



Development and characterization of targeted MART-1-nanoparticles for melanoma treatment and β -lapachone-loaded liposomal in hydrogel for wound healing

Sarah Brandao Palacio

► To cite this version:

Sarah Brandao Palacio. Development and characterization of targeted MART-1-nanoparticles for melanoma treatment and β -lapachone-loaded liposomal in hydrogel for wound healing. Galenic pharmacology. Université Paris Saclay (COMUE); Universidade federal de Pernambuco (Récife, Brésil), 2017. English. NNT : 2017SACLS487 . tel-01753178

HAL Id: tel-01753178

<https://theses.hal.science/tel-01753178>

Submitted on 29 Mar 2018

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.



UNIVERSIDADE
FEDERAL
DE PERNAMBUCO

Development and characterization of targeted MART-1-nanoparticles for melanoma treatment and β - lapachone-loaded liposomes in hydrogel for wound healing

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à L'Université Fédérale du Pernambouc

École doctorale n°569 innovation thérapeutique: du fondamental à l'appliqué
(ITFA)

Spécialité de doctorat: Pharmacotechnie et Biopharmacie

Thèse présentée et soutenue à Recife, 01/12/2017, par

Brandão Palácio, Sarah

Composition du Jury:

Mme. Santos-Magalhães, Nereide Stela
Professeur, Universidade Federal de Pernambuco, (Département de Pharmacie) Président- Co-
Directeur de thèse

Mme. Fontes, Adriana
Professeur, Universidade Federal de Pernambuco (Department de Biophysics) Rapporteur

Mme. Lira Nogueira, Mariane
Professeur, Universidade Federal de Pernambuco (Department de Biophysics) Rapporteur

M. Ponchel, Gilles
Professeur, Université Paris-Sud, CNRS UMR 8612 Directeur de thèse

M. Tabosa do Egito, Eryvaldo Sócrates
Professeur, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (Department de Pharmacie), Examinateur

Titre : Développement et caractérisation de nanoparticules conjuguées à MART1 pour le traitement du mélanome et de liposomes contenant de la bêta-lapachone et incorporés dans un hydrogel destiné à la cicatrisation des plaies.

Mots clés : Nanoparticules polymères, MART1, poly(glutamate de benzyle), mélanome, biopolymères, liposomes, β -lapachone, cicatrisation.

Résumé : L'objectif principal de ce travail a été le développement, la caractérisation et l'évaluation *in vitro* et *in vivo* de différents nanovecteurs avec, d'une part, des nanoparticules spécifiques pour le traitement de la mélanome et des liposomes de β -lapachone-incorporés dans des hydrogels de biopolymère pour la cicatrisation de blessures topiques. La première partie de cette thèse présente une revue de la littérature et les récentes avancées dans le domaine du ciblage des cellules circulantes mésenchymateuses issues des mélanomes. Les principaux biomarqueurs de ces cellules ont été passés en revue afin de définir les caractéristiques qu'il est souhaitable de conférer aux nanovecteurs. La partie expérimentale du travail a consisté à préparer des nanoparticules (non sphériques) par nanoprécipitation de copolymères dérivés du poly(γ -benzyl-L-glutamate). Ces nanoparticules, taille comprise entre 20 et 100 nm et porteuses d'une charge négative (-3 à -30 mV). Elles ont ensuite été combinées avec l'anticorps MART-1 spécifique de la membrane des cellules de mélanome, en mettant en oeuvre des liaisons de type biotine-streptavidine. La combinaison de l'anticorps en surface des nanoparticules a été évaluée par western blot. L'affinité des immune-nanoparticules pour des cellules modèles du mélanome (lignée B16-GFP) et pour des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVECs) a ensuite été évaluée *in vitro* par cytométrie de flux. Par ailleurs, étant destinées à une injection intra-veineuse, il était important d'évaluer le degré d'activation du système du complément induit par les nanoparticules. La technique d'immunoélectrophorèse 2D mise en oeuvre a permis de conclure à une activation limitée, favorable à une augmentation du temps de circulation sanguine après injection IV.

Par ailleurs, les nanoparticules présentaient une faible cytotoxicité (test au MTT) vis à vis des cellules de mélanome ou des cellules endothéliales. En terme de capture cellulaire, les immuno-nanoparticules fonctionnalisées par MART1, anticorps spécifique pour la reconnaissance de l'antigène surexprimé dans des cellules de mélanome, a été augmentée de 40 à 50% par rapport au contrôle. La deuxième partie de cette thèse a été consacrée au développement, à la caractérisation et l'évaluation *in vivo* de l'activité cicatrisante de la β -lapachone encapsulée dans des liposomes multilamellaires, eux-mêmes incorporés dans un hydrogel d'un biopolymère produit par la bactérie *Zoogloea* sp. Ces formulations originales (β -lap-Lipo/ZBP/HEC) présentaient un pH et un comportement rhéologique approprié pour l'application topique, ainsi que la capacité de ralentir la libération de la β -lapachone à partir de l'hydrogel. Une étude histopathologique détaillée de l'activité cicatrisante a été conduite dans un modèle *in vivo* et a permis de montrer que l'hydrogel de biopolymère était capable de stimuler la réparation tissulaire, d'augmenter la cellularité locale, de favoriser les fibroblastes, les cellules inflammatoires, les vaisseaux sanguins et la production de fibrilles de collagène pendant la phase proliférative de la cicatrisation. De plus, la formulation β -lap-Lipo/ZBP/HEC a favorisé l'angiogenèse locale et a permis de diminuer l'inflammation de la blessure, démontrant le potentiel de cette formulation originale de β -lap-Lipo/ZBP/HEC dans la thérapie des lésions cutanées. Pour conclure, les nanovecteurs développés constituent des outils intéressants en vue d'intercepter les cellules circulantes du mélanome, tandis que les formulations liposomales associant des biopolymères originaux présentent un potentiel intéressant dans la cicatrisation des blessures.

Title : Development and characterization of targeted MART-1-nanoparticles for melanoma treatment and β -lapachone-loaded liposomal in hydrogel for wound healing.

Keywords : Polymeric nanoparticles, MART1, poly (benzyl glutamate), melanoma, biopolymers, liposomes, β -lapachone, wound healing.

The main aim of this work was the development, characterization and *in vitro* and *in vivo* evaluation of different nanocarriers with specific nanoparticles for the treatment of melanoma and β -lapachone liposomes incorporated in biopolymer hydrogels for the healing of topical wounds. The first part of this thesis presents a review of the literature and recent advances in the field of targeting mesenchymal circulating cells derived from melanomas. The main biomarkers of these cells have been reviewed to define the suitable characteristics of this nanocarriers. The experimental part of the work consisted of development of nanoparticles (non-spherical) by nanoprecipitation of copolymers derived from poly (γ -benzyl-L-glutamate). These nanoparticles, size between 20 and 100 nm and carrying a negative charge (-3 to -30 mV) were then combined with the MART-1 antibody, specific for the melanoma cell membrane, by biotin-streptavidin binding. The binding of the antibody on the surface of nanoparticles was evaluated by Western blot. The affinity of immuno-nanoparticles for melanoma cells (B16-GFP line) and for endothelial cells of human umbilical vein (HUVECs) was then evaluated *in vitro* by flow cytometry and, being intended for intravenous injection, it was important to evaluate the degree of activation of the complement system induced by the nanoparticles. The 2D immunoelectrophoresis technique used made it possible to conclude that the activation was limited and favourable to increase the blood circulation time of nanoparticles, after intravenous injection. The nanoparticles exhibited low cytotoxicity (MTT assay) against melanoma cells or endothelial cells.

In terms of cellular uptake, the immuno-nanoparticles functionalized with MART1, a specific antibody for the recognition of the overexpressed antigen in melanoma cells, was increased by 40 to 50% compared to control. The second part of this thesis was dedicated to the development, characterization and *in vivo* evaluation of the wound healing activity of β -lapachone encapsulated in multilamellar liposomes and incorporated in a hydrogel of a biopolymer produced by the bacterium *Zoogloea* sp. These original formulations (β -lap-Lipo/ZBP/HEC) had a pH and rheological behavior suitable for topical application, as well as the ability to slow the release of β -lapachone from the hydrogel. A detailed histopathological study of the wound healing activity was conducted in an *in vivo* model and showed that the biopolymer hydrogel was able to stimulate tissue repair, increasing the local cellularity, fibroblasts, cells inflammatory, blood vessels and the production of collagen fibrils during the proliferative phase of healing. In addition, the β -lap-Lipo/ZBP/HEC formulation promoted local angiogenesis and reduced inflammation of the wound, demonstrating the potential of this original formulation of β -lap-Lipo/ZBP/HEC in cutaneous lesions therapy. To conclude, the developed nanocarriers are interesting approaches for intercepting the circulating melanoma cells, while liposomal formulations combining with original biopolymers have an interesting potential for wound healing applications.

Title : Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas MART-1 específicas para o tratamento do melanoma e hidrogéis lipossomais contendo β -lapachone para cicatrização de feridas.

Keywords : Nanopartículas poliméricas, MART1, poli (benzil glutamato), melanoma, biopolímeros, lipossomas, β -lapachona, cicatrização.

O objetivo principal deste trabalho foi o desenvolvimento, caracterização e avaliação *in vitro* e *in vivo* de diferentes nanocarreadores: nanopartículas específicas para o tratamento de melanoma e lipossomas contendo β -lapachona incorporados em hidrogéis de biopolímero para a cicatrização de feridas tópicas. A primeira parte desta tese apresenta uma revisão da literatura e avanços recentes no campo do direcionamento de fármacos através do uso de nanocarreadores para a células circulantes mesenquimatosas derivadas de melanomas. Os principais biomarcadores presentes nestas células foram descritos com o objetivo de definir as características adequadas para o desenvolvimento de nanocarreadores. A parte experimental do trabalho consistiu no desenvolvimento de nanopartículas (não esféricas) por nanoprecipitação de copolímeros derivados de poli (γ -benzil-L-glutamato). Essas nanopartículas, tamanho entre 20 e 100 nm e carga negativa (-3 a -30 mV) foram então combinadas com o anticorpo MART-1, específico para a membrana das células do melanoma, pela ligação biotina-estreptavidina. A ligação do anticorpo na superfície das nanopartículas foi avaliada por Western blot. A afinidade das imuno-nanopartículas para células de melanoma (linha B16-GFP) e para células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs) foi então avaliada *in vitro* por citometria de fluxo e, sendo destinada a injeção intravenosa, era importante avaliar o grau de ativação do sistema complemento induzido pelas nanopartículas. A técnica utilizada de imunoelektroforese 2D permitiu concluir que a ativação foi limitada e favorável para aumentar o tempo de circulação sanguínea das nanopartículas, após a injeção intravenosa. As nanopartículas apresentaram baixa citotoxicidade (teste MTT) contra células de melanoma ou células endoteliais. Em termos de absorção celular, as imuno-nanopartículas funcionalizadas com MART1, um anticorpo

específico para o reconhecimento do antígeno super-expresso em células de melanoma, foi aumentada em 40 a 50% em comparação com o controle. A segunda parte desta tese foi dedicada ao desenvolvimento, caracterização e avaliação *in vivo* da atividade de cicatrização da β -lapachona encapsulada em lipossomas multilamelares e incorporada em um hidrogel de um biopolímero produzido pela bactéria *Zoogloea* sp. Estas formulações originais (β -lap-Lipo/ZBP/HEC) apresentaram um pH e comportamento reológico adequados para aplicação tópica, bem como a capacidade de retardar a liberação de β -lapachona do hidrogel. Um estudo histopatológico detalhado da atividade de cicatrização de feridas foi conduzido em um modelo *in vivo* e mostrou que o hidrogel de biopolímero foi capaz de estimular o reparo tecidual, aumentando a celularidade local, fibroblastos, células inflamatórias, vasos sanguíneos e a produção de fibrilas de colágeno durante a fase proliferativa. Além disso, a formulação β -lap-Lipo/ZBP/HEC promoveu angiogênese local e reduziu a inflamação da ferida, demonstrando o potencial desta formulação original de β -lap-Lipo/ZBP/HEC na terapia de lesões cutâneas. Para concluir, os nanocarreadores desenvolvidos demonstraram ser abordagens interessantes para interceptar as células de melanoma circulantes, enquanto as formulações lipossomais combinada com biopolímero têm um potencial interessante para aplicações de cicatrização de feridas.

ACKNOWLEDGMENTS

There are many things to be grateful at this moment and the conclusion of my PhD certainly will be a big landmark in my life. When I was a child I had the willness to be a scientist, discovery new things and travel the world changing experiences and knowlegde. Nevertheless, the reality was not that simple as seemed to be. During my graduation, master's degree and PhD, many difficult tasks have come into my way, impelling me to be strong, resilient and hardworking. On the other hand, great moments of joy, reciprocity and passion also accompanied me on this journey. Naturally, there is still a long path to go towards the construction of scientific knowledge.

I would like to thank the wonderful people who crossed my path and who have helped me to achieve my goals and always encouraging me to be the best version of me. First, I will be eternally grateful to my family, my parents and brothers, for supporting me in all moments. We are a very close-knit family, full of love and compasion. An specially thank for my father who is my mentor and main supporter.

What would life be without friends as well? So, my special thank will be to my childhood friends that knows me more than myself: Elisa, Duda, Tatiane, Rivanda, Pinelli, Renata Lima, Camila Farias and Marcela. Thank you also to my college friends: Amanda, Larissa Morgana, Giovanna, Dea, Rebecca, Vinicius e Fernanda. Still talking about great friends, but now the new ones, I really must thanks to my colleagues from Maison du Brésil for all the friendship and support during my stay in Paris: Taty, Bárbara, Priscila, Renata, Nayara, Rodrigo, Igor, Júlia, Gustavo, Fabiano etc. Thank you very much for being part of one of the great moments of my life.

I would like to greatly thanks to my supervisors and co-superviors: Nereide Stela Santos Magalhães, Gilles Ponchel and Christine Vauthier for provide amazing opportunities of knowledge and for supporting me in all my needs and requirements. You are for me the biggest examples of competence, intelligence and resilience. I would like to express my huge gratitude for my teammates from Brasil and France, that make this journey less labored and more joyful. Any Taylor (my mexican sister) and Mariane Lira (my roommate), I have no words to thank you girls for all your support and friendship, you were a key part of my development as a person and professional. Any, thank you for teaching me and helping me to construct this thesis. Isabella Macário, Rafaela Ferraz, Marília Evelyn, Daniel Charles, Jean Baptist Coty, Francisco Junior Xavier, thank you for all the priceless contributions in this work and for trusted and believed in me. Finally, but not least, thanks for all my SLC's (Milena, Marcela, Dani, Vanderval, Clara, Victor etc) and Institut Galien/Paris-sud teammates (André, Henrique, Cassiana, Gabriela, Andreza etc) and professors (Juliette Verganaud, Kawtar Bauchemal, Valerie Nicolas etc) that helped me enormously with all knowledge and friendship.

“If you are distressed by anything external, the pain is not due to the thing itself but to your own estimate of it; and this you have the power to revoke at any moment.”

Marcus Aurelius Antoninus

Emperor of Rome and stoic philosopher (121 to 180).

LIST OF FIGURES

SECTION I

CHAPTER I

Figure 1. Schematic illustration of tumor site derived circulating melanoma cells (CMC) and melanoma cancer stem cells (m-CSCs) in blood flow and representation of the epidermal to mesenchymal transition (EMT) processes. The CMC and m-CSCs possess high metastatic potential and disseminated preferentially to the lung and liver. The main known biomarkers for m-CSCs and CMC are shown in scheme below, highlighting the common markers.

Figure 2. Schematic illustration of passive targeting (a) and active targeting (b) for melanoma treatment and diagnosis. In passive targeting, the enhanced permeation and retention (EPR) effect allows the accumulation of nanoparticles at the heterogeneous tumor niche that contains differentiated melanoma cells (d-mc) and melanoma cancer stem cells (m-CSCs) (a). In active targeting, the targeted nanoparticles can recognize surface receptors expressed by m-CSCs, circulating melanoma cells (CMC), endothelial cells of tumor vasculature and/or d-mc, and promote a receptor-mediated endocytosis and drug-delivery of antitumoral or diagnosis agents into the melanoma cells.

CHAPTER II

Figure 1. Synthesis scheme of PBLG-Rhodamine copolymer.

Figure 2. FT-IR spectra of PBLG-Bz polymerization film recorded at 0 min (a), 58 min (b), 139 min (c), 277 min (d) and 570 min (e) of reaction time.

Figure 3. FT-IR spectra of PBLG derivatives: PBLG-Bz (I), PBLG-PEG (II), PBLG-PEG-Bt (III) and PBLG-Rhod (IV).

Figure 4. ^1H RMN spectra of PBLG derivatives: PBLG-Bz (I), PBLG-Rhod (II), PBLG-PEG-Bt (III) and PBLG-PEG (IV).

Figure 5. MALDI-TOF MS spectra of PBLG-Rhod (a) and PBLG-Bz (b).

Figure 6. TEM photographs of nanoparticles obtained from the following PBLG derivatives. Magnification $20000\times$. PBLG-Bz (a), PBLG-Rhod (b), PBLG/PBLG-Rhod (c), PBLG-PEG/PBLG (d), PBLG-PEG/PBLG-Rhod (e), PBLG-PEG-Bt/PBLG (f), PBLG-PEG-Bt/PBLG-Rhod (g), PBLG-PEG-Bt-MART-1/PBLG-Rhod (h) and PBLG-PEG-Bt-IgG/PBLG-Rhod (i).

Figure 7. Cellular uptake of PBLG-Rhod (100%) and PBLG/PBLG-Rhod (10%) nanoparticles by B16-GFP and HUVECs cells. Data were expressed as fold increase over control (mean $\pm$ SD).

Figure 8. Western blot analysis of the remaining free antibodies found in supernatant of biotinylated nanoparticles and the migration profile of non-denatured nanoparticles containing Mart-1 antibody (a) and control antibody (b) after incubation with (+) or without (-) streptavidin. The Western blot analysis also demonstrated the migration profile of the complex antibody-streptavidin (mAb+Strep) non-denatured and denatured. The theoretical ratios of the number of nanoparticles over the number of antibody molecules were 1:0, 1:5.

Figure 9. Cellular uptake of PBLG-PEG/PBLG-Rhod, PBLG-PEG-Bt/PBLG-Rhod and PBLG-PEG-Bt-MART-1/PBLG-Rhod nanoparticles by B16-GFP and HUVECs cells. Data were expressed as fold increase over control (mean $\pm$ SD).

Figure 10. Electrophoregram peaks of complement activation for different PBLG nanoparticles with the respective complement activation factor (% CAF).

Figure 11. Evaluation of the MART-1 expression on B16-GFP cells and HUVECs cells by flow cytometer. Percentage of B16-GFP cells (MART-1 positive; upper right quadrant) and the number of viable cells shown at each time point (a). Data of fluorescence intensity are shown as mean fold over control as function of the antibody concentration (b).

Figure 12. B16-GFP cells viability percentage after treatment with PBLG-derived nanoparticles using the MTT assay. Error bars indicate the standard deviation.

Figure 13. HUVECs cells viability percentage after treatment with PBLG-derived nanoparticles using the MTT assay. Error bars indicate the standard deviation.

Figure 14. Cellular uptake of PBLG-PEG/PBLG-Rhod, PBLG-PEG-Bt/PBLG-Rhod and PBLG-PEG-Bt-MART-1/PBLG-Rhod nanoparticles by HUVECs (a) and B16-GFP (b) cells. Data were expressed as fold increase over control (mean $\pm$ SD).

SECTION II

CHAPTER III

Figure 1. Viscosity *versus* shear rate graphs of the liposomal gels at different lipid concentrations. The upper graphs correspond to the liposomal gel stability followed for a 90-day period: β -lap-Lipo/ZBP/HEC15 (2.5 mg/g) (a), β -lap-Lipo/ZBP/HEC30 (5.1 mg/g) (b) and β -lap-Lipo/ZBP/HEC60 (10.2 mg/g) (c). The lower graphs depict the liposomal gels in three different lipid concentrations on day 1(d) and day 90(e). The last graph (f) shows the effect of lipid concentration in the gels and the storage time on the zero shear rate viscosity values obtained for the liposomal gels, by fitting the rheological measurement using the Cross model.

Figure 2. Cumulative amount of β -lap released per time (h) from liposome, control gel and liposomal gel. Each point is the mean from at least three independent experiments and bars represent the standard deviation of means.

Figure 3. The histograms of cellular densities and collagen fibers on day 3, 7 and 14 post-wounding in the dermis layer of Wistar rats, after treatment with hydrogels or liposomal gels at different concentrations: Vessel density (a); fibroblast density (b); inflammatory cell density (c) and collagen fibers (d). *Significant difference ($p < 0.05$) among all the treated groups as compared with the controls without treatment. **Significant difference ($p < 0.05$) between the analyzed groups treated with hydrogels vehicles and liposomal gels containing β -lap.

Figure 4. Representative histopathological images of skin in the dermis layer: hematoxylin and eosin-stained sections on day 3, 7 or 14 post-wounding of control (a), ZBP (b), ZBP/HEC (c) and β -lap-Lipo/ZBP/HEC60 (d) groups. Wound area shows fibroblasts (green arrows), inflammatory cells (black arrows) and blood vessels (red arrows). Original magnification: $400\times$.

LIST OF TABLES

SECTION I

CHAPTER I

Table 1. Current biomarkers detected in m-CSC and CMC

Table 2. *In vivo* and *in vitro* studies with drugs-loaded polymeric nanoparticles for passive and active tumor targeting in advanced melanoma treatment.

CHAPTER II

Table 1. Characteristics of PBLG derivatives.

Table 2. Morphological analysis and zeta potential of nanoparticles.

LIST OF ABBREVIATIONS

μ C-IE	Multi-crossed electrophoresis
^1H NMR	Proton Nuclear Magnetic Resonance
Bt	Biotin
B16-GFP	Green fluorescent protein-labeled B16 melanoma cells
CAF	Complement activation factor
CMCs	Circulating melanoma cells
CSCs	Cancer stem cells
CTCs	Circulating tumor cells
DLS	Dynamic light scattering
FT-IR	Fourier transform infrared spectroscopy
HABA	4'-hydroxyazobenzene-2-carboxylic acid
HEC	Hydroxyethylcellulose
HUVECs	Human Umbilical Vascular Endothelial cells
IC ₅₀	Average 50% growth inhibitory concentration
IgG	Immunoglobulin G
MALDI-TOF MS	Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry
MART-1/Melan-A	Melanoma antigen recognized by T-cells
m-CSCs	Melanoma cancer stem cells
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
PBLG	Poly(γ -benzyl-L-glutamate)
PEG	Poly (ethylene glycol)
Rhod	Rhodamine

TEM	Transmission Electron Microscopy
ZBP	<i>Zoogloea</i> sp. polymer
ZBP/HEC	Polymeric blend hydrogel of ZBP and HEC
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
β -lap	β -lapachone
β -lap/ZBP/HEC	β -lapachone incorporated in ZBP/HEC hydrogel
β -lap-Lipo	β -lapachone-loaded liposomes
β -lap-Lipo/ZBP/HEC	β -lapachone-loaded liposomes incorporated in ZBP/HEC hydrogel
EMT	Epidermal to Mesenchymal Transition

TABLE OF CONTENTS

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
LIST OF FIGURES.....	viii
LIST OF TABLES.....	xi
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xii
GENERAL INTRODUCTION.....	16
SECTION I: DEVELOPMENT AND <i>IN VITRO</i> EVALUATION OF NANOPARTICLES FOR TARGETING MELANOMA CANCER CELLS	
Chapter I: Advances in polymeric nanoparticles for metastatic melanoma treatment: therapeutic targeting of cancer stem cells and circulating tumor cells.....	24
Chapter II: Rational design of immunonanoparticles conceived for intercepting melanoma CTCs within the blood stream.....	93
SECTION II: TOPICAL LIPOSOMAL-HYDROGELS FOR WOUND CARE APPROACH	
Chapter III: Wound healing properties of β -lapachone-loaded liposomes incorporated in a biopolymer hydrogel.....	139
CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES.....	172
RÉSUMÉ ÉTENDU.....	175
ANNEXE A: Ethics committee certificate of approval.....	184

GENERAL INTRODUCTION

The nanotechnology has been widely applied in diagnosis and treatment of several diseases (ANGELI et al., 2008). Nanotechnology applications in biomedical field, including vaccination, diagnostics and drug-delivery (BOULAIZ et al., 2011; CHOWDHURY et al., 2016; REED et al., 2015). In pharmaceutical field, the nanocarriers has been used to improve the efficacy of therapeutic and/or diagnosis agents and to overcome biopharmaceutical, pharmacokinetics and toxicological drawbacks related to the conventional therapies (BAO; MITRAGOTRI; TONG, 2013; DEVALAPALLY; CHAKILAM; AMIJI, 2007; PIKTEL et al., 2016). In general, this nanocarrier can be classified as lipidic or polymeric. Liposomes and nanoemulsions are examples of nanocarriers based on lipid components, whereas nanospheres and nanocapsules are examples of polymer-based nanoparticles (ALLEN; CULLEN et al., 2004; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

Nanotechnology applications in cancer based on drug delivery systems have been extensively evaluated over last decade and demonstrated to be a promising approach to improve the efficacy of anti-cancer therapy (BRYN et al., 2016; SUTRADHAR; AMIN, 2014). However, the cellular heterogeneity and plasticity presented in tumors sites represent one of the main causes of metastasis and can be considered as one of the most challenge subjects for the improvement of cancer therapeutics (BROOKS; BURNES; WICHA, 2015).

Precisely, two types of cancer cells are directly involved in tumor heterogeneity and metastasis: the cancer stem cells (CSCs) and circulating tumor cells (CTCs). The CSCs represents a minority cell population in tumor environment with pluripotent characteristics and high metastatic ability (BROOKS; BURNES; WICHA, 2015; CSERMELY et al., 2014). On the other side, the CTCs are tumor cells spread in blood and/or lymphatic vessels from solid tumors (XU; ZHONG, 2010). High levels of CSCs

and CTCs has been associated with tumor progression, chemoresistance and metastatic spread (LA PORTA; ZAPPERI, 2013; PORE et al., 2016).

In this context, one of the cancer types with greatest metastatic potential and chemotherapeutic resistance is the melanoma. This tumor is characterized as the malignant transformation of melanocytes of neural crest origin and it is considered the deadliest skin cancer, with a 5-year-survival rate for distant melanoma metastasis of less than 20% (ALBINO et al., 1992; CHEN, et al., 2013). Owing to the clinical relevance of this skin cancer, the melanoma treatment has been widely explored for nanotechnology applications, including the use of polymeric nanoparticles (ANTÔNIO et al., 2017; JAIN; THANKI; JAIN, 2013; LI et al., 2015).

The first section of this thesis was dedicated to the nanotechnological approaches for metastatic melanoma treatment. The first chapter consisted in a literature review about the role of CSCs and CTCs in the development of metastatic melanoma; the current biomarkers of these distinct population of melanoma cells and the advances in polymer based nanoparticles for the metastatic melanoma treatment. In this perspective, the influence of architectural properties of polymeric nanoparticles in the effectiveness of passive and active-melanoma targeting were widely discussed. Thus, the goal of this review was to present and discuss the up-to-date status of melanoma biomarkers and to evaluate the advances in polymeric nanoparticles strategies in order to develop effective drug delivery systems for the treatment of metastatic melanoma.

Thereafter, the second chapter comprised of the development and in vitro evaluation of polymeric nanoparticles for targeting melanoma cells. In this study, the melanoma antigen recognized by T-cells (MART-1) was selected as a target, due to this overexpression in melanoma cell lines (TAZZARI et al., 2015). Immunonanoparticles, based on poly (γ -benzyl-L-glutamate) (PBLG) and coupled with antibody against MART-

1, were developed, characterized and tested in vitro on melanoma and endothelial lineages.

The use of nanotechnology for wound healing treatment also offers a number of advantages when compared to the conventional cutaneous therapies, such as occlusive dressings (JACKSON; KOPECKI; COWIN, 2013). These advantages comprise on the protection of active principles, enhanced drug penetration, promotion of localized drug effects and reduced unwanted systemic absorption (CARNEIRO et al., 2010). In this context, nanoemulsions and liposomes are the most utilized nanocarriers for cutaneous applications (WU; GUY, 2009).

Liposomes are spherical vesicles formed by one or more concentric phospholipid bilayers with an aqueous core. The main advantage of this nanocarrier is the ability to encapsulate lipophilic, amphiphilic and hydrophilic substances, due to their biphasic character (TORCHILIN, 2005). Lipophilic substances, such as β -lapachone, a naphthoquinone that presents important biological properties including wound healing, can be encapsulated into liposomes with high drug loads (CAVALCANTI et al., 2015; FU et al., 2011; KUNG et al., 2008). Nevertheless, the application of liposomal dispersion directly to the skin is limited specially due to their low viscosity characteristic (MOURTAS et al., 2008). In this way, the use of thickening agents, including hydrogels, can improve the liposomes rheological properties for topical drug-delivery and also exhibit biological properties (CIOBANU et al., 2014; MOURTAS et al., 2007).

Thus, the second section of this thesis aimed to develop a liposomal-hydrogel containing β -lapachone for wound healing applications. The liposomal-hydrogel formulation consisted of β -lapachone-loaded multilamellar liposomes incorporated in a polymeric blend, containing a bacterial cellulose hydrogel produced by *Zoogloea* sp. Both bacterial cellulose and β -lapachone are expected to have wound healing properties. This

study evaluated the in vitro kinetics and rheological properties of the liposomal-hydrogels containing β -lapachone, as well as their in vivo wound healing activity.

In general, this thesis aimed to contribute for the development of polymeric and lipidic nanocarriers with different biological applications and administration routes, for instance systemic treatment of melanoma and topical action in wound healing.

References

ALBINO, A. P., SOZZI, G., NANUS, D. M., JHANWAR, S. C., & HOUGHTON, A. N. Malignant transformation of human melanocytes: induction of a complete melanoma phenotype and genotype. *Oncogene*, v. 7, n. 11, p. 2315–2321, 1992.

ALLEN, T.M; CULLIS, P.R. et al. Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream. *Science*, v. 303, n. 5665, p. 1818-1822, 2004.

ANGELI, E. et al. Nanotechnology applications in medicine. *Medical Device Technology*, v. 14 (5), p. 29–31, 2008. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/12852120>>.

ANTÔNIO, E. et al. Poly(lactic acid) nanoparticles loaded with ursolic acid: Characterization and in vitro evaluation of radical scavenging activity and cytotoxicity. *Materials Science and Engineering: C*, v. 71, p. 156–166, 2017.

BAO, G.; MITRAGOTRI, S.; TONG, S. Multifunctional nanoparticles for drug delivery and molecular imaging. *Annual review of biomedical engineering*, v. 15, n. 4, p. 253–82, 2013.

BOULAIZ, H. et al. Nanomedicine: Application areas and development prospects. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 12, n. 5, p. 3303–3321, 2011.

BROOKS, M. D.; BURNES, M. L.; WICHA, M. S. Therapeutic Implications of Cellular Heterogeneity and Plasticity in Breast Cancer. *Cell Stem Cell*, v. 17, n. 3, p. 260–271, 2015.

BRY, A. K. et al. Nanotechnology-based strategies for combating toxicity and resistance in melanoma therapy. *Biotechnology Advances*, v. 34, n. 5, p. 565–577, 2016.

CARNEIRO, G. et al. Topical delivery and in vivo antileishmanial activity of paromomycin-loaded liposomes for treatment of cutaneous leishmaniasis. *Journal of liposome research*, v. 20, n. 1, p. 16–23, 2010.

CAVALCANTI, I. M. F. et al. Antimicrobial activity of β -lapachone encapsulated into liposomes against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Cryptococcus neoformans* clinical strains. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, v. 3, p. 6–11, 2015.

CHEN, F. et al. In Vivo Tumor Targeting and Image-Guided Drug Delivery with Antibody-Conjugated , Radiolabeled Mesoporous Silica Nanoparticles Radiolabeled Mesoporous Silica Nanoparticles. 2013.

CHOWDHURY, R. M. et al. Cancer nanotheranostics: Strategies, promises and impediments. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 84, p. 291-304, 2016.

CIOBANU, B. C. et al. Modulated release from liposomes entrapped in chitosan/gelatin hydrogels. *Materials Science and Engineering C*, v. 43, p. 383–391, 2014.

CSERMELY, P. et al. Cancer stem cells display extremely large evolvability: alternating plastic and rigid networks as a potential. *Seminars in cancer biology*, v. 8, p. 1–10, 2014.

DEVALAPALLY, H.; CHAKILAM, A.; AMIJI, M. Role of Nanotechnology in Pharmaceutical Product Development. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 96, n. 10, p. 2548–2564, 2007.

FU, S. C. et al. β -Lapachone Accelerates the Recovery of Burn-Wound Skin. *Histology and Histopathology*, v. 26, n. 7, p. 905–914, 2011.

JACKSON, J. E.; KOPECKI, Z.; COWIN, A. J. Nanotechnological advances in cutaneous medicine. *Journal of Nanomaterials*, v. 2013, p. 1–8, 2013.

JAIN, A. K.; THANKI, K.; JAIN, S. Co-encapsulation of tamoxifen and quercetin in polymeric nanoparticles: Implications on oral bioavailability, antitumor efficacy, and drug-induced toxicity. *Molecular Pharmaceutics*, v. 10, n. 9, p. 3459–3474, 2013.

KUNG, H.-N. et al. In vitro and in vivo wound healing-promoting activities of beta-lapachone. *American journal of physiology. Cell physiology*, v. 295, n. 4, p. C931-43, out. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18650264>>. Acesso em: 6 jan. 2013.

LA PORTA, C. A M.; ZAPPERI, S. Human breast and melanoma cancer stem cells biomarkers. *Cancer Letters*, v. 338, n. 1, p. 69–73, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2012.03.017>>.

LI, J. et al. Nanobiotechnology for the Therapeutic Targeting of Cancer Cells in Blood. *Cellular and Molecular Bioengineering*, v. 8, n. 1, p. 137–150, 2015.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International journal of pharmaceutics*, v. 385, n. 1, p. 113-142, 2010.

MOURTAS, S. et al. Liposomal drugs dispersed in hydrogels. Effect of liposome, drug and gel properties on drug release kinetics. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, v. 55, n. 2, p. 212–21, 2007.

MOURTAS, S. et al. The effect of added liposomes on the rheological properties of a hydrogel: a systematic study. *Journal of colloid and interface science*, v. 317, n. 2, p. 611–9, 2008.

PIKTEL, E. et al. Recent insights in nanotechnology-based drugs and formulations designed for effective anti-cancer therapy. *Journal of nanobiotechnology*, NULL, v. 14, n. 1, p. 39, 2016.

PORE, M. et al. Cancer Stem Cells, Epithelial to Mesenchymal Markers, and Circulating Tumor Cells in Small Cell Lung Cancer. *Clinical Lung Cancer*, v. 17, n. 6, p. 535–542, 2016.

REED, C. M. et al. Vaccination with melanoma helper peptides induces antibody responses associated with improved overall survival. *Clinical Cancer Research*, v. 21, n. 17, p. 3879–3887, 2015.

SUTRADHAR, K. B.; AMIN, L. Nanotechnology in Cancer Drug Delivery and Selective Targeting. *Nanotechnology*, v. 2014, p. 1–12, 2014.

TAZZARI, M. et al. Melan-A/MART-1 immunity in a EWS-ATF1 translocated clear cell sarcoma patient treated with sunitinib: a case report. *BMC Cancer*, v. 15, n. 1, p. 1–8, 2015.

TORCHILIN, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature reviews. Drug discovery*, v. 4, n. 2, p. 145–160, 2005.

WU, X.; GUY, R. H. Applications of nanoparticles in topical drug delivery and in cosmetics. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 19, n. 6, p. 371–384, 2009.

XU, X.; ZHONG, J. F. Circulating tumor cells and melanoma progression. *The Journal of investigative dermatology*, v. 130, n. 10, p. 2349–2351, 2010.

CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES

The first section of this thesis was dedicated to site-specific polymeric nanoparticles for melanoma treatment. In the first chapter, it was conducted an overview of recent literature about polymeric nanoparticles for the therapeutic targeting of melanoma cells (m-CSCs and CMCs) with high metastatic potential. Based on literature review, it is clear the key role of these cells at the physiopathology of metastasis. The reported biomarkers expressed in m-CSCs and CMCs can be used as potential targets of site-specific theranostic nanoparticles for melanoma. In addition, the optimal design of polymeric nanoparticles for passive and active tumor targeting were also discussed take into account the size, shape and surface properties of the nanoparticles.

In the second chapter, surface modified polymeric nanoparticles (stealth, fluorescent label and site-specific) based on PBLG-derivatives were prepared and characterized. The nanoparticles showed small sizes, homogenous population, slightly elongated shapes and negative surface potential. Besides, the PBLG-based nanoparticles and immunonanoparticles were not recognized by the complement system and were not cytotoxic for normal endothelial or melanoma cells. In addition, the developed immunonanoparticles containing MART-1 antibody (PBLG-PEG-Bt-MART-1) showed a specific cellular uptake by B16-GFP cells, that overexpress the MART-1 receptor. However, further studies should be performed in order to optimize these immunonanoparticles and to enhance their specific recognition by melanoma cells, for example, increasing the antibody ratio conjugated at the surface of nanoparticles, as well as the incorporation of the drugs into these particles to increase the cytotoxicity against melanoma cells. In summary, these studies highlighted the potential of PBLG-based nanoparticles to be used as systemic drug-delivery systems for melanoma targeting approach. As discussed in the literature review, other promising antibodies against CMC and/or m-CSCs biomarkers can be essayed for melanoma therapeutic and diagnosis

purposes and the PBLG-based nanoparticles can be used as versatile and modifiable nanoplatforms for this aim.

On the second section of this thesis, a topical polymeric hydrogel containing β -lap-loaded multilamellar liposomes (β -lap-Lipo/ZBP-HEC) was developed for *in vivo* wound healing application. The liposomal-hydrogels showed suitable sizes, pH and rheological characteristics for topical applications. In addition, the release kinetic profile of β -lap from liposomal-hydrogels at the wound site followed the Higuchi model and was 1.9 folds slower than β -lap released from hydrogel. ZBP/HEC hydrogel enhanced the *in vivo* wound healing activity, increasing the density of specific cells involved in the wound repair. In addition, β -lap-Lipo/ZBP-HEC increased around 2-folds the formation of new vessels at wound site and decreased the inflammatory process during the proliferative phase of skin repair. These results suggest that β -lap-Lipo and ZBP/HEC hydrogel had a synergic effect. These promising findings also shed light to future researches using the ZBP/HEC hydrogel as a bioactive vehicle for incorporation of other drugs with topical actions.

Taking into account the overall results, this present work contributed for the development of promising polymeric and lipidic nanocarriers with different biological applications and administration routes: immunonanoparticles containing antibody targeted for MART-1 receptor for systemic treatment of melanoma and β -lapachone encapsulated in multilamellar liposomes and incorporated in a biopolymer hydrogel for topical application in wound healing.

RÉSUMÉ ÉTENDU

Les nanotechnologies permettent de concevoir les outils thérapeutiques nouveaux, conçus pour résoudre les différents problèmes de nature physico-chimique ou biologique qui surviennent lors de l'administration des molécules actives. Les pathologies concernées sont très variées. Toutefois, au cours de la dernière décennie, c'est certainement en cancérologie que les efforts ont été les plus importants (BRYs et al., 2016 ; SUTRADHAR et al. 2014). Dans ce domaine, la principale stratégie développée a consisté à utiliser une très grande variété de systèmes de taille nanométrique conçu pour véhiculer plus les molécules antitumorales vers les cellules cancéreuses, plus spécifiquement que ne peuvent le faire les molécules actives seules, afin d'augmenter l'index thérapeutique de ces molécules. Toutefois, cette stratégie ne permet pas de déjouer tous les obstacles. Ainsi, l'hétérogénéité et la plasticité cellulaire au sein des tumeurs aboutissent à la dissémination des métastases dans des organes distincts que les nanomédecines, conçues pour atteindre les tumeurs primaires, ne peuvent pas rejoindre efficacement.

De manière générale, le traitement des métastases est considéré comme étant un défi majeur pour l'amélioration des traitements du cancer (BROOKS et al., 2015). Plus précisément, deux types de cellules cancéreuses sont directement impliqués dans l'hétérogénéité tumorale et le développement des métastases : les cellules souches cancéreuses (CSCs) et les cellules tumorales circulantes (CTCs). Les CSCs représentent une quantité minoritaire de cellules dans la tumeur mais qui ont la particularité d'être pluripotentes et de posséder une forte capacité métastatique (BROOKS ; BURNES ; WICHA, 2015 ; CSERMELY et al., 2014). A côté de ces cellules, les CTCs sont des cellules tumorales propagées par le sang et/ou la circulation lymphatiques (XU ; ZHONG, 2010), capables de s'implanter dans un organe distant de la tumeur primaire. Des niveaux élevés de CSCs et CTCs ont été associés à la progression tumorale, à la chimiorésistance et aux métastases (LA PORTA ; ZAPPERI, 2013; PORES et al., 2016), ce qui a conduit

récemment à considérer les CTCs comme étant des biomarqueurs intéressants. Bien que leur détection représente un véritable défi, en raison de leur rareté, un nombre croissant de techniques est actuellement développé.

Dans ce contexte, nous nous sommes focalisés sur le mélanome qui présente un fort potentiel métastatique et fait souvent l'objet de résistance aux traitements chimiothérapeutiques. Le mélanome provient de la transformation maligne de mélanocytes cutanés. Il s'agit d'un type de cancer particulièrement meurtrier, avec un taux de survie de 5 ans pour des métastases de mélanome inférieures à 20 % (ALBINO et al., 1992 ; CHEN, et al., 2013). En raison de la pertinence clinique de ce cancer de la peau, le traitement du mélanome a été largement étudié pour des applications de la nanotechnologie, y compris l'utilisation de nanoparticules polymériques (ANTÔNIO et al., 2017 ; JAIN ; THANKI; JAIN, 2013; LI et al., 2015).

La première partie de cette thèse a été consacrée aux approches nanotechnologiques pour le traitement du mélanome métastatique. Le **premier chapitre** consiste en une revue bibliographique. Pour des raisons de simplicité, elle a été divisée en deux parties. Ainsi, dans un premier temps, le rôle et l'importance des cellules souches cancéreuses du mélanome (m-CSC) et des cellules de mélanome circulantes (CMC) dans le développement de métastases ont été décrits et précisés. En particulier, les principaux biomarqueurs connus des m-CSCs et des CMC ont été recensés et présentés sous l'angle de l'importance clinique de ces cellules, de leur utilisation en tant que biomarqueurs pour le diagnostic, le pronostic et le traitement du mélanome. Cette analyse a également examiné le modèle d'expression des m-CSC et des biomarqueurs CMC, leurs fonctions biologiques et les mécanismes de résistance de ces cellules. La deuxième partie de cette analyse a été consacrée à décrire et discuter les approches nanotechnologiques actuelles ayant pour objectif de cibler les cellules de mélanome, en mettant l'accent sur les études portant sur les nanoparticules polymériques. Les stratégies de ciblage passives et actives

développées ont été présentées et les caractéristiques des nanoparticules qui influencent l'efficacité de ciblage de m-CSCs et CMC a été discutée. Ainsi, l'objectif de cette analyse était de présenter et de discuter l'état actuel des connaissances des biomarqueurs du mélanome et d'évaluer les avantages et les inconvénients des nanoparticules polymériques proposés à ce jour. Elle a permis d'identifier quelles devraient être les principales caractéristiques désirables de nanomédecines efficaces en vue du traitement du mélanome métastatique.

Le **deuxième chapitre** a été consacré au développement rationnel et à la caractérisation des nanoparticules polymères constituées par l'autoassemblage de poly(gamma-L-benzyle glutamate) (PBLG) fonctionnalisées pour le ciblage des cellules du mélanome et spécialement les cellules tumorales circulantes. Ce chapitre expérimental présente le développement et la caractérisation d'immuno-nanoparticules de PBLG obtenues par le greffage en surface d'un anticorps dirigés contre l'antigène MART-1 du mélanome, reconnu par les anticorps de lymphocytes T (MART-1). L'antigène MART-1 a été sélectionné comme cible en raison de sa surexpression dans les cellules du mélanome (TAZZARI et al., 2015) et de l'existence de lignées cellulaires permettant l'établissement de modèles *in vitro* et *in vivo* chez l'animal.

Les immuno-nanoparticules PBLG-MART1 étaient de petite taille (typiquement inférieure à 100 nm) et chargées négativement en surface. Elles formaient une population homogène et présentaient en microscopie électronique une morphologie légèrement allongée. Ces nanoparticules ayant été conçues pour être administrées par voie intraveineuse; nous avons vérifié qu'elles possédaient des caractéristiques : (i) leur permettant de circuler longtemps dans le torrent circulatoire, puisqu'un des objectifs était d'intercepter et de capturer les CTCs présentes dans le sang; (ii) leur permettant de reconnaître spécifiquement les CTCs tout en n'étant pas capturées par les autres types cellulaires rencontrés localement, notamment les cellules endothéliales. Les principaux

résultats obtenus se sont inspirés des méthodes *in vitro*, comme l'activation du complément, la cytotoxicité et les test d'absorption cellulaire visant à évaluer l'interaction des protéines de sérum humain, les endothéliales et les cellules du mélanome avec des nanoparticules basée sur la PBLG.

Une étude *in vitro* a montré que lorsqu'elles étaient incubées en présence de sérum humain, les nanoparticules préparées n'étaient pas en mesure d'activer le système du complément. Il s'agit donc d'une caractéristique importante puisque le phénomène d'activation est connu comme étant un préalable à la reconnaissance des particules étrangères par le système immunitaire et à leur disparition rapide dans le compartiment sanguin. Sans qu'il y ait une relation directe, cette constatation est donc favorable à une circulation prolongée des particules dans le compartiment sanguin. Toutefois, seule une étude pharmaco-cinétique chez l'animal permettrait de confirmer ce résultat. Une seconde étude a montré que les immunonanoparticules présentaient *in vitro* une faible cytotoxicité pour les différents types cellulaires testés. Enfin, la capture cellulaire des immunonanoparticules associées à l'anticorps MART-1 par les cellules de la lignée B16 a été évaluée par cytométrie de flux. Ainsi, les particules préparées reconnaissent l'antigène surexprimé dans cette lignée cellulaire, indiquant une certaine spécificité des nanoparticules. Cependant, l'intensité de la capture des immuno-nanoparticules et de leur reconnaissance spécifique par les cellules de mélanome devrait être améliorée en augmentant par exemple, le nombre d'anticorps associés à la surface à des nanoparticules, ou bien en testant d'autres ligands de ciblage. En revanche, l'affinité des particules pour les cellules endothéliales, mesurée sur la lignée HUVEC, est limitée, ce qui accroît le différentiel d'affinité B16/HUVEC. Enfin, l'incorporation de molécules cytotoxiques dans ces nanoparticules pourrait être envisagé dans le futur afin d'augmenter leur cytotoxicité contre les cellules du mélanome.

En résumé, cette première partie du travail a confirmé le potentiel des

nanoparticules de PBLG à servir de base à la préparation d'immuno-nanoparticules susceptibles en vue du ciblage du mélanome. Comme cela a été discuté dans l'analyse bibliographique, le couplage d'autres anticorps prometteurs contre les CTCs et/ou les biomarqueurs m-CSCs pourraient être conjugués aux nanoparticules de PBLG qui constituent une plate-forme polyvalente et aisément fonctionnalisable en vue de la fabrication "à façon" des nanomédecines d'intérêt.

La cicatrisation cutanée est parfois un processus extrêmement long et difficile. Lorsque l'administration locale de molécules actives est envisagée, les nanotechnologies sont susceptibles d'améliorer considérablement conventionnelles l'efficacité des substances cicatrisantes, y compris en comparaison (ou en complément) d'autres stratégies thérapeutiques telles que l'occlusion cutanée (JACKSON; KOPECKI; COWIN, 2013). En termes technologiques, l'association des substances actives à des nanomédecines présentent les avantages suivants : (i) une protection accrue de principes actifs fragiles vis-à-vis du milieu environnant, (ii) une pénétration et une localisation des nanomédicaments au niveau du site d'action, (iii) la possibilité de localiser l'effet pharmacologique tout en réduisant l'absorption systémique indésirable (CARNEIRO et al., 2010). Dans le contexte de l'administration cutanée, les nanotransporteurs les plus utilisés sont les nano-emulsions et les liposomes (WU ; GUY, 2009).

Dans la deuxième partie de notre travail, nous nous sommes focalisés sur l'emploi de liposomes destinés à favoriser la cicatrisation des plaies. Il s'agit de vésicules sphériques de taille micronique ou sub-micronique formées d'une ou plusieurs bicouches phospholipidiques concentriques délimitant en leur centre une cavité aqueuse. Le principal avantage de ces transporteurs est leur capacité à encapsuler indifféremment des substances lipophiles, amphiphiles et hydrophiles, en raison de leur caractère biphasique (TORCHILIN, 2005). Par ailleurs, nous avons utilisé la β -lapachone en tant que substance active qui présente des propriétés biologiques importantes, dont la guérison des plaies.

Cette naphthoquinone possède un caractère lipophile favorisant son encapsulation dans des liposomes avec des charges élevées (CAVALCANTI et al., 2015 ; FU et al., 2011 ; KUNG et al., 2008). Cependant, l'application des dispersions liposomales directement sur la peau n'est pas optimale en raison de leur faible viscosité (MOURTAS et al., 2008). Pour cette raison, la dispersion des liposomes au sein d'hydrogels permet d'atteindre des caractéristiques rhéologiques favorables à leur administration topique. Simultanément, le choix judicieux des polysaccharides utilisés en tant qu'agents épaississants permet d'associer d'autres propriétés biologiques à la préparation (CIOBANU et al., 2014 ; MOURTAS et al., 2007).

Ainsi, le **troisième chapitre** décrit l'élaboration et la caractérisation d'un système liposomes-hydrogel contenant une molécule active, la β -lapachone (β -lap-Lipo/ZBP-HEC). Son activité cicatrisante a été établie *in vivo* sur un modèle animal. L'hydrogel utilisé consiste en un mélange de biopolymères, comprenant notamment une cellulose d'origine bactérienne obtenue à partir de la mélasse de la canne à sucre. Ces biopolymères ont déjà démontré leur intérêt dans plusieurs applications biomédicales, déjà décrites dans la littérature. Toutefois, ce travail apporte une nouvelle approche pour l'utilisation biomédicale de ce biopolymère produit par *Zoogloea* sp. puisqu'il a été utilisé ici non seulement comme hydrogel capable de moduler la libération de composés bioactifs, mais aussi pour son action cicatrisante intrinsèque.

Cette étude a évalué la cinétique *in vitro* et les propriétés rhéologiques du liposomale-hydrogels contenant la β -lapachone, ainsi que leur cicatrisation *in vivo*, et les deux, la cellulose bactérienne et la β -lapachone, étaient censées avoir des propriétés de cicatrisation.

Des hydrogels contenant des liposomes chargés en β -lapachone (β -lap-Lipo/ZBP-HEC) ont été préparés à partir de liposome de taille appropriée. Après dispersion, le pH et les caractéristiques rhéologiques des préparations ont été ajustées pour qu'elles soient

adaptées à une application topique. L'incorporation de liposomes dans un système d'hydrogel permet de contrôler la libération du principe actif, en fonctionnant comme un réservoir de médicaments. Ainsi, les cinétiques de libération de la β -lapachone à partir des hydrogels a été établie *in vivo*. L'analyse des cinétiques a montré que la libération obéissait au modèle d'Higuchi et que dans le cas des systèmes β -lap-Lipo/ZBP-HEC la libération était ralentie d'un facteur 2 environ par rapport à l'hydrogel simple contenant de la β -lapachone. Des études de cicatrisation ont été conduites *in vivo* sur des rats Wistar. L'analyse histologique des tissus a permis de montrer que les animaux ayant reçu seulement l'hydrogel ZBP/HEC présentaient une augmentation de la densité des cellules spécifiques impliqués dans la cicatrisation de la plaie. En revanche, les animaux appartenant aux groupes traités avec le système β -lap-Lipo/ZBP-HEC (hydrogels contenant les liposomes) ont présenté une augmentation d'un facteur 2 de la formation de nouveaux vaisseaux dans la zone de cicatrisation et ont simultanément diminué le processus inflammatoire au cours de la phase proliférative de réparation de la peau.

Pris simultanément, ces résultats suggèrent que les liposomes de β -lapachone (β -lap-Lipo) d'une part, et l'hydrogel ZBP/HEC, d'autre part ont eu un effet synergique. Ces résultats prometteurs ouvrent aussi la voie à de futures recherches utilisant l'hydrogel ZBP/HEC comme un transporteur bioactif auquel d'autres molécules à action topique pourraient être associées, de façon à obtenir des effets synergiques intéressants.

En conclusion, ce travail doctoral a permis de montrer, dans deux pathologies différentes, l'intérêt de concevoir les formulations à l'échelle nanométrique, notamment des immuno-nanoparticules de PBLG fonctionnalisées par des anticorps dirigés contre MART-1 en vue de l'interception des cellules tumorales circulantes (CTCs) du mélanome dans le sang et/ou le traitement systémique du mélanome et des liposomes multilamellaires encapsulant de la β -lapachone et dispersés dans un hydrogel de biopolymères destinés à favoriser la cicatrisation des plaies cutanées.

Referências

- ALBINO, A. P., SOZZI, G., NANUS, D. M., JHANWAR, S. C., & HOUGHTON, A. N. Malignant transformation of human melanocytes: induction of a complete melanoma phenotype and genotype. *Oncogene*, v. 7, n. 11, p. 2315–2321, 1992.
- ANTÔNIO, Emilli et al. Poly(lactic acid) nanoparticles loaded with ursolic acid: Characterization and in vitro evaluation of radical scavenging activity and cytotoxicity. *Materials Science and Engineering: C*, v. 71, p. 156–166, 2017.
- BROOKS, Michael D.; BURNES, Monika L.; WICHA, Max S. Therapeutic Implications of Cellular Heterogeneity and Plasticity in Breast Cancer. *Cell Stem Cell*, v. 17, n. 3, p. 260–271, 2015.
- BRY, Adam K. et al. Nanotechnology-based strategies for combating toxicity and resistance in melanoma therapy. *Biotechnology Advances*, v. 34, n. 5, p. 565–577, 2016.
- CARNEIRO, Guilherme et al. Topical delivery and in vivo antileishmanial activity of paromomycin-loaded liposomes for treatment of cutaneous leishmaniasis. *Journal of liposome research*, v. 20, n. 1, p. 16–23, 2010.
- CAVALCANTI, I M F et al. Antimicrobial activity of b -lapachone encapsulated into liposomes against meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Cryptococcus neoformans* clinical strains. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, v. 3, p. 6–11, 2015.
- CHEN, Feng et al. In Vivo Tumor Targeting and Image-Guided Drug Delivery with Antibody-Conjugated , Radiolabeled Mesoporous Silica Nanoparticles Radiolabeled Mesoporous Silica Nanoparticles. 2013.
- CIOBANU, Bogdan C. et al. Modulated release from liposomes entrapped in chitosan/gelatin hydrogels. *Materials Science and Engineering C*, v. 43, p. 383–391, 2014.
- CSERMELY, Peter et al. Cancer stem cells display extremely large evolvability: alternating plastic and rigid networks as a potential Mechanism: Network models, novel therapeutic target strategies, and the contributions of hypoxia, inflammation and cellular senescence. *Seminars in cancer biology*, p. 1–10, 8 jan. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24412105>>. Acesso em: 22 set. 2014.
- FU, Shih Chen et al. β -Lapachone Accelerates the Recovery of Burn-Wound Skin. *Histology and Histopathology*, v. 26, n. 7, p. 905–914, 2011.
- JACKSON, Jessica E; KOPECKI, Zlatko; COWIN, Allison J. *Nanotechnological_advances_in_cutaneous_medicine.PDF*. *Journal of Nanomaterials*, v. 2013, p. 1–8, 2013.
- JAIN, Amit K.; THANKI, Kaushik; JAIN, Sanyog. Co-encapsulation of tamoxifen and quercetin in polymeric nanoparticles: Implications on oral bioavailability, antitumor efficacy, and drug-induced toxicity. *Molecular Pharmaceutics*, v. 10, n. 9, p. 3459–3474, 2013.
- KUNG, Hsiu-Ni et al. In vitro and in vivo wound healing-promoting activities of beta-lapachone. *American journal of physiology. Cell physiology*, v. 295, n. 4, p. C931-43, out. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18650264>>. Acesso

em: 6 jan. 2013.

LA PORTA, Caterina a M; ZAPPERI, Stefano. Human breast and melanoma cancer stem cells biomarkers. *Cancer Letters*, v. 338, n. 1, p. 69–73, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2012.03.017>>.

LI, Jiahe et al. Nanobiotechnology for the Therapeutic Targeting of Cancer Cells in Blood. *Cellular and Molecular Bioengineering*, NULL, v. 8, n. 1, p. 137–150, 2015.

MOURTAS, Spyridon et al. Liposomal drugs dispersed in hydrogels. Effect of liposome, drug and gel properties on drug release kinetics. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, v. 55, n. 2, p. 212–21, 1 abr. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17223020>>. Acesso em: 6 jan. 2013.

MOURTAS, Spyridon et al. The effect of added liposomes on the rheological properties of a hydrogel: a systematic study. *Journal of colloid and interface science*, v. 317, n. 2, p. 611–9, 15 jan. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17949732>>. Acesso em: 6 jan. 2013.

PORE, Milind et al. Cancer Stem Cells, Epithelial to Mesenchymal Markers, and Circulating Tumor Cells in Small Cell Lung Cancer. *Clinical Lung Cancer*, v. 17, n. 6, p. 535–542, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.clcc.2016.05.015>>.

SUTRADHAR, Kumar Bishwajit; AMIN, Lutful. Nanotechnology in Cancer Drug Delivery and Selective Targeting. *Nanotechnology*, v. 2014, p. 1–12, 2014.

TAZZARI, Marcella et al. Melan-A/MART-1 immunity in a EWS-ATF1 translocated clear cell sarcoma patient treated with sunitinib: a case report. *BMC Cancer*, v. 15, n. 1, p. 1–8, 2015. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2407/15/58>>.

TORCHILIN, Vladimir P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature reviews. Drug Discovery*, v. 4, n. 2, p. 145–160, 2005.

WU, X.; GUY, R. H. Applications of nanoparticles in topical drug delivery and in cosmetics. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 19, n. 6, p. 371–384, 2009.

XU, Xiaowei; ZHONG, Jiang F. Circulating tumor cells and melanoma progression. *The Journal of investigative dermatology*, v. 130, n. 10, p. 2349–2351, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/jid.2010.215>>.

ANNEXE A. Ethics committee certificate of approval.

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
Fones: (55 81) 2126 8840 / 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Recife, 02 de maio de 2012.

Ofício nº 427/12

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Profa. Nereide Estela Santos Magalhaes**
Laboratório de Imunologia Keizo Asami-LIKA
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.017434/2012-11

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, **"Estudo in Vivo da Atividade Cicatrizante de Lipossomas Multilamelares Contendo β -Lapachona Veiculado em Biogel Produzido a partir da Zooglea sp."**.

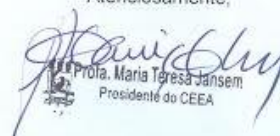
Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Nutrição-UFPE; Animais: Ratos; Linhagem: Wistar; Sexo: machos; número de animais previsto no protocolo: 48 animais; Peso: 150-250g; Idade: 50 a 60 dias.

Atenciosamente,


Profa. Maria Teresa Jansen
Presidente do CEEA

CCB: Integrar para desenvolver