dilution dans la circulation systémique sur la stabilité du complexe peptide-LNC

peut se poser. Des travaux récents ont démontré la possibilité d'utiliser des CPP sans recours à un greffage chimique sur les nanoparticules (Doxil[®] ou Abraxane[®]) mais par simple co-injection, conduisant à une augmentation de la pénétration et de l'accumulation tumorale (non cérébrale)³³. Le peptide en question est le peptide iRGD qui module la pénétration dans la cellule par liaison avec l'intégrine α_v puis par interaction avec la neuropiline-1. Cette modalité d'administration sans greffage covalent facilite la formulation des nanovecteurs et permet de ne pas altérer la conformation et donc la fonction du peptide.

Il serait donc intéressant de vérifier si cette technique peut s'appliquer au peptide NFL-TBS. D'autre part, la littérature fait état de certains types de CPP capables d'augmenter l'accumulation cérébrale³⁴. En effet, il a été montré que le greffage du peptide TAT à la surface de quantum dots a permis la traversée de la BHE d'un animal sain après injection par la carotide, comme révélé par les images de fluorescence³⁵. Il se pourrait donc que le peptide NFL-TBS ait une fonction supplémentaire favorisant le passage de la BHE.

La limite principale de ces CPP, faisant obstacle à un développement clinique, est leur manque de spécificité ainsi que des problèmes de toxicité rencontrés avec les peptides cationiques²⁹.

Lors de l'étude par la voie intra-carotidienne, le décès précoce d'un des animaux peut être à l'origine d'une complication suite à l'injection artérielle, reflétant les risques liés à cette approche. Compte tenu des résultats encourageant obtenus par cette voie systémique et dans le cadre d'une éventuelle application clinique, il nous a semblé intéressant d'évaluer l'administration des LNC par voie intraveineuse (iv) toujours à visée cérébrale. Cette technique est moins invasive et plus confortable pour le patient et présente moins de risque vital que l'injection carotidienne. Etant donnée l'altération de la BHE liée au développement tumoral, l'utilisation des nanoparticules par voie systémique semble pertinente. Une étude a donc été réalisée avec des injections multiples de LNC conventionnelles ou PI chargées en FcdiOH sur des animaux porteurs de gliome 9L orthotopique. Les résultats ont mis en évidence une tendance positive sur la survie pour les groupes traités par les LNC-FcdiOH PI. Par conséquent, afin d'évaluer le passage des LNC dans le SNC, une étude FRET a été récemment effectuée sur des souris porteuses de glioblastome U87MG intracranial. Cette étude a été réalisée à partir des formulations furtives optimisées (LNC OS) comparativement aux LNC conventionnelles. Malheureusement, dans les conditions expérimentales utilisées, aucune fluorescence n'a pu être observée dans le cerveau, quelle que soit la formulation.

Différentes hypothèses ont été émises afin d'expliquer ce résultat négatif. D'une part, il a été montré que les fenestrations des tumeurs 9L sont plus importantes (2 fois plus grandes) que celles des U87MG³⁶, ce qui constitue, pour ces dernières, une barrière à l'extravasation des particules. D'autre part, comparé à l'étude d'efficacité, les formulations furtives n'étaient pas les mêmes (revêtement en PEG moins dense pour les nouvelles LNC et concentration en LNC plus faible), ce qui pourrait être une condition défavorable au passage dans le SNC. De plus, la tumeur pourrait être insuffisamment développée (nombre de cellules injectées faible par rapport à la littérature^{37,38}), restant donc étanche aux nanoparticules. Ce dernier point a été confronté par l'injection plus tardive (deux semaines plus tard) de deux souris ayant subi les mêmes implantations tumorales afin d'évaluer l'impact de la taille de la tumeur. Ces résultats préliminaires ont montré la détection d'un signal fluorescent au sein de la tumeur et encouragent vivement la poursuite de ces travaux. Les nanocapsules lipidiques pourraient donc offrir une nouvelle stratégie de vectorisation cérébrale d'agents thérapeutiques sans recours à une approche invasive.

Références bibliographiques

1. Hanahan, D.; Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674.
2. Pietras, K.; Ostman, A. Hallmarks of Cancer: Interactions with the Tumor Stroma. *Exp. Cell Res.* **2010**, *316*, 1324–1331.
3. Griesenbach, U. Progress and Prospects: Gene Therapy Clinical Trials (Part 2). *Gene Ther* **2007**, *14*, 1555–1563.
4. Sliwkowski, M. X.; Mellman, I. Antibody Therapeutics in Cancer. *Science* **2013**, *341*, 1192–1198.
5. Rosenberg, B.; VanCamp, L.; Trosko, J. E.; Mansour, V. H. Platinum Compounds: a New Class of Potent Antitumour Agents. *Nature* **1969**, *222*, 385–386.
6. Harper, B. W.; Krause-Heuer, A. M.; Grant, M. P.; Manohar, M.; Garbutcheon-Singh, K. B.; Aldrich-Wright, J. R. Advances in Platinum Chemotherapeutics. *Chemistry* **2010**, *16*, 7064–7077.
7. Fiorina, V. J.; Dubois, R. J.; Brynes, S. Ferrocenyl Polyamines as Agents for the Chemoimmunotherapy of Cancer. *J. Med. Chem.* **1978**, *21*, 393–395.
8. Ornelas, C. Application of Ferrocene and Its Derivatives in Cancer Research. *New J. Chem.* **2011**, *35*, 1973–1985.
9. Plažuk, D.; Wieczorek, A.; Błaż, A.; Rychlik, B. Synthesis and Biological Activities of Ferrocenyl Derivatives of Paclitaxel. *Med. Chem. Commun.* **2012**, *3*, 498–501.
10. Nguyen, A.; Vessières, A.; Hillard, E. A.; Top, S.; Pigeon, P.; Jaouen, G. Ferrocifens and Ferrocifenols as New Potential Weapons Against Breast Cancer. *CHIMIA International Journal for Chemistry* **2007**, *61*, 716–724.
11. Vessières, A. Metal Carbonyl Tracers and the Ferrocifen Family: Two Facets of Bioorganometallic Chemistry. *Journal of Organometallic Chemistry* **2013**, *734*, 3–16.
12. Görmen, M.; Pigeon, P.; Top, S.; Hillard, E. A.; Huché, M.; Hartinger, C. G.; Montigny, F. de; Plamont, M.-A.; Vessières, A.; Jaouen, G. Synthesis, Cytotoxicity, and COMPARE Analysis of Ferrocene and [3]ferrocenophane Tetrasubstituted Olefin Derivatives Against Human Cancer Cells. *ChemMedChem* **2010**, *5*, 2039–2050.
13. Allard-Vannier, E. *Apport Des Nanocapsules Lipidiques Dans Le Traitement Local Des Gliomes Malins : Application à L'encapsulation de Complexes Lipophiles Métalliques*; Angers, 2008.
14. Huynh, N. T. APPLICATION DES NANOCAPSULES LIPIDIQUES CHARGEES EN FERROCIPHENOL DANS LE TRAITEMENT DU GLIOBLASTOME, Université d'Angers, 2011.
15. Sanhai, W. R.; Sakamoto, J. H.; Canady, R.; Ferrari, M. Seven Challenges for Nanomedicine. *Nat Nano* **2008**, *3*, 242–244.
16. Paillard, A.; Hindré, F.; Vignes-Colombeix, C.; Benoit, J.-P.; Garcion, E. The Importance of Endo-lysosomal Escape with Lipid Nanocapsules for Drug Subcellular Bioavailability. *Biomaterials* **2010**, *31*, 7542–7554.
17. Jares-Erijman, E. A.; Jovin, T. M. FRET Imaging. *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1387–1395.
18. Gabizon, A.; Goren, D.; Horowitz, A. T.; Tzemach, D.; Lossos, A.; Siegal, T. Long-circulating Liposomes for Drug Delivery in Cancer Therapy: a Review of Biodistribution Studies in Tumor-bearing Animals. *Advanced Drug Delivery Reviews* **1997**, *24*, 337–344.
19. Charrois, G. J. R.; Allen, T. M. Rate of Biodistribution of STEALTH® Liposomes to Tumor and Skin: Influence of Liposome Diameter and Implications for Toxicity and Therapeutic Activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2003**, *1609*, 102–108.

20. Lotem, M.; Hubert, A.; Lyass, O.; Goldenhersh, M. A.; Ingber, A.; Peretz, T.; Gabizon, A. Skin Toxic Effects of Polyethylene Glycol-coated Liposomal Doxorubicin. *Arch Dermatol* **2000**, *136*, 1475–1480.
21. Mazevet, M.; Moulin, M.; Llach-Martinez, A.; Chargari, C.; Deutsch, E.; Gomez, A.-M.; Morel, E. Complications of Chemotherapy, a Basic Science Update. *Presse Med* **2013**, *42*, e352–361.
22. Clark, A. S.; Vahdat, L. T. Chemotherapy-Induced Palmar-Plantar Erythrodysesthesia Syndrome: Etiology and Emerging Therapies. *Supportive Cancer Therapy* **2004**, *1*, 213–218.
23. Lokich, J. J.; Moore, C. Chemotherapy-associated Palmar-plantar Erythrodysesthesia Syndrome. *Ann. Intern. Med.* **1984**, *101*, 798–799.
24. Cowens, J. W.; Creaven, P. J.; Greco, W. R.; Brenner, D. E.; Tung, Y.; Ostro, M.; Pilkiewicz, F.; Ginsberg, R.; Petrelli, N. Initial Clinical (phase I) Trial of TLC D-99 (doxorubicin Encapsulated in Liposomes). *Cancer Res.* **1993**, *53*, 2796–2802.
25. Lorusso, D.; Stefano, A. D.; Carone, V.; Fagotti, A.; Pisconti, S.; Scambia, G. Pegylated Liposomal Doxorubicin-related Palmar-plantar Erythrodysesthesia (“hand-foot” Syndrome). *Ann Oncol* **2007**.
26. Huynh, N. T.; Morille, M.; Bejaud, J.; Legras, P.; Vessieres, A.; Jaouen, G.; Benoit, J.-P.; Passirani, C. Treatment of 9L Gliosarcoma in Rats by Ferrociphenol-loaded Lipid Nanocapsules Based on a Passive Targeting Strategy via the EPR Effect. *Pharm. Res.* **2011**, *28*, 3189–3198.
27. Rakha, E. A.; Chan, S. Metastatic Triple-negative Breast Cancer. *Clinical Oncology* **2011**, *23*, 587–600.
28. Berges, R.; Balzeau, J.; Peterson, A. C.; Eyer, J. A Tubulin Binding Peptide Targets Glioma Cells Disrupting Their Microtubules, Blocking Migration, and Inducing Apoptosis. *Mol. Ther.* **2012**, *20*, 1367–1377.
29. Vivès, E.; Schmidt, J.; Pèlegri, A. Cell-penetrating and Cell-targeting Peptides in Drug Delivery. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1786*, 126–138.
30. MacEwan, S. R.; Chilkoti, A. Harnessing the Power of Cell-penetrating Peptides: Activatable Carriers for Targeting Systemic Delivery of Cancer Therapeutics and Imaging Agents. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* **2013**, *5*, 31–48.
31. Gupta, B.; Torchilin, V. P. Transactivating Transcriptional Activator-mediated Drug Delivery. *Expert Opin Drug Deliv* **2006**, *3*, 177–190.
32. Balzeau, J.; Pinier, M.; Berges, R.; Saulnier, P.; Benoit, J.-P.; Eyer, J. The Effect of Functionalizing Lipid Nanocapsules with NFL-TBS.40-63 Peptide on Their Uptake by Glioblastoma Cells. *Biomaterials* **2013**, *34*, 3381–3389.
33. Sugahara, K. N.; Teesalu, T.; Karmali, P. P.; Kotamraju, V. R.; Agemy, L.; Greenwald, D. R.; Ruoslahti, E. Coadministration of a Tumor-penetrating Peptide Enhances the Efficacy of Cancer Drugs. *Science* **2010**, *328*, 1031–1035.
34. Zou, L.-L.; Ma, J.-L.; Wang, T.; Yang, T.-B.; Liu, C.-B. Cell-Penetrating Peptide-Mediated Therapeutic Molecule Delivery into the Central Nervous System. *Curr Neuropharmacol* **2013**, *11*, 197–208.
35. Santra, S.; Yang, H.; Stanley, J. T.; Holloway, P. H.; Moudgil, B. M.; Walter, G.; Mericle, R. A. Rapid and Effective Labeling of Brain Tissue Using TAT-conjugated CdS:Mn/ZnS Quantum Dots. *Chem. Commun.* **2005**, 3144–3146.

36. Brigger, I.; Morizet, J.; Aubert, G.; Chacun, H.; Terrier-Lacombe, M.-J.; Couvreur, P.; Vassal, G. Poly(ethylene Glycol)-coated Hexadecylcyanoacrylate Nanospheres Display a Combined Effect for Brain Tumor Targeting. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, *303*, 928–936.
37. Jiang, X.; Xin, H.; Sha, X.; Gu, J.; Jiang, Y.; Law, K.; Chen, Y.; Chen, L.; Wang, X.; Fang, X. PEGylated Poly(trimethylene Carbonate) Nanoparticles Loaded with Paclitaxel for the Treatment of Advanced Glioma: In Vitro and in Vivo Evaluation. *Int J Pharm* **2011**, *420*, 385–394.
38. Serwer, L. P.; Noble, C. O.; Michaud, K.; Drummond, D. C.; Kirpotin, D. B.; Ozawa, T.; Prados, M. D.; Park, J. W.; James, C. D. Investigation of Intravenous Delivery of Nanoliposomal Topotecan for Activity Against Orthotopic Glioblastoma Xenografts. *Neuro-oncology* **2011**, *13*, 1288–1295.

Conclusion et Perspectives

Au cours de ces travaux de thèse, une nouvelle formulation de LNC à circulation plasmatique prolongée a été développée par un procédé simple et aisément transposable. Ces LNC dites « one-step » ont fait preuve à la fois d'une bonne stabilité physique et d'une stabilité d'encapsulation *in vitro* et *in vivo* après injection intraveineuse. Elles ont également démontré de bonnes performances de vectorisation tumorale.

En ce qui concerne les complexes ferrocéniques, l'efficacité de deux nouveaux composés, FcOHTAM et ansa-FcdiOH vectorisés par des LNC, a été étudiée sur des modèles sous-cutanés expérimentaux de cancer du sein triple négatif et de gliome malin, respectivement. Dans les deux cas, un ralentissement significatif de la progression tumorale a pu être observé, confirmant l'activité anti-proliférative de ces composés. Ces nanomédicaments de LNC chargés en complexe ferrocénique apparaissent donc comme prometteurs pour une stratégie alternative de traitement du cancer. Des études complémentaires doivent cependant être envisagées afin d'optimiser la performance des vecteurs et des ferrocifènes.

Pour compléter l'étude de biodistribution FRET, une étude de pharmacocinétique des LNC chargés en ferrocifène devrait être réalisée afin d'évaluer les sites d'accumulation des molécules ainsi que leurs voies de métabolisation et d'élimination. Ainsi, la distribution des LNC pourrait être comparée à celle des complexes ferrocéniques. De plus, afin d'approfondir la caractérisation de la stabilité des formulations, des études de libération dans différents milieux (plasma, solution d'albumine..) devraient également être effectuées. La mise en place d'une technique de séparation de la molécule encapsulée de celle libérée sera donc nécessaire. Par ailleurs, les interactions avec les éléments plasmatiques jouent un rôle majeur dans la biodistribution des vecteurs. Il serait donc intéressant d'évaluer la nature de la couronne plasmatique se formant autour des LNC en fonction de leur propriété de surface, après injection iv.

Dans la continuité des travaux réalisés sur le CSTN, des modèles métastatiques¹ pourraient être développés pour évaluer l'efficacité du traitement par les LNC-FcOHTam OS. Les métastases liées au cancer du sein correspondent au stade le plus avancé de la maladie et en sont la cause principale de mortalité². L'utilisation des nanocapsules lipidiques furtives peut donc s'avérer pertinente grâce à leur circulation prolongée, permettant d'atteindre les sites métastatiques par effet EPR. Les cellules de cancer du sein de type MDA-MB-231 peuvent, par exemple, être injectées par voie intracardiaque ou iv afin de modéliser des métastases au

niveau de différents organes et peuvent également être injectées par voie intracrâniale pour mimer les métastases cérébrales³.

En parallèle de ces travaux, au vue de l'activité *in vivo* de l'ansa-FcdiOH sur le gliome 9L intradermique, l'étude d'efficacité de ce complexe encapsulé dans les LNC OS sur un modèle intracrânial constitue la prochaine étape. Cette étude pourrait être associée à un travail plus approfondi consacré à l'évaluation des LNC pour la délivrance cérébrale par voie iv. Une étude FRET pourrait donc être à nouveau envisagée sur des souris porteuses d'un glioblastome U87MG orthotopique avec, au préalable, étude de la perméabilité de la BHE après injection de bleu de trypan, afin de déterminer le jour optimal pour le traitement.

Compte tenu de l'implication des dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) dans le mécanisme d'action des complexes ferrocéniques, il serait intéressant d'évaluer leur interaction avec les mitochondries, source principale de la production cellulaire de DRO⁴. Par ailleurs, comme évoqué précédemment, les chimiothérapies administrées en clinique sont généralement constituées d'une association de différentes molécules anticancéreuses agissant en synergie. Une meilleure connaissance du mécanisme pourrait donc permettre d'envisager des co-traitements avec des molécules anti-cancéreuses standards, telle que le témozolomide ou la doxorubicine. En effet, il a été notamment montré que le flavonoïde kaempferol, qui induit l'apoptose sur des cellules de glioblastome par la production de DRO, pouvait potentialiser l'activité de la doxorubicine⁵. De même, le polyphénol resvératrol permettrait d'améliorer les effets du témozolomide, également à travers la production de DRO⁶. Toujours dans le cadre de l'activité biologique, certains des complexes seraient capables d'induire la sénescence cellulaire^{7,8}, un programme physiologique d'arrêt terminal de la multiplication des cellules. Ce mécanisme pourrait donc constituer une stratégie alternative permettant de surmonter la résistance des cancers aux stimuli pro-apoptotiques souvent à l'origine des échecs des thérapies⁹.

Enfin, étant donné les progrès en imagerie avec le développement de techniques non invasives, il serait intéressant d'élaborer un outil théranostique combinant le complexe ferrocénique et un agent d'imagerie au sein des LNC permettant ainsi un monitoring de la distribution et de l'évolution tumorale. Dans une perspective d'application clinique, ces outils théranostiques peuvent permettre de développer des thérapies personnalisées grâce à l'intégration d'un outil de diagnostic, d'imagerie et de thérapie dans un même nanosystème.

Pour conclure, ces travaux de thèse ont permis d'apporter de nouvelles connaissances sur le comportement des LNC et des complexes ferrocéniques, constituant un pas de plus vers l'élaboration de nouveaux nanomédicaments. C'est en poursuivant ces activités de recherche multidisciplinaires que les nanomédecines « magic bullet », capables de tuer sélectivement les cellules cancéreuses, pourraient devenir une réalité, comme le concevait le prix Nobel Paul Ehrlich dans les années 1900.

Références bibliographiques

1. Fantozzi, A.; Christofori, G. Mouse Models of Breast Cancer Metastasis. *Breast Cancer Research* **2006**, *8*, 212.
2. Weigelt, B.; Peterse, J. L.; Veer, L. J. van 't Breast Cancer Metastasis: Markers and Models. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 591–602.
3. Anders, C. K.; Adamo, B.; Karginova, O.; Deal, A. M.; Rawal, S.; Darr, D.; Schorzman, A.; Santos, C.; Bash, R.; Kafri, T.; *et al.* Pharmacokinetics and Efficacy of PEGylated Liposomal Doxorubicin in an Intracranial Model of Breast Cancer. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e61359.
4. Frantz, M.-C.; Wipf, P. Mitochondria as a Target in Treatment. *Environ. Mol. Mutagen.* **2010**, *51*, 462–475.
5. Sharma, V.; Joseph, C.; Ghosh, S.; Agarwal, A.; Mishra, M. K.; Sen, E. Kaempferol Induces Apoptosis in Glioblastoma Cells through Oxidative Stress. *Mol. Cancer Ther.* **2007**, *6*, 2544–2553.
6. Lin, C.-J.; Lee, C.-C.; Shih, Y.-L.; Lin, T.-Y.; Wang, S.-H.; Lin, Y.-F.; Shih, C.-M. Resveratrol Enhances the Therapeutic Effect of Temozolomide Against Malignant Glioma in Vitro and in Vivo by Inhibiting Autophagy. *Free Radic. Biol. Med.* **2012**, *52*, 377–391.
7. Roninson, I. B. Tumor Cell Senescence in Cancer Treatment. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 2705–2715.
8. Nardella, C.; Clohessy, J. G.; Alimonti, A.; Pandolfi, P. P. Pro-senescence Therapy for Cancer Treatment. *Nat Rev Cancer* **2011**, *11*, 503–511.
9. Kornienko, A.; Mathieu, V.; Rastogi, S. K.; Lefranc, F.; Kiss, R. Therapeutic Agents Triggering Nonapoptotic Cancer Cell Death. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 4823–4839.

Annexes

Annexe I

Chapitre de livre

**Brain tumors: Convection-enhanced delivery of drugs
(method)**

Chapter 21

Brain Tumors: Convection-Enhanced Delivery of Drugs (Method)

Anne-Laure Laine, Emilie Allard, Philippe Menei, and Catherine Passirani

Abstract Delivery of therapeutic agents into the brain has been an ongoing challenge for many years. The poor prognosis for patient with primary malignant brain tumors treated with conventional techniques (surgery, radiotherapy and chemotherapy) has motivated the development of new strategies to deliver drugs into the brain. Local intracranial delivery of anti-neoplastic agents has appeared to be the most effective drug delivery technique into the central nervous system by circumventing the limitations imposed by the blood brain barrier (BBB). Convection-enhanced delivery (CED) is an alternative strategy to directly infuse drugs into brain tissue. This approach is based on continuous injection of the therapeutic agent under positive pressure via a catheter implanted into the brain. Convective transport driven by pressure gradient allows a widespread distribution of small and large drugs within the brain. In vivo experiments in rodents, cats and primates proved the efficacy of CED to deliver drugs into a targeted zone. However, clinical trials have reported frequent leakage phenomenon leading to mixed results for this delivery technique. A better optimization of operational parameters including infusion rate, catheter design, catheter placement and drug pharmacological formulation should allow achieving accurate and efficient delivery. In conjunction with CED, the use of nanocarriers to enhance drug pharmacokinetic behavior may help to achieve higher therapeutic index against tumor cells

over healthy tissues. Additionally, the development of computer simulation to predict drug distribution and the real-time imaging for immediate assessment of convection efficiency may contribute to the CED improvement.

Keywords Therapeutic agents · Convection-enhanced delivery · Catheter · Infusion rate · Infusate · CNS

Introduction

Despite considerable advances of research in the area of Central Nervous System (CNS) disorders, the prognosis for patients with brain tumors remains poor. Median survival for patients with the most severe form treated with surgical resection, radiation and the addition of systemic chemotherapy is 12–15 months (Stupp et al., 2005). Finding new therapeutic strategies that will provide efficient treatment against CNS tumors remains a major challenge.

Conventional methods for the treatment of brain tumors usually involve delivery of drugs via the systemic circulation. Failure of those therapies is attributed to the presence of the blood brain barrier (Pardridge, 2007). The BBB is a physical barrier that separates circulating blood from cerebrospinal fluid in the CNS. This separation protects the brain from the penetration of toxic substances throughout the CNS. The restricted entry into the brain is imposed by a layer of endothelial cells joined by tight junctions. This structure confers a limited diffusion through the BBB that prevents the entry of most pharmaceuticals into the CNS.

C. Passirani (✉)
INSERM, U646, Université d'Angers, Angers F-491000,
France
e-mail: catherine.passirani@univ-angers.fr

Despite a variety of approaches tested for enhancing BBB permeability of drugs, no significant improvement was showed for the treatment of CNS tumors (Misra et al., 2003). The poor results obtained by all conventional therapies and the unchanged prognoses for patient with GBM have motivated more direct approaches of drug delivery. Intracranial drug delivery has appeared to be the most adequate method of overcoming the BBB (Sawyer et al., 2006).

In theory, regional drug approach constitutes a way to deliver high concentration of drug directly into the tumor. Such delivery can also reduce systemic exposure to drug-induced toxicity. A local delivery technique was achieved implanting a degradable or non-degradable polymer delivery system into the brain (Raza et al., 2005). This approach presents some advantages such as sustained controlled drug release. However, polymer-controlled release as intracerebral bolus injection suffers from restricted drug distribution due to limited drug diffusion within the brain (Fung et al., 1998). An alternative local delivery based on convective transport has been proposed to overcome the limitation imposed by the diffusion observed with polymer-delivery system. This technique called Convection-Enhanced Delivery (CED) was introduced by researchers from the US National Institutes of Health (NIH) by the early 1990s (Bobo et al., 1994). In CED method, the infusate is administered via a small catheter connected to a pump. The continuous injection of a convective flow directly in the brain results in a widespread distribution of small as well as large molecules into it (Debinski and Tatter, 2009). By bypassing the BBB, this technique allows the local delivery of a variety of agents, ranging from conventional therapeutics agents, to monoclonal antibodies, targeted toxins, nanocarriers (Allard et al., 2009) and viruses (Bidros and Vogelbaum, 2009).

However, several parameters can affect therapeutic efficacy of CED, including infusion rate, cannula shape, infused tissue structure and physico-chemical properties of the infusate. Those parameters have to be carefully investigated and set up for an optimal delivery. This chapter aims at giving an overview of the CED approach. The following paragraphs will describe the technical aspects and critical parameters of this promising local delivery technique. Optimal setting for efficient delivery will be proposed according to the literature.

Convection Enhanced Delivery

Convection-enhanced delivery is a local delivery method in which drugs are infused directly into brain tissue. The therapeutic agents are administered via one to several catheters implanted into the brain (Fig. 21.1a). An external pump produces a positive pressure which pushes the infusate through the catheter. With this delivery system, the drug is directly infused into the target tissue at a predetermined concentration, rate and duration.

The use of a catheter allows a stereotaxic placement into a CNS targeted zone. Stereotaxy uses a three-dimensional coordinates system to localize structures and targets within the brain. Thanks to this technique, the catheter can be accurately implanted within the tumor mass or around the tumor or the resection cavity. The ability to target the delivery placement limits structural damage to the infused tissue, except at the site of the catheter, and allows avoiding systemic toxicity.

Most of local delivery techniques including polymer systems and bolus injection rely on diffusive transport to distribute a therapeutic agent within the CNS. Diffusion corresponds to the spread of molecules from regions of higher concentration to regions of lower concentration. The diffusion of a compound depends mainly on the concentration gradient and its diffusivity properties. Many therapeutic agents such as neurotrophic factors, antibodies, growth factors and enzymes are not able to diffuse over large distances into the brain due to high molecular weight. This poor diffusion severely limits drug distribution and penetration into the brain tissue. For example, an antibody IgG requires 3 days to diffuse 1 mm from its delivery site in tumor (Jain, 1989). That is why most antineoplastic substances show limited effects after direct administration into brain via diffused-based techniques. In contrast to those delivery techniques, CED relies on convection, a molecular weight independent transport, to overcome the limitation imposed by diffusion. The term convection refers to the mass transfer by bulk motion of the fluid. In CED, the convective flow, also called bulk flow, is driven by pressure gradient induced by the difference between the interstitial pressure and the pressure at the tip of the catheter. Drugs are carried along with the fluid flow and distributed through the brain tissue by convective and diffusive transport.

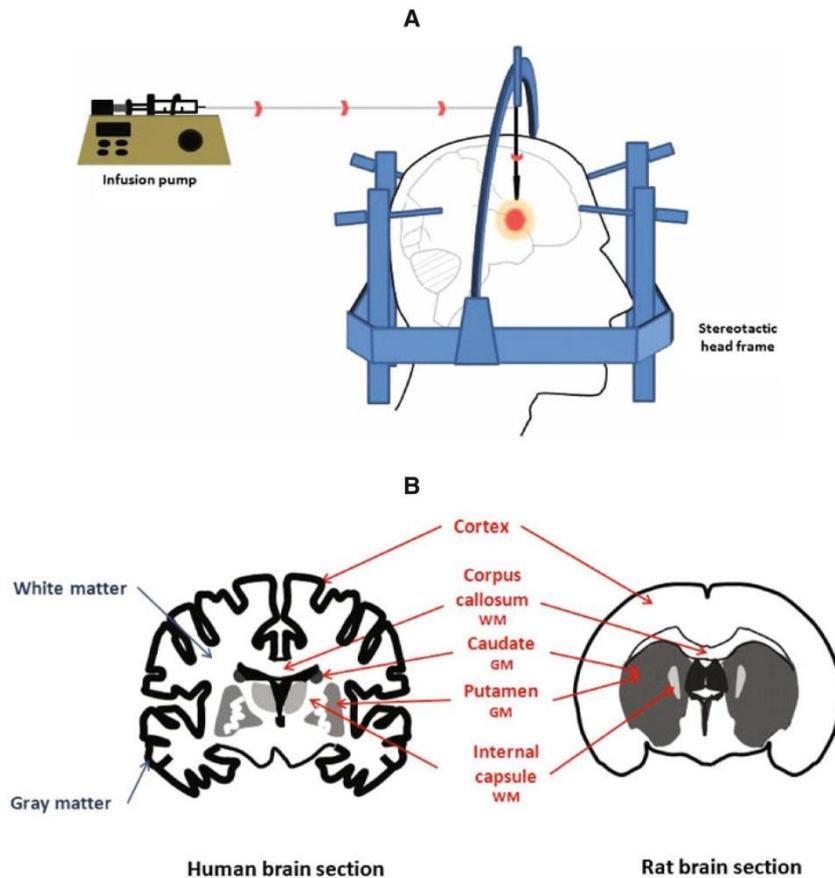


Fig. 21.1 a Convection-enhanced delivery in a human brain. The drug is infused via a catheter implanted into the brain. An external pump connected to the catheter provides positive pressure pushing the drug through the interstitial space of the

central nervous system. **b** Brain section with identification of the gray matter (GM) and white matter (WM) location in humans and rats

The superposition of transports by random motion of the molecules (diffusion) and by the bulk motion of the fluid (convection) offers a greater volume of distribution than simple diffusion. Morrison et al. (1994) showed that CED can provide distribution volumes in brain that are 2- to 10-fold larger than those obtained after direct interstitial injection (Morrison et al., 1994). Additionally, data from CED studies showed enhanced distribution of various therapeutic agents in rat, cat and non human primate brains with an order of magnitude greater than simple diffusion-based delivery (Bobo et al., 1994; Yokosawa et al., 2010).

However, despite proven efficacy, CED shows some limitations. Most common issues with infusions of

drug into the brain are reflux along the catheter track and leakage outside the targeted area. It has been reported that leakage phenomenon affects 20% of CED experiments (Varenika et al., 2008). While preventing continued pressure in the interstitial space, reflux and leakage can also increase the risk of neurotoxicity to adjacent tissue and induce adverse effects. The occurrence of leakage and reflux may explain the mixed results obtained in clinical trials (Kunwar, 2003, 2007). Indeed, for optimal CED efficiency, it is essential to cover the entire target zone while avoiding exposure of healthy tissue. The extent of drug distribution achieved via CED depends on the type of tissue infused (that is, tumor, gray matter or white matter), infusion volume

and rate, catheter design but also on drug elimination mechanism including metabolism, binding, efflux and leakage. These different parameters are discussed in the following paragraphs.

Key Parameters

Catheter Placement

During CED, the distribution volume for a given agent is highly dependent on the type of tissue being infused and its structural properties, such as hydraulic conductivity, vascular volume fraction, and extracellular fluid fraction. Clinical trials outcomes have highlighted the importance of accurate catheter placement for optimal drug distribution (Kunwar et al., 2007). Two main areas can be distinguished in the CNS; the gray matter and the white matter (Fig. 21.1b). The gray matter is mainly composed of cell bodies and glial cells and the transport within this structure is isotropic. In contrast, the white matter consists mostly of axons leading to the peripheral nervous system. This structure composed of fiber pathways makes the transport anisotropic. It is worth noting that gliomas invasion preferentially occurs along these white bundles. It has been reported that a significant natural bulk flow with an interstitial velocity of $10 \mu\text{m}/\text{mL}$ may exist in porous white matter near the ventricular surface (Rosenberg et al., 1980).

Bobo et al. (1994) demonstrated that an infusion via CED into the corona radiata (white matter) of cats allowed an effective and large distribution of the drug within the brain tissue. Similar observations were reported by Lieberman et al. (1995) regarding a drug infusion via CED into the gray matter. Both gray and white matters have the capability to distribute the infused drug within the CNS. However, the distribution profile differs between both structures and the difference is even more significant compared to brain tumor.

When the infusion takes place into a homogeneous brain structure (e.g., gray matter) the infusion is initially driven by pressure gradient from the source of injection toward surrounding tissue producing spherical volume (Fig. 21.2a). The concentration profile in this volume is relatively uniform and proportional to the delivered concentration. At the flow front, the pressure gradient reaches zero and the distribution

is no longer driven by convection but by diffusion. The concentration declines precipitately and exponentially within adjacent tissues in accordance with the mathematics of diffusion (Morrison et al., 1994).

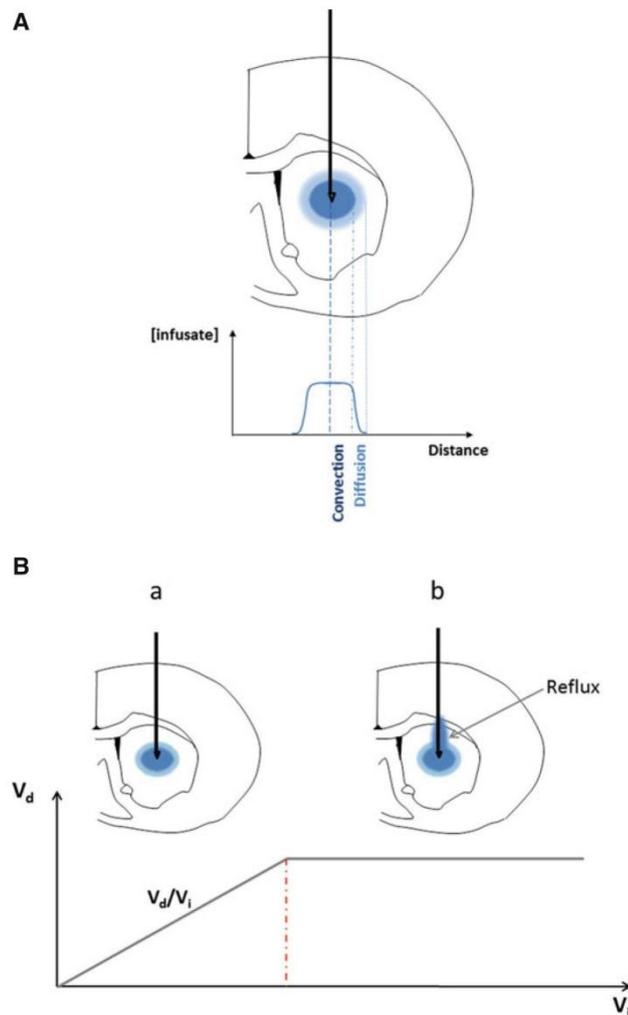
If the infused drug encounters a structure containing fiber pathways (eg. white matter), the convective flow can be modified by the natural bulk flow within that pathway. It has been reported that interstitial velocities into the white matter may be used to increase the rate of the infusate (Rosenberg et al., 1980). However, this natural movement in white matter can also lead to unpredictable flow and leakage outside the target zone if the direction of the natural bulk flow is opposed to that of the infusate flow (Krauze et al., 2005).

It is apparent that inhomogeneities in the tissue may cause unpredictable distribution. The presence of oedemas, often observed in brain cancer and also induced by infusion, reduces volume of treated tissue and can disturb the flow of the infused drug. Moreover, the distribution profile into brain tumors differs markedly from the normal brain. This variation may be due to the difference of interstitial fluid pressure. In normal brain tissue the interstitial pressure is relatively low, 1–2 mmHg, whereas in brain tumor tissue it can be more than 25 times greater. The increased interstitial pressure in peritumoral tissue and within the tumor produces a counterproductive pressure gradient that can drive infusate to follow the path of lowest interstitial pressure, out of high pressure areas such as tumor tissue. The complex anatomy of brain tumor and its high intracranial pressure can lead to drug distribution in undesired area and leakage into the subarachnoid space.

Infusion Volume and Rate

The flow of injection is a critical parameter for forming an efficient convection and is related to the resistance of the infused tissue (gray and white matter). Experimental results have demonstrated that the higher the infusion rate, the greater the reflux induced (Morrison et al., 1999). It has been shown that infusion rate below $0.5 \mu\text{L}/\text{min}$ in normal brain limits the spread of the drug but results in homogeneous distribution whereas high flow (above $5 \mu\text{L}/\text{min}$) facilitates backflow (Bobo et al., 1994; Morrison et al., 1999). In most cases, the optimal infusion rate is that which allows the delivery of the therapeutic volume over the

Fig. 21.2 **a** Schematic representation of drug distribution in brain tissues via CED. The drug distribution is initially driven by convective flow producing a spherical volume around the infusion point. At the flow front, the infusion is governed by diffusion. **b** Relationship between the volume of infusion (V_i) and the volume of distribution (V_d). In a successful delivery (**a**), V_d linearly increases in proportion to V_i . Once undesirable phenomenon begins such as leakage or reflux (**b**), there is a plateau to V_d despite increases in V_i



least amount of time without associated reflux. The optimal infusion rate is also dependent on the cannula size. Krauze et al. (2005) reported that CED infusion flow rates less than $0.5 \mu\text{L}/\text{min}$ can prevent reflux in catheters up to 0.6 mm (outer diameter). However, higher infusion rates are preferred in order to shorten the CED treatment. A mean to achieve high rate is to use modified catheter such as stepped catheter or hollow fiber catheter. Those different types of catheters and their delivery characteristics are described in the following chapter.

A correlation between the infusion volume (V_i) and the distribution volume (V_d) has been largely

proved from several CED outcomes (Bobo et al., 1994; Varenika et al., 2008). In an efficient CED without reflux or leakage, the relationship between V_i and V_d is linear which means that V_d increases linearly in proportion to V_i (Fig. 21.2b). The slope of the curve V_d/V_i is dependent on the structural properties of the tissue, the characteristics of the infusate and the rate of infusion (Bobo et al., 1994; Varenika et al., 2008). Once reflux or leakage begins, there is a plateau to V_d . Despite increases in V_i , V_d does not increase. The extra infused volume is lost in leak or reflux along the catheter track, away from the targeted zone.

Catheter Design

The first infusion tool for CED was a needle implanted into the brain of experimental animals (Bobo et al., 1994). The technique has been improved replacing the needle by a catheter which can be stereotactically placed in the CNS. The material used for the catheter fabrication has to be biocompatible to allow a long implantation time. Such material can be plastic, teflon or fused silica. Standard catheters have only one port through that the drug is released. It has been recognized that the larger the catheter diameter, the more easily reflux occurs (Morrison et al., 1999). Additionally, data from experiments with agarose gelatin have shown that small diameter catheters can produce repeatable and uniform spherical volume of distribution (Bauman et al., 2004).

New types of CED catheters (Fig. 21.3) are currently under development to increase the efficiency and the reliability of drug delivery. Fiandaca et al. (2008) developed a stepped cannula that allows increasing the infusion rate up to 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ without any reflux. This reflux-preventing catheter consists of a needle extended with a narrower tip at its end, the differing diameter making the step. This design prevents the reflux along the catheter track by restricting initial backflow of fluid flow beyond the step. The stepped cannula was recently compared with a stepless cannula by Yin et al. (2010). They showed that reflux

occurred at only 0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ in agarose gel for the stepless cannula leading to a small infusion volume of 4 μL . In contrast, with the 1-mm step cannula no reflux occurred even at high infusion rate of 3.0 $\mu\text{L}/\text{min}$ allowing a wide distribution volume of 79 μL . Moreover, the infusion of a recombinant growth factor, GDNF via the step design cannula allowed achieving a great distribution volume of 97.2% in rat striatum with little evidence of reflux. The distribution volume percentage reached via the cannula without step was only 70.7% with significant reflux and leakage in the corpus callosum and the white matter (Yin et al., 2010).

Catheters with a single opening for the drug release have shown their limitation for the delivery into brain tumor. The pressure gradient resulting from high interstitial pressure in brain tumor drives the drug flow into low-pressure area. With one port catheter, the infusate flow will follow the path of lowest interstitial pressure which will restrict the distribution and may lead to leakage. Thus, multiple-hole catheters have been designed to provide infusate flow in all the directions around the catheter overcoming the limitation of the one port catheter. The design consists of multiple openings of a few millimeters along the distal end of the catheter. However, a previous study performed in agarose gel showed that the drug release is effective only via the proximal port, rendering the other ports useless (Raghavan et al., 2006). This issue can be overcome by reducing the hole size. A porous hollow fiber

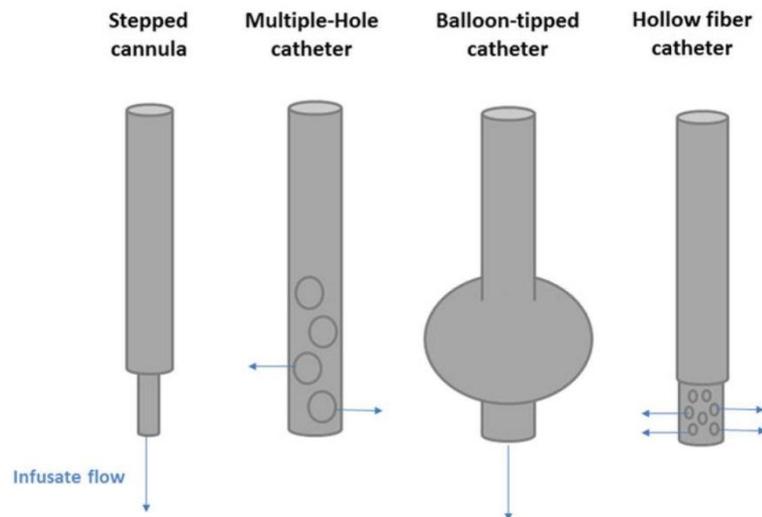


Fig. 21.3 Novel catheter designs for CED: stepped cannula, multiple-hole catheter, balloon-tipped catheter, hollow fiber catheter

catheter composed of millions of nano-openings (0.45 μm) along its surface has been developed to provide multiple pathways for the drug to infuse within the tissue. Seunguk et al. (2009) compared the distribution of Evans blue dye into the mouse brain through CED via a hollow fiber catheter versus a conventional 28-gauge needle. Experimental results showed a threefold increase in the dye distribution volume with the hollow fiber catheter relative to the single-lumen needle.

Since recently, a new type of catheter named balloon-tipped catheter has been proposed. This catheter is a one-port-opening with a balloon proximal to its tip which can be inflated. The inflated form has been designed to fill a resection cavity and prevent reflux phenomenon. A CED experiment using balloon-tipped catheter into canine model showed an efficient drug penetration within the brain parenchyma all around the balloon (Olson et al., 2008).

Infusate Formulation

In a typical CED application, the therapeutic agent is dissolved in saline solution and delivered by infusion under positive pressure (Yang et al., 2011). It has been observed that infusion of some drugs achieves poorer efficiency than others due to their low viscosity. Mardor et al. (2005) have shown that low-viscosity infusates tend to backflow along the catheter and into the ventricles whereas high-viscosity infusates limit backflow event and tend to form efficient convection. The infusate viscosity can be increased by adding sucrose, human serum albumin or polyethylene glycol in the aqueous phase of the infusate. A linear correlation between infusate viscosity and distribution volume has been established showing the impact of the viscosity on the CED efficacy. Additionally, infusion of high-viscosity infusate via CED allows covering larger volumes of distribution in less time, thus leading to shorter treatment. Highly viscous formulation can be applied to a wide range of infusate including gene therapy, proteins, and nanoparticles (Perlstein et al., 2008).

It has also been shown that the use of co-infusate (e.g., heparin, basic fibroblast growth factor or mannitol) expedites the spread of the drug within the CNS by reducing the affinity of therapeutic agent to the

brain environment. For example, the tissue penetration of GDNF and GDNF-homologous trophic factors was significantly enhanced with heparin co-infusion, probably by binding and blocking heparin-binding sites in the extracellular matrix (Hamilton et al., 2001).

Despite these progresses, CED of free drug shows severe limitations. First of all, the drug concentration that can be delivered is limited by the solubility of the drug. Additionally, efficiency of free drug CED is restricted by rapid clearance of the therapeutic agent from the tumor interstitium (Kunwar et al., 2007) and no selective accumulation in targeted tissue. Other issues inherent to the physico-chemical properties of the drug can undermine CED efficiency. Although being a promising therapeutic agent, CED of free synthetic retinoid Am80, did not show any improvement on the mean survival days of rats bearing intracranial glioblastoma xenografts (Yokosawa et al., 2010). The failure was attributed to the Am80 hydrophobicity which increases the retention within the brain tissue resulting in a poor distribution volume.

A solution to overcome solubility issue and to protect therapeutic agents against elimination and in vivo degradation is to formulate them into nanocarriers. Different drug carrier systems have recently emerged and been tested in CED technique including liposomes (Saito et al., 2006), polymer micelles (Inoue et al., 2009), lipid nanocapsules (Allard et al., 2009). . . Inoue et al. (2009) compared the therapeutic efficacy of free doxorubicin (DOX) and polymer micellar DOX infused by CED against 9L brain tumors in rat model. They showed that polymer micellar doxorubicin (DOX) achieved much wider distribution in brain tissue than free DOX. Accordingly, the median survival obtained with micellar DOX was 36 days compared to 19.6 days obtained from the free DOX treatment.

Nanocarriers are constructed systems in nanometer size that can carry drugs (Yokosawa et al., 2010) and imaging agents (Fiandaca et al., 2008). Carrier systems include mainly polymer or lipid-based carriers such as liposomes, nanoparticles, micelles and dendrimers. These differ in structure composition, drug-loading capacity, carrier stability, targeting possibility and ability to encapsulate hydrophobic or hydrophilic molecule. Nanocarrier systems are of great interest as they are inert until the drug is released from the confine of the carriers, thus minimizing side effects and toxicity to normal brain tissue. Additionally, they

offer several advantages, including enhancement of drug pharmacokinetic behavior and convection properties. Once a drug is encapsulated, the pharmacokinetic properties are no longer related to the drug but are determined by the nanocarrier. Furthermore, the nanocarrier architecture offers the possibility to adjust drug release rate. Improving sustained drug release allows the prolongation of drug's half-life leading to increased exposure of brain tumor tissue to the therapeutic agent. It also limits the high peak concentration of free drug potentially associated with toxicity and provides an effective inhibition of drug absorption by cells.

Surface properties have a considerable impact on the spread of the infusate distribution. The poorer brain distribution observed with hydrophobic or cationic infusate can be circumvented by adding polyethylene glycol or dextran onto the nanocarrier. Indeed, PEG or dextran coating make the infusate more hydrophilic leading to less tissue affinity and increased distribution. Saito et al. (2006) have reported that athymic nude rats bearing U87MG human glioma cells survived significantly longer after treatment with topotecan encapsulated into PEGylated liposome given by CED compared with free topotecan. PEG encapsulation also provides steric stabilization and reduces surface charge (Yokosawa et al., 2010).

As the pore size of the extracellular matrix (ECM) is estimated as about 50 nm, nanocarrier size should be in the range of 20–50 nm for an effective transit through the interstitial space (MacKay et al., 2005). It has been showed that the infusion of a hyperosmolar solution of mannitol, either before the CED treatment or in co-infusion with the drug, may increase the size of channels of the interstitial space enhancing the nanoparticle transport through the ECM (Neeves et al., 2007). For instance, CED of 40 nm-liposomes co-infused with 25% mannitol showed an improvement of the V_d from 52.5 ± 2.1 to 78.5 ± 5.5 units immediately after CED (Mamot et al., 2004).

Ced Patient-Specific Simulation and Real-Time Imaging

Imaging of brain tumor can be realized via CED. The co-infusion of tracers with the drug allows monitoring its distribution as it is being delivered (Fiandaca et al., 2008). The most common technique currently used to track real-time distribution of therapeutics is the

Magnetic Resonance Imaging (MRI). Varenika et al. (2008) used gadoteridol-loaded liposomes infused by CED to visualize the distribution in various anatomical structures of the CNS of nonhuman primates and canines with MR imaging. This technique evidenced the unexpected high frequency of leakage phenomenon (20% of infusions) into cerebral ventricles.

Monitoring of CED is of crucial importance to ensure optimal delivery of therapeutic agents into target sites while minimizing exposure of healthy tissue. Adjustment and alteration to the infusion plan can be carried out in case of undesirable events during the process. In the event of reflux, reducing the infusion rate can allow CED process to continue while backflow is limited. More drastic changes would include altering the cannula placement or inserting a second cannula at the onset of leakage. Those adjustments could allow overcoming leakage issues and covering the targeted area without stopping the process.

Additionally, direct visualization can help to determine whether a treatment failed because of the drug's lack of therapeutic efficacy or because of inadequate delivery. Monitoring information allows optimizing the process including catheter placement in order to achieve robust and reliable delivery of therapeutics.

As for any invasive procedure, it would be of great interest to base decision on how to plan CED with patient-specific simulation. The entry of CED in clinical trial has motivated the development of computational methods to aid in planning CED treatments. Such software developed by BrainLAB AG and approved by FDA is now commercially available for neuro-oncology. This program simulates drug distribution into the human brain based on the individual patient's tractography MRI data and brain tissue anatomy. It is worth noting that tractography allows visualizing the white matter bundles which is of great interest for the simulation of drug distribution. Treatment of specific tumor can be visualized in 3D including the number and position of catheters. The distribution concordance between the actual distribution of ILI3-PE38QQR co-infused with ^{123}I -albumin by CED and the distribution prediction has proved the software specificity and reliability in treatment planning (Sampson et al., 2007). Additionally, this simulation allows observing infusate leakage into the subarachnoid cerebrospinal fluid space when catheters cross deep sulci (Sampson et al., 2007). Computational simulation provides therefore a useful tool to optimize CED catheter placement.

Conclusion

Convection enhanced-delivery has been developed as a local drug delivery strategy. Using convective transport, it offers the advantage of better drug distribution than the regional delivery technology based on diffusion. CED represents a potential powerful methodology for targeted therapy in the field of neuro-oncology. Bypassing the blood-brain barrier, this approach allows tumor and other brain tissue to be exposed to high drug concentration that could not be achieved via systemic application. The potential of this technique has been clearly demonstrated in preclinical studies (Yang et al., 2011; Yokosawa et al., 2010). However, adverse events including drug backflow along the catheter track and leakage in undesired zone can occur during infusion. Such events undermine CED efficacy and can imply side effects including neurotoxicity and adjacent structure damages.

Some improvements are under development for making CED an effective way of delivering antineoplastic drugs in human brain. The use of nanocarrier technology to deliver drugs via CED seems to be a promising combination to improve the efficacy of the treatment against brain tumor. Further development of targeting nanocarriers would allow the accumulation in the desired area and limit extensive distribution into the CNS. It may also help to penetrate the tumor which shows relative inaccessibility. However, there is a need to better understand the drug release mechanism out of the carrier system. It would be also of great interest to pay special attention to others parameters which may impact the distribution such as the manipulation of physiological parameters including blood pressure and heart rate. Indeed, it was shown that larger V_d could be obtained by increasing blood pressure/heart rate induced by epinephrine (Hadaczek et al., 2006).

There is also a need for a better understanding of the drug delivery into tumor brain, markedly different from normal brain. Clinical trials have also reported that target tissue anatomy and patient-specific anatomy play a major role in drug distribution using CED. Gaining more information about the brain's anatomy and fluid dynamics that govern delivery would allow predicting the time, direction and eventually, the efficiency of therapeutic molecule distribution. Finally, the transposition from rodent or non human primate brain to human brain remains an ongoing challenge

due to significant differences between brain structures (Fig. 21.1b) and CED intra-operational parameters have to be adjusted by taking precisely anatomical criteria into account.

References

- Allard E, Huynh NT, Vessières A, Pigeon P, Jaouen G, Benoit JP, Passirani C (2009) Dose effect activity of ferrocifen-loaded lipid nanocapsules on a 9L-glioma model. *Int J Pharm* 379(2):317–323
- Allard E, Passirani C, Benoit JP (2009) Convection-enhanced delivery of nanocarriers for the treatment of brain tumors. *Biomaterials* 30:2302–2318
- Bauman MA, Gillies GT, Raghavan R, Brady ML, Pedain C (2004) Physical characterization of neurocatheter performance in a brain phantom gelatin with nanoscale porosity: steady-state and oscillatory flows. *Nanotechnology* 15:92–97
- Bidros DS, Vogelbaum MA (2009) Novel drug delivery strategies in neuro-oncology. *J Am Soc Exp Neuroth* 6:539–546
- Bobo RH, Laske DW, Akbasak A, Morrison PF, Dedrick RL, Oldfield EH (1994) Convection-enhanced delivery of macromolecules in the brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:2076–2080
- Debinski W, Tatter ST (2009) Convection-enhanced delivery for the treatment of brain tumors. *Expert Rev Neurother* 9:15719–1527
- Fiandaca MS, Forsayeth JR, Dickinson PJ, Bankiewicz KS (2008) Image-guided convection-enhanced delivery platform on the treatment of neurological diseases. *Neurotherapeutics* 5:123–127
- Fung LK, Ewend MG, Sills A, Sipos EP, Thompson R, Watts M, Colvin OM, Brem H, Saltzman WM (1998) Pharmacokinetics of interstitial delivery of carmustine, 4-hydroperoxycyclophosphamide, and paclitaxel from a biodegradable polymer implant in the monkey brain. *Cancer Res* 58:672–684
- Hadaczek P, Mirek H, Tamas L, Bohn MC, Noble C, Park JW, Bankiewicz K (2006) The “perivascular pump” driven by arterial pulsation is a powerful mechanism for the distribution of therapeutic molecules within the brain. *Mol Therapy* 14:69–71
- Hamilton JF, Morrison PF, Chen MY, Harvey-White J, Pernaute RS, Phillips H, Oldfield E, Bankiewicz KS (2001) Heparin coinfusion during convection-enhanced delivery (CED) increases the distribution of the glial-derived neurotrophic factor (GDNF) ligand family in rat striatum and enhances the pharmacological activity of neurturin. *Exp Neurol* 168:155–161
- Inoue T, Yamashita Y, Nishihara M, Sugiyama S, Sonoda Y, Kumabe T, Yokoyama M, Tominaga T (2009) Therapeutic efficacy of a polymeric micellar doxorubicin infused by convection-enhanced delivery against intracranial 9L brain tumor models. *Neuro-Oncology* 11:151–157
- Jain RK (1989) Delivery of novel therapeutic agent in tumors: physiological barriers and strategies. *J Natl Cancer Inst* 81:570–576

- Krauze MT, Saito R, Noble C, Bringas J, Forsayeth J, Mcknight TR, Park J, Bankiewicz KS (2005) Effects of the perivascular space on convection-enhanced delivery of liposomes in primate putamen. *Exp Neurol* 196:104–111
- Kunwar S (2003) Convection enhanced delivery of IL13-PE38QQR for treatment of recurrent malignant glioma: presentation of interim findings from ongoing phase I studies. *Acta Neurochir Suppl* 88:105–111.
- Kunwar S, Prados MD, Chang SM, Berger MS, Lang FF, Piepmeier JM, Sampson J, Ram Z, Gutin PH, Gibbons RD, Aldape KD, Croteau DJ, Sherman JW, Puri RK (2007) Direct intracerebral delivery of cintredekin besudotox (IL13-PE38QQR) in recurrent malignant glioma: a report by the Cintredekin Besudotox Intraparenchymal Study Group. *J Clin Oncol* 25:837–844
- Lieberman DM, Laske DW, Morrison PF, Bankiewicz KS, Oldfield EH (1995) Convection-enhanced distribution of large molecules in gray matter during interstitial drug infusion. *J Neurosurg* 82:1021–1029
- MacKay JA, Deen DF, Szoka C Jr (2005) Distribution in brain of liposomes after convection enhanced delivery; modulation by particle charge, particle diameter, and presence of steric coating. *Brain Res* 1035:139–153
- Mamot C, Nguyen JB, Pourdehnad M, Hadaczek P, Saito R, Bringas JR, Drummond DC, Hong K, Kirpotin DB, McKnight T, Berger MS, Park JW, Bankiewicz KS (2004) Extensive distribution of liposomes in rodent brains and brain tumors following convection-enhanced delivery. *J Neurooncol* 68:1–9
- Mardor Y, Rahav O, Zauberman Y, Lidar Z, Ocherashvilli A, Daniels D, Roth Y, Maier SR, Orenstein A, Ram Z (2005) Convection-enhanced drug delivery: increased efficacy and Magnetic Resonance Image Monitoring. *Cancer Res* 65:6858–6863
- Misra A, Ganesh S, Shahiwala A, Shah SP (2003) Drug Delivery to the central nervous system: a review. *J Pharm Pharm Sci* 6:252–273
- Morrison PF, Chen MY, Chadwick RS, Lonser RR, Oldfield EH (1999) Focal delivery during direct infusion to brain: role of flow rate, catheter diameter, and tissue mechanics. *Am J Physiol* 277:1218–1229
- Morrison PF, Laske DW, Bobo H, Oldfield EH, Dedrick RL (1994) High-flow microinfusion: tissue penetration and pharmacodynamics. *Am J Physiol* 266:292–305
- Neeves KB, Sawyer AJ, Foley CP, Saltzman WM, Olbricht WL (2007) Dilution and degradation of the brain extracellular matrix enhances penetration of infused polymer nanoparticles. *Bain Res* 1180:121–132
- Olson JJ, Zhang Z, Dillehay D, Stubbs J (2008) Assessment of a balloon-tipped catheter modified for intracerebral convection-enhanced delivery. *J Neurooncol* 89:159–168
- Pardridge WM (2007) Blood-brain barrier delivery. *Drug Discov Today* 12:54–61
- Perlstein B, Ram Z, Daniels D, Ocherashvilli A, Roth Y, Margel S, Mardor Y (2008) Convection-enhanced delivery of maghemite nanoparticles: increased efficacy and MRI monitoring. *Neuro-Oncology* 10(2):153–161
- Raghavan R, Brady ML, Rodríguez-Ponce MI, Hartlep A, Pedain C, Sampson JH (2006) Convection-enhanced delivery of therapeutics for brain disease, and its optimization. *Neurosurg Focus* 20:E12
- Raza SM, Pradilla G, Legnani FG, Thai QA, Olivi A, Weingart JD, Brem H (2005) Local delivery of antineoplastic agents by controlled-release polymers for the treatment of malignant brain tumours. *Expert Opin Biol Ther* 5:477–494
- Rosenberg GA, Kyner WT, Estrada E (1980) Bulk flow of brain interstitial fluid under normal and hyperosmolar conditions. *Am J Physiol* 238:42–49
- Saito R, Krauze MT, Noble CO, Drummond DC, Kirpotin DB, Berger MS, Park JW, Bankiewicz KS (2006) Convection-enhanced delivery of Ls-TPT enables an effective, continuous, low-dose chemotherapy against malignant glioma xenograft model. *Neuro-Oncology* 8:205–214
- Sampson JH, Raghavan R, Brady ML, Provenzale JM, Herndon JE II, Croteau D, Friedman AH, Reardon DA, Coleman RE, Wong T, Bigner DD, Pastan I, Rodríguez-Ponce MI, Tanner P, Puri R, Pedain C (2007) Clinical utility of a patient-specific algorithm for simulating intracerebral drug infusions. *Neuro-Oncology* 9:343–353
- Sawyer AJ, Piepmeier JM, Saltzman WM (2006) New methods for direct delivery of chemotherapy for treating brain tumors. *Yale J Biol Med* 79:141–152
- Seunguk O, Odland R, Wilson SR, Kroeger KM, Liu C, Lowenstein PR, Castro MG, Hall WA, Ohlfest JR (2009) Improved distribution of small molecules and viral vectors in the murine brain using a hollow fiber catheter. *Neuro-Oncology* 9:343–353
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphroom MJB, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352:987–996
- Varenika V, Dickinson P, Bringas J, LeCouteur R, Higgins R, Park J, Fiandaca M, Berger M, Sampson J, Bankiewicz K (2008) Detection of infusate leakage in the brain using real-time imaging of convection-enhanced delivery. *J Neurosurg* 109:874–880
- Yang W, Huo T, Barth RF, Gupta N, Weldon M, Grecula JC, Ross BD, Hoff BA, Chou TC, Rousseau J, Elleaume H (2011) Convection enhanced delivery of carboplatin in combination with radiotherapy for the treatment of brain tumors. *J Neurooncol* 101:379–390
- Yin D, Forsayeth J, Bankiewicz KS (2010) Optimized cannula design and placement for convection-enhanced delivery in rat striatum. *J Neurosci Meth* 187:46–51
- Yokosawa M, Sonoda Y, Sugiyama S, Saito R, Yamashita Y, Nishihara M, Satoh T, Kumabe T, Yokoyama M, Tominaga T (2010) Convection-enhanced delivery of a synthetic retinoid Am80, loaded into polymeric micelles, prolongs the survival of rats bearing intracranial Glioblastoma xenografts. *Tohoku J Exp Med* 221:257–264

Annexe II

Article paru dans « Science et Santé »

→ DÉCOUVERTES

Cancer du sein

Des nanocapsules contre les « triples négatifs »

Caractérisés par l'absence concomitante au niveau des cellules cancéreuses des récepteurs aux œstrogènes, à la progestérone et au facteur de croissance cellulaire HER2, les cancers du sein « triples négatifs » sont particulièrement agressifs. Insensibles aux traitements actuels, ils nécessitent l'exploration de voies thérapeutiques alternatives. Ainsi, le tamoxifène, majoritairement utilisé contre les cancers du sein hormono-dépendants, qui agit via les récepteurs aux oestrogènes, semble être inutile. Cependant, son association au ferrocène, un composé organométallique, a montré *in vitro* un effet sur la prolifération des cellules cancéreuses. Anne-Laure Lainé (✉), au sein de l'unité Micro- et nanomédecines biomimétiques, a mis en évidence que l'injection dans le péritoine de nanocapsules lipidiques transportant le ferrocényl-tamoxifène ralentissait le développement des tumeurs chez des souris xénogreffées avec des cellules cancéreuses mammaires d'origine humaine et dépourvues de récepteurs aux oestrogènes. Un premier essai *in vivo* plein de promesses... V. M.

✉ Anne-Laure Lainé : unité 1066 Inserm – Université d'Angers

📖 A.-L. Lainé *et al.* *Biomaterials*, septembre 2013 ; 34 (28) : 6949-56

Curriculum vitae

Compétences

Formulation et drug delivery

- Techniques de solubilisation de principes actifs hydrophobes
- Formulation de nanoparticules
 - nanocapsules lipidiques
 - liposomes
 - nanosuspensions
 - Technologie « Top-down » : homogénéisation haute pression, broyage en voie humide
 - Technologie « Bottom-up » : émulsification / évaporation de solvant, nanopréciipitation via co-solvant
 - Modification de surface pour ciblage actif et passif
- Technologie des poudres
 - Micronisation en voie sèche
 - Mélange de poudres
 - Compression
 - Nano-broyage en voie humide
- Lyophilisation
- Connaissances en masquage de goût

Caractérisation et techniques analytiques

- Mesure de la taille des particules : diffusion dynamique de la lumière (DLS), granulométrie laser, microscopie
- Développement de méthode de mesure de taille par granulométrie laser (formation)
- Potentiel zéta
- Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)
- HPLC (formation, logiciel : Empower, Chromeleon)
- Spectroscopie UV
- Test de dissolution *in vitro*

Etudes *in vitro* / *in vivo*

- *In vitro* : Culture cellulaire, immunohistochimie, étude d'internalisation par FACS
 - *In vivo* : Manipulation des animaux, inoculation de tumeurs, études pharmacocinétiques, études d'efficacité, injection intraveineuse, intrapéritonéale et intra-carotidienne, ponction cardiaque, stéréotaxie.
- Diplôme d'expérimentation animale obtenu en 2011

Compétence générale

- Encadrement de stagiaires (niveau licence à M2)
- Capacité à travailler dans un environnement multi-disciplinaire

Langues

- Anglais : Bon niveau (820 obtenu au dernier test TOEIC de 2008)
- Allemand : Niveau scolaire

Divers

2007 Obtention de l'Attestation de Formation aux Premiers Secours

Centres d'intérêt : Voyage, Gymnastique sportive : Compétitions au niveau national (1991-2003)

Références

Référence académique: Pr. Catherine Passirani, Enseignant-chercheur, INSERM U1066 "Micro et nanomédecines biomimétiques", Angers, France

Référence industrielle: Dr Elvire Fournier, Associate director, Senior lab head Preformulation and Preclinical Galenics, Actelion Pharmaceuticals Ltd, Basel, Switzerland

Productions scientifiques

Publications acceptées

Lainé A-L, Passirani C: Novel metal-based anticancer drugs: a new challenge in drug delivery. *Curr Opin Pharmacol* 2012, 12:420–426

Lainé A-L*, Huynh NT*, Clavreul A, Balzeau J, Béjaud J, Vessieres A, Benoit J-P, Eyer J, Passirani C: Brain tumour targeting strategies via coated ferrociphenol lipid nanocapsules. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2012, 81:690–693

➤ **EJPB 2012 Best paper award**

Lainé A-L, Adriaenssens E, Vessières A, Jaouen G, Corbet C, Desruelles E, Pigeon P, Toillon R.A, Passirani C. The in vivo performance of ferrocenyl tamoxifen lipid nanocapsules in xenografted triple negative breast cancer. *Biomaterials*. 2013, 34:6949-6956

Publications soumises ou à soumettre

Lainé A.L, Clavreul A., Rousseau A., Tétaud C., Vessieres A., Garcion E., Jaouen G., Aubert L., Guilbert M., Benoit J.P., Toillon R.A., Passirani C. Inhibition of ectopic glioma tumor growth by a potent ferrocenyl drug loaded into stealth lipid nanocapsules *Submitted in Nanomedicine : nanotechnology, biology and medicine*

Lainé A-L., Henry M., Béjaud J., Pancani E., Wiber M., Benoit J.P, Coll J-L, Passirani C. Conventional vs stealth Lipid Nanocapsules : formulation and in vivo fate prediction through FRET monitoring.

Chapitre de livre

Laine A.L., Allard E., Menei P., Passirani C, 2011. Brain Tumors: Convection-Enhanced Delivery of Drugs (Method) (Chap. 21). Tumors of the central nervous system (Vol.3) Brain tumors (part 1) Hayat, M.A. p.207-216

Communications orales

Communications Internationales

Lainé A.L., Adriaenssens E., Vessières A., Jaouen G., Benoît J.P., Toillon R.A., Passirani.C. Formulation, characterization and in vivo evaluation of a ferrocenyl tamoxifen derivative loaded into lipid nanocapsules for breast cancer therapy. Workshop “nanomedicine in oncology” Berder, September 2012

Lainé A-L. A, Vessières A, Jaouen G, Benoît J-P, Kiss R, Passirani C Influence of the PEG coating on the delivery performance of stealth LNCs loaded with a ferrocenyl drug: application through ectopic glioma tumor treatment. CLINAM 2013, Basel, Switzerland, June 2013 (Small speech + Poster)

Lainé A.L., Clavreul A., Rousseau A., Jaouen G., Kiss R., Benoit J.P., Vessières A., Passirani C. A novel ferrocenyl drug loaded into stealth lipid nanocapsules inhibits the growth of ectopic glioma tumor. 19th international Symposium on microencapsulation, Pamplona, Spain, September 2013 (Small speech + Poster)

* : *Co-auteur*

Summer school

Lainé A.L., Huynh N.T., Vessières Anne, Jaouen G., Benoît J.P., Passirani C Application of ferrociphenol-loaded lipid nanocapsules in brain tumor treatment. Research summer school, Angers 2011

Lainé A.L., Adriaenssens E., Vessières A., Jaouen G., Benoît J.P., Toillon R.A., Passirani.C. Encapsulation of ferrocenyl drugs into lipid nanocapsules for cancer treatment. Research summer school, Angers, July 2012

Communication nationale

Lainé A.L., Huynh N.T., Vessières Anne, Jaouen G., Benoît J.P., Passirani. C Ciblage tumoral passif et actif par des nanocapsules lipidiques chargées en ferrociphénol. Colloque Nanohybrides 8, Bastia, June 2011

Posters

Lainé A.L., Wiber M., Boussier M., Legras P., Vessières A., Jaouen G., Benoît J.P., Passirani C. Development of a one-step process for stealth LNC formulation. Nanofar autumn school, Angers, France, october 2012

Lainé A.L., Wiber M., Boussier M., Legras P., Vessières A., Jaouen G., Benoît J.P., Passirani C. One-step stealth lipid nanocapsule design for anticancer drug delivery. 27th GTRV scientific meeting, Chilly-Mazarin, France, December 2012

Lainé A-L. Adriaenssens E, Vessières A, Jaouen G, Benoît J-P, Toillon R-A, Passirani C. Ferrocenyl tamoxifen derivatives in cancer treatment: Preclinical evaluation through lipid nanocapsules. Journées des jeunes chercheurs. Romainville, France, February 2013

Laine A.L., Henry M., Béjaud J., Benoit J-P., Coll J-C., Passirani C. Conventional versus stealth lipid nanocapsules : in vivo fate prediction through FRET monitoring. 28th GTRV scientific meeting, Orléans, France, December 2013

Anne-Laure LAINÉ

9 rue du Canal
49100 Angers
annelaure.laine@wanadoo.fr
06 08 89 98 86



Professional experience

Since Sept. 2010

Angers, France

Ph.D., pharmaceutical sciences

INSERM U1066, Biomimetic micro and nanomedicines, Pr. Benoît

- Development and *in vitro* / *in vivo* evaluation of ferrocifen loaded lipid nanocapsules for cancer treatment
- Assistant teacher at the school of pharmacy in Angers

2009-2010 (14 months)

Basel, Switzerland

Research associate in preformulation and preclinical galenics

Actelion pharmaceuticals

- Formulation support for *in vitro* / *in vivo* studies (pharmacology, pharmacokinetics, toxicology) in various therapeutic fields (oncology, immunology, CNS, anti-infectives)
- Development of nanosizing technique *via* wet-milling
- Oral formulation screening and taste masking for a phase I trial

2008 (6 months)

Orleans, France

Formulation project Associate

Technologie Servier

- Development and characterization of injectable nanosuspension of an anticancer drug
- Setting-up of the zeta potential measurement technique

2008 (6 months)

Orleans, France

Internship in research and development

Technologie Servier

- Achieving a tablet from an oil in water emulsion to improve the dissolution rate of poorly soluble drugs

Education

2008

Degree in Chemistry and Chemical Engineering (5 years)

Obtained from ESCOM (École Supérieure de Chimie Organique et Minérale)

2007-2008

5th year : Specialization in pharmaceutical development

Enrolled at ENSCM (Ecole Nationale Supérieure de Chimie Montpellier)

2003-2007

1st to 4th years of chemical engineering studies

Enrolled at ESCOM

2003

Scientific “Baccalauréat” with distinction

Expertise

Pharmaceutical technologies and drug delivery

- Strong background in strategies for hydrophobic drug solubilization
- Strong knowledge in injectable dosage forms
- Nanoparticle formulation
 - Lipid nanocapsule
 - Liposome
 - Nanosuspension
 - « Top-down » technology: high pressure homogenization, wet-milling
 - « Bottom-up » technology: emulsion solvent evaporation, co-solvent nanoprecipitation
- Particle engineering
 - Micronising by air-jet milling
 - Wet milling
 - Powder mixing
 - Tablet compression
- Freeze-drying
- Knowledge in oral dosage forms and general knowledge of taste masking

Characterization and analytical techniques

- Particle size measurement : dynamic and static light scattering, microscopy
- Development of particle size measurement method (training)
- Zeta potential
- Differential scanning calorimetry (DSC)
- HPLC (training, software : Chromeleon[®], Empower)
- UV spectroscopy
- *In vitro* dissolution test

In vitro / *in vivo* skills

- *In vitro* : Cell culture, immunohistochemistry, FACS for cell uptake analysis
- *In vivo* : animal handling, tumor inoculation, pharmacokinetic study, efficacy study, intravenous, intraperitoneal, intradermic and intra-carotid injection, cardiac puncture, stereotaxic surgery.
Certificate of animal experimentation training obtained in 2011

General skills

- Supervision of trainees
- Ability to work in a multidisciplinary environment
- Cross-functional collaboration with biologists and chemists

Languages

- French: mother tongue
- English : Good skills, both written and oral (TOEIC in 2008: 820)
- German : Good knowledge

Miscellaneous

2007 AFPS – first aider certificate

Main interests: Travelling, Gymnastics (1991-2003)

References

Academic reference: Pr Catherine Passirani, INSERM U1066 "Biomimetic micro and nanomedicines", Angers, France

Industrial reference: Dr Elvire Fournier, Associate director, Senior lab head Preformulation and Preclinical Galenics, Actelion Pharmaceuticals Ltd, Basel, Switzerland

Publications and communications

Accepted Publications

Lainé A-L, Passirani C: Novel metal-based anticancer drugs: a new challenge in drug delivery. *Curr Opin Pharmacol* 2012, 12:420–426

Lainé A-L*, Huynh NT*, Clavreul A, Balzeau J, Béjaud J, Vessieres A, Benoit J-P, Eyer J, Passirani C: Brain tumour targeting strategies via coated ferrociphenol lipid nanocapsules. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2012, 81:690–693

➤ **EJPB 2012 Best paper award**

Lainé A-L, Adriaenssens E, Vessières A, Jaouen G, Corbet C, Desruelles E, Pigeon P, Toillon R.A, Passirani C. The in vivo performance of ferrocenyl tamoxifen lipid nanocapsules in xenografted triple negative breast cancer. *Biomaterials*. 2013, 34:6949-6956

Papers submitted or to be submitted for publication

Lainé A.L, Clavreul A., Rousseau A., Tétaud C., Vessieres A., Garcion E., Jaouen G., Aubert L., Guilbert M., Benoit J.P., Toillon R.A., Passirani C. Inhibition of ectopic glioma tumor growth by a potent ferrocenyl drug loaded into stealth lipid nanocapsules *Submitted in Nanomedicine : nanotechnology, biology and medicine*

Lainé A-L., Henry M., Béjaud J., Pancani E., Wiber M., Benoit J.P, Coll J-L, Passirani C. Conventional vs stealth Lipid Nanocapsules : formulation and in vivo fate prediction through FRET monitoring.

Book Chapter

Laine A.L., Allard E., Menei P., Passirani C, 2011. Brain Tumors: Convection-Enhanced Delivery of Drugs (Method) (Chap. 21). Tumors of the central nervous system (Vol.3) Brain tumors (part 1) Hayat, M.A. p.207-216

Oral communications

International communications

Lainé A.L., Adriaenssens E., Vessières A., Jaouen G., Benoît J.P., Toillon R.A., Passirani.C. Formulation, characterization and in vivo evaluation of a ferrocenyl tamoxifen derivative loaded into lipid nanocapsules for breast cancer therapy. Workshop “nanomedicine in oncology” Berder, September 2012

Lainé A-L. A, Vessières A, Jaouen G, Benoît J-P, Kiss R, Passirani C Influence of the PEG coating on the delivery performance of stealth LNCs loaded with a ferrocenyl drug: application through ectopic glioma tumor treatment. CLINAM 2013, Basel, Switzerland, June 2013 (Small speech + Poster)

Lainé A.L., Clavreul A., Rousseau A., Jaouen G., Kiss R., Benoit J.P., Vessières A., Passirani C. A novel ferrocenyl drug loaded into stealth lipid nanocapsules inhibits the growth of ectopic glioma tumor. 19th international Symposium on microencapsulation, Pamplona, Spain, Spetembre 2013 (Small speech + Poster)

* : Co-author

Summer school

Lainé A.L., Huynh N.T., Vessières Anne, Jaouen G., Benoît J.P., Passirani C Application of ferrociphenol-loaded lipid nanocapsules in brain tumor treatment. Research summer school, Angers, July 2011

Lainé A.L., Adriaenssens E., Vessières A., Jaouen G., Benoît J.P., Toillon R.A., Passirani.C. Encapsulation of ferrocenyl drugs into lipid nanocapsules for cancer treatment. Research summer school, Angers, July 2012

National communication

Lainé A.L., Huynh N.T., Vessières Anne, Jaouen G., Benoît J.P., Passirani. C Ciblage tumoral passif et actif par des nanocapsules lipidiques chargées en ferrociphenol. Colloque Nanohybrides 8, Bastia, June 2011

Posters

Lainé A.L., Wiber M., Boussier M., Legras P., Vessières A., Jaouen G., Benoît J.P., Passirani C. Development of a one-step process for stealth LNC formulation. Nanofar Autumn School, Angers, France, October 2012

Lainé A.L., Wiber M., Boussier M., Legras P., Vessières A., Jaouen G., Benoît J.P., Passirani C. One-step stealth lipid nanocapsule design for anticancer drug delivery. 27th GTRV scientific meeting, Chilly-Mazarin, France, December 2012

Lainé A.L., Adriaenssens E, Vessières A, Jaouen G, Benoît J-P, Toillon R-A, Passirani C. Ferrocenyl tamoxifen derivatives in cancer treatment: Preclinical evaluation through lipid nanocapsules. Young researchers days. Romainville, France, February 2013

Lainé A.L., Henry M., Béjaud J., Benoit J-P., Coll J-C., Passirani C. Conventional versus stealth lipid nanocapsules : in vivo fate prediction through FRET monitoring. 28th GTRV scientific meeting, Orléans, France, December 2013

Thèse de Doctorat

Anne-Laure LAINÉ

Vectorisation de complexes ferrocéniques par les nanocapsules lipidiques pour le traitement du cancer

Vectorisation of ferrocenyl complexes through lipid nanocapsules for cancer treatment

Résumé

Ces travaux ont pour but l'évaluation préclinique de trois composés ferrocéniques (FcOHTAM, FcdiOH et ansa-FcdiOH) formulés au sein de nanocapsules lipidiques (LNC) dans le cadre d'une thérapie anticancéreuse. Dans une première étude, le potentiel anticancéreux des ferrocifènes est démontré sur un modèle de cancer du sein triple négatif avec un retard significatif de la progression tumorale grâce à l'administration des LNC chargées en FcOHTAM. Afin d'améliorer le ciblage tumoral passif, la seconde partie de la thèse est consacrée au développement de LNC furtives par un procédé de formulation en une étape (one-step OS). Ces LNC OS présentent une circulation plasmatique prolongée et conservent l'intégrité de leur structure plusieurs heures après injection intraveineuse (iv), comme observé par imagerie FRET. Par ailleurs, l'injection répétée des LNC OS chargées en ansa-FcdiOH a provoqué l'arrêt de la croissance de gliomes implantés en sous-cutané. La dernière partie des travaux est dédiée au traitement du gliome orthotopique par différentes stratégies d'administration des LNC (en local et en périphérie). L'injection intra-carotidienne de LNC de FcdiOH recouvertes de peptide NFL-TBS a donné lieu à une amélioration de la survie pour quelques animaux (5/12). L'infusion intracérébrale prolongée des LNC de ferrocifènes a engendré une toxicité et mortalité importante. Finalement, l'administration répétée par voie iv s'est révélée être une approche encourageante avec une légère augmentation de la médiane de survie (7%). L'ensemble de ces résultats démontre l'activité prometteuse des complexes ferrocéniques associés aux LNC OS pour une approche alternative de thérapie du cancer.

Mots clés

Nanomédecine, Ferrocifène, cancer du sein triple négatif, glioblastome

Abstract

The aim of this work is the preclinical evaluation of three ferrocenyl complexes (FcOHTam, FcdiOH and ansa-FcdiOH) formulated into lipid nanocapsules (LNCs) for oncology purposes. Firstly, the anticancer activity of the ferrocifens is demonstrated on a triple negative breast cancer model with a significant delay of the tumor growth upon administration of LNCs loaded with FcOHTAM. In order to enhance the passive tumoral targeting, the second part is dedicated to the development of stealth LNCs through a one-step (OS) formulation process. These OS LNCs showed an extended blood circulation time and maintained their integrity several hours after intravenous (iv) injection, as observed by FRET imaging. Additionally, repeated injections of ansa-FcdiOH-LNCs led to the growth inhibition of subcutaneous glioma. The last part of this work is devoted to the treatment of orthotopic glioma through various strategy of LNC administration (local or peripheral). The intra-carotid injection of FcdiOH-LNCs coated with the NFL-TBS peptide resulted in an improved survival time for some animals (5/12). The intracerebral sustained infusion of ferrocifen-loaded LNCs provoked severe toxicity and mortality. Finally, the repeated iv injections turned out to be an encouraging approach with a slight increase in the mean survival time (7%). Taken together, these results demonstrate the promising activity of the ferrocenyl complexes associated to OS LNCs for an alternative anticancer therapy approach.

Key Words

Nanomedicine, Ferrocifen, triple negative breast cancer, glioblastome