



HAL
open science

Nouvelle approche en thérapie anti-tumorale : développement de nanovecteurs du calcitriol ciblant les macrophages

Sabrina Nicolas

► To cite this version:

Sabrina Nicolas. Nouvelle approche en thérapie anti-tumorale: développement de nanovecteurs du calcitriol ciblant les macrophages. Ingénierie biomédicale. Université de Lyon, 2018. Français. NNT : 2018LYSE1248 . tel-03018105

HAL Id: tel-03018105

<https://theses.hal.science/tel-03018105>

Submitted on 22 Nov 2020

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.



N°d'ordre NNT : 2018LYSE1248

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale EDISS 205
(Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé)

**Spécialité de doctorat : Ingénierie pour le vivant, Sciences
Pharmacotechniques**

Soutenue publiquement le 21/11/2018, par :
Sabrina NICOLAS

Nouvelle approche en thérapie anti-tumorale : développement de nanovecteurs du calcitriol ciblant les macrophages

Devant le jury composé de :

Stéphanie BRIANÇON, Professeur (Université de Lyon)
Valérie HOFFART, Maître de Conférences (Université Paris Descartes)
Alf LAMPRECHT, Professeur (Université de Bonn)
Aurélie MALZERT-FREON, Professeur (Université de Caen Normandie)
Mohamed SKIBA, Maître de Conférences (Université de Rouen)

Présidente du jury
Rapporteur
Rapporteur
Rapporteur
Examineur

Marie-Alexandrine BOLZINGER, Professeur (Université de Lyon)
Eyad ALMOUAZEN, Maître de conférences, (Université de Lyon)
Hatem FESSI, Professeur émérite, (Université de Lyon)

Directrice de thèse
Co-directeur de thèse
Co-directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directrice Générale des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. X. PERROT

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme C. FELIX

Département GEP

Directeur : M. le Professeur H. HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. le Professeur E.PERRIN

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE

Remerciements

Cette thèse a été réalisée au sein du Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés (LAGEP, UMR CNRS 5007) et en collaboration avec l'équipe Anticorps Anticancer du centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (UMR Inserm 1052 CNRS 5286).

Je tiens à remercier sincèrement,

Stéphanie Briançon, Professeur à l'Université Claude Bernard Lyon 1, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et pour sa gentillesse durant ces 3 années mais aussi durant mon stage de recherche durant lequel elle a su se montrer disponible et à l'écoute, et pour m'avoir fait l'honneur d'être présidente de mon jury de thèse.

Marie-Alexandrine Bolzinger, Professeur à l'Université Claude Bernard Lyon 1, ma directrice de thèse, pour m'avoir permis de réaliser cette thèse de manière autonome, pour la confiance qu'elle m'a accordée et pour les conseils qu'elle m'a prodigués durant cette thèse.

Hatem Fessi, Professeur à l'Université Claude Bernard Lyon 1, mon co-encadrant de thèse, pour ses conseils, sa gentillesse, sa bienveillance, et ses encouragements qui m'ont, à plusieurs reprises, profondément rassurée et motivée.

Eyad Almouazen, Maître de Conférences à l'Université Claude Bernard Lyon 1, mon co-encadrant de thèse, pour m'avoir accordé sa confiance pour la poursuite de son projet de thèse, ce qui n'est pas rien ! Je le remercie infiniment pour sa disponibilité, ses précieux conseils, son soutien et pour m'avoir rassurée dans les moments de doute. La première doctorante d'une longue liste...

Madame Valérie Hoffart, Maître de Conférences à l'Université Paris Descartes, Madame Aurélie Malzert-Fréon, Professeur à l'Université de Caen, et Monsieur Alf Lamprecht, Professeur à l'Université de Bonn de m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse.

Monsieur Mohamed Skiba, Maître de Conférences à l'Université de Rouen, de m'avoir faire l'honneur d'être examinateur de cette thèse.

Yves Chevalier, Directeur de Recherches CNRS, pour avoir su répondre à chacune de mes questions, particulièrement lors de la synthèse de polymères modifiés et les RMN, qui pour moi étaient un vrai casse-tête.

Charles Dumontet, Professeur à l'Université Claude Bernard Lyon 1 et chef de l'équipe Anticorps Anticancer, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire durant ces trois années.

Lars Petter Jordheim, Maître de Conférences à l'Université Claude Bernard Lyon 1, pour sa contribution, pour avoir été toujours disponible et pour ses précieux conseils pour la partie biologie de ce travail. Je le remercie aussi pour ses encouragements tout au long de ma thèse.

Emeline Cros Perrial, Assistante ingénieur, pour m'avoir transmis son savoir pour toutes mes manipulations in vitro. C'était toujours un plaisir d'échanger avec toi professionnellement comme personnellement.

Je tiens aussi à remercier toutes les personnes rencontrées au cours de ma thèse, spécialement :

Jocelyne Pelletier, Ingénieur de recherche lors de mon arrivée en stage de recherche et jusqu'à ma troisième année de thèse. Ma chère Joce (pour qui l'HPLC n'a aucun secret !), merci pour ta gentillesse, ta disponibilité, merci pour les moments partagés (et la découverte du Bo Bun, quel délice !). Loin de mes proches, tu as su être une présence rassurante pour moi, merci pour ta bienveillance à mon égard.

Mes co-bureaux/amies, en particulier

Augustine. Merci pour ton amitié, ta confiance et ton soutien inébranlable, particulièrement en cette fin de thèse que nous partageons. Je te souhaite le meilleur pour ton avenir.

Greta. Ma petite Italienne pétillante et pleine de folie. Merci pour ta présence et toutes tes petites attentions qui avaient toute leur importance à mes yeux. Une très belle amitié est née. Je te souhaite le meilleur pour cette dernière année de thèse et au-delà. Grazie de tutto ! Sarò sempre lì per te.

Margaux. Ma petite Franco-Polonaise. Merci pour tous ces moments partagés, entre rires, (craquages culinaires) et larmes, cela a forgé notre amitié. Merci pour ta présence et tes mots rassurants. Je te souhaite à toi aussi le meilleur pour la suite ! Dziękuję za wszystko ☺

Marion. Ça a été difficile quand tu es partie, mais c'était pour la bonne cause. Merci pour nos discussions, ton écoute et pour ton soutien même quand j'avais tort ! Belle continuation à toi, personnellement comme professionnellement !!

Et aussi Alicia, Amina, et Zoé malheureusement parties au début de ma thèse. Je vous remercie pour les moments passés ensemble et votre soutien. Je vous souhaite également l'avenir dont vous rêvez.

Mes collègues permanents de Rockefeller : Cynthia, Delphine, Giovanna, Jacqueline, Ouali, Sandrine. Merci pour les moments partagés ensemble, et votre bonne humeur quotidienne ! C'était toujours un plaisir de vous voir.

Mes stagiaires, que j'ai eu le plaisir d'encadrer et qui m'ont aidée durant mes 2 premières années de thèse : Anne-Lise, Elise, Emilie, Kusumita et Sélène, mais aussi tous les autres stagiaires qui ont contribué à la bonne ambiance au travail.

Mes collègues doctorants/amis que j'ai eu le plaisir de connaître au cours de ma thèse, en particulier Sabrina, Laura, Annalisa, Flavia, Francesca, Jorge, Alex, Francisco, Pierre, Tanmoy, Ben, Andrea, Karim, Badri,-mais aussi tous les autres avec qui c'était toujours un plaisir d'échanger durant mes (courts) passages à La Doua.

Tous les autres membres du LAGEP, en particulier Nadia Chapel qui s'est toujours montrée d'une douceur incroyable, pour la gestion de la partie administrative, toujours dans la bonne humeur.

Toutes les personnes de la formidable équipe Anticorps Anticancer, qui m'ont toujours accueillie chaleureusement dans leurs locaux et avec qui j'ai partagé de bons moments, et parfois de longues discussions !

Nos collègues de parasitologie. Merci pour votre bonne humeur, votre gentillesse et pour ces échanges rassurants bien que souvent entre deux cours ou deux manips.

Les personnes que j'ai eu le plaisir de connaître au cours de mes heures d'enseignement à la faculté de pharmacie, en particulier Plamen Kirilov et Céline Serre pour leur aide et leur profonde gentillesse.

Enfin, un immense merci à :

Mes amis de longue date, en particulier Adélie, Adéliska, Amandine, Carine, Fabrice, Florian, Isabelle, Laurie, Lucile, Marc, Marion, Mathilde, Moreen, Nathanaël, Nicolas, Sylvain, Violaine, ... Merci pour tous ces moments de partage, de bonheur, et de simplicité. Merci pour votre soutien. Qu'est-ce que je ferai sans vous !

Mes proches, en particulier mes parents, mon frère (nous serons deux Dr. Nicolas désormais !!) et Stéphane. Je ne vous remercierai jamais assez pour tout ce que vous avez toujours fait pour moi, pour les sacrifices et le soutien sans failles dont vous avez fait preuve et qui m'ont permis d'arriver jusqu'ici aujourd'hui.

Résumé

Les macrophages (M ϕ) infiltrés dans les tumeurs orchestrent les différentes étapes du développement tumoral. De par leur capacité à internaliser les nanoparticules (NPs) et leur plasticité phénotypique, ils sont impliqués dans l'efficacité thérapeutique des actifs vectorisés par un rôle de réservoir de NPs ou une modulation de leur réponse envers les cellules néoplasiques. Le calcitriol, métabolite actif de la vitamine D, possède des activités à la fois anti-cancéreuse et immunomodulatrice. Sa vectorisation *via* des NPs est une approche thérapeutique intéressante pour potentialiser ses activités tout en limitant les effets secondaires s'opposant à son utilisation clinique dans le cadre de la chimiothérapie. Une étude de formulation a permis de développer des NPs à base d'acide poly(D,L)lactique et de triglycérides (ratio 1:2) d'une taille de 200 nm et présentant une libération prolongée du calcitriol. Des études *in vitro* menées sur les cellules de cancer du sein MCF-7 ont permis de mettre en évidence l'avantage d'une libération prolongée du calcitriol vis-à-vis de son activité antiproliférative aboutissant à une réduction de 65% de la viabilité cellulaire après 10 jours par rapport au contrôle, non observable avec le calcitriol libre. La participation active des M ϕ à l'activité cytotoxique du calcitriol sur les lignées cellulaires de cancer du sein MCF-7 et de leucémie MV4-11 a aussi été mise en évidence par un modèle de co-culture *in vitro*. En effet, les NPs de calcitriol, après internalisation par les M ϕ , provoquent une action cytotoxique prolongée contre les cellules MCF-7 en co-culture au bout de 10 jours avec seulement 20% de cellules viables vs 70% en l'absence de M ϕ .

Mots-clés : calcitriol, nanoparticules polymères, macrophages, cancer du sein, leucémie

Abstract

Tumor associated macrophages (M ϕ) orchestrate the different stages of tumor development. They are able to internalize nanoparticles (NPs) and are known for their phenotypic plasticity, which make them interesting targets for cancer treatment through the storage of NPs or a modulation of their activity towards the neoplastic cells. Calcitriol, the active metabolite of vitamin D, exerts both anticancer and immunomodulatory activities. Its vectorization *via* NPs is an interesting therapeutic approach to potentiate its activities while limiting its side effects, which hamper its current clinical use in chemotherapy. We developed poly (D,L) lactic acid and triglyceride-based NPs (1:2 ratio) measuring 200 nm and exhibiting a sustained release of calcitriol. *In vitro* studies, performed on breast cancer cells (MCF-7), showed the advantages of a sustained release of calcitriol regarding its antiproliferative activity with a 65%-decrease in cell viability after 10 days compared to unexposed cells, while it was unobservable for free calcitriol. The implication of M ϕ in the cytotoxic activity of calcitriol towards MCF-7 cells and MV4-11 cells (leukemia) cells has been demonstrated using an *in vitro* co-culture model. Calcitriol-NPs showed a sustained cytotoxic activity towards MCF-7 cells in co-cultures after 10 days, through their uptake by M ϕ , with a decrease in cell viability of 80% vs 30% in mono-cultures.

Keywords: calcitriol, polymeric nanoparticles, macrophages, breast cancer, leukemia

Sommaire

REMERCIEMENTS	2
RESUME	5
ABSTRACT	5
LISTE DES FIGURES	11
LISTE DES TABLEAUX	13
LISTE DES ABREVIATIONS	14
INTRODUCTION GENERALE	16
CHAPITRE I: LA VITAMINE D, INTERET THERAPEUTIQUE & APPLICATION EN CHIMIOETHERAPIE ANTI-TUMORALE	21
I.1. Généralités	21
I.1.1. Synthèse et métabolisme de la vitamine D	21
I.1.2. Régulation du métabolisme de la vitamine D	25
I.1.3. Mécanismes d'internalisation cellulaire du calcidiol et du calcitriol	25
I.2. Activités biologiques de la vitamine D	27
I.2.1. Production locale de calcitriol	27
I.2.2. Actions génomiques et non génomiques	28
I.2.3. Homéostasie phospho-calcique	30
I.2.4. Rôle du calcitriol dans la prévention et le traitement du cancer	31
I.2.4.1. Généralités	31
I.2.4.2. Métabolisme du calcitriol dans le cancer	32
I.2.4.3. Mécanismes d'action	33
I.2.4.4. Efficacité du calcitriol sur différents types de cancer	35
I.2.4.5. Efficacité du calcitriol en combinaison avec d'autres agents anti-cancéreux	38
I.2.4.6. Etudes pré-cliniques et cliniques utilisant le calcitriol pour le traitement du cancer	40
I.2.4.7. Analogues du calcitriol	45
I.2.5. Rôle dans le système immunitaire	47
I.2.5.1. Maladies infectieuses virales ou bactériennes	47
I.2.5.2. Maladies auto-immunes	48
I.2.5.3. Cancer	49
I.3. Encapsulation de la vitamine D	52
I.3.1. Application dans le domaine pharmaceutique	52
I.3.2. Application dans le domaine agro-alimentaire	54

I.4. Conclusion	55
I.5. Références	55
CHAPITRE II : POTENTIEL THERAPEUTIQUE DES MACROPHAGES	67
II.1. Rôle biologique des macrophages	67
II.2. Diversité phénotypique des macrophages	68
II.3. Nanoparticules et macrophages	71
II.3.1. Mécanismes d'internalisation	71
II.3.1.1. Phagocytose	72
II.3.1.2. Pinocytose	73
II.3.2. Propriétés des micro- et nano-particules influençant leur internalisation	74
II.3.2.1. Taille	75
II.3.2.2. Propriétés de surface des nanoparticules	76
II.3.2.3. Morphologie	78
II.3.2.4. Rigidité	78
II.4. Intérêt thérapeutique des macrophages	79
II.4.1. Maladies inflammatoires	79
II.4.2. Maladies infectieuses	80
II.4.2.1. Infections bactériennes	80
II.4.2.2. Infections virales	81
II.4.2.3. Infections parasitaires	82
II.4.3. Cancer	83
II.4.3.1. Les macrophages associés aux tumeurs (TAMs)	83
II.4.3.2. Stratégies thérapeutiques ciblant les TAMs	86
II.4.3.3. Ciblage des TAMs par les NPs	90
II.5. Conclusion	97
II.6. Références	97
CHAPITRE III : VECTORISATION D'IMMUNOMODULATEURS POUR UNE APPLICATION EN THERAPIE ANTI-CANCEREUSE	106
III.1. Les maladies impliquant le système immunitaire	106
III.2. Le double rôle du système immunitaire dans le cancer	107
III.3. Immunothérapies anti-cancéreuses	110
III.3.1. Anticorps monoclonaux	110
III.3.2. Immunothérapie ciblant les points de contrôle du système immunitaire	112
III.3.3. Vaccins anti-cancéreux	114
III.3.4. Immunomodulateurs et apport de leur vectorisation	116
III.3.4.1. Les bisphosphonates	121
III.3.4.2. Acide polyinosinique-polycytidilique	132
III.3.4.3. Acide rétinoïque	133

III.3.4.4. Hydrazinocurcumine	135
III.3.4.5. Méthylglyoxal	136
III.3.4.6. Oligodésoxynucléotides à motifs CPG non méthylés	137
III.3.4.7. Rifampicine	138
III.4. Conclusion	139
III.5. Références	140
CHAPITRE IV : DEVELOPPEMENT DE NANOPARTICULES ENCAPSULANT LE CALCITRIOL ET PROLONGEANT SON ACTIVITE ANTI-CANCEREUSE	153
IV.1. Introduction	153
IV.2. Publication	155
IV.2.1. Abstract	155
IV.2.2. Introduction	156
IV.2.3. Materials and methods	159
IV.2.3.1. Chemicals	159
IV.2.3.2. Preparation of the calcitriol-loaded polymeric NPs	159
IV.2.3.3. NP physicochemical characterizations	160
IV.2.3.4. <i>In vitro</i> calcitriol-NPs release studies	161
IV.2.3.5. Evaluation of the stability of the encapsulated calcitriol	161
IV.2.3.6. Solubilizing properties of NC components – theoretical background	161
IV.2.3.7. Partition of calcitriol between polymer and oil	162
IV.2.3.8. <i>In vitro</i> biological evaluations of calcitriol activity	162
IV.2.3.9. Statistical analysis	164
IV.2.4. Results	164
IV.2.4.1. Impact of formulation parameters on calcitriol encapsulation	164
IV.2.4.2. Solubilizing properties of NC components	167
IV.2.4.3. <i>In vitro</i> evaluation of growth inhibitory activities of calcitriol-loaded NP	169
IV.2.4.4. <i>In vitro</i> evaluation of the cytotoxic activities of calcitriol-loaded NP	171
IV.2.4.5. Evaluation of calcitriol release profile impact on its growth inhibitory activity <i>in vitro</i>	172
IV.2.5. Discussion	173
IV.2.6. Conclusion	177
IV.3. Résultats complémentaires	178
IV.3.1. Validation de la méthode d'évaluation de la libération	178
IV.3.2. Influence de la concentration en calcitriol sur les propriétés des nanocapsules	178
IV.3.3. Evaluation de l'activité cytotoxique du calcitriol <i>in vitro</i>	179
IV.3.4. Etudes préliminaires de la toxicité des nanocapsules chargées en calcitriol <i>in vivo</i>	180
IV.4. Références	184
CHAPITRE V : IMPLICATION DES MACROPHAGES DANS L'ACTIVITE PRO-APOPTOTIQUE DE NANOCAPSULES ENCAPSULANT LE CALCITRIOL	188
V.1. Introduction	188

V.2. Publication	190
V.2.1. Abstract	190
V.2.2. Introduction	191
V.2.3. Materials and methods	193
V.2.3.1. Chemicals	193
V.2.3.2. Preparation of the calcitriol-loaded polymeric nanocapsules	193
V.2.3.3. NC physicochemical characterizations	193
V.2.3.4. <i>In vitro</i> calcitriol-NCs release studies	194
V.2.3.5. <i>In vitro</i> biological evaluations of calcitriol activity	194
V.2.3.6. Statistical analysis	198
V.2.4. Results	199
V.2.4.1. NC physicochemical characterizations	199
V.2.4.2. Cellular uptake of NCs	200
V.2.4.3. Cytotoxic activity of calcitriol-NCs on MCF-7 cells in mono-culture	201
V.2.4.4. Cytotoxic activity calcitriol-NCs on MCF-7 cells in co-culture with THP-1 macrophages	203
V.2.4.5. Cytotoxic activity of calcitriol-NCs, and blank-NCs on MCF-7 cells in delayed co-cultures with THP-1 macrophages	203
V.2.5. Discussion	206
V.2.6. Conclusion	209
V.2.7. References	209

CHAPITRE VI : EFFICACITE ANTI-CANCEREUSE DE NANOCAPSULES ENCAPSULANT LE CALCITRIOL SUR DES CELLULES DE LEUCEMIE MYELOÏDE AIGÛE *IN VITRO* 213

VI.1. Introduction	213
VI.2. Matériel et méthodes	215
VI.2.1. Préparation et caractérisation des nanocapsules encapsulant le calcitriol	215
VI.2.2. Culture cellulaire	215
VI.2.3. Différenciation des monocytes THP-1 en macrophages	215
VI.2.4. Evaluation de l'activité antiproliférative du calcitriol sur les cellules MV4-11	216
VI.2.5. Evaluation de l'activité cytotoxique du calcitriol sur les cellules MV4-11	216
VI.2.5.1. Activité du calcitriol sur des mono-cultures de cellules MV4-11	216
VI.2.5.2. Activité du calcitriol sur des cellules MV4-11 cultivées avec des macrophages THP-1 après exposition directe à l'actif	217
VI.2.5.3. Activité du calcitriol sur des cellules MV4-11 cultivées avec des macrophages THP-1 pré-incubés avec l'actif	217
VI.2.5.4. Evaluation de la viabilité cellulaire des cellules MV4-11	218
VI.2.6. Evaluation de l'interaction entre le calcitriol et la cytarabine <i>in vitro</i>	218
VI.2.7. Analyses statistiques	219
VI.3. Résultats et discussion	219
VI.3.1. Activité antiproliférative du calcitriol sur les cellules MV4-11	219
VI.3.2. Activité cytotoxique du calcitriol sur les cellules MV4-11 en mono- et en co-cultures avec des macrophages THP-1	221
VI.3.3. Evaluation de l'intérêt de la combinaison thérapeutique du calcitriol et de la cytarabine <i>in vitro</i>	225
VI.4. Conclusion	227
VI.5. Références	227

DISCUSSION GENERALE	230
Développement de nanoparticules encapsulant le calcitriol	234
Internalisation des nanocapsules développées par les cellules cancéreuses et les macrophages	237
Activités anti-cancéreuses directes du calcitriol <i>in vitro</i>	238
Participation des macrophages à l'activité cytotoxique du calcitriol <i>in vitro</i>	240
Références	242
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	247
Références	249
ANNEXE : SELECTION D'UNE LIGNEE CELLULAIRE SENSIBLE AU CALCITRIOL	250

Liste des figures

Figure 1. Métabolisme de la vitamine D	22
Figure 2. Conversion du 7-déshydrocholestérol en tacalcioI.....	22
Figure 3. Structures chimiques des métabolites de la vitamine D	23
Figure 4. Synthèses rénale et extrarénale du calcitriol et actions associées.....	28
Figure 5. Mécanisme à l'origine des actions génomiques du calcitriol.	29
Figure 6. Représentation schématique des étapes de la régulation du métabolisme phospho-calcique	31
Figure 7 : Activités anti-cancéreuses du calcitriol	33
Figure 8. Influence du calcitriol sur le niveau d'expression de la 24-hydroxylase après 72 heures d'exposition. 37	
Figure 9 : Avantages du profil pharmacocinétique de la formule DN-101	42
Figure 10. Formules de divers analogues du calcitriol.....	46
Figure 11. Activité cytotoxique de la cathélicidine envers la lignée cellulaire de lymphome à larges cellules B (Raji) <i>in vitro</i> en fonction de la concentration sérique en calcidiol.....	51
Figure 12. Polarisation des macrophages en réponse à la sécrétion de cytokines par les cellules immunitaires ou à d'autres facteurs	70
Figure 13 : Schématisation des différentes voies d'internalisation cellulaire des nanoparticules.....	72
Figure 14 : Exemple illustrant l'influence de la taille, de la charge de surface, et de la morphologie de NPs sur leur biodistribution	75
Figure 15. Impact de la PEGylation de nanoparticules d'or sur leur internalisation par les macrophages murins J774A.1.	77
Figure 16. Influence de l'orientation des particules lors de leur contact avec des macrophages sur leur capacité à être phagocytées par ces derniers.....	79
Figure 17. Exemples d'interaction entre les TAMs et les cellules tumorales ainsi que les cellules du système immunitaire infiltrées dans les tumeurs	84
Figure 18. Fonctions pro-tumorales des TAMs et mécanismes associés	85
Figure 19. Stratégies thérapeutiques ciblant les TAMs et molécules associées.....	86
Figure 20. Intérêt des macrophages vis-à-vis de l'impact de la doxorubicine sur la croissance tumorale chez un modèle murin de xénotgreffe de carcinome pulmonaire.....	90
Figure 21. Illustration de l'effet EPR, permettant le ciblage tumoral passif par les nanoparticules PEGylées après administration IV	92
Figure 22. Activité et accumulation intra-tumorale des nanoparticules encapsulant un dérivé de platine	94
Figure 23. Structure des micelles polymères développées par Yu <i>et al.</i> (2013).	96
Figure 24. La théorie des 3 E.	109
Figure 25. Mécanisme d'échappement au système immunitaire des points de contrôle immunitaire PD-1/PD-L1 et inhibition de ces derniers.....	113
Figure 26. Représentation schématique de la méthode de préparation du vaccin Sipuleucel-T et des mécanismes mis en jeu après vaccination du patient	115

Figure 27. Structures chimiques de bisphosphonates de 1 ^{ère} , 2 ^{ème} et 3 ^{ème} génération	121
Figure 28. Action des bisphosphonates sur la voie mévalonate	122
Figure 29. Inhibition de la voie mévalonate par les bisphosphonates de 2 ^{ème} et 3 ^{ème} génération et mécanismes biologique et immunitaires associés	123
Figure 30. Activité anti-tumorale de l'acide zolédronique sur un modèle murin de xéno greffe de cancer de la prostate (PC3).....	127
Figure 31. Analyse immunohistochimique de la déplétion des TAMs chez un modèle murin de rhabdomyosarcome.....	130
Figure 32. Représentation schématique des différents conjugués de CpG-ODN à des nanoparticules d'or.....	137
Figure 33. Method for the evaluation of calcitriol antiproliferative activity <i>in vitro</i>	163
Figure 34. Influence of the polymer:oil ratio on calcitriol release profile from NPs.....	165
Figure 35. Influence of the oil content of PLA-based NCs on calcitriol encapsulation and release.....	167
Figure 36. Antiproliferative activity of free (red) and encapsulated (black) calcitriol..	171
Figure 37. Cytotoxic activity of calcitriol. At Day 0, MCF-7 cells were exposed for 24 h to 1000 nM of free or encapsulated (NC-LM, polymer oil:ratio of 1:2) calcitriol.....	172
Figure 38. Influence of the NP polymer:oil ratio on calcitriol antiproliferative activity.....	173
Figure 39. Activité cytotoxique du calcitriol.....	180
Figure 40. Schéma du protocole permettant l'obtention de sérum	181
Figure 41. Evaluation de l'impact de l'injection de calcitriol (0,5 µg/souris) sur la calcémie d'un modèle murin de lymphome de Burkitt (Raji).	182
Figure 42. Evaluation de l'impact de l'injection de calcitriol (0,125 µg/souris) sur la calcémie d'un modèle murin de carcinome mammaire humain (MDA-MB-231).....	183
Figure 43. Release profiles of calcitriol-NCs.....	200
Figure 44. Influence of the incubation period of MCF-7 cells with calcitriol on its cytotoxic activity. MCF-7 cells were incubated 3, 24, or 96 h with (a) free or (b) encapsulated calcitriol (1 µM).....	201
Figure 45. Cellular uptake of NCs. Based on the fluorescence of Nile red-NCs, the cellular uptake of NCs by (a) MCF-7 or (b) THP-1 macrophages in mono-cultures and (c) co-cultures was evaluated.....	202
Figure 46. Influence of calcitriol on MCF-7 cell viability.	204
Figure 47. Cytotoxic activity of calcitriol on MCF-7 cells co-cultured with THP-1 macrophages.....	205
Figure 48. Activité antiproliférative du calcitriol libre (rouge) ou encapsulé (noir).....	220
Figure 49. Activité cytotoxique du calcitriol sur les cellules MV4-11.	223
Figure 50. Activité cytotoxique du calcitriol sur les cellules MV4-11.....	224
Figure 51. Activité antiproliférative du calcitriol et de la cytarabine sur les cellules MV4-11	225

Liste des tableaux

Tableau 1: Propriétés physico-chimiques générales des métabolites de la vitamine D.	24
Tableau 2. Exemples d'anticorps monoclonaux approuvés pour une immunothérapie anti-cancéreuse.....	111
Tableau 3 : Exemples d'immunomodulateurs, de leurs mécanismes d'action ainsi que des cancers pour lesquels une telle action est décrite.....	117
Table 4. Physicochemical properties and encapsulation efficiency of calcitriol-loaded NPs with various polymer:oil ratios.	164
Table 5. Physicochemical properties of NCs with various oil contents.	166
Table 6. Solubility parameters δ (MPa ^{1/2}) of PLA, Miglyol® 829, Labrafac lipophile® WL1349 and calcitriol and their contributions δ_d , δ_p , δ_b . The distance between two compounds was calculated according to Hansen (2007). .	168
Table 7. Partition of calcitriol between PLA and Miglyol® 829	Erreur ! Signet non défini.
Tableau 8. Propriétés des nanocapsules encapsulant le calcitriol formulées avec différentes concentrations en actif.....	178
Table 9. Physicochemical properties of NCs. Data are represented as means of 3 independent experiments \pm SEM.	199
Tableau 10. Estimation des IC ₅₀ et calcul de l'indice de combinaison (IC) du calcitriol et de la cytarabine après 3 ou 10 jours d'exposition des cellules MV4-11 par le logiciel Compusyn (moyenne \pm SEM, n=3)	226

Liste des abréviations

AC : Anticorps

CDK : Kinases cycline-dépendantes

DMEM : Dulbecco's modified eagle medium

EE : Efficacité d'encapsulation

FACS : Fluorescence-activated cell sorting, cytométrie en flux

FDA : Food and drug administration

FGF : Fibroblast Growth Factor

HPLC : Chromatographie liquide haute performance

IL : Interleukine

IFN : Interféron

iNOS : Oxyde nitrique synthase inductible

IV : Intraveineuse

LAMs : Macrophages associés à la leucémie

MAP : Mitogen-activated protein

MMP : Métalloprotéinases matricielles

NCs : Nanocapsules

NEs : Nanoémulsions

NK : Natural Killer

NPs : Nanoparticules

NR : rouge nile

OHase : hydroxylase

PEG : Polyéthylène glycol

PLA : acide poly(D,L)lactique

PLGA : Acide poly(lactique-co-glycolique)

PMA : Phorbol myristate acetate

PSA : Antigène prostatique spécifique

PTH : Hormone parathyroïde

ROS : Dérivés réactifs de l'oxygène

RPM : Rotations par minute

RPMI : Roswell park memorial Institute

RXR : Récepteur alpha du rétinol X

STAT : Signal transducers and activators of transcription

TAMs : Macrophages associés aux tumeurs

TGF : Facteur de croissance transformant

TLR : Récepteur de type Toll

TNF : Facteur de nécrose tumorale

VDR : Récepteur à la vitamine D

VDRE : Eléments de réponse à la vitamine

VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

Introduction générale

Les macrophages sont des cellules immunitaires impliquées dans diverses pathologies incluant les maladies infectieuses, les maladies auto-immunes et le cancer. L'infiltration des tumeurs par les macrophages, alors appelés « macrophages associés aux tumeurs » (TAMs) est généralement associée à un mauvais pronostic vital, notamment dans le cas des cancers du sein, gastrique, digestif, ovarien, ou les leucémies (Lewis et Pollard, 2006). L'activité des TAMs, majoritairement délétère vis-à-vis de l'organisme puisqu'ils présentent un rôle central de l'initiation tumorale à la formation de métastases, est renforcée par le microenvironnement pro-tumoral et une suppression de la réponse immunitaire. De plus, ils participent à la résistance à la chimiothérapie (Ruffell et Coussens, 2015). Ils représentent donc une population cible dans le cas du traitement du cancer.

Plusieurs stratégies thérapeutiques exploitant les propriétés des macrophages reposant sur les nanomédecines sont ainsi envisageables (Binnemars-Postma *et al.*, 2017). Les TAMs sont capables de rapidement internaliser les nanoparticules de 1^{ère} génération après administration intra-tumorale, ou après administration intraveineuse dans le cas des cancers et métastases hépatiques. Les nanoparticules PEGylées, dites de 2^{ème} génération, peuvent quant à elles être recrutées au niveau tumoral après administration intraveineuse où elles sont internalisées aussi bien par les TAMs que par les cellules cancéreuses. De nouvelles stratégies de ciblage de TAMs ont été développées dans le but d'améliorer le ciblage tumoral. Elles reposent sur la fonctionnalisation de la surface de nanoparticules avec des ligands se liant spécifiquement à des récepteurs présents uniquement ou surexprimés au niveau tumoral (nanoparticules de 3^{ème} génération). La capacité de phagocytose des macrophages leur permet d'internaliser efficacement et de stocker des nanovecteurs chargés en actifs, comme cela a notamment été démontré avec des nanoparticules polymères (Gustafson *et al.*, 2015). Leur mobilité au sein de la tumeur leur permet de distribuer les actifs encapsulés aux cellules néoplasiques environnantes. Par ailleurs, leur plasticité phénotypique est particulièrement intéressante puisqu'ils peuvent, sous l'action d'immunomodulateurs notamment, être reprogrammés vers un phénotype anti-tumoral, permettant une action anti-cancéreuse sur du long terme (Mantovani et Locati, 2013). Cependant, très peu d'études décrivent l'implication des macrophages dans l'activité des actifs encapsulés (Miller *et al.*, 2015; Soma *et al.*, 2000; Zanganeh *et al.*, 2016) et aucune n'a évalué l'intérêt de combiner ces deux approches.

Le calcitriol, métabolite actif de la vitamine D, est une molécule de choix pour cette étude puisqu'il possède à la fois des actions dirigées contre les cellules cancéreuses, à savoir des activités antiproliférative, cytotoxique, et pro-différenciative, et un rôle immunomodulateur envers les macrophages (Deeb *et al.*, 2007). Une étude a par ailleurs démontré que le calcitriol était capable

d'induire la production de cathélicidine par ces derniers, qui s'est avérée cytotoxique vis-à-vis d'un modèle de lymphome à larges cellules B *in vitro* (Bruns *et al.*, 2015). Par ailleurs, l'utilisation clinique du calcitriol est limitée par les doses requises pour son efficacité qui sont responsables d'effets secondaires hypercalcémiques ainsi que par sa mauvaise biodisponibilité (Woloszynska-Read *et al.*, 2011). L'encapsulation du calcitriol dans des nanoparticules est une approche thérapeutique intéressante pour pallier ces limitations tout en prolongeant l'activité du calcitriol, permettant ainsi une réduction de la dose en calcitriol administrée et/ou de sa fréquence d'administration. Les travaux de vectorisation du calcitriol sont peu nombreux et se limitent à la conservation de son activité anti-cancéreuse *in vitro* sans une amélioration ou une prolongation de cette dernière, essentielles à la réussite d'une telle stratégie.

Ce travail présente de multiples objectifs. Le premier objectif repose sur le développement de nanoparticules biodégradables de 1^{ère} génération encapsulant efficacement le calcitriol et présentant des profils de libération variés de ce dernier. En effet, bien que cette relation libération/activité ait été revendiquée dans les travaux d'encapsulation du calcitriol pour son application en chimiothérapie anti-tumorale, elle n'a à ce jour jamais été démontrée (Nguyen *et al.*, 2007; Almouazen *et al.*, 2013; Ramalho *et al.*, 2015). En tenant compte de ces pré-requis, nous avons réalisé une étude de formulation autour du développement de nanoparticules présentant des caractéristiques physicochimiques adaptées à leur internalisation rapide et leur rétention dans les macrophages associés aux tumeurs ainsi qu'à leur internalisation par les cellules cancéreuses. Le second objectif du travail vise à évaluer le potentiel thérapeutique des nanoparticules encapsulant le calcitriol et l'impact des paramètres de formulation vis-à-vis de son activité anti-cancéreuse. Pour ce faire, le protocole a été optimisé et l'activité antiproliférative des nanoparticules chargées en calcitriol a été évaluée. L'implication des macrophages vis-à-vis de l'activité du calcitriol encapsulé a également été étudiée au cours de ce projet. Afin d'évaluer la capacité des macrophages à agir en tant que réservoir de nanoparticules et à redistribuer le calcitriol encapsulé aux cellules cancéreuses environnantes, nous les avons pré-incubés puis co-cultivés avec les cellules cancéreuses. Des co-cultures permettant une exposition simultanée des deux types cellulaires au calcitriol ont également été établies. Enfin, l'extrapolation de ces résultats à d'autres types de cancer tant d'un point de vue galénique que biologique a été abordée.

Ce manuscrit de thèse est composé d'une partie bibliographique ayant pour but de situer le projet dans son contexte scientifique, et d'une partie décrivant les études menées au cours de ce travail. La partie bibliographique est divisée en 3 axes :

Dans le chapitre I, le métabolisme de la vitamine D et ses activités biologiques seront abordés. Une partie sera ensuite consacrée au calcitriol, métabolite actif de la vitamine D, à ses activités anti-

cancéreuses ainsi qu'aux essais cliniques conduits. Les travaux d'encapsulation du calcitriol dans des nanoparticules seront également décrits.

Dans le chapitre II, les fonctions biologiques des macrophages, leur diversité phénotypique et leur rôle dans le cancer seront décrites. Seront aussi détaillés les mécanismes impliqués dans les interactions macrophages-nanoparticules ainsi que les propriétés des nanovecteurs entrant en jeu dans ces interactions. Une partie du chapitre sera consacrée aux approches thérapeutiques ciblant les macrophages dans diverses pathologies, incluant le cancer, par l'utilisation des nanomédecines.

Le chapitre III sera consacré à la description de l'implication du système immunitaire dans le développement de diverses pathologies avec un focus sur le cancer. Les différentes stratégies envisageables en immunothérapie anti-cancéreuse et les avancées majeures connues dans ce domaine ces dernières années seront inévitablement abordées avant de présenter les actifs immunomodulateurs d'intérêt pour le traitement du cancer, en particulier par le biais d'un ciblage des macrophages associés aux tumeurs. Les travaux d'encapsulation de ces actifs et l'apport de la vectorisation seront aussi détaillés.

La partie expérimentale du manuscrit est également constituée de 3 parties, correspondant chacune à une problématique spécifique.

Dans le chapitre IV, l'étude de formulation ayant abouti au développement de différents nanovecteurs encapsulant le calcitriol ainsi que l'évaluation de leur efficacité *in vitro* sur une lignée d'adénocarcinome mammaire humain seront présentés. Ces travaux ayant donné lieu à un article scientifique intitulé « Polymeric nanocapsules as drug carriers for sustained anticancer activity of calcitriol in breast cancer cells » (International Journal of Pharmaceutics), c'est sous cette forme qu'ils seront présentés. Quelques résultats complémentaires à la publication seront également détaillés, en particulier une étude *in vivo* du suivi de la calcémie menée chez des souris.

Dans le chapitre V, les résultats issus de l'étude *in vitro* de l'implication des macrophages dans l'activité cytotoxique du calcitriol sur une lignée d'adénocarcinome mammaire humain seront exposés. Ils seront aussi présentés sous la forme d'un article intitulé « Macrophages enhance the *in vitro* cytotoxic activity of calcitriol-loaded nanocapsules on breast cancer cells ».

Dans le chapitre VI, les activités anti-cancéreuses du calcitriol encapsulé vis-à-vis d'une lignée cellulaire de leucémie myéloïde aigüe en mono- et co-cultures de ces cellules avec des macrophages seront abordées.

Finalement, une discussion générale des choix stratégiques et des résultats obtenus au cours de cette thèse ainsi que les perspectives envisagées pour la poursuite du projet clôtureront ce manuscrit.

Références

- Almouazen, E., Bourgeois, S., Jordheim, L.P., Fessi, H., Briançon, S., 2013. Nano-encapsulation of Vitamin D3 Active Metabolites for Application in Chemotherapy: Formulation Study and *in vitro* Evaluation. *Pharm. Res.* 30, 1137–1146.
- Binnemars-Postma, K., Storm, G., Prakash, J., 2017. Nanomedicine Strategies to Target Tumor-Associated Macrophages. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 979-1006.
- Bruns, H., Buttner, M., Fabri, M., Mougiakakos, D., Bittenbring, J.T., Hoffmann, M.H., Beier, F., Pasemann, S., Jitschin, R., Hofmann, A.D., Neumann, F., Daniel, C., Maurberger, A., Kempkes, B., Amann, K., Mackensen, A., Gerbitz, A., 2015. Vitamin D-dependent induction of cathelicidin in human macrophages results in cytotoxicity against high-grade B cell lymphoma. *Sci. Transl. Med.* 7, 282ra47-282ra47.
- Deeb, K.K., Trump, D.L., Johnson, C.S., 2007. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat. Rev. Cancer* 7, 684–700.
- Gustafson, H.H., Holt-Casper, D., Grainger, D.W., Ghandehari, H., 2015. Nanoparticle uptake: The phagocyte problem. *Nano Today* 10, 487–510.
- Lewis, C.E., Pollard, J.W., 2006. Distinct Role of Macrophages in Different Tumor Microenvironments. *Cancer Res.* 66, 605–612.
- Mantovani, A., Locati, M., 2013. Tumor-Associated Macrophages as a Paradigm of Macrophage Plasticity, Diversity, and Polarization: Lessons and Open Questions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33, 1478–1483.
- Miller, M.A., Zheng, Y.-R., Gadde, S., Pfirschke, C., Zope, H., Engblom, C., Kohler, R.H., Iwamoto, Y., Yang, K.S., Askevold, B., Kolishetti, N., Pittet, M., Lippard, S.J., Farokhzad, O.C., Weissleder, R., 2015. Tumour-associated macrophages act as a slow-release reservoir of nano-therapeutic Pt(IV) pro-drug. *Nat. Commun.* 6, 1-13.
- Nguyen, T.L.U., Tey, S.Y., Pourgholami, M.H., Morris, D.L., Davis, T.P., Barner-Kowollik, C., Stenzel, M.H., 2007. Synthesis of semi-biodegradable crosslinked microspheres for the delivery of 1,25 dihydroxyvitamin D3 for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Eur. Polym. J.* 43, 1754–1767.
- Ramalho, M.J., Loureiro, J.A., Gomes, B., Frasco, M.F., Coelho, M.A.N., Pereira, M.C., 2015. PLGA nanoparticles as a platform for vitamin D-based cancer therapy. *Beilstein J. Nanotechnol.* 6, 1306–1318.
- Ruffell, B., Coussens, L.M., 2015. Macrophages and Therapeutic Resistance in Cancer. *Cancer Cell* 27, 462–472.
- Soma, C.E., Dubernet, C., Barratt, G., Benita, S., Couvreur, P., 2000. Investigation of the role of macrophages on the cytotoxicity of doxorubicin and doxorubicin-loaded nanoparticles on M5076 cells *in vitro*. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 68, 283–289.
- Woloszynska-Read, A., Johnson, C.S., Trump, D.L., 2011. Vitamin D and cancer: Clinical aspects. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 25, 605–615
- Zanganeh, S., Hutter, G., Spitler, R., Lenkov, O., Mahmoudi, M., Shaw, A., Pajarinen, J.S., Nejadnik, H., Goodman, S., Moseley, M., Coussens, L.M., Daldrup-Link, H.E., 2016. Iron oxide nanoparticles inhibit tumour growth by inducing pro-inflammatory macrophage polarization in tumour tissues. *Nat. Nanotechnol.* 11, 986–994.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : La vitamine D, intérêt thérapeutique & application en chimiothérapie anti-tumorale

La vitamine D est une molécule liposoluble qui, après assimilation dans le corps humain, subit des hydroxylations successives aboutissant à la formation de divers métabolites. Finalement, le métabolite actif de la vitamine D est obtenu : le calcitriol. Ce dernier n'est non plus une vitamine à proprement parler, mais une hormone stéroïde du fait de son mode d'action. La vitamine D a un rôle central dans l'homéostasie phospho-calcique, favorisant notamment l'absorption du calcium, et est de ce fait employée pour le traitement de diverses maladies osseuses. Au-delà de cette activité, la vitamine D possède un large spectre d'actions puisqu'elle intervient aussi notamment dans la réponse immunitaire, ainsi que dans la prolifération et la différenciation cellulaire. Dans ce chapitre, les activités biologiques de la vitamine D ainsi que son intérêt dans le cadre du traitement contre le cancer seront décrits. Finalement, l'encapsulation de la vitamine D sera abordée par le biais d'un état de l'art des principaux vecteurs développés à ce jour pour son utilisation dans divers domaines d'application.

I.1. Généralités

C'est en 1922 que McCollum *et al.* mirent pour la première fois en évidence l'intérêt thérapeutique de la vitamine D dans le cadre de la prévention et du traitement du rachitisme, faisant d'elle la 4^{ème} vitamine découverte après les vitamines A, B, et C (McCollum *et al.*, 1922). Ce n'est que quelques années plus tard que ses différents métabolites, leurs structures chimiques et leurs propriétés furent définis (DeLuca, 2014). La vitamine D est majoritairement synthétisée dans l'organisme après exposition au soleil, mais elle peut aussi être directement assimilée après ingestion de certaines ressources nutritives. Ainsi, d'après le rapport de l'Académie nationale de médecine des États-Unis sur l'examen des apports nutritionnels de référence pour la vitamine D et le calcium datant du 30 novembre 2010, l'apport nutritionnel journalier recommandé dans le cas d'une exposition minimale au soleil est de 400 UI (10 µg) pour les enfants de moins d'1 an, de 600 UI, soit 15 µg pour les individus de 1 à 70 ans, et de 800 UI (20 µg) au-delà de 70 ans.

I.1.1. Synthèse et métabolisme de la vitamine D

La vitamine D peut être issue de deux ressources distinctes : l'alimentation et la synthèse dans la peau après exposition au soleil (Figure 1). Deux formes inactives de la vitamine D peuvent ainsi être apportées à l'organisme par l'alimentation : la vitamine D₂, aussi appelée ergocalciférol, issue de

sources végétales (champignons, levures, ...) et le cholécalciférol, issu de sources d'origine animale (poissons, œufs,...). Ces deux molécules sont des 9,10-sécostéroïdes.

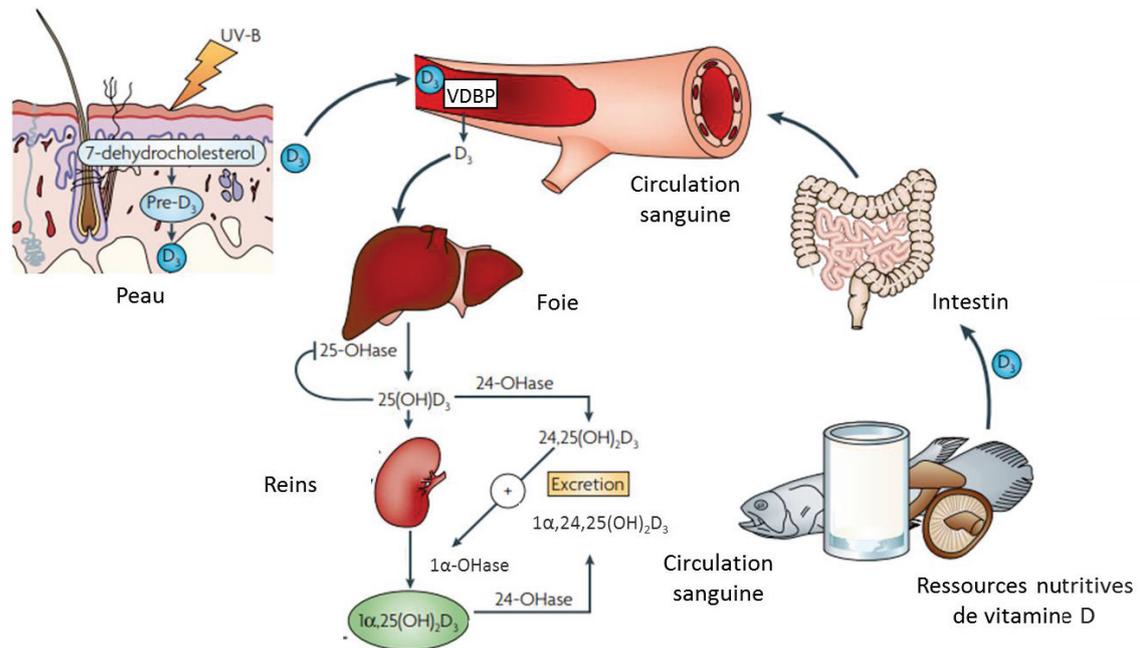


Figure 1. Métabolisme de la vitamine D (adapté de Deeb *et al.*, 2007)

Par ailleurs, l'exposition aux rayons ultraviolets B (longueur d'onde comprise entre 290 et 315 nm) permet le clivage du cycle B d'une molécule abondamment présente dans la peau, le 7-déhydrocholestérol, et ainsi sa conversion en pré-vitamine D₃, aussi appelée tacalcinol (Figure 2) (Bikle, 2012). Le tacalcinol subit ensuite une isomérisation thermique à 37 °C pour former le cholécalciférol.

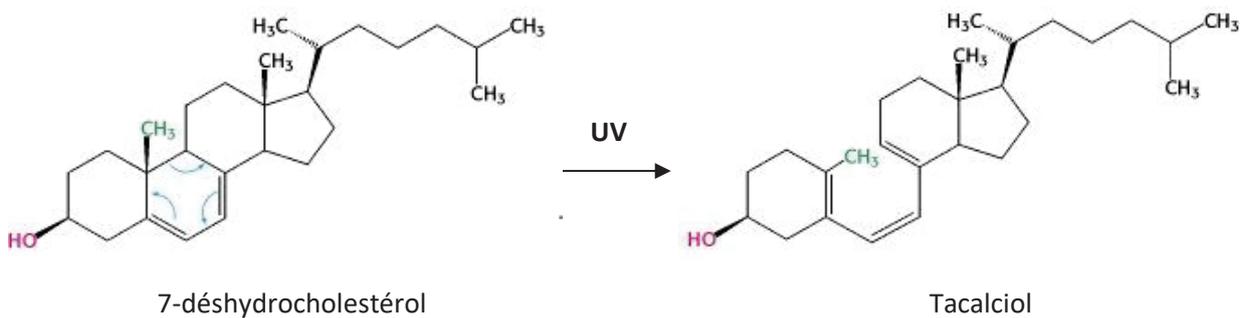


Figure 2. Conversion du 7-déhydrocholestérol en tacalcinol

Une fois synthétisé dans la peau ou assimilé après ingestion de certaines ressources nutritives, le cholécalciférol peut prétendre à deux devenir, l'un étant son stockage dans les graisses, et l'autre sa métabolisation pour former du calcidiol (25(OH)D₃), puis le calcitriol (1α,25(OH)₂D₃). La formation

du calcidiol ayant lieu dans le foie, le cholécalférol est transporté dans la circulation sanguine jusque dans cet organe après liaison à la « Vitamin D Binding Protein », ou VDBP (Heaney *et al.*, 2008). C'est dans cet organe que l'hydroxylation du cholécalférol par la 25-hydroxylase (25-OHase, codée par CYP2R1 ou CYP27A1) a lieu, formant ainsi le calcidiol. Il se caractérise par un groupe hydroxyle supplémentaire en position 25 (Figure 3). Ce dernier, forme circulante majoritaire de la vitamine D, est transporté à son tour par complexation avec la VDBP, avec une demi-vie dans la circulation sanguine d'environ deux semaines (Jones *et al.*, 2014), jusque dans les reins. Il est alors internalisé par les cellules rénales et hydroxylé par la 25-hydroxyvitamine D₃ 1 α -hydroxylase (1 α -OHase; codée par CYP27B1) pour former le métabolite actif de la vitamine D : le calcitriol (1 α ,25-dihydroxyvitamine D₃). Le calcitriol possède quant à lui deux groupes hydroxyle : l'un en C1 α et l'autre en C25 (Figure 3).

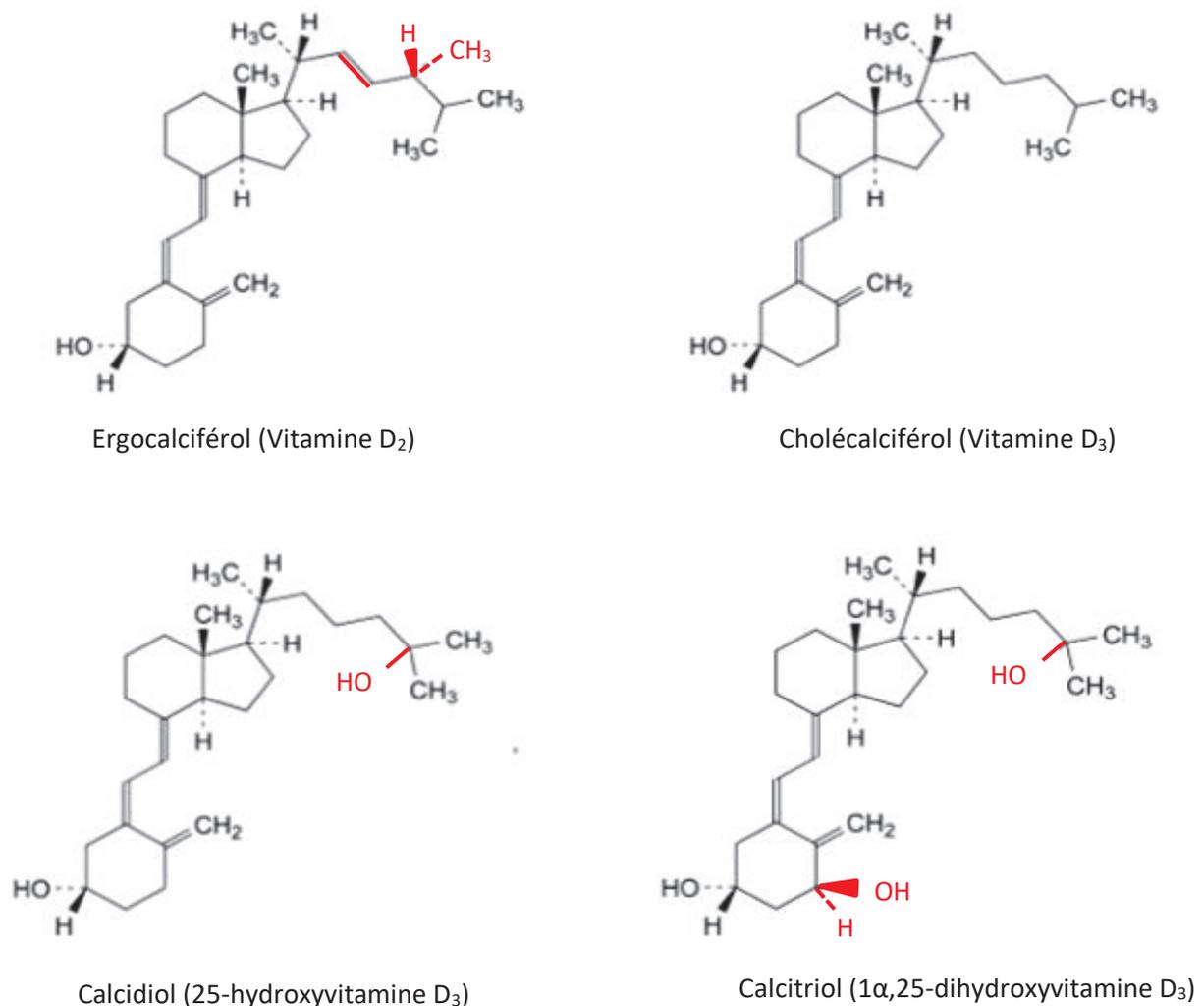


Figure 3. Structures chimiques des métabolites de la vitamine D, d'après la Pharmacopée Européenne 9.0

Outre sa production rénale, le calcitriol peut être, dans une moindre mesure, produit localement à partir de son précurseur, dépendamment de la présence de la 1 α -OHase. L'expression de cet enzyme a ainsi été mise en évidence *in vitro* chez des cellules non rénales, en particulier les cellules de la prostate, les cellules placentaires, les kératinocytes, les ostéoblastes, ou encore les macrophages (Dusso *et al.*, 1994; Lehmann et Meurer, 2003). Plusieurs études ont suggéré une implication de cette production extra-rénale de calcitriol dans la régulation de processus physiologiques, mais également dans le développement de diverses pathologies (Hewison *et al.*, 2004; Bikle *et al.*, 2018).

Les propriétés physico-chimiques des métabolites de la vitamine D sont présentées dans le Tableau 1. Ils sont tous liposolubles, comme l'indiquent leurs coefficients de partage octanol/eau (LogP) dont la valeur est de 5,5 pour le moins lipophile (calcitriol).

Tableau 1. Propriétés physico-chimiques générales des métabolites de la vitamine D. La solubilité et le LogP théorique sont issus de la source ALOGPS (d'après www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)

	Ergocalciférol	Cholécalférol	Calcidiol	Calcitriol
Nom IUPAC	(3 β ,5Z,7E,22E)-9,10-Sécoergosta-5,7,10(19),22-tétraène-3 β -ol	(3 β ,5Z,7E)-9,10-Sécocholesta-5,7,10(19)-triène-3 β -ol	(3 β ,5Z,7E)-9,10-Sécocholesta-5,7,10(19)-triène-3 β ,25-diol	(3 β ,5Z,7E)-9,10-Sécocholesta-5,7,10(19)-triène-1 α ,3 β ,25-triol
Numéro CAS	50-14-6	67-97-0	19356-17-3	32222-06-3
Formule brute	C ₂₈ H ₄₄ O	C ₂₇ H ₄₄ O	C ₂₇ H ₄₄ O ₂	C ₂₇ H ₄₄ O ₃
Masse molaire (g/mol)	396,6	384,6	400,6	416,6
Solubilité théorique dans l'eau (μ g/mL)	0,4	0,3	2,2	6,7
LogP théorique	7,6	7,9	6,7	5,5

Le calcitriol présente une demi-vie plasmatique plus courte que celle de son précurseur puisqu'elle est de seulement 5 à 8 heures pour ses formes commercialisées. Le calcidiol et le calcitriol sont en effet inactivés par le biais d'une oxydation sur leur carbone C24. Cette réaction est déclenchée

par la 24-OHase (codée par CYP24A1), formant respectivement du 24,25-(OH)₂D₃ et du 1α,24,25-(OH)₂D₃. Ces deux molécules forment ensuite le produit de dégradation du calcitriol, l'acide calcitroïque, qui est excrété dans les urines (Reddy and Tserng, 1989; Deeb *et al.*, 2007). La 24-OHase est aussi capable de dégrader le calcitriol par le biais d'une oxydation sur son carbone C23, à l'origine d'une cascade de réactions aboutissant à la formation d'un produit final de dégradation, le 1α,25-(OH)₂D₃-26,23-latone (Ohnuma et Norman, 1982).

I.1.2. Régulation du métabolisme de la vitamine D

Compte tenu des activités biologiques du calcitriol et notamment de son rôle dans l'homéostasie phospho-calcique, qui feront l'objet de la 2^{ème} partie de ce chapitre, la carence en vitamine D est problématique. En pratique, le dosage de la concentration sérique en calcidiol, forme circulante majeure de la vitamine D, permet d'évaluer la nécessité ou non d'une supplémentation en vitamine D. La concentration physiologique en 25(OH)D est comprise entre 75 et 125 nmol/L ; l'état de carence est donc avéré lorsque celle-ci est inférieure à 75 nmol/L et nécessite dans ce cas une supplémentation alimentaire ou médicamenteuse en vitamine D (Holick, 2004). Ainsi, le maintien de concentrations sériques physiologiques en calcitriol (pmol/L) et en son précurseur, le calcidiol, est essentiel (Welsh, 2011; Tuohimaa et Lou, 2012). Cette régulation se fait par la mise en place de rétro-contrôles agissant sur les enzymes cataboliques et anaboliques du calcitriol. La mise en place de ces rétro-contrôles dépend du calcitriol lui-même ainsi que de l'hormone parathyroïde (PTH), mais également du facteur de croissance fibroblastique 23, du facteur de croissance insulinique de type 1, et de la calcitonine (Olmos-Ortiz *et al.*, 2015). Par exemple, des concentrations sériques en calcium faibles sont responsables de la sécrétion de PTH par la glande parathyroïde, qui va quant à elle stimuler l'expression rénale de CYP27B1 aboutissant à la synthèse de la 1α-OHase et donc à la production de calcitriol (Olmos-Ortiz *et al.*, 2015). Des concentrations sériques supraphysiologiques en calcitriol ainsi qu'en phosphate sont quant à elles responsables d'une inhibition de l'expression rénale de CYP27B1 et une stimulation de l'expression rénale de CYP24A1, codant pour la 24-hydroxylase (24-OHase) qui est l'enzyme responsable de la dégradation du calcitriol (Welsh, 2011). De la même manière, la production locale de calcitriol est modulée en fonction de différents stimulus, par exemples immunitaires dans le cas de sa production par les macrophages (Baeke *et al.*, 2010).

I.1.3. Mécanismes d'internalisation cellulaire du calcidiol et du calcitriol

Les mécanismes d'internalisation cellulaire des métabolites de la vitamine D ont fait l'objet de nombreux travaux. Ainsi, l'internalisation cellulaire du complexe calcidiol-VDBP se fait par le biais d'une endocytose contrôlée par 2 protéines membranaires : la mégaline et la cubiline (van Driel *et al.*,

2006) et est extrêmement rapide (30 minutes *in vitro*, (van Driel *et al.*, 2006)). Ces deux protéines ont également été identifiées, de la même manière que la 1 α -OHase, dans des tissus extra-rénaux incluant les tissus mammaires murins sains, les lignées cellulaires d'épithélium mammaire humain et dans quelques lignées cellulaires de cancer du sein humain (Rowling *et al.*, 2006). Leur importance pour l'internalisation cellulaire du calcidiol, et donc pour la production de calcitriol, a été démontrée *in vivo* chez des souris dépourvues de mégaline, ainsi que chez les espèces canine et humaine dans le cas de mutations de la cubiline la rendant inactive. Dans ces cas, il a été observé que le complexe calcidiol–VDBP n'était pas internalisé par les cellules rénales, aboutissant à une inaptitude à convertir le calcidiol en calcitriol, ainsi qu'à son excrétion urinaire (Nykjaer *et al.*, 2001). Par ailleurs, Rowling *et al.* ont démontré *in vitro* sur une lignée tumorale mammaire humaine (T-47D) qu'une inhibition de la mégaline était responsable du blocage de l'endocytose du complexe calcidiol–VDBP. La même équipe a également démontré qu'en inhibant les microtubules, éléments clés de l'endocytose, par le biais d'une faible température (4°C), l'internalisation cellulaire du complexe n'avait pas lieu. Cependant, cette endocytose dépendante de la mégaline et la cubiline n'est peut-être pas l'unique moyen pour les cellules d'internaliser le calcidiol (Rowling *et al.*, 2006). En effet, des chercheurs ont démontré que le calcitriol pouvait être produit à partir de son précurseur dans des cellules mammaires non tumorales même en l'absence de VDBP sur 24h, laissant à penser que l'internalisation du calcidiol non complexé à sa protéine de liaison (libre) est également possible, par le biais d'une simple diffusion membranaire (Welsh, 2011).

De la même manière, les mécanismes d'internalisation cellulaire du calcitriol restent le sujet de nombreux travaux. En effet, le calcitriol est à ce jour difficilement traçable car il n'existe pas de fluorophores qui lui sont spécifiques, d'où le manque de connaissances concernant les mécanismes impliqués dans son internalisation cellulaire. L'hypothèse de « l'hormone libre » était jusqu'il y a quelques années l'unique mécanisme d'internalisation du calcitriol proposé. En effet, ce dernier étant hydrophobe, certains chercheurs avançaient qu'une fois le calcitriol libre dans la circulation sanguine, il entrerait dans les cellules par diffusion membranaire (Selvaraj *et al.*, 2015). Cependant, cette hypothèse semble peu probable dans la mesure où le calcitriol se lie à la VDBP, hydrophile. Puis, il y a quelques années, Schaefer *et al.* ont conjugué le calcitriol à des quantum dots (15-20 nm) et ont proposé que l'internalisation du calcitriol pouvait se faire, au moins en partie, par une endocytose cavéoline-dépendante du complexe suite à une étude *in vitro* réalisée sur un modèle de cancer du sein inflammatoire (Schaefer *et al.*, 2013).

I.2. Activités biologiques de la vitamine D

Depuis le début du 20^{ème} siècle, la vitamine D est connue pour ses rôles classiques dans la régulation du transport et du métabolisme du calcium et du phosphate, et dans le développement du squelette (Deeb *et al.*, 2007; Takeda *et al.*, 1999). Plus récemment, les effets extra-osseux de la vitamine D ont été mis en évidence suite à la découverte de la production extra-rénale de calcitriol.

I.2.1. Production locale de calcitriol

Le calcitriol exerce son action endocrine phosphocalcique lorsqu'il est produit au niveau rénal puis transporté dans la circulation sanguine jusqu'à ses tissus cibles. Outre cette activité, le calcitriol est également capable d'exercer des effets autocrines, paracrines et intracrines (Figure 4). En effet, de nombreuses cellules expriment le VDR et la 1α -OHase, permettant une production locale de calcitriol à partir de son précurseur (Hewison *et al.*, 2007). Leur expression a notamment été mise en évidence au sein des cellules de la glande parathyroïde (Kawahara *et al.*, 2008), de la prostate (Flanagan *et al.*, 2006), du côlon (Dou *et al.*, 2016), du sein (McCarthy *et al.*, 2009), des kératinocytes (Pillai *et al.*, 1988; Huang *et al.*, 2002), des cellules déciduales du placenta (Evans *et al.*, 2006), du pancréas (Bland *et al.*, 2004), du cerveau (Neveu *et al.*, 1994; Eyles *et al.*, 2005), du tissu osseux (Nakamichi *et al.*, 2018), et des cellules immunitaires (cellules dendritiques, monocytes, macrophages et lymphocytes T) (Baeke *et al.*, 2010; Lagishetty *et al.*, 2010). Le calcitriol pourrait de ce fait être impliqué dans le développement d'infections (VIH,...) et de maladies auto-immunes, les maladies cardiovasculaires, diverses affections neurologiques ainsi que dans le cancer (Morris, 2014; Trochoutsou *et al.*, 2015).

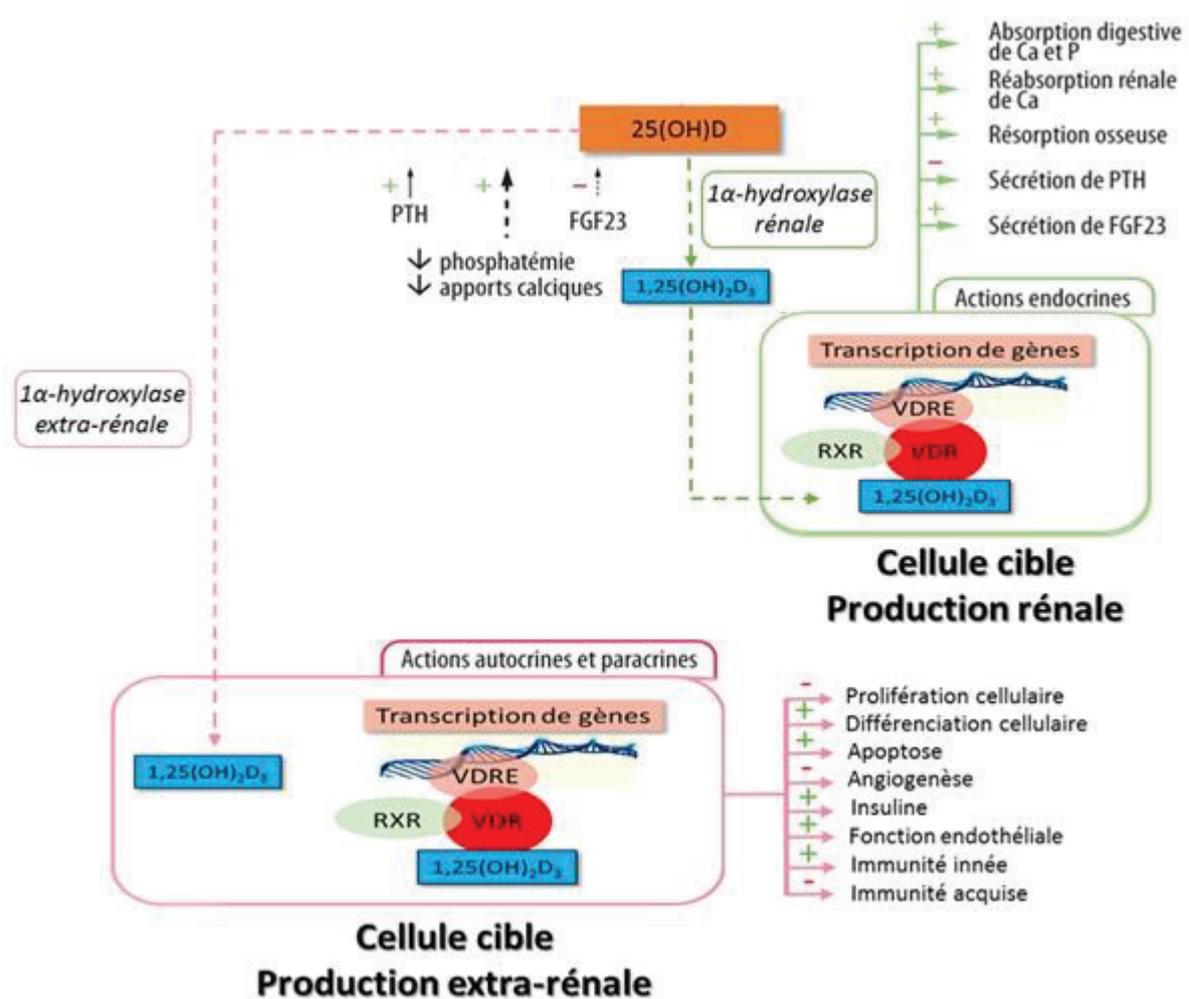


Figure 4. Synthèses rénale et extrarénale du calcitriol et actions associées

I.2.2. Actions génomiques et non génomiques

L'action de la vitamine D est contrôlée par deux mécanismes donnant lieu à des actions génomiques, et des actions non génomiques. Les actions génomiques de la vitamine D requièrent sa liaison à son récepteur nucléaire : le Vitamin D Receptor ou VDR, pour moduler la transcription de gènes et la traduction d'ARN. Le VDR, membre de la famille des récepteurs nucléaires aux hormones stéroïdes, est présent dans divers types cellulaires et tissulaires, suggérant un vaste spectre d'activités biologiques du calcitriol (Deeb *et al.*, 2007). La liaison de la vitamine D à son récepteur aboutit à la dimérisation du VDR avec le récepteur alpha du rétinolide X (RXR), et par conséquent à son activation. Ce complexe VDR/RXR se fixe spécifiquement aux séquences promotrices de certains gènes, aussi appelées « éléments de réponse à la vitamine D » (VDRE) (Figure 5). Cette liaison aboutit ainsi à la stimulation ou la répression de leur transcription (Bikle, 2014).

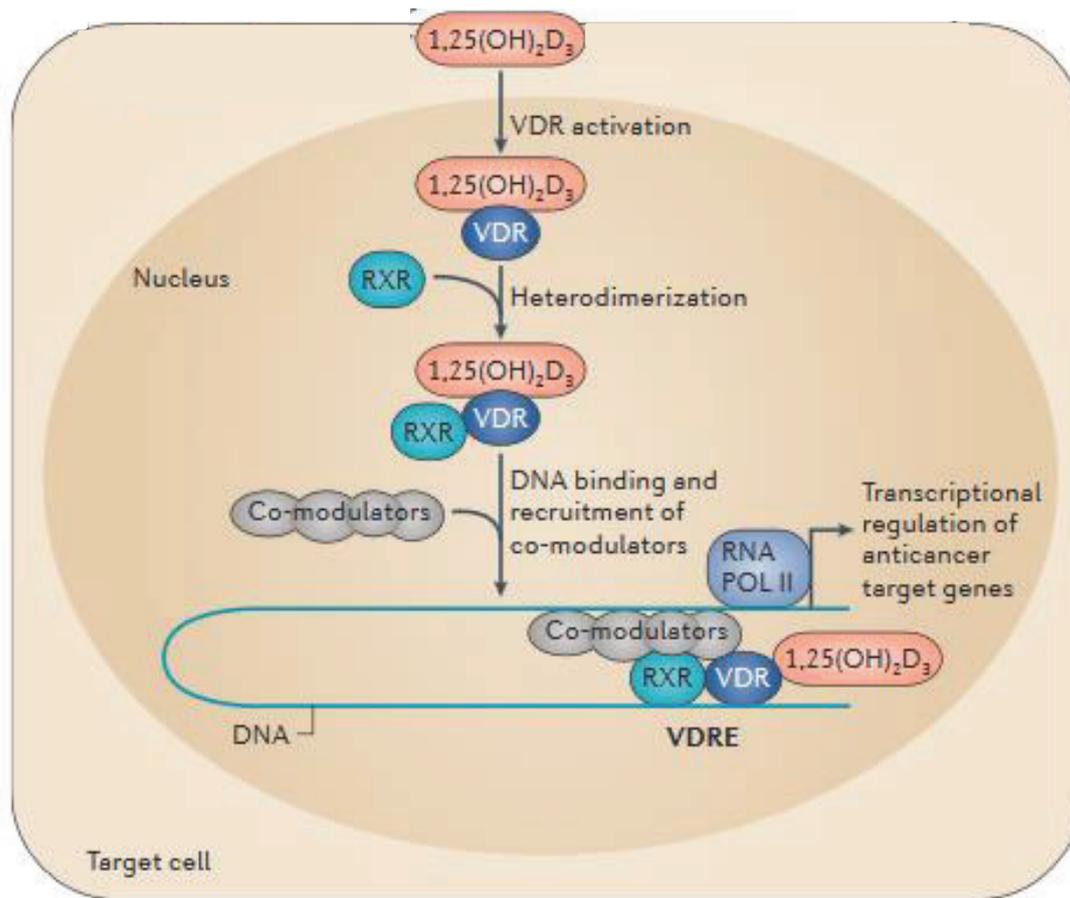


Figure 5. Mécanisme à l'origine des actions génomiques du calcitriol. Une fois transporté ou synthétisé dans la cellule cible à partir du calcidiol, le calcitriol se lie au VDR. Le complexe calcitriol/VDR est ensuite dimérisé avec le récepteur RXR, suivi d'une translocation jusque dans le noyau cellulaire. Le domaine de liaison de l'ADN du VDR interagit avec les séquences spécifiques de l'ADN dans la région promotrice des gènes cibles du calcitriol : les gènes VDRE (vitamin D response elements). Cette étape est à l'origine du recrutement de co-modulateurs, soit co-activateurs, soit co-répresseurs afin de moduler positivement ou négativement la transcription des ARN et donc l'expression des gènes cibles (Feldman *et al.*, 2014)

Outre cette voie génomique, l'existence d'une voie d'action non génomique donnant lieu à des actions plus rapides et ne mettant pas directement en jeu la transcription de gènes a plus récemment été mise en évidence, comme rapporté par Hii et Ferrante (Hii et Ferrante, 2016). Cette dernière requiert la liaison du calcitriol à son récepteur membranaire : le « membrane-associated Vitamin D receptor » ou ERp60, activant par la suite de nombreuses voies de signalisation intracellulaires (Selvaraj *et al.*, 2015). L'action non génomique du calcitriol la plus décrite est l'absorption du calcium, décrite dans le paragraphe suivant.

I.2.3. Homéostasie phospho-calcique

Le calcitriol, métabolite actif de la vitamine D, joue un rôle central dans l'homéostasie du calcium et du phosphate en agissant à la fois sur leur absorption, leur excrétion et sur le stockage du calcium dans les os (Figure 6) (Khammissa *et al.*, 2018). Le lien entre la carence en vitamine D et les pathologies osseuses (rachitisme, ostéoporose, polyarthrite rhumatoïde) est en effet reconnu depuis de nombreuses années, résultant directement de son activité sur l'homéostasie phospho-calcique, aussi bien de manière directe qu'indirecte *via* une cascade de réactions (Anderson, 2017; Holick, 2004).

Pour commencer, le calcitriol est hypercalcémiant. En effet, la diminution de la concentration sérique en calcium engendre la sécrétion de l'hormone parathyroïde (PTH), activant la synthèse du calcitriol au niveau rénal via l'enzyme 1α -OHase. Ce dernier, associé à l'hormone thyroïde, stimule la réabsorption rénale du calcium, et son stockage dans le tissu osseux. Le calcitriol favorise également l'absorption intestinale du calcium après son apport nutritionnel, passant de 10-15% d'absorption dans le cas d'une carence en vitamine D, à 30% pour un individu ne présentant pas de carence (Holick, 2004). Ainsi, Nakamichi *et al.* ont démontré *in vivo* que le traitement de souris sur une longue période avec des doses physiologiques en vitamine D permettait d'augmenter la minéralisation osseuse, le volume trabéculaire osseux, et diminuait la résorption osseuse (Nakamichi *et al.*, 2018). En revanche, lorsque les concentrations sériques en calcium sont insuffisantes, le calcitriol interagit avec son récepteur dans les ostéoblastes, favorisant leur maturation en ostéoclastes et la résorption osseuse, permettant à terme la mobilisation du calcium (Nakamichi *et al.*, 2018). Ainsi, la carence en vitamine D est responsable de matrices squelettiques pauvrement minéralisées aboutissant à des maladies telles que le rachitisme, touchant principalement les enfants, et l'ostéomalacie chez les adultes (Baeke *et al.*, 2010; Lin, 2016). Ces maladies entraînent un risque accru de fractures.

Par ailleurs, le calcitriol est hyperphosphatémiant de par la stimulation de la production de l'hormone peptidique appelée « Fibroblast Growth Factor 23 » ou FGF 23 par les ostéoblastes et ostéocytes (Prié, 2015). La FGF 23 s'opposant à la réabsorption rénale du phosphate, son taux sérique est maintenu.

L'homéostasie phosphocalcique est maintenue par des feedbacks négatifs des différentes étapes de cette cascade, aboutissant notamment à une stimulation du catabolisme du calcitriol par le biais de la 24 -OHase ainsi qu'à l'inhibition de la 1α -OHase responsable de sa production.

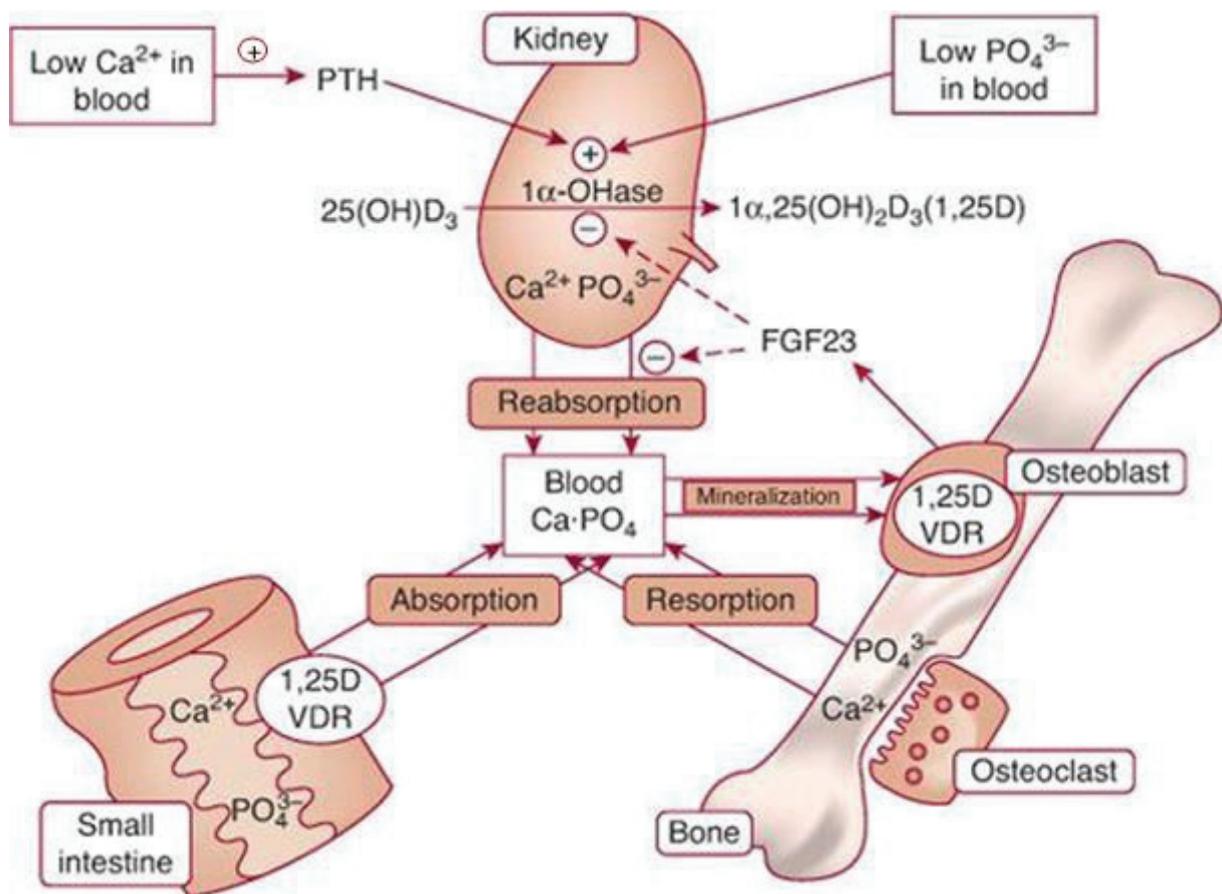


Figure 6. Représentation schématique des étapes de la régulation du métabolisme phosphocalcique (Rudolph *et al.*, 2011)

I.2.4. Rôle du calcitriol dans la prévention et le traitement du cancer

I.2.4.1. Généralités

Le rôle du calcitriol dans le cancer a pour la première fois été suggéré suite à des études épidémiologiques menées dans les années 40. Garland et Garland ont alors mis en évidence le rôle de l'exposition au soleil dans le cancer en démontrant une plus forte mortalité associée au cancer du côlon dans le Nord des Etats-Unis, que sur le reste du pays sans identifier le lien direct avec la vitamine D dont la synthèse est favorisée par l'exposition aux UV B, comme décrit dans le paragraphe I.1.1. (L. Apperly, 1940). Ce n'est que par la suite, dans les années 90, que l'hypothèse qu'un déficit en vitamine D pouvait être un facteur favorisant le cancer du côlon et de la prostate a été émise (Garland et Garland, 1980; Schwartz et Hulka, 1990). Depuis, son rôle dans bien d'autres cancers a été démontré (sein, pancréas, ovaires, leucémie, glioblastome, peau,...) aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* lors d'études

pré-cliniques et cliniques, avec des voies d'administration tout aussi variées (Ben-Eltriki *et al.*, 2016; Maj *et al.*, 2015; Swami *et al.*, 2012; Woloszynska-Read *et al.*, 2011).

I.2.4.2. Métabolisme du calcitriol dans le cancer

Chez tous les individus, l'enzyme 1α -OHase est exprimé au niveau rénal pour permettre la production de calcitriol. Le VDR et la 24-OHase, permettant respectivement l'action et la dégradation de ce dernier, sont également présents dans cet organe. Dans les conditions physiologiques, les concentrations en 1α -OHase sont régulées par le calcitriol et le VDR *via* un feedback négatif, permettant un équilibre entre synthèse et dégradation du calcitriol. Dans le cadre du cancer, des modifications de l'expression des deux enzymes 1α -OHase et 24-OHase perturbant l'équilibre entre synthèse et dégradation du calcitriol, ainsi que du VDR peuvent être rencontrées, aboutissant à un risque accru de cancers ainsi qu'à une résistance tumorale au calcitriol (Bikle, 2014).

Dans les cancers du sein non-hormono-dépendants, c'est-à-dire ne présentant pas de récepteurs aux œstrogènes, il est bien connu que le VDR est sous-exprimé par rapport aux cancers du sein hormono-dépendants résultant en des caractéristiques plus agressives et une progression plus rapide du cancer (Al-Azhri *et al.*, 2017). Au-delà de la sous-expression du VDR, voire de son absence, celui-ci peut subir diverses mutations génétiques, rendant le récepteur silencieux (Dai *et al.*, 2015; Welsh, 2017). La mutation génétique Cdx-2 est ainsi associée à un risque accru de cancers colorectal et ovarien. La mutation FokI est une autre mutation fréquente du VDR et est responsable d'une augmentation de 20% du risque de cancer ovarien et de 8% de divers autres cancers incluant les cancers colorectal, de la prostate, et de la peau (Dai *et al.*, 2015). Il est à noter que certaines lignées cellulaires (sein, prostate, côlon) sont résistantes au calcitriol du fait non pas de la modification directe du VDR, mais de mécanismes épigénétiques impactant sa fonction, notamment *via* la suppression de la transcription des gènes antiprolifératifs (Abedin *et al.*, 2006). Cependant, une étude récente a montré que dans de tels cas, la combinaison du calcitriol et d'inhibiteurs des histones déacétylases (HDACi) pouvait contrecarrer ces mécanismes épigénétiques et restaurer l'expression de ces gènes, donc l'activité du calcitriol (Abedin *et al.*, 2006).

Par ailleurs, la 24-OHase, enzyme majoritairement responsable de l'inactivation du calcitriol, est présente de manière excessive dans de nombreux types de cancers. Dans le cas du cancer de la prostate par exemple, il a été observé *in vitro* que la lignée cellulaire DU 145 était résistante au calcitriol du fait de la surexpression de CYP24A1 (codant pour la 24-OHase) par cette lignée (Ly *et al.*, 1999). Dans cette étude, l'inhibition de ce gène avec du liarozole fumarate a considérablement augmenté la demi-vie ainsi que l'activité antiproliférative du calcitriol puisqu'ils ont triplé (Ly *et al.*, 1999).

La diminution de la production de 1α -OHase et/ou de son activité a notamment été démontrée dans les cancers ovariens, dans certains cancers du sein et de la prostate et elle est associée à une progression tumorale plus importante (Brożyna *et al.*, 2015; Hsu *et al.*, 2001; Lopes *et al.*, 2010). De la même manière que pour le VDR, les gènes codant pour les enzymes 24-OHase et 1α -OHase présentent de nombreux polymorphismes impactant pour certains leur activité et donc le métabolisme du calcitriol, notamment dans le cas du cancer du côlon (Jacobs *et al.*, 2013).

I.2.4.3. Mécanismes d'action

L'activité anti-cancéreuse du calcitriol ayant été démontrée dans de nombreuses études pré-cliniques et cliniques, divers mécanismes d'action ont été à ce jour identifiés (Figure 7), dépendamment du type tumoral (Feldman *et al.*, 2014; Flanagan *et al.*, 2003; Krishnan *et al.*, 2012).

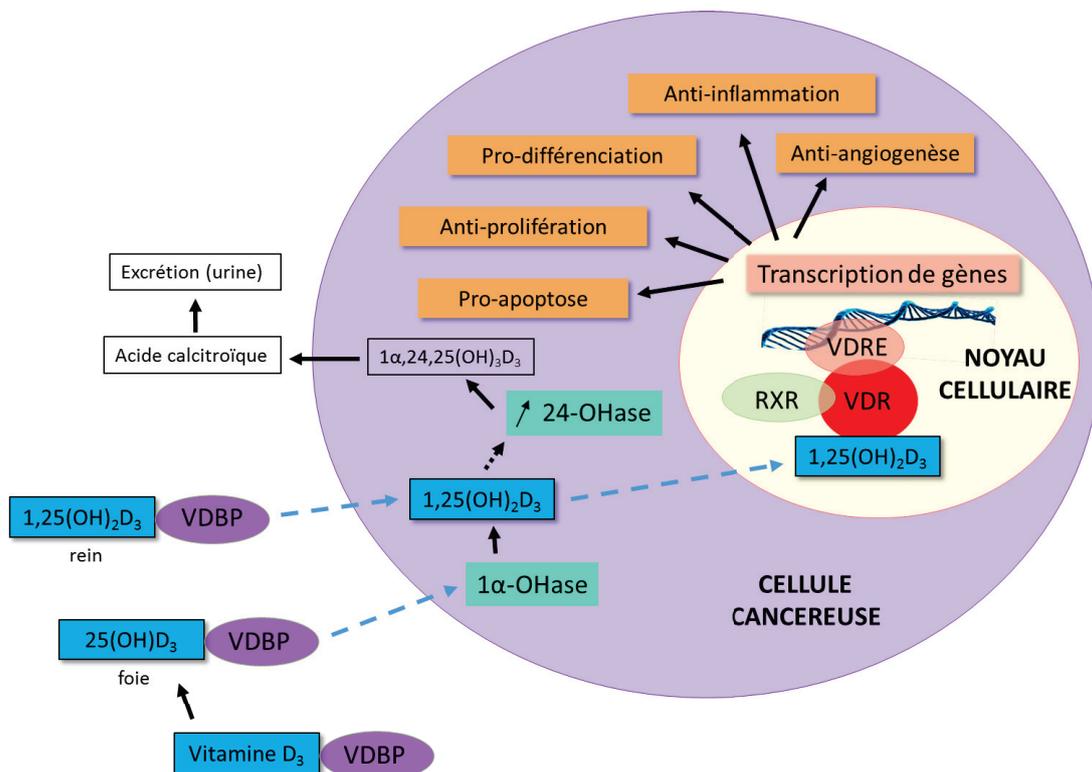


Figure 7 : Activités anti-cancéreuses du calcitriol (inspiré de Chiang *et al.*, 2011)

Ces études ont démontré que le calcitriol était impliqué tout au long du développement tumoral, de la tumorigenèse jusqu'à la formation de métastases, faisant de lui une molécule intéressante aussi bien dans la prévention que dans le traitement du cancer (Feldman *et al.*, 2014). Son rôle dans l'inflammation fera l'objet du paragraphe I.2.5.

1.2.4.3.1. Activité antiproliférative

Le calcitriol est au cœur d'une multitude de mécanismes aboutissant à l'accumulation des cellules en phase G0/G1 (Simboli-Campbell *et al.*, 1997). Il a ainsi été démontré *in vitro* dans le cancer du sein que le calcitriol augmentait l'expression de la protéine de liaison du facteur de croissance IGF (insulin-like growth factor-1), inhibant ainsi ses effets mitogènes (Xie *et al.*, 1997). Le calcitriol et ses analogues augmentent également l'expression d'inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines (p21 et p27), entraînant un arrêt du cycle cellulaire comme démontré *in vitro* sur des cellules de cancer du pancréas (Kawa *et al.*, 1997). L'induction de l'expression du facteur de croissance tumorale TGF- β 1 et l'activation de divers facteurs de transcription de gènes participant à l'arrêt du cycle cellulaire par le calcitriol participent aussi à son activité antiproliférative (Koli et Keski-Oja, 1995; Heberden *et al.*, 1998; An *et al.*, 2010). Enfin, chez les femmes post ménopausées atteintes de cancer du sein de type hormono-dépendant, les œstrogènes jouent un rôle majeur dans la progression tumorale puisqu'ils stimulent la prolifération cellulaire (Doisneau-Sixou *et al.*, 2003). Le calcitriol s'oppose à la production d'œstrogènes en inhibant l'expression de l'aromatase, enzyme responsable de leur production, ainsi que l'expression des récepteurs aux œstrogènes (Krishnan et Feldman, 2011). De ce fait, le calcitriol limite le stimulus mitogène des œstrogènes, inhibant ainsi la prolifération des cellules malignes de cancer du sein (Simboli-Campbell *et al.*, 1997).

1.2.4.3.2. Activité pro-différenciative

Le calcitriol possède un rôle pro-différenciatif vis-à-vis des cellules cancéreuses de par la régulation de l'activité de plusieurs dizaines de gènes impliqués dans la différenciation cellulaire, leur permettant d'acquérir un phénotype similaire à celui des cellules saines. Ainsi, dans le cas du carcinome du côlon, le calcitriol et ses analogues inhibent la voie de signalisation Wnt/ β -caténine et induisent l'expression de protéines d'adhésion (cadhérine E, occludine, vinculine), stimulant ainsi la différenciation cellulaire (Pálmer *et al.*, 2001; Pendás-Franco *et al.*, 2008). Il a également été démontré dans des modèles de leucémie que le calcitriol induisait l'activation de kinases cycline-dépendantes (Cdk), notamment la Cdk5 (Godyn *et al.*, 1994), résultant en une différenciation des cellules myéloïdes leucémiques en monocytes puis macrophages. Cette dernière pourrait aussi s'expliquer par l'inhibition de l'expression du proto-oncogène « myc » comme démontré dans le cas de leucémies et du cancer de la prostate (Reitsma *et al.*, 1983; Rohan et Weigel, 2009). La stimulation de l'expression de la protéine du rétinoblastome (Ji *et al.*, 2002) ainsi que l'inhibition de l'activité des MAP kinases p38 (Wang *et al.*, 2000) participeraient aussi à l'activité pro-différenciative du calcitriol et de ses analogues.

1.2.4.3.3. *Activité pro-apoptotique*

Les actions pro-apoptotiques du calcitriol résultent d'une modulation des gènes impliqués dans ce phénomène, en particulier l'inhibition de la transcription de gènes anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-XL), renforcée par l'activation de la transcription de gènes pro-apoptotiques (Bax) (Sarah E. Blutt *et al.*, 2000; Kizildag *et al.*, 2010). Un autre mécanisme à l'origine de cette action repose sur l'induction du relargage de calcium par le réticulum endoplasmique, aboutissant au recrutement et à l'activation de calpaïnes qui sont des enzymes à l'origine du déclenchement de l'apoptose, comme notamment démontré *in vitro* sur le modèle de cancer du sein MCF-7 (Mathiasen *et al.*, 2002). Enfin, l'activité pro-apoptotique du calcitriol est contrôlée par l'activation de la voie de signalisation des caspases (McGuire *et al.*, 2001).

1.2.4.4. **Efficacité du calcitriol sur différents types de cancer**

C'est en 1981 que fut pour la première fois mise en évidence l'activité antiproliférative du calcitriol sur des cellules malignes de mélanome *in vitro* (Colston *et al.*, 1982). Il a alors été observé que cette activité nécessitait des concentrations en calcitriol de l'ordre de la nanomole (Colston *et al.*, 1982). Par la suite, la nécessité de concentrations sériques supraphysiologiques en calcitriol (>1 nM) vis-à-vis de son activité en tant qu'anti-cancéreux a été confirmée *in vivo*. Cependant, l'exposition chronique à de telles concentrations en calcitriol est associée à des hypercalcémies responsables de diverses toxicités, notamment rénales (Brawer, 2007). De nombreuses études sur l'efficacité anti-cancéreuse du calcitriol seul ou en combinaison avec des actifs utilisés en chimiothérapie ont ainsi été menées. L'efficacité du calcitriol a été mise en évidence sur de nombreux cancers mais nous nous focaliserons dans cette partie sur les 3 cancers les plus étudiés : le cancer du sein, le cancer de la prostate, et la leucémie.

1.2.4.4.1. *Cancer du sein*

Dès lors que le potentiel anti-cancéreux du calcitriol a été mis en évidence, de nombreux travaux évaluant l'activité du calcitriol sur différentes lignées cellulaires de cancer du sein et les modèles tumoraux associés ont vu le jour. Il est vite apparu que l'activité du calcitriol sur de tels modèles était à la fois dépendante de la présence de récepteurs aux œstrogènes dans ces lignées et du VDR (Peng *et al.*, 2006).

Murray *et al.* ont étudié la présence de VDR dans un panel de lignées cellulaires de cancer du sein ainsi que l'effet antiprolifératif du calcitriol sur ces dernières (Murray *et al.*, 2017). L'équipe a ainsi

confirmé le lien entre la présence de VDR dans des lignées cancéreuses et leur sensibilité au calcitriol. Aussi, les lignées cellulaires MCF-7, T47D et BT20 notamment se sont révélées porteuses du VDR et sensibles au calcitriol. En revanche, les lignées MDA-MB-231, HCC1937, Hs578t(i8) et HCC1143, dépourvues de VDR, se sont révélées résistantes à l'actif ($IC_{50} > 20 \mu M$) (Murray *et al.*, 2017).

Par ailleurs, plusieurs articles ont mis en évidence la sensibilité des lignées de cancer du sein possédant le récepteur aux œstrogènes (hormono-dépendantes) et la résistance de celles ne l'exprimant pas (non hormono-dépendantes) au calcitriol. Suite à cela, Peng *et al.* ont transfecté les lignées non hormono-dépendantes MDA-MB-231 et S30 avec le récepteur aux œstrogènes ainsi qu'avec le VDR, ces lignées le sous-exprimant. Ils ont alors démontré que cela ne suffisait pas à rendre les lignées cellulaires sensibles à l'analogue de la vitamine D testé, démontrant en plus l'importance des voies de signalisation de ces récepteurs (Peng *et al.*, 2006).

L'effet anti-cancéreux du calcitriol a été bien démontré sur la lignée d'adénocarcinome mammaire humain MCF-7, avec des activités à la fois antiprolifératives ($IC_{50} = 145 \text{ nM}$ après 24h d'exposition) et pro-apoptotiques (Chouvet *et al.*, 1986; Saracligil *et al.*, 2017; Simboli-Campbell *et al.*, 1997). Chouvet *et al.* ont ainsi démontré *in vitro* l'activité antiproliférative dose dépendante du calcitriol avec une concentration minimale efficace de 10^{-11} M après 7 jours d'exposition au calcitriol et un renouvellement de l'exposition tous les 2 jours (Chouvet *et al.*, 1986). L'intérêt thérapeutique du calcitriol a également été démontré *in vivo* sur un modèle murin immunodéprimé porteur de xénogreffe MCF-7, recevant des injections intrapéritonéales de calcitriol (0,025 à 0,1 $\mu\text{g/souris}$) 3 fois par semaine pendant 4 semaines (Swami *et al.*, 2011). Dans cette étude, le traitement a abouti à une diminution de respectivement 50 et 70% du volume tumoral par rapport aux souris non traitées pour les doses minimale (0,025 $\mu\text{g/souris}$ 3 fois/semaine) et maximale (0,1 $\mu\text{g/souris}$ 3 fois/semaine) testées. Cependant, malgré la sensibilité de la lignée à l'activité anti-cancéreuse du calcitriol, il a été observé que l'exposition chronique des cellules à ce dernier ou à ses analogues les rendait résistantes à son activité antiproliférative (Narvaez *et al.*, 1996). Cela peut s'expliquer par la surexpression de la 24-OHase à la suite du traitement comme suggéré par Thill *et al.* (Thill *et al.*, 2012). Les auteurs ont démontré *in vitro* que l'exposition de différentes lignées cellulaires de cancer du sein, y compris les cellules MCF-7, induisait une augmentation de l'expression de l'ARNm codant pour la 24-OHase (x 33), aboutissant à une augmentation de la quantité d'enzymes produits (Figure 8).

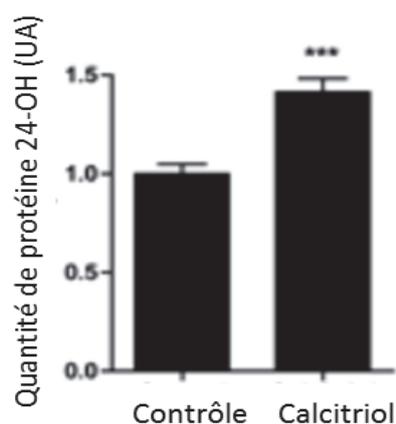


Figure 8. Influence du calcitriol sur le niveau d'expression de la 24-hydroxylase après 72 heures d'exposition, $p < 0,01$ (*) (Thill *et al.*, 2012).**

1.2.4.4.2. Cancer de la prostate

Les cellules de cancer de la prostate et les tissus tumoraux associés expriment l'enzyme 1α -OHase, responsable de la conversion de la forme circulante de la vitamine D en calcitriol, et sont donc capables de synthétiser localement le calcitriol. Par ailleurs, il est bien connu que les tumeurs prostatiques peuvent exprimer fortement le récepteur à la vitamine D (VDR). Aussi, les patients atteints d'un cancer de la prostate surexprimant le VDR auraient moins de risques de mourir de ce cancer (Hendrickson *et al.*, 2011). La sensibilité des lignées LNCaP et PC3 à l'activité antiproliférative du calcitriol (10 nM) durant 14 jours a été démontrée *in vitro* (de Vos *et al.*, 1997). La lignée cellulaire DU145 n'est quant à elle pas sensible à l'activité antiproliférative du calcitriol mais sensible à son effet anti-métastatique avec une invasion fortement inhibée (66%) après exposition à 100 nM de calcitriol pendant 72 heures (de Vos *et al.*, 1997; Schwartz *et al.*, 1997).

1.2.4.4.3. Leucémie

L'activité du calcitriol sur les cellules leucémiques myéloïdes est bien décrite, particulièrement pour la lignée humaine HL-60 *in vitro* (Abe *et al.*, 1981; Gocek *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 1987) et *in vivo* (Honma *et al.*, 1983). Ainsi, le calcitriol induit la différenciation des blastes leucémiques en macrophages à des concentrations supérieures à 0,12 nM (Gocek *et al.*, 2012).

Lasky *et al.* ont démontré l'activité antiproliférative du calcitriol sur la lignée cellulaire de leucémie myéloïde chronique RWLeu-4 à des concentrations supérieures à 1 nM (Lasky *et al.*, 1994). En revanche, même à 100 nM, le calcitriol ne présente pas d'activité antiproliférative sur la lignée résistante JMR. Dans ce cas, la résistance au calcitriol de cette lignée cellulaire peut notamment

s'expliquer par l'affinité entre le calcitriol et son récepteur et non pas par le nombre de récepteurs ni par l'activité des enzymes cataboliques et anaboliques du calcitriol (Lasky *et al.*, 1994).

L'association de la cytarabine et du calcitriol a fait l'objet de plusieurs études sur divers modèles de leucémie. Ainsi, Studzinski *et al.* ont exposé la lignée cellulaire humaine de leucémie promyélocytaire HL-60 au calcitriol pendant 4 heures ou à la cytarabine (1.10^{-6} M) et à l'hydroxyurée (5 mM) pendant 4 heures suivies d'une exposition au calcitriol (1.10^{-7} M) pendant la même durée (Studzinski *et al.*, 1986). Les auteurs ont observé un effet pro-différenciatif du calcitriol et une potentialisation de l'activité cytotoxique de la cytarabine et de l'hydroxyurée vis-à-vis des cellules HL-60 par ce dernier avec une viabilité cellulaire diminuée de plus du double par rapport à celle observée après exposition aux actifs seuls (Studzinski *et al.*, 1986). Par ailleurs, Makishima *et al.* ont évalué l'activité antiproliférative de la cytarabine seule ou en présence de calcitriol *in vitro* sur la lignée de cellules humaines de leucémie aigüe U937 (Makishima *et al.*, 1998). Les auteurs ont ainsi observé une réduction de l'IC₅₀ de la cytarabine en présence de calcitriol passant de 6,86 nM à 2,41 nM après 4 jours d'exposition (Makishima *et al.*, 1998). Des études cliniques ont également été menées dans le but d'identifier le potentiel thérapeutique d'une telle association. Ainsi, dans une étude menée par Slapak *et al.* chez 29 patients atteints de leucémie myéloïde aigüe, l'administration de cytarabine (perfusion, 20 mg/m²/jour), d'hydroxyurée (voie orale, 500 mg) pendant 21 jours et de calcitriol (voie orale, 0,25 µg) jusqu'à la fin de l'étude a permis d'observer des résultats prometteurs pouvant s'expliquer par une synergie entre les actifs (Slapak *et al.*, 1992). Dans cette étude, près de la moitié des patients traités (45%) ont fait preuve d'une rémission complète, et 34% des patients ont montré une réponse partielle au traitement, avec une rémission médiane de 9,8 mois (Slapak *et al.*, 1992). Dans une autre étude, deux patientes (48 et 60 ans) atteintes de leucémie myéloïde aigüe (rechute) ont reçu 0,6 mg/kg/j de cytarabine (perfusion) pendant 14 jours et 0,25 µg de calcitriol par voie orale 2 fois/j. Une rémission d'une durée de 6 mois a été observée chez les deux patientes traitées. Cependant, seules 2 patientes ont été intégrées dans cette étude, et la stratégie thérapeutique était basée sur une faible dose en actifs (Yamada *et al.*, 2006).

I.2.4.5. Efficacité du calcitriol en combinaison avec d'autres agents anti-cancéreux

Du fait de ses propriétés anti-cancéreuses remarquables, de nombreuses associations entre le calcitriol ou ses analogues et des agents utilisés en chimiothérapie ont été testées et ont mis en évidence des effets synergiques voire additifs entre les principes actifs. Cela peut s'expliquer par de nombreux phénomènes, incluant notamment une augmentation de l'activité du VDR et donc la potentialisation de l'activation des voies de signalisation associées, le ciblage simultané de différentes

molécules clés d'une même voie de signalisation, ou encore le ciblage simultané de différentes voies de signalisation (Beer et Myrthue, 2004).

1.2.4.5.1. Stéroïdes

Une potentialisation de l'activité anti-cancéreuse du calcitriol a été démontrée *in vitro* et *in vivo* dans le cas d'une association avec la dexaméthasone. Ainsi, la dexaméthasone permet une augmentation du nombre de VDR, comme démontré par des études *in vitro* dans le cas du carcinome à cellules squameuses. La dexaméthasone semblerait aussi augmenter l'affinité entre le calcitriol et son récepteur comme démontré *in vivo* chez des souris de ce même modèle tumoral (Yu *et al.*, 1998). Il a été proposé que l'augmentation du nombre de VDR était due à l'augmentation de sa transcription par le stéroïde (Hidalgo *et al.*, 2011).

1.2.4.5.2. Actifs cytotoxiques utilisés en chimiothérapie

Des études portant principalement sur le cancer de la prostate ont démontré la synergie entre le calcitriol et divers agents cytotoxiques tels que les taxanes : le docétaxel (Ting *et al.*, 2007) et le paclitaxel (Hershberger *et al.*, 2001), les composés dérivés de platine (Moffatt *et al.*, 1999), ainsi que la mitoxantrone (Ahmed *et al.*, 2002). Ces interactions ont également été observées dans le cancer du sein (Cho *et al.*, 1991), le rétinoblastome (Kulkarni *et al.*, 2009), la leucémie myéloïde (Torres *et al.*, 2000), et le carcinome à cellules squameuses (Light *et al.*, 1997). Le mécanisme aboutissant à cette synergie reste à ce jour inconnu et mérite des études supplémentaires.

1.2.4.5.3. Rétinoïdes

L'association du calcitriol ou de ses analogues avec l'acide rétinoïque favorise les activités antiproliférative (Segaert *et al.*, 1997), pro-apoptotique et pro-différenciative (Elstner *et al.*, 1997) des molécules ainsi que l'inhibition de l'angiogenèse (Majewski *et al.*, 1993). L'avantage d'une telle combinaison a été observé *in vivo* chez un modèle murin de xénogreffe de cancer de la prostate (Ikeda *et al.*, 2003). Cette synergie peut s'expliquer facilement puisque l'action génomique du calcitriol requiert au préalable la dimérisation du VDR avec le récepteur alpha du rétinoïde X (RXR), comme décrit dans le paragraphe 1.2.2. (Bikle, 2014). Westin *et al.* ont démontré que la complexation du RXR avec ses ligands modulait la structure de l'hétérodimère VDR/RXR et favorisait sa liaison aux co-activateurs de la transcription des gènes cibles du calcitriol (Westin *et al.*, 1998).

1.2.4.5.4. Anti-oestrogènes

Dans le cancer du sein, l'association du calcitriol ou de ses analogues avec le tamoxifène permet une augmentation de l'effet antiprolifératif du calcitriol ainsi que l'inhibition de la croissance tumorale *in vivo* comme observé chez un modèle murin de xéno greffe MCF-7 (Abe-Hashimoto *et al.*, 1993; Vink-van Wijngaarden *et al.*, 1994).

1.2.4.5.5. Kétoconazole

L'association du calcitriol et du kétoconazole permet une augmentation des effets antiprolifératif et pro-apoptotique du calcitriol (Muindi *et al.*, 2010). L'intérêt de cette combinaison thérapeutique a également été démontré *in vivo* sur un modèle murin de xéno greffe de cancer de la prostate avec une réduction significativement plus importante de la croissance tumorale par rapport au traitement à base de calcitriol uniquement (Muindi *et al.*, 2010). Ceci peut s'expliquer par le fait que le kétoconazole est un inhibiteur des enzymes du cytochrome P450 dont la 24-OHase, enzyme catabolique du calcitriol, fait partie. Il permet donc de limiter la dégradation de l'actif.

Outre l'intérêt thérapeutique d'une association entre le calcitriol et d'autres actifs anti-cancéreux, des études menées sur les lignées cellulaires du cancer du sein (MCF-7) (Polar *et al.*, 2003) et de la prostate (LNCaP), toutes deux hormono-dépendantes, ont suggéré que l'administration de calcitriol en parallèle d'une radiothérapie anti-cancéreuse pouvait potentialiser son efficacité (Dunlap *et al.*, 2003; Sundaram *et al.*, 2003).

1.2.4.6. Etudes pré-cliniques et cliniques utilisant le calcitriol pour le traitement du cancer

L'activité anti-cancéreuse du calcitriol a fait l'objet de nombreuses études pré-cliniques sur différents modèles tumoraux, et de plusieurs études cliniques chez des patients atteints de divers cancers. Les études cliniques utilisant le calcitriol seul ou en association avec des actifs utilisés en chimiothérapie ont été très évolutives, principalement en terme de fréquence d'administration du traitement.

1.2.4.6.1. Les formes pharmaceutiques de calcitriol commercialisées

Deux formes pharmaceutiques de calcitriol sont actuellement sur le marché :

- Rocaltrol® (Roche), forme pharmaceutique solide (capsules contenant 0,25 µg ou 0,50 µg de calcitriol), adaptée pour la voie orale et dont la posologie dépend de la concentration sérique en calcium du patient et de la maladie ciblée, variant ainsi de 0,25 à 1 µg par jour. Le Rocaltrol® est prescrit

dans le cas de rachitismes et d'ostéomalacies, d'anomalies osseuses (ostéodystrophies, ...) et de troubles de la calcification provoqués par un mauvais fonctionnement des glandes parathyroïdes.

- Calcijex® (Abbott), forme pharmaceutique liquide (ampoules contenant une solution à 1 µg de calcitriol), adaptée pour la voie injectable. Le Calcijex® est prescrit dans le cas d'hypocalcémies principalement, mais aussi dans le cas de taux élevés en hormone parathyroïde, via une injection 3 fois par semaine ou par dialyse.

Malgré le fait que ces formulations n'aient pas été développées pour le traitement contre le cancer, elles ont été employées dans les premières études cliniques visant à évaluer l'activité anti-cancéreuse du calcitriol (Osborn *et al.*, 1995; Gross *et al.*, 1998; Beer *et al.*, 2001; Fakih *et al.*, 2007; Muindi *et al.*, 2009; Chadha *et al.*, 2010; Ramnath *et al.*, 2013).

1.2.4.6.2. Traitement continu vs traitement intermittent

Dans une étude clinique de phase II menée par Osborn *et al.* sur des patients atteints de cancer de la prostate hormono-résistant, l'administration de 0,5 à 1,5 µg de calcitriol (Rocaltrol®) par jour de manière continue, soit de 3,5 à 10,5 µg/semaine, a permis de diminuer chez 2 patients sur 14 les concentrations en antigène prostatique spécifique (PSA) de respectivement 25 et 45%, suggérant une régression du cancer (Osborn *et al.*, 1995). Cependant, 11 des patients ont présenté des hypercalcémies liées au traitement. Plus tard, Gross *et al.* ont démontré que l'administration de Rocaltrol® à des patients atteints de cancer de la prostate à des doses en calcitriol allant jusqu'à 2,5 µg/jour, soit 17,5 µg/semaine, était non pas associée à des hypercalcémies mais à des hypercalciuries chez tous les patients (Gross *et al.*, 1998). Compte tenu de ces effets secondaires limitant la dose administrable de calcitriol, un régime intermittent a été proposé. Cependant, malgré le fait que ce mode d'administration permette d'échelonner les doses en calcitriol administrées aux patients, les formes commercialisées se sont rapidement montrées inadaptées pour assurer l'activité anti-cancéreuse du calcitriol. En effet, Muindi *et al.* ont démontré que même dans le cas d'une prise de 80 gélules *per os* de Rocaltrol® par jour 3 jours consécutifs par semaine, la fenêtre thérapeutique n'était pas atteinte (concentrations sériques en calcitriol > 1 nM) (Muindi *et al.*, 2005). La même équipe a observé une absence de relation directe entre les doses en calcitriol administrées aux patients, autrement dit entre l'exposition au calcitriol et les concentrations sériques atteintes. Ceci a été confirmé par l'équipe de Beer *et al.* dans une étude menée chez des patients ayant reçu le traitement 1 fois par semaine durant 4 semaines (Beer *et al.*, 2001). L'équipe de chercheurs a alors démontré l'existence d'une saturation de l'absorption du calcitriol pour des prises en calcitriol supérieures à 0,48 µg/kg (Beer *et al.*, 2001).

Sur la base de ces études, une nouvelle formule, toujours adaptée à la voie orale mais avec une pharmacocinétique améliorée a été développée : DN-101 (Novacea Pharmaceutical).

1.2.4.6.3. Développement d'une formulation à base de calcitriol adaptée au traitement contre le cancer : DN-101

La formulation DN-101, développée dans le but d'améliorer la pharmacocinétique du calcitriol après une administration par voie orale, se présente sous forme de capsules, chacune composée de 15 ou 45 µg de calcitriol, soit respectivement 30 et 90 fois plus de calcitriol que les capsules Rocaltrol® n'en contiennent (Beer *et al.*, 2007a). Pour des doses en calcitriol comprises entre 15 et 165 µg, la formulation DN-101 présente une pharmacocinétique linéaire, comme démontré par Beer *et al.*, avec pour la concentration maximale administrée une C_{max} de 6,21 ng/mL et une demi-vie de 16,2 heures (Beer, 2005). Sur la base du développement d'hypercalcémies de grade 2 (concentrations sériques en calcium de 11,6–12,5 mg/dL) chez deux patients sur six, bien que réversibles, cette même équipe a démontré que la dose maximum tolérable de calcitriol était de 60 µg par semaine (Beer, 2005). La dose retenue pour la suite des études a donc été celle de 45 µg par semaine, permettant d'atteindre la fenêtre thérapeutique du calcitriol sans être à l'origine d'hypercalcémies grâce à son administration intermittente (Figure 9).

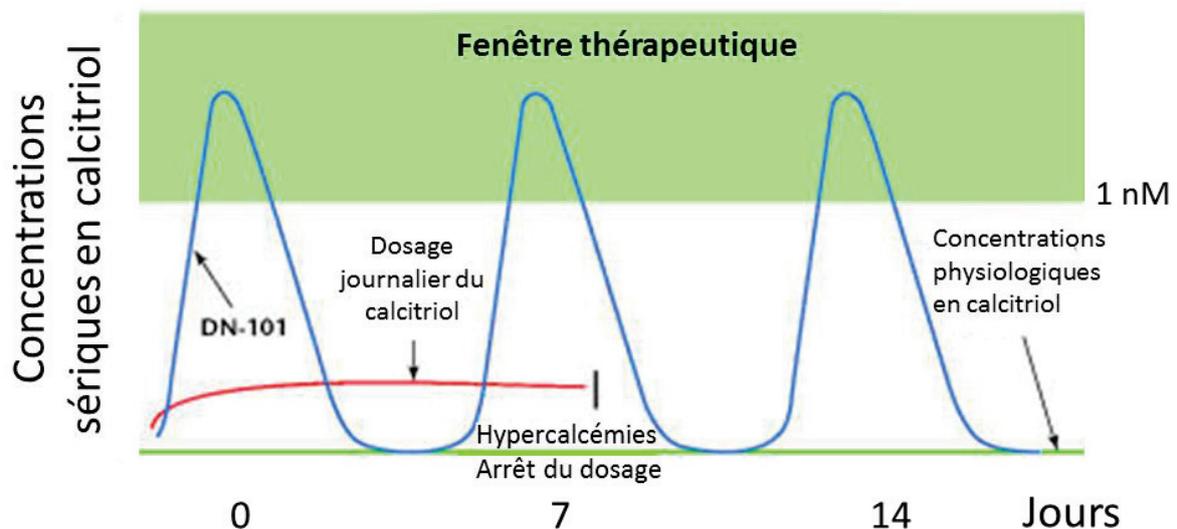


Figure 9 : Avantages du profil pharmacocinétique de la formule DN-101 (administration intermittente, en bleu) par rapport à une administration journalière (en rouge) de calcitriol (Brawer, 2007)

Par la suite, deux études cliniques randomisées marquantes utilisant la formulation DN-101, appelées « Androgen-Independent Prostate Cancer Study of Calcitriol Enhancing Taxotere » ou « ASCENT » 1 et 2 ont notamment été réalisées (Beer *et al.*, 2007b; Scher *et al.*, 2011).

I.2.4.6.3.1. ASCENT 1

L'étude clinique de phase II nommée ASCENT 1, a été réalisée chez 250 patients atteints d'un cancer de la prostate métastatique et progressif androgène-indépendant. Les patients ont été répartis en deux groupes recevant un traitement hebdomadaire 3 semaines sur 4 : le groupe recevant le calcitriol (45 µg/semaine) et le docétaxel (36 mg/m² par semaine), et le groupe recevant un placebo et le docétaxel (36 mg/m² par semaine) (Beer *et al.*, 2007b). Le critère d'évaluation principal de l'efficacité du traitement dans cette étude était la fréquence de survenue d'une réduction de 50% du taux de PSA dans les 6 mois suivant le traitement. La conjugaison du DN-101 avec le docétaxel n'a pas montré d'amélioration du traitement par rapport au docétaxel seul en considérant le critère principal établi, *i.e.* le taux de PSA. De plus, les patients ayant reçu le traitement associant DN-101 et la docétaxel se sont révélés plus sujets aux hypercalcémies (33%) par rapport au groupe placebo + docétaxel (8%) bien qu'elles aient été réversibles. Cependant, le calcitriol semble dans cette étude avoir un impact favorable sur la survie des patients puisque la survie médiane, estimée en utilisant le « hazard ratio » largement utilisé en clinique, était de 24,5 mois dans le groupe DN-101 contre 16,4 mois dans le groupe placebo. Le risque de décès a donc été réduit d'environ 1/3.

Ces résultats prometteurs ont donc fait l'objet de la poursuite de l'étude de l'intérêt du DN-101 en association avec le docétaxel avec l'initiation d'une étude clinique de phase III : ASCENT-2 (Scher *et al.*, 2011).

I.2.4.6.3.2. ASCENT 2

L'étude clinique de phase III ASCENT 2 a été réalisée chez 953 patients présentant un cancer de la prostate métastatique résistant à la castration (Scher *et al.*, 2011). Comme pour l'étude ASCENT 1, les patients ont été répartis en 2 groupes :

- Le groupe ASCENT, recevant de manière hebdomadaire 3 semaines sur quatre 45 µg de DN-101 + 36 mg/m² docétaxel + 24 mg dexaméthasone
- Le groupe contrôle, recevant de manière hebdomadaire 3 semaines sur quatre le traitement en vigueur du cancer de la prostate métastatique, à savoir 5 mg prednisone (2 fois par jour) + 75 mg/m² docétaxel + 24 mg dexaméthasone.

Sur la base de la première étude ayant démontré un impact positif de l'addition de DN-101 au traitement vis-à-vis de la survie des patients, c'est ce critère qui a été défini comme étant le principal indicateur de l'efficacité du traitement. Une analyse intermédiaire de l'état des patients a mis en évidence un nombre de décès plus important dans le groupe recevant en plus le DN-101, menant à l'interruption précoce de l'étude. Ainsi, la survie globale médiane dans le groupe ASCENT était de 17,8 mois contre 20,2 mois pour le groupe contrôle.

Même si ces résultats pourraient laisser à penser que le calcitriol ne potentialise pas l'effet du docétaxel, cette étude présente des limites, rendant les résultats discutables. En effet, le groupe contrôle a reçu plus de deux fois plus de docétaxel que le groupe ASCENT du fait de l'évolution du traitement entre cette étude et l'étude préalable ASCENT 1. De plus, la dexaméthasone et la prednisone ont été ajoutées au traitement dans cette étude par rapport à l'étude ASCENT 1. Or, il est bien connu que ces dernières limitent les effets hypercalcémiques du calcitriol, permettant ainsi une augmentation de sa dose maximale tolérable (Kennedy *et al.*, 2013). Aussi, après injection par voie IV du calcitriol, la dexaméthasone augmente la dose maximale tolérable de calcitriol de 74 à 125 µg de calcitriol par semaine (Muindi *et al.*, 2009).

Bien que cette étude reste à ce jour la dernière grande étude clinique utilisant le calcitriol, d'autres essais évaluant l'efficacité anti-tumorale du calcitriol ont été conduits.

I.2.4.6.3.3. Autres études

Une étude clinique de phase II a été conduite chez 21 patients atteints de cancer de la prostate (récidive) afin d'évaluer l'efficacité de l'association de calcitriol (DN-101, 45 µg/semaine) avec un anti-inflammatoire non stéroïdien : le naproxène (375 mg 2 fois/jour) (Srinivas et Feldman, 2009). Des réponses modestes au traitement ont été enregistrées puisque chez 75% des patients, le temps de doublement du taux de PSA a augmenté de plusieurs mois. De plus, aucun groupe témoin n'ayant été établi, il est difficile de définir clairement l'avantage d'une telle combinaison thérapeutique par rapport à un traitement contrôle (Srinivas et Feldman, 2009).

Shamseddine *et al.* ont mené une étude clinique de phase II sur 30 patients atteints de cancer de la prostate résistant à la castration (Shamseddine *et al.*, 2013). Les patients ont reçu durant 6 semaines consécutives et sur un cycle de 8 semaines :

- 0,5 µg/kg par semaine de calcitriol en 4 prises en 4h, soit une prise par heure (voie orale, jour 1)
- 36 mg/m² par semaine de docétaxel (voie intraveineuse, jour 2)
- 4 mg d'acide zoledronique (voie intraveineuse, jour 2 des semaines 1 et 5 de chaque cycle de traitement).

Des résultats encourageants ont été obtenus puisque pour près de la moitié des patients, le taux de PSA a diminué d'au moins 50% en un peu plus de 3 mois, et pour près de 30% d'entre eux s'est stabilisé. Cependant, les auteurs ont souligné une plus faible réponse au traitement testé par rapport à l'utilisation du docétaxel seul (Shamseddine *et al.*, 2013).

I.2.4.7. Analogues du calcitriol

Le calcitriol, quelle que soit sa fréquence d'administration, entraîne des hypercalcémies aux doses requises pour assurer une action anti-cancéreuse. Cela limite donc les doses administrables et en conséquence son efficacité. La synthèse d'analogues du calcitriol, tout aussi efficaces mais avec un effet hypercalcémique moindre a donc été entreprise. C'est ainsi que des milliers d'analogues du calcitriol ont été synthétisés, dont certains testés *in vitro* et *in vivo* aussi bien dans des études pré-cliniques que cliniques afin d'évaluer leur activité anti-cancéreuse (Trump, 2018). La Figure 10 regroupe les formules des analogues décrits dans ce paragraphe.

Le séocalcitol ou EB1089, est un des analogues prometteurs du calcitriol largement étudié. Des études *in vitro* ont démontré que le séocalcitol pouvait être jusqu'à 200 fois plus efficace que le calcitriol en terme d'activité antiproliférative et pro-différenciative (Hansen *et al.*, 2000). Outre son efficacité, des études *in vivo* chez des rats ont démontré que le séocalcitol permettait de réduire de moitié les hypercalcémies en comparaison au calcitriol (Hansen *et al.*, 2000). Une étude *in vivo* sur un modèle de tumeur mammaire chez le rat a d'ailleurs démontré qu'à des doses équivalentes (0,5 µg/Kg par jour *per os*), le séocalcitol était plus efficace en terme de réduction de la progression tumorale, et moins hypercalcémiant que le calcitriol (Colston *et al.*, 1992). Son intérêt thérapeutique a également été mis en évidence dans le cas du cancer de la prostate, avec une activité antiproliférative et cytotoxique *in vitro* sur la lignée cellulaire de cancer de la prostate hormono-dépendante LNCaP et une réduction de la croissance tumorale *in vivo* sur un modèle murin de xénogreffe LNCaP (S. E. Blatt *et al.*, 2000). Par ailleurs, l'avantage du EB1089 en combinaison avec la radiothérapie a été mis en évidence sur un modèle murin de cancer du sein (xénogreffe MCF-7) (Sundaram *et al.*, 2003). Sundaram *et al.* ont ainsi démontré que cette association permettait une réduction tumorale significativement plus importante que la radiothérapie seule, et que les volumes tumoraux étaient réduits de 50% avec cette combinaison thérapeutique (Sundaram *et al.*, 2003). Le séocalcitol a ainsi été testé dans le cadre d'études cliniques. Une étude clinique de phase II a été réalisée chez 56 patients atteints de carcinome hépatocellulaire non-opérable (Dalhoff *et al.*, 2003). Le séocalcitol a été administré de manière journalière avec une dose initiale de 10 µg/jour augmentée toutes les deux semaines. L'administration journalière *per os* de 10 µg de séocalcitol a été bien tolérée par les patients bien qu'au-delà les patients souffrent d'hypercalcémies notamment. De plus, une activité modérée du séocalcitol a été mise en évidence dans cette étude avec une stabilisation du carcinome hépatocellulaire en terme de taille et de nombre de lésions (Dalhoff *et al.*, 2003). Dans une autre étude clinique de phase II, menée sur des patients atteints de cancer pancréatique inopérable, le séocalcitol n'a démontré aucune activité anti-tumorale (Evans *et al.*, 2002).

Un autre analogue du calcitriol, l'inécalcitol a démontré des effets antiprolifératif et pro-apoptotique plus importants que le calcitriol aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* sur différents types de cancers incluant les cancers du sein et de la prostate. Pour cette raison, il a été testé en combinaison avec des agents utilisés en chimiothérapie dans des études cliniques de phase I et II. Ainsi, au cours d'une étude clinique de phase I, l'inécalcitol (*per os*) a été administré en combinaison avec le docétaxel (75 mg/m² toutes les trois semaines, par voie intraveineuse) et la prednisone (5 mg 2 fois par jour *per os*) à 54 patients atteints de cancer de la prostate résistant à la castration (Medioni *et al.*, 2014). Bien qu'une hypercalcémie réversible ait été notée suite à l'administration de la dose maximale d'inécalcitol (8 mg par jour, 2 fois supérieure à la dose maximum tolérable), cette étude s'est révélée prometteuse puisqu'une diminution de la concentration en PSA, suggérant une régression du cancer, a été notée dans les 3 mois suivant le traitement. Cependant, ces résultats restent modestes et nécessiteraient de clarifier le rôle propre à l'inécalcitol dans ces résultats ainsi que des paramètres plus généraux tels que la survie des patients après traitement. Une étude clinique de phase II est actuellement en cours (Medioni *et al.*, 2014). Deux études cliniques de phase II utilisant l'inécalcitol en combinaison avec l'imatinib (étude NCT02949570) ou avec la décitabine (étude NCT02802267) pour le traitement de leucémie myéloïde chronique sont actuellement en cours.

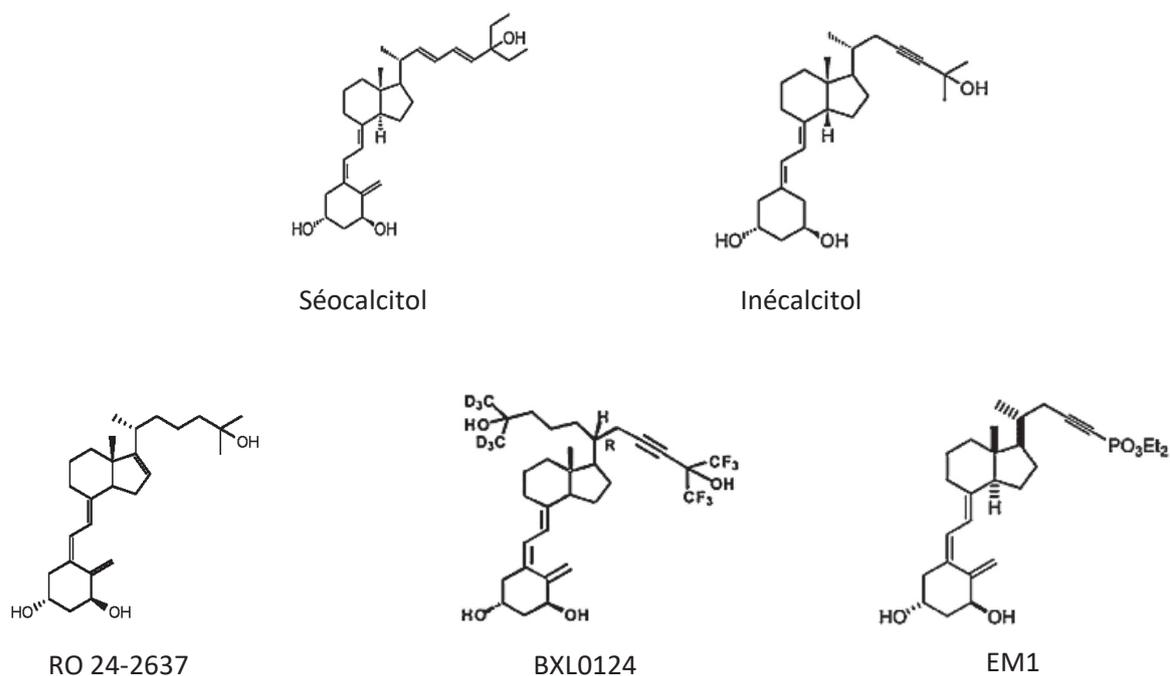


Figure 10. Formules de divers analogues du calcitriol (Duffy *et al.*, 2017; Mathieu and Adorini, 2002)

Schwartz *et al.* ont évalué l'efficacité et la cytotoxicité d'un autre analogue du calcitriol : le 1,25-Dihydroxy-16-ene-23-yne-cholecalciferol (RO 24-2637) (Schwartz *et al.*, 1995). Ils ont ainsi

démontré que l'injection intrapéritonéale de cet analogue du calcitriol à un modèle murin de cancer de la prostate (1,6 µg 1 jour sur 2) permettait de limiter la croissance tumorale sur une courte période avec un volume tumoral inférieur de 15% par rapport au groupe non traité. Ils ont également conclu que le traitement n'avait pas d'effet hypercalcémique, mais cette conclusion est critiquable compte tenu de l'hypercalcémie causée par la tumeur, ainsi que par l'unique dosage de la calcémie pratiqué (Schwartz *et al.*, 1995).

Le BXL0124 (1,25-dihydroxy-20R-21(3-hydroxy-3-deuterome-thyl-4,4,4-trideuterobutyl)-23-yne-26,27-hexafluoro-cholecalciferol), autre analogue du calcitriol, a été testé *in vivo* sur différents modèles animaux de cancer du sein. Chez un modèle murin d'adénocarcinome canalaire invasif, Wahler *et al.* ont trouvé que le volume tumoral était réduit de 43% par rapport au groupe contrôle après 4 semaines de traitement (Wahler *et al.*, 2014). Les chercheurs ont également démontré que le BXL0214 réduisait la concentration en ARNm codant pour les métalloprotéinases matricielles, laissant suggérer un rôle anti-invasif de ce dernier (Wahler *et al.*, 2014).

Un autre analogue du calcitriol, plus faiblement hypercalcémique que ce dernier, [(5Z,7E)-(1S,3R)-1,3-dihydroxy-9,10-secochola-5,7,10(19)-trien-23-in-24-yl], aussi appelé EM1, a démontré une activité antiproliférative *in vitro* sur différentes lignées cellulaires et une activité antimétastatique *in vivo* sur un modèle murin de cancer du sein (Ferronato *et al.*, 2015).

Bien que certains des analogues du calcitriol synthétisés aient démontré des résultats encourageants, aucun n'est pour le moment clairement supérieur au calcitriol en terme d'activité anti-tumorale pour une toxicité équivalente.

I.2.5. Rôle dans le système immunitaire

Le calcitriol intervient à la fois dans l'immunité innée et acquise. En effet, il présente un rôle stimulateur de l'immunité innée puisqu'il tend à activer les cellules immunitaires, notamment les monocytes et les macrophages. Par ailleurs, il module les réponses du système immunitaire adaptatif par le biais de différents mécanismes incluant une inhibition de la maturation des cellules dendritiques, diminuant ainsi leur capacité à présenter les antigènes, une inhibition de l'activation et de la prolifération des lymphocytes T *via* la suppression de la production d'interleukines 6, 12, et 23 ; et une inhibition de la différenciation des précurseurs des lymphocytes B (Etten et Mathieu, 2005).

I.2.5.1. Maladies infectieuses virales ou bactériennes

Des études épidémiologiques ont démontré le lien entre une carence en vitamine D et la survenue de maladies infectieuses telles que la grippe, la dengue, le VIH, ou encore la tuberculose (Aranow, 2011).

Des travaux portant sur la tuberculose, causée par *Mycobacterium tuberculosis* ont en effet démontré que le calcitriol stimulait l'activité antimicrobienne des macrophages, aussi bien de manière directe via leur activation, que de manière indirecte via la stimulation de la production d'un peptide antimicrobien : la cathélicidine (Bruns *et al.*, 2015). Ainsi, dans le cas d'une infection par *Mycobacterium tuberculosis* par exemple, les toll like receptors (TLRs) sont activés, augmentant l'expression de 1 α -OHase ainsi que de VDR. Le calcitriol est donc synthétisé à partir de la vitamine D circulante, et est à l'origine d'une cascade de réactions qui sont :

- Inhibition de la différenciation des monocytes en cellules dendritiques,
- Stimulation de la différenciation des monocytes en macrophages (Baeke *et al.*, 2010),
- Stimulation de la production de cathélicidine par les macrophages par le biais de sa liaison au VDR,
- Elimination de la mycobactérie par la cathélicidine.

Cette implication dans la défense de l'organisme contre l'infection causée par *Mycobacterium tuberculosis* témoigne de l'action du calcitriol dans la réponse immunitaire innée. Par ailleurs, le calcitriol stimule l'autophagie des macrophages infectés par *Mycobacterium tuberculosis* via la fusion des phagosomes et lysosomes (Bruns et Stenger, 2014; Selvaraj *et al.*, 2015).

Le calcitriol est aussi intéressant dans le cas du traitement contre le virus de la Dengue, qui est associé à une surproduction de cytokines pro-inflammatoires et dont la progression se fait par le biais de l'attachement du virus aux récepteurs au mannose présents à la surface des macrophages, permettant sa réplication (Arboleda Alzate *et al.*, 2017). En plus des actions communes à celles induites lors d'une infection par *Mycobacterium tuberculosis* (différenciation des monocytes en macrophages, augmentation du nombre de VDR et de production de 1 α -OHase), Alzate *et al.* ont démontré *in vitro* que le calcitriol induisait dans ce cas la production de macrophages exprimant peu de récepteurs au mannose à leur surface, limitant la progression du virus de la Dengue.

I.2.5.2. Maladies auto-immunes

La carence en calcitriol est également à l'origine de maladies auto-immunes telles que la sclérose en plaques, l'arthrite rhumatoïde, le diabète, la maladie de Crohn, le psoriasis ou encore l'athérosclérose (Aranow, 2011). Cette dernière est une maladie inflammatoire chronique des artères qui se caractérise par la formation d'une plaque athéroscléreuse pouvant mener à l'obstruction ou à la rupture des vaisseaux sanguins dans les cas extrêmes. Dans ce cas, l'interaction entre le calcitriol et les macrophages permettrait une inhibition de la progression de la plaque athéroscléreuse (Riek *et al.*, 2013). L'équipe de Riek *et al.* ont ainsi observé que le calcitriol stimulait la différenciation des monocytes en macrophages immunostimulants, et limitait la conversion des macrophages en cellules spumeuses, partie intégrante de la plaque athéroscléreuse. Cette action, renforcée par l'inhibition de

différents récepteurs scavengers (CD36 et SRA-1) par le calcitriol, s'oppose au développement de la maladie (Riek *et al.*, 2013).

I.2.5.3. Cancer

Le site tumoral est une zone d'inflammation chronique, et il est aujourd'hui admis que cette inflammation a un rôle clé dans l'initiation de la tumorigenèse (Bhatelia *et al.*, 2014; Fernandes *et al.*, 2015; Mantovani *et al.*, 2008). Par ailleurs, de multiples études épidémiologiques font état d'une association entre les maladies auto-immunes et le cancer, avec en particulier un risque accru de cancer chez les personnes atteintes de maladies auto-immunes (Giat *et al.*, 2017). Les activités anti-inflammatoires du calcitriol font partie intégrante de son activité anti-cancéreuse, comme démontré pour les cancers du sein MCF-7, et de la prostate (LNCaP, PC-3, DU145). Il agit en tant que tel par le biais de différents mécanismes.

I.2.5.3.1. Prostaglandines

Les prostaglandines, produites après action enzymatique de la cyclooxygénase-2 (COX-2), participent à la progression tumorale de par leur activité pro-inflammatoire. Il a été observé *in vitro* sur des lignées cellulaires de cancer du sein hormono-dépendant et de cancer de la prostate que le calcitriol inhibait l'expression de COX-2 (Moreno *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2012). D'autres études ont par ailleurs démontré que le calcitriol induisait la stimulation de l'expression de la 15-hydroxyprostaglandine déshydrogénase (15-PGDH) qui dégrade les prostaglandines et entraîne une sous-expression de leurs récepteurs (Feldman *et al.*, 2014; Krishnan et Feldman, 2011).

I.2.5.3.2. Voies de signalisation des MAP (Mitogen-Activated Protein) kinases p38

Les voies de signalisation des MAP kinases p38 sont responsables de la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine 6 (IL-6) aussi bien dans les cellules saines de la prostate que dans les cellules de cancer de la prostate (Nonn *et al.*, 2006). Ainsi, une corrélation positive entre le taux sérique en IL-6 et le développement tumoral ainsi que la formation de métastases a notamment été mise en évidence dans les cas du cancer du sein (Hussein *et al.*, 2004), du cancer de la prostate (Culig et Pühr, 2018), et du cancer colorectal (Chung et Chang, 2003). Le calcitriol a un rôle central sur ces voies de signalisation puisqu'il est capable d'induire l'expression de la MAP kinase phosphatase 5, empêchant ainsi l'activation des MAP kinases 38, et donc la production d'IL-6, témoignant de son rôle anti-inflammatoire dans le cancer (Nonn *et al.*, 2006).

1.2.5.3.3. Voie de signalisation NF-κB (nuclear factor kappa B)

Le calcitriol inhibe la voie de signalisation NF-κB, famille de facteurs de transcription de protéines régulant de nombreux gènes, notamment ceux impliqués dans la réponse immunitaire innée ainsi que dans l'inflammation (Bao, 2006; Lundqvist *et al.*, 2014). Cette voie de signalisation, plus active dans les cellules cancéreuses, joue un rôle clé dans le développement tumoral en potentialisant notamment la transcription de gènes anti-apoptotiques (Bcl2), la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-8), et la production du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), responsable de la vascularisation tumorale aussi appelée angiogenèse (Krishnan et Feldman, 2011). La voie de signalisation NF-κB potentialise aussi la production d'enzymes protéolytiques de la famille des métalloprotéinases matricielles (MMP), notamment MMP-9 connue pour être associée aux cancers du sein métastatiques en participant notamment au remodelage de la matrice extracellulaire, à l'origine de la formation de métastases (Mehner *et al.*, 2014). L'inhibition de la voie de signalisation NF-κB par le calcitriol résulte aussi de l'augmentation de l'expression de l'IκB dans les cellules mononucléaires sanguines périphériques ainsi que dans les macrophages (Cohen-Lahav *et al.*, 2006).

1.2.5.3.4. Interaction entre les cellules immunitaires et cancéreuses

Les tumeurs sont infiltrées par des cellules immunitaires (macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes B et T) dont l'action est plutôt délétère vis-à-vis de l'organisme puisqu'elles tendent à promouvoir la croissance tumorale (Sica *et al.*, 2008). Le calcitriol possède des effets immunomodulateurs envers ces cellules qui font partie intégrante de son activité anti-cancéreuse. Elles sont majoritairement représentées par les macrophages, alors appelés macrophages associés aux tumeurs, ou « TAMs » qui font l'objet du 2^{ème} chapitre du manuscrit. Outre ses actions pro-différenciatives vis-à-vis des monocytes, le calcitriol possède un rôle activateur de l'activité de phagocytose des macrophages pouvant participer à la destruction des cellules cancéreuses (Chakraborti, 2011). Par ailleurs, il stimule la production de cathélicidine par ces derniers, qui s'est avérée cytotoxique vis-à-vis d'un modèle de lymphome à larges cellules B (Raji) au cours d'une étude *in vitro* (Bruns *et al.*, 2015). En effet, Bruns *et al.* ont démontré par le biais de co-cultures que les macrophages pro-inflammatoires exerçaient une action cytotoxique envers les cellules Raji par le biais de la sécrétion de cathélicidine, mais que cette action était limitée pour les macrophages présentant un phénotype anti-inflammatoire. Compte tenu de la faible capacité des macrophages anti-inflammatoires à synthétiser du calcitriol à partir du calcidiol, les auteurs ont émis l'hypothèse que cette sécrétion était dépendante de la vitamine D. Cela a été vérifié en supplémentant le sérum dans lequel les macrophages étaient cultivés avec une concentration faible (≤ 40 nM) ou importante (≈ 100 nM) en calcitriol, aboutissant à une cytotoxicité positivement corrélée à la concentration en actif

(Figure 11) (Bruns *et al.*, 2015). Ces résultats sont très prometteurs quant à l'utilisation de calcitriol dans le cadre de l'immunothérapie anti-tumorale.

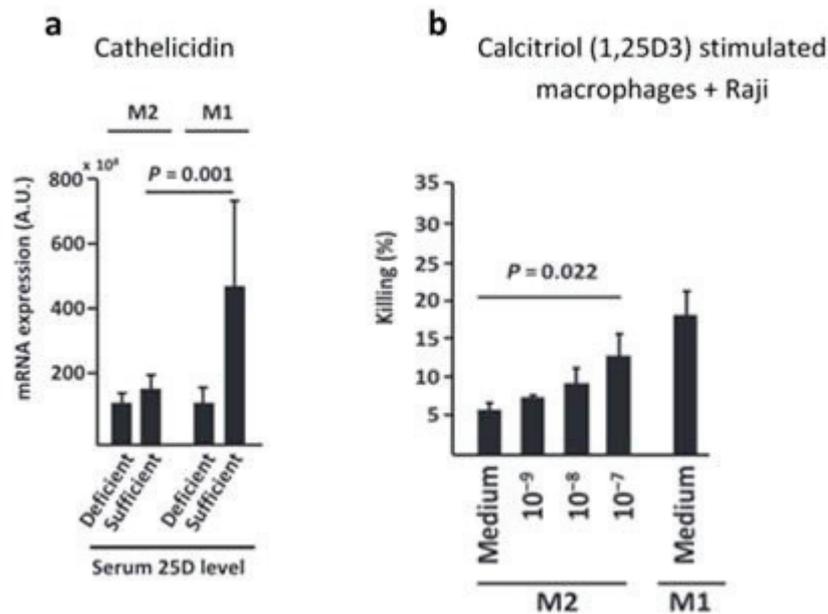


Figure 11. Activité cytotoxique de la cathélicidine envers la lignée cellulaire de lymphome à larges cellules B (Raji) *in vitro* en fonction de la concentration sérique en calcidiol. (a) les macrophages immuno-stimulants (M1) ou immuno-suppresseurs (M2) ont été cultivés en présence de sérum supplémenté avec une faible concentration en calcitriol (≤ 40 nM, « déficient ») ou une forte concentration en calcidiol (≈ 100 nM, « suffisant ») pendant 6 jours. L'expression de l'ARNm de la cathélicidine a été déterminé par PCR quantitative ($n=4$). (b) Les macrophages M2 ont été incubés 2 jours avec du calcitriol puis co-cultivés avec les cellules Raji (ratio 5:1, 48 heures). La viabilité des cellules Raji a été déterminée par un double marquage annexine-V/7-AAD par cytométrie en flux. La figure représente le pourcentage de cellules Raji mortes (7-AAD+) par rapport aux cellules non exposées ($n= 10$). Les macrophages M1 ont été utilisés comme contrôle positif et le milieu de culture cellulaire comme contrôle négatif (Bruns *et al.*, 2015).

Par ailleurs, un modèle de co-culture de cellules mononucléées sanguines périphériques et de cellules de cancer du côlon a permis de démontrer le rôle inhibiteur du calcitriol vis-à-vis de la production de cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IL-6, ainsi que d'IL-10 mais dans une moindre mesure, confirmant le rôle anti-inflammatoire du calcitriol dans le cadre du cancer (Bessler et Djaldetti, 2012).

I.3. Encapsulation de la vitamine D

Les différents métabolites de la vitamine D ont été encapsulés dans des nanosystèmes variés (liposomes, micelles, nanoparticules protéiques ou polymères) pour une application principalement dans le domaine agroalimentaire avec pour objectif d'améliorer leur stabilité dans le cadre de l'enrichissement des produits en vitamine D, mais aussi dans le domaine pharmaceutique avec pour objectifs principaux d'améliorer sa biodisponibilité et d'ainsi potentialiser son activité, ou encore d'exploiter les capacités ciblantes de tels vecteurs. Il est important de souligner que dans le domaine pharmaceutique, le cholécalciférol est souvent choisi comme molécule modèle du calcitriol lors d'études de formulation car il est moins onéreux que ce dernier. Il peut cependant aussi être employé pour cibler des cellules capables de le convertir en calcitriol.

I.3.1. Application dans le domaine pharmaceutique

Sun *et al.* ont développé des nanoparticules à base de dérivés d'alginate pour encapsuler le cholécalciférol pour le traitement de maladies osseuses telles que le rachitisme (Sun *et al.*, 2012). La pharmacocinétique des nanoparticules a été évaluée *in vivo* sur un modèle murin et a démontré une amélioration importante de la biodisponibilité du cholécalciférol après encapsulation. Par ailleurs, des études histologiques de l'intégrité de fémurs de rats atteints de rachitisme par microscopie confocale ont démontré une meilleure efficacité des nanoparticules encapsulant le cholécalciférol par rapport à sa forme libre (Sun *et al.*, 2012).

Egalement dans le cadre de l'activité de la vitamine D sur le métabolisme osseux, Ignjatović *et al.* ont encapsulé le cholécalciférol dans des nanoparticules biocompatibles composées d'hydroxyapatite de polymère (PLGA) mesurant environ 100 nm. Bien que les résultats obtenus *in vitro* sur des ostéoblastes aient été peu convaincants, les auteurs ont poursuivi leur étude *in vivo* et ont ainsi démontré l'intérêt de tels vecteurs pour l'activité du cholécalciférol notamment en terme de régénération osseuse (Ignjatović *et al.*, 2013).

Nguyen *et al.* ont encapsulé du calcitriol dans des microsphères polymères biocompatibles et semi-biodégradables de poly(vinyl neodecanoate-crosslinked-ethyleneglycol dimethacrylate) (35 µm). Ces microsphères ont été développées pour être injectées localement au niveau hépatique pour une application en chimiothérapie contre le cancer du foie. Elles ont démontré une libération prolongée avec seulement 1% de calcitriol libéré après 40 jours, le but étant d'obtenir une libération du calcitriol sur plusieurs mois (Nguyen *et al.*, 2007).

Dans le cadre d'une application en chimiothérapie anti-tumorale, Almouazen *et al.* ont développé des nanocapsules polymères biodégradables à base de PLA et de triglycérides (caprylic/capric/succinic TG) pour l'encapsulation du calcitriol (Almouazen *et al.*, 2013). Ils ont réalisé

une étude de formulation en utilisant le cholécalciférol comme molécule modèle du calcitriol permettant d'établir un ratio polymère:huile optimal de 1:4. L'équipe de chercheurs a ainsi encapsulé le calcitriol dans des nanocapsules monodisperses d'environ 200 nm avec une efficacité d'encapsulation de l'actif de $88 \pm 1\%$. L'activité antiproliférative du système a été démontrée *in vitro* sur des cellules d'adénocarcinome mammaire humain MCF-7 par le biais d'un test MTT avec des concentrations en calcitriol testées supérieures à 10^{-7} M sur 10 jours. Toutefois, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre la forme libre et la forme encapsulée du calcitriol excepté après 10 jours pour la concentration maximale testée. Les auteurs ont démontré de manière qualitative la capacité des nanocapsules développées à être internalisées pendant 10 jours par les MCF-7 en encapsulant une molécule fluorescente dans les nanocapsules : le rouge nile (Almouazen *et al.*, 2013).

De manière similaire, deux ans plus tard, une autre équipe a développé des nanosphères polymères (PLGA) biodégradables pour l'encapsulation du calcitriol et pour son application en chimiothérapie anti-tumorale. Les nanosphères ainsi obtenues présentaient une taille moyenne de 186 ± 3 nm, étaient chargées négativement, et présentaient une efficacité d'encapsulation moyenne de $57 \pm 8\%$. La libération du calcitriol a été évaluée dans du PBS et a montré 46% de libération après 24 heures, avec l'atteinte d'un équilibre à 96 heures, démontrant ainsi une libération de 80% au bout de 7 jours. Les auteurs se sont ensuite concentrés sur la forme encapsulée du calcitriol et ont ainsi évalué son activité anti-cancéreuse *in vitro* sur trois lignées cellulaires cancéreuses : deux lignées pancréatiques (S2-013 et hTERT-HPNE) et une de poumon (A549). L'internalisation cellulaire des nanosphères a d'abord été démontrée, uniquement sur la lignée A549 en utilisant des nanoparticules marquées à la coumarine, avec une persistance de l'internalisation pendant 72 heures (Ramalho *et al.*, 2015). Sur cette même lignée, le calcitriol encapsulé a démontré une réduction plus importante du nombre de cellules que la forme libre à une même concentration avec par exemple pour une exposition à $3,2 \mu\text{M}$ de calcitriol libre ou encapsulé respectivement, 45 et 20% d'inhibition de la prolifération cellulaire au bout de 72 heures (Ramalho *et al.*, 2015).

De manière similaire à Schaefer *et al.* (2013) (paragraphe I.1.3.), Bonor *et al.* ont conjugué le calcitriol à des quantum dots biocompatibles (17 nm) adaptés pour l'imagerie efficaces pour évaluer sa biodistribution, élucider ses voies d'internalisation cellulaires ainsi que les mécanismes mis en jeu dans son action aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Bonor *et al.*, 2012).

I.3.2. Application dans le domaine agro-alimentaire

Le cholécalciférol a été encapsulé dans des micelles de caséine d'environ 100 nm pour une application dans le domaine agro-alimentaire, ce qui a permis d'augmenter sa stabilité durant au moins 28 jours (Haham *et al.*, 2012).

Toujours dans le but d'améliorer la stabilité du cholécalciférol dans le cadre de la production de fromages riches en vitamine D, Banville *et al.* ont encapsulé l'actif dans des liposomes multilamellaires. Les auteurs ont ainsi observé une meilleure stabilité du cholécalciférol après encapsulation avec 20% d'actif supplémentaire retrouvé après 7 mois (Banville *et al.*, 2000).

Abbasi *et al.* ont amélioré la stabilité du cholécalciférol après 7 jours en l'encapsulant dans des nanoparticules protéiques (isolat de protéines de lactosérum) (Abbasi *et al.*, 2014).

Par ailleurs, le cholécalciférol a été encapsulé avec succès dans des nanoparticules protéiques composées de zéine coatées avec du carboxyméthyle chitosan (Luo *et al.*, 2012). Luo *et al.* ont ainsi démontré que les nanoparticules permettaient d'augmenter la stabilité chimique de l'actif. Par ailleurs, les auteurs ont démontré que les nanoparticules développées permettaient une libération contrôlée du cholécalciférol dans un milieu simulant le fluide gastro-intestinal. Ainsi, Luo *et al.* ont observé une libération de l'actif de seulement 25% après 6,5 heures contre près de 100% pour le cholécalciférol libre, permettant une amélioration de sa biodisponibilité après administration par voie orale.

De la même manière, des nanoparticules d'alginate encapsulant le cholécalciférol de taille comprise entre 305 ± 6 nm et 559 ± 10 nm et libérant de manière stable 50% de l'actif après 2h dans un modèle de fluide gastro-intestinal ont été développées (Li *et al.*, 2011).

Guttoff *et al.* ont quant à eux développé des émulsions formées de nanoparticules encapsulant du cholécalciférol et mesurant de 100 nm à 1,5 μ m pour une application dans le domaine agroalimentaire. L'équipe a démontré l'impact de paramètres de formulation incluant la nature du tensioactif employé ainsi que sa concentration, et la vitesse d'agitation magnétique sur les caractéristiques physicochimiques de nanoémulsions (Guttoff *et al.*, 2015).

Des études de formulation visant à évaluer la possibilité d'encapsuler le cholécalciférol dans d'autres types de vecteurs pour améliorer sa stabilité ont par ailleurs été menées. Mohammadi *et al.* ont encapsulé du cholécalciférol (93%) dans des liposomes de taille inférieure à 100 nm et chargés négativement pour la fortification de boissons en vitamine D₃ (Mohammadi, Maryam *et al.*, 2014).

Dans le but d'enrichir le lait et la margarine en vitamine D, des nanoparticules solides lipidiques ont été développées pour encapsuler un autre métabolite de la vitamine D, l'ergocalciférol (vitamine D₂). Les nanoparticules ainsi obtenues mesuraient environ 65 nm et encapsulaient jusqu'à 20 % d'actif (Patel et San Martin-Gonzalez, 2012).

I.4. Conclusion

La vitamine D, et plus particulièrement son métabolite actif, le calcitriol, présente un intérêt thérapeutique dans de nombreuses pathologies telles que l'ostéoporose ou le rachitisme, les infections virales, ou encore le cancer. Les effets anti-cancéreux remarquables du calcitriol sont cependant limités par ses effets secondaires, principalement l'hypercalcémie. Malgré le développement d'une formulation permettant l'atteinte de la fenêtre thérapeutique du calcitriol sans causer d'hypercalcémie grâce à son administration intermittente, les résultats cliniques restent faibles. Ceci peut s'expliquer par la faible période durant laquelle la concentration sanguine en calcitriol pour qu'il soit efficace (>1 nM) est atteinte. La vectorisation du calcitriol est une approche thérapeutique intéressante en thérapie anti-cancéreuse permettant de potentialiser son activité tout en évitant ses effets secondaires par le biais d'un ciblage tumoral. Bien que plusieurs systèmes de vectorisation du calcitriol aient été développés, leur intérêt en chimiothérapie anti-cancéreuse n'a que faiblement été démontré. Il est donc nécessaire d'exploiter ardemment cette stratégie. Par ailleurs, compte tenu de son activité vis-à-vis des macrophages et de leur implication dans le développement tumoral, l'intérêt de sa vectorisation serait double, permettant un ciblage simultané des cellules néoplasiques et des macrophages.

I.5. Références

- Abbasi, A., Emam-Djomeh, Z., Mousavi, M.A.E., Davoodi, D., 2014. Stability of vitamin D3 encapsulated in nanoparticles of whey protein isolate. *Food Chem.* 143, 379–383.
- Abe, E., Miyaura, C., Sakagami, H., Takeda, M., Konno, K., Yamazaki, T., Yoshiki, S., Suda, T., 1981. Differentiation of mouse myeloid leukemia cells induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 4990–4994.
- Abe-Hashimoto, J., Kikuchi, T., Matsumoto, T., Nishii, Y., Ogata, E., Ikeda, K., 1993. Antitumor effect of 22-oxa-calcitriol, a noncalcemic analogue of calcitriol, in athymic mice implanted with human breast carcinoma and its synergism with tamoxifen. *Cancer Res.* 53, 2534–2537.
- Ahmed, S., Johnson, C.S., Rueger, R.M., Trump, D.L., 2002. Calcitriol (1,25-Dihydroxycholecalciferol) Potentiates Activity of Mitoxantrone/Dexamethasone in an Androgen Independent Prostate Cancer Model. *J. Urol.* 168, 756–761.
- Al-Azhri, J., Zhang, Y., Bshara, W., Zirpoli, G., McCann, S.E., Khoury, T., Morrison, C.D., Edge, S.B., Ambrosone, C.B., Yao, S., 2017. Tumor Expression of Vitamin D Receptor and Breast Cancer Histopathological Characteristics and Prognosis. *Clin. Cancer Res.* 23, 97–103.
- Almouazen, E., Bourgeois, S., Jordheim, L.P., Fessi, H., Briançon, S., 2013. Nano-encapsulation of Vitamin D3 Active Metabolites for Application in Chemotherapy: Formulation Study and *in vitro* Evaluation. *Pharm. Res.* 30, 1137–1146.

An, B.-S., Tavera-Mendoza, L.E., Dimitrov, V., Wang, X., Calderon, M.R., Wang, H.-J., White, J.H., 2010. Stimulation of Sirt1-Regulated FoxO Protein Function by the Ligand-Bound Vitamin D Receptor. *Mol. Cell. Biol.* 30, 4890–4900.

Anderson, P.H., 2017. Vitamin D Activity and Metabolism in Bone. *Curr. Osteoporos. Rep.* 15, 443–449.

Aranow, C., 2011. Vitamin D and the immune system. *J. Investig. Med. Off. Publ. Am. Fed. Clin. Res.* 59, 881–886.

Arboleda Alzate, J.F., Rodenhuis-Zybert, I.A., Hernández, J.C., Smit, J.M., Urcuqui-Inchima, S., 2017. Human macrophages differentiated in the presence of vitamin D3 restrict dengue virus infection and innate responses by downregulating mannose receptor expression. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11, e0005904.

Baeke, F., Takiishi, T., Korf, H., Gysemans, C., Mathieu, C., 2010. Vitamin D: modulator of the immune system. *Curr. Opin. Pharmacol.* 10, 482–496.

Banville, C., Vuilleumard, J., Lacroix, C., 2000. Comparison of different methods for fortifying Cheddar cheese with vitamin D. *Int. Dairy J.* 10, 375–382.

Bao, B.-Y., 2006. 1, 25-dihydroxyvitamin D3 suppresses interleukin-8-mediated prostate cancer cell angiogenesis. *Carcinogenesis* 27, 1883–1893.

Beer, T.M., 2005. Pharmacokinetics and Tolerability of a Single Dose of DN-101, a New Formulation of Calcitriol, in Patients with Cancer. *Clin. Cancer Res.* 11, 7794–7799.

Beer, T.M., Javle, M.M., Ryan, C.W., Garzotto, M., Lam, G.N., Wong, A., Henner, W.D., Johnson, C.S., Trump, D.L., 2007a. Phase I study of weekly DN-101, a new formulation of calcitriol, in patients with cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 59, 581–587.

Beer, T.M., Munar, M., Henner, W.D., 2001. A Phase I trial of pulse calcitriol in patients with refractory malignancies: pulse dosing permits substantial dose escalation. *Cancer* 91, 2431–2439.

Beer, T.M., Myrthue, A., 2004. Calcitriol in cancer treatment: from the lab to the clinic. *Mol. Cancer Ther.* 3, 373–381.

Beer, T.M., Ryan, C.W., Venner, P.M., Petrylak, D.P., Chatta, G.S., Ruether, J.D., Redfern, C.H., Fehrenbacher, L., Saleh, M.N., Waterhouse, D.M., Carducci, M.A., Vicario, D., Dreicer, R., Higano, C.S., Ahmann, F.R., Chi, K.N., Henner, W.D., Arroyo, A., Clow, F.W., 2007b. Double-Blinded Randomized Study of High-Dose Calcitriol Plus Docetaxel Compared With Placebo Plus Docetaxel in Androgen-Independent Prostate Cancer: A Report From the ASCENT Investigators. *J. Clin. Oncol.* 25, 669–674.

Ben-Eltriki, M., Deb, S., Guns, E.S.T., 2016. Calcitriol in Combination Therapy for Prostate Cancer: Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Interactions. *J. Cancer* 7, 391–407.

Bessler, H., Djaldetti, M., 2012. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 modulates the interaction between immune and colon cancer cells. *Biomed. Pharmacother.* 66, 428–432.

Bhatelia, K., Singh, K., Singh, R., 2014. TLRs: Linking inflammation and breast cancer. *Cell. Signal.* 26, 2350–2357.

Bikle, D.D., 2014. Vitamin D Metabolism, Mechanism of Action, and Clinical Applications. *Chem. Biol.* 21, 319–329.

Bikle, D.D., 2012. Vitamin D and Bone. *Curr. Osteoporos. Rep.* 10, 151–159.

Bikle, D.D., Patzek, S., Wang, Y., 2018. Physiologic and pathophysiologic roles of extra renal CYP27b1: Case report and review. *Bone Rep.* 8, 255–267.

Bland, R., Markovic, D., Hills, C.E., Hughes, S.V., Chan, S.L.F., Squires, P.E., Hewison, M., 2004. Expression of 25-hydroxyvitamin D3-1 α -hydroxylase in pancreatic islets. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 89–90, 121–125.

- Blutt, S.E., McDonnell, T.J., Polek, T.C., Weigel, N.L., 2000. Calcitriol-Induced Apoptosis in LNCaP Cells Is Blocked By Overexpression of Bcl-2¹. *Endocrinology* 141, 10–17.
- Blutt, S.E., Polek, T.C., Stewart, L.V., Kattan, M.W., Weigel, N.L., 2000. A calcitriol analogue, EB1089, inhibits the growth of LNCaP tumors in nude mice. *Cancer Res.* 60, 779–782.
- Bonor, J.C., Schaefer, R.J., Menegazzo, N., Booksh, K., Nohe, A.G., 2012. Design of 1,25 dihydroxyvitamin D3 coupled quantum dots, a novel imaging tool. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 12, 2185–2191.
- Brawer, M.K., 2007. Recent Progress in the Treatment of Advanced Prostate Cancer With Intermittent Dose-Intense Calcitriol (DN-101). *Rev. Urol.* 9, 1–8.
- Brożyna, A.A., Jóźwicki, W., Jochymski, C., Slominski, A.T., 2015. Decreased expression of CYP27B1 correlates with the increased aggressiveness of ovarian carcinomas. *Oncol. Rep.* 33, 599–606.
- Bruns, H., Buttner, M., Fabri, M., Mougiakakos, D., Bittenbring, J.T., Hoffmann, M.H., Beier, F., Pasemann, S., Jitschin, R., Hofmann, A.D., Neumann, F., Daniel, C., Maurberger, A., Kempkes, B., Amann, K., Mackensen, A., Gerbitz, A., 2015. Vitamin D-dependent induction of cathelicidin in human macrophages results in cytotoxicity against high-grade B cell lymphoma. *Sci. Transl. Med.* 7, 282ra47-282ra47.
- Bruns, H., Stenger, S., 2014. New insights into the interaction of *Mycobacterium tuberculosis* and human macrophages. *Future Microbiol.* 9, 327–341.
- Chadha, M.K., Tian, L., Mashtare, T., Payne, V., Silliman, C., Levine, E., Wong, M., Johnson, C., Trump, D.L., 2010. Phase 2 trial of weekly intravenous 1,25 dihydroxy cholecalciferol (Calcitriol) in combination with dexamethasone for castration-resistant prostate cancer. *Cancer* 2132-2139.
- Chakraborti, C., 2011. Vitamin D as a promising anticancer agent. *Indian J. Pharmacol.* 43, 113-120.
- Chiang, K.-C., Yeh, C.-N., Chen, T.C., 2011. Vitamin D and Pancreatic Cancer—An Update. *Cancers* 3, 213–226.
- Cho, Y.L., Christensen, C., Saunders, D.E., Lawrence, W.D., Deppe, G., Malviya, V.K., Malone, J.M., 1991. Combined effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and platinum drugs on the growth of MCF-7 cells. *Cancer Res.* 51, 2848–2853.
- Chouvet, C., Vicard, E., Devonec, M., Saez, S., 1986. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibitory effect on the growth of two human breast cancer cell lines (MCF-7, BT-20). *J. Steroid Biochem.* 24, 373–376.
- Chung, Y.-C., Chang, Y.-F., 2003. Serum interleukin-6 levels reflect the disease status of colorectal cancer. *J. Surg. Oncol.* 83, 222–226.
- Cohen-Lahav, M., Shany, S., Tobvin, D., Chaimovitz, C., Douvdevani, A., 2006. Vitamin D decreases NFκB activity by increasing IκBα levels. *Nephrol. Dial. Transplant.* 21, 889–897.
- Colston, K., Colston, M.J., Fieldsteel, A.H., Feldman, D., 1982. 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors in human epithelial cancer cell lines. *Cancer Res.* 42, 856–859.
- Colston, K.W., Mackay, A.G., James, S.Y., Binderup, L., Chander, S., Coombes, R.C., 1992. EB1089: A new vitamin D analogue that inhibits the growth of breast cancer cells *in vivo* and *in vitro*. *Biochem. Pharmacol.* 44, 2273–2280.
- Culig, Z., Pühr, M., 2018. Interleukin-6 and prostate cancer: Current developments and unsolved questions. *Mol. Cell. Endocrinol.* 462, 25–30.
- Dai, Z.-M., Fei, Y.-L., Zhang, W.-G., Liu, J., Cao, X.-M., Qu, Q.-M., Li, Y.-C., Lin, S., Wang, M., Dai, Z.-J., 2015. Association of Vitamin D Receptor Cdx-2 Polymorphism With Cancer Risk: A Meta-Analysis. *Medicine (Baltimore)* 94, e1370.

- Dalhoff, K., Dancey, J., Astrup, L., Skovsgaard, T., Hamberg, K.J., Lofts, F.J., Rosmorduc, O., Erlinger, S., Bach Hansen, J., Steward, W.P., Skov, T., Burcharth, F., Evans, T.R.J., 2003. A phase II study of the vitamin D analogue Seocalcitol in patients with inoperable hepatocellular carcinoma. *Br. J. Cancer* 89, 252–257.
- de Vos, S., Holden, S., Heber, D., Elstner, E., Binderup, L., Uskokovic, M., Rude, B., Chen, D.L., Le, J., Cho, S.K., Koeffler, H.P., 1997. Effects of potent vitamin D₃ analogs on clonal proliferation of human prostate cancer cell lines. *The Prostate* 31, 77–83.
- Deeb, K.K., Trump, D.L., Johnson, C.S., 2007. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat. Rev. Cancer* 7, 684–700.
- DeLuca, H.F., 2014. History of the discovery of vitamin D and its active metabolites. *BoneKEy Rep.* 3, 1–8.
- Dou, R., Ng, K., Giovannucci, E.L., Manson, J.E., Qian, Z.R., Ogino, S., 2016. Vitamin D and colorectal cancer: molecular, epidemiological and clinical evidence. *Br. J. Nutr.* 115, 1643–1660.
- Dunlap, N., Schwartz, G.G., Eads, D., Cramer, S.D., Sherk, A.B., John, V., Koumenis, C., 2003. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ (calcitriol) and its analogue, 19-nor-1 α ,25(OH)₂D₂, potentiate the effects of ionising radiation on human prostate cancer cells. *Br. J. Cancer* 89, 746–753.
- Dusso, A., Brown, A., Slatopolsky, E., 1994. Extrarenal production of calcitriol. *Semin. Nephrol.* 14, 144–155.
- Elstner, E., Linker-Israeli, M., Le, J., Umiel, T., Michl, P., Said, J.W., Binderup, L., Reed, J.C., Koeffler, H.P., 1997. Synergistic decrease of clonal proliferation, induction of differentiation, and apoptosis of acute promyelocytic leukemia cells after combined treatment with novel 20-epi vitamin D₃ analogs and 9-cis retinoic acid. *J. Clin. Invest.* 99, 349–360.
- Etten, E. van, Mathieu, C., 2005. Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃: Basic concepts. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 97, 93–101.
- Evans, K.N., Nguyen, L., Chan, J., Innes, B.A., Bulmer, J.N., Kilby, M.D., Hewison, M., 2006. Effects of 25-Hydroxyvitamin D₃ and 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ on Cytokine Production by Human Decidual Cells. *Biol. Reprod.* 75, 816–822.
- Evans, T.R.J., Colston, K.W., Lofts, F.J., Cunningham, D., Anthoney, D.A., Gogas, H., de Bono, J.S., Hamberg, K.J., Skov, T., Mansi, J.L., 2002. A phase II trial of the vitamin D analogue Seocalcitol (EB1089) in patients with inoperable pancreatic cancer. *Br. J. Cancer* 86, 680–685.
- Eyles, D.W., Smith, S., Kinobe, R., Hewison, M., McGrath, J.J., 2005. Distribution of the Vitamin D receptor and 1 α -hydroxylase in human brain. *J. Chem. Neuroanat.* 29, 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2004.08.006>
- Fakih, M.G., Trump, D.L., Muindi, J.R., Black, J.D., Bernardi, R.J., Creaven, P.J., Schwartz, J., Brattain, M.G., Hutson, A., French, R., Johnson, C.S., 2007. A Phase I Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Study of Intravenous Calcitriol in Combination with Oral Gefitinib in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clin. Cancer Res.* 13, 1216–1223.
- Feldman, D., Krishnan, A.V., Swami, S., Giovannucci, E., Feldman, B.J., 2014. The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. *Nat. Rev. Cancer* 14, 342–357.
- Fernandes, J.V., Cobucci, R.N.O., Jatobá, C.A.N., de Medeiros Fernandes, T.A.A., de Azevedo, J.W.V., de Araújo, J.M.G., 2015. The Role of the Mediators of Inflammation in Cancer Development. *Pathol. Oncol. Res.* 21, 527–534.
- Ferronato, M.J., Obiol, D.J., Fermento, M.E., Gandini, N.A., Alonso, E.N., Salomón, D.G., Vitale, C., Mascaró, E., Fall, Y., Raimondi, A.R., Curino, A.C., Facchinetti, M.M., 2015. The alkynylphosphonate

analogue of calcitriol EM1 has potent anti-metastatic effects in breast cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 154, 285–293.

Flanagan, J.N., Young, M.V., Persons, K.S., Wang, L., Mathieu, J.S., Whitlatch, L.W., Holick, M.F., Chen, T.C., 2006. Vitamin D metabolism in human prostate cells: implications for prostate cancer chemoprevention by vitamin D. *Anticancer Res.* 26, 2567–2572.

Flanagan, L., Packman, K., Juba, B., O’Neill, S., Tenniswood, M., Welsh, J., 2003. Efficacy of Vitamin D compounds to modulate estrogen receptor negative breast cancer growth and invasion. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 84, 181–192.

Garland, C.F., Garland, F.C., 1980. Do sunlight and vitamin D reduce the likelihood of colon cancer? *Int. J. Epidemiol.* 9, 227–231.

Giat, E., Ehrenfeld, M., Shoenfeld, Y., 2017. Cancer and autoimmune diseases. *Autoimmun. Rev.* 16, 1049–1057.

Gocek, E., Burska, H., Marchwicka, A., Marcinkowska, E., 2012. Regulation of Leukemic Cell Differentiation through the Vitamin D Receptor at the Levels of Intracellular Signal Transduction, Gene Transcription, and Protein Trafficking and Stability. *Leuk. Res. Treat.* 2012, 1–11.

Godyn, J.J., Xu, H., Zhang, F., Kolla, S., Studzinski, G.P., 1994. A dual block to cell cycle progression in HL60 cells exposed to analogues of vitamin D₃. *Cell Prolif.* 27, 37–46.

Gross, C., Stamey, T., Hancock, S., Feldman, D., 1998. Treatment of early recurrent prostate cancer with 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (calcitriol). *J. Urol.* 159, 2035–2039–2040.

Guttoff, M., Saberi, A.H., McClements, D.J., 2015. Formation of vitamin D nanoemulsion-based delivery systems by spontaneous emulsification: Factors affecting particle size and stability. *Food Chem.* 171, 117–122.

Haham, M., Ish-Shalom, S., Nodelman, M., Duek, I., Segal, E., Kustanovich, M., Livney, Y.D., 2012. Stability and bioavailability of vitamin D nanoencapsulated in casein micelles. *Food Funct.* 3, 737.

Hansen, C.M., Hamberg, K.J., Binderup, E., Binderup, L., 2000. Seocalcitol (EB 1089): a vitamin D analogue of anti-cancer potential. Background, design, synthesis, pre-clinical and clinical evaluation. *Curr. Pharm. Des.* 6, 803–828.

Heaney, R.P., Armas, L.A.G., Shary, J.R., Bell, N.H., Binkley, N., Hollis, B.W., 2008. 25-Hydroxylation of vitamin D₃: relation to circulating vitamin D₃ under various input conditions. *Am. J. Clin. Nutr.* 87, 1738–1742.

Hendrickson, W.K., Flavin, R., Kasperzyk, J.L., Fiorentino, M., Fang, F., Lis, R., Fiore, C., Penney, K.L., Ma, J., Kantoff, P.W., Stampfer, M.J., Loda, M., Mucci, L.A., Giovannucci, E., 2011. Vitamin D Receptor Protein Expression in Tumor Tissue and Prostate Cancer Progression. *J. Clin. Oncol.* 29, 2378–2385.

Hershberger, P.A., Yu, W.D., Modzelewski, R.A., Rueger, R.M., Johnson, C.S., Trump, D.L., 2001. Calcitriol (1,25-dihydroxycholecalciferol) enhances paclitaxel antitumor activity *in vitro* and *in vivo* and accelerates paclitaxel-induced apoptosis. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 7, 1043–1051.

Hewison, M., Burke, F., Evans, K.N., Lammas, D.A., Sansom, D.M., Liu, P., Modlin, R.L., Adams, J.S., 2007. Extra-renal 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase in human health and disease. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 103, 316–321.

Hewison, M., Zehnder, D., Chakraverty, R., Adams, J.S., 2004. Vitamin D and barrier function: a novel role for extra-renal 1 α -hydroxylase. *Mol. Cell. Endocrinol.* 215, 31–38.

Hidalgo, A.A., Deeb, K.K., Pike, J.W., Johnson, C.S., Trump, D.L., 2011. Dexamethasone Enhances 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ Effects by Increasing Vitamin D Receptor Transcription. *J. Biol. Chem.* 286, 36228–36237.

- Hii, C., Ferrante, A., 2016. The Non-Genomic Actions of Vitamin D. *Nutrients* 8, 135.
- Holick, M.F., 2004. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 80, 1678S–1688S.
- Honma, Y., Hozumi, M., Abe, E., Konno, K., Fukushima, M., Hata, S., Nishii, Y., DeLuca, H.F., Suda, T., 1983. 1 alpha,25-Dihydroxyvitamin D₃ and 1 alpha-hydroxyvitamin D₃ prolong survival time of mice inoculated with myeloid leukemia cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80, 201–204.
- Hsu, J.Y., Feldman, D., McNeal, J.E., Peehl, D.M., 2001. Reduced 1alpha-hydroxylase activity in human prostate cancer cells correlates with decreased susceptibility to 25-hydroxyvitamin D₃-induced growth inhibition. *Cancer Res.* 61, 2852–2856.
- Huang, D.C., Papavasiliou, V., Rhim, J.S., Horst, R.L., Kremer, R., 2002. Targeted disruption of the 25-hydroxyvitamin D₃ 1alpha-hydroxylase gene in ras-transformed keratinocytes demonstrates that locally produced 1alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ suppresses growth and induces differentiation in an autocrine fashion. *Mol. Cancer Res. MCR* 1, 56–67.
- Hussein, M.Z., Al Fikky, A., Abdel Bar, I., Attia, O., 2004. Serum IL-6 and IL-12 levels in breast cancer patients. *Egypt. J. Immunol.* 11, 165–170.
- Ignjatović, N., Uskoković, V., Ajduković, Z., Uskoković, D., 2013. Multifunctional hydroxyapatite and poly(d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles for the local delivery of cholecalciferol. *Mater. Sci. Eng. C* 33, 943–950.
- Ikeda, N., Uemura, H., Ishiguro, H., Hori, M., Hosaka, M., Kyo, S., Miyamoto, K., Takeda, E., Kubota, Y., 2003. Combination treatment with 1alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ and 9-cis-retinoic acid directly inhibits human telomerase reverse transcriptase transcription in prostate cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* 2, 739–746.
- Jacobs, E.T., Van Pelt, C., Forster, R.E., Zaidi, W., Hibler, E.A., Galligan, M.A., Haussler, M.R., Jurutka, P.W., 2013. CYP24A1 and CYP27B1 Polymorphisms Modulate Vitamin D Metabolism in Colon Cancer Cells. *Cancer Res.* 73, 2563–2573.
- Ji, Y., Kutner, A., Verstuyf, A., Verlinden, L., Studzinski, G.P., 2002. Derivatives of Vitamins D₂ and D₃ Activate Three MAPK Pathways and Upregulate pRb Expression in Differentiating HL60 Cells. *Cell Cycle* 1, 410–415.
- Jones, K.S., Assar, S., Harnpanich, D., Bouillon, R., Lambrechts, D., Prentice, A., Schoenmakers, I., 2014. 25(OH)D₂ Half-Life Is Shorter Than 25(OH)D₃ Half-Life and Is Influenced by DBP Concentration and Genotype. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99, 3373–3381.
- Kawa, S., Nikaido, T., Aoki, Y., Zhai, Y., Kumagai, T., Furihata, K., Fujii, S., Kiyosawa, K., 1997. Vitamin D analogues up-regulate p21 and p27 during growth inhibition of pancreatic cancer cell lines. *Br. J. Cancer* 76, 884–889.
- Kawahara, M., Iwasaki, Y., Sakaguchi, K., Taguchi, T., Nishiyama, M., Nigawara, T., Tsugita, M., Kambayashi, M., Suda, T., Hashimoto, K., 2008. Predominant role of 25OHD in the negative regulation of PTH expression: Clinical relevance for hypovitaminosis D. *Life Sci.* 82, 677–683.
- Kennedy, D., Cooley, K., Skidmore, B., Fritz, H., Campbell, T., Seely, D., 2013. Vitamin D: Pharmacokinetics and Safety When Used in Conjunction with the Pharmaceutical Drugs Used in Cancer Patients: A Systematic Review. *Cancers* 5, 255–280.
- Khammissa, R.A.G., Fourie, J., Motswaledi, M.H., Ballyram, R., Lemmer, J., Feller, L., 2018. The Biological Activities of Vitamin D and Its Receptor in Relation to Calcium and Bone Homeostasis, Cancer, Immune and Cardiovascular Systems, Skin Biology, and Oral Health. *BioMed Res. Int.* 2018, 1–9.

- Kizildag, S., Ates, H., Kizildag, S., 2010. Treatment of K562 cells with 1,25-dihydroxyvitamin D₃ induces distinct alterations in the expression of apoptosis-related genes BCL2, BAX, BCLXL, and p21. *Ann. Hematol.* 89, 1–7.
- Koli, K., Keski-Oja, J., 1995. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ enhances the expression of transforming growth factor beta 1 and its latent form binding protein in cultured breast carcinoma cells. *Cancer Res.* 55, 1540–1546.
- Krishnan, A.V., Feldman, D., 2011. Mechanisms of the Anti-Cancer and Anti-Inflammatory Actions of Vitamin D. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 51, 311–336.
- Krishnan, A.V., Swami, S., Feldman, D., 2012. The potential therapeutic benefits of vitamin D in the treatment of estrogen receptor positive breast cancer. *Steroids* 77, 1107–1112.
- Kulkarni, A.D., van Ginkel, P.R., Darjatmoko, S.R., Lindstrom, M.J., Albert, D.M., 2009. Use of combination therapy with cisplatin and calcitriol in the treatment of Y-79 human retinoblastoma xenograft model. *Br. J. Ophthalmol.* 93, 1105–1108.
- L. Apperly, F., 1940. The Relation of Solar Radiation to Cancer Mortality in North America* 191–195.
- Lagishetty, V., Chun, R.F., Liu, N.Q., Lisse, T.S., Adams, J.S., Hewison, M., 2010. 1 α -Hydroxylase and innate immune responses to 25-hydroxyvitamin D in colonic cell lines. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 121, 228–233.
- Lasky, S.R., Posner, M.R., Iwata, K., Santos-Moore, A., Yen, A., Samuel, V., Clark, J., Maizel, A.L., 1994. Characterization of a vitamin D₃-resistant human chronic myelogenous leukemia cell line. *Blood* 84, 4283–4294.
- Lee, Y., Dunlap, B.E., Mellon, W.S., 1987. Induction of monocytic differentiation by calcitriol (1,25-dihydroxyvitamin D₃) in the human promyelocytic leukemic cell line (HL-60) in serum-free medium. *Biochem. Pharmacol.* 36, 3893–3901.
- Lehmann, B., Meurer, M., 2003. Extrarenal sites of calcitriol synthesis: the particular role of the skin. *Recent Results Cancer Res. Fortschritte Krebsforsch. Progres Dans Rech. Sur Cancer* 164, 135–145.
- Li, Q., Liu, C.-G., Huang, Z.-H., Xue, F.-F., 2011. Preparation and Characterization of Nanoparticles Based on Hydrophobic Alginate Derivative as Carriers for Sustained Release of Vitamin D₃. *J. Agric. Food Chem.* 59, 1962–1967.
- Light, B.W., Yu, W.D., McElwain, M.C., Russell, D.M., Trump, D.L., Johnson, C.S., 1997. Potentiation of cisplatin antitumor activity using a vitamin D analogue in a murine squamous cell carcinoma model system. *Cancer Res.* 57, 3759–3764.
- Lin, R., 2016. Crosstalk between Vitamin D Metabolism, VDR Signalling, and Innate Immunity. *BioMed Res. Int.* 2016, 1–5.
- Lopes, N., Sousa, B., Martins, D., Gomes, M., Vieira, D., Veronese, L.A., Milanezi, F., Paredes, J., Costa, J.L., Schmitt, F., 2010. Alterations in Vitamin D signalling and metabolic pathways in breast cancer progression: a study of VDR, CYP27B1 and CYP24A1 expression in benign and malignant breast lesions. Vitamin D pathways unbalanced in breast lesions. *BMC Cancer* 10, 483–493.
- Lundqvist, J., Yde, C.W., Lykkesfeldt, A.E., 2014. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ inhibits cell growth and NF κ B signaling in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Steroids* 85, 30–35.
- Luo, Y., Teng, Z., Wang, Q., 2012. Development of Zein Nanoparticles Coated with Carboxymethyl Chitosan for Encapsulation and Controlled Release of Vitamin D₃. *J. Agric. Food Chem.* 60, 836–843.
- Ly, L.H., Zhao, X.-Y., Holloway, L., Feldman, D., 1999. Liarozole Acts Synergistically with 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ to Inhibit Growth of DU 145 Human Prostate Cancer Cells by Blocking 24-Hydroxylase Activity¹. *Endocrinology* 140, 2071–2076.

- Maj, E., Filip-Psurska, B., Świtalska, M., Kutner, A., Wietrzyk, J., 2015. Vitamin D Analogs Potentiate the Antitumor Effect of Imatinib Mesylate in a Human A549 Lung Tumor Model. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 27191–27207.
- Majewski, S., Szmurlo, A., Marczak, M., Jablonska, S., Bollag, W., 1993. Inhibition of tumor cell-induced angiogenesis by retinoids, 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and their combination. *Cancer Lett.* 75, 35–39.
- Makishima, M., Okabe-Kado, J., Honma, Y., 1998. Growth inhibition and differentiation induction in human monoblastic leukaemia cells by 1 α -hydroxyvitamin D derivatives and their enhancement by combination with hydroxyurea. *Br. J. Cancer* 77, 33–39.
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., Balkwill, F., 2008. Cancer-related inflammation. *Nature* 454, 436–444.
- Mathiasen, I.S., Sergeev, I.N., Bastholm, L., Elling, F., Norman, A.W., Jäättelä, M., 2002. Calcium and Calpain as Key Mediators of Apoptosis-like Death Induced by Vitamin D Compounds in Breast Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* 277, 30738–30745.
- McCarthy, K., Laban, C., Bustin, S.A., Ogunkolade, W., Khalaf, S., Carpenter, R., Jenkins, P.J., 2009. Expression of 25-hydroxyvitamin D-1- α -hydroxylase, and vitamin D receptor mRNA in normal and malignant breast tissue. *Anticancer Res.* 29, 155–157.
- McCullum, E.V., Simmonds, N., Ernestine Becker, J., Shipley, P.G., 1922. STUDIES ON EXPERIMENTAL RICKETS: XXI. AN EXPERIMENTAL DEMONSTRATION OF THE EXISTENCE OF A VITAMIN WHICH PROMOTES CALCIUM DEPOSITION. *J. Biol. Chem.* 293–312.
- McGuire, T.F., Trump, D.L., Johnson, C.S., 2001. Vitamin D₃-induced Apoptosis of Murine Squamous Cell Carcinoma Cells: SELECTIVE INDUCTION OF CASPASE-DEPENDENT MEK CLEAVAGE AND UP-REGULATION OF MEKK-1. *J. Biol. Chem.* 276, 26365–26373.
- Medioni, J., Deplanque, G., Ferrero, J.-M., Maurina, T., Rodier, J.-M.P., Raymond, E., Allyon, J., Maruani, G., Houillier, P., Mackenzie, S., Renaux, S., Dufour-Lamartinié, J.-F., Elaidi, R., Lerest, C., Oudard, S., 2014. Phase I Safety and Pharmacodynamic of Inecalcitol, a Novel VDR Agonist with Docetaxel in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer Patients. *Clin. Cancer Res.* 20, 4471–4477.
- Mehner, C., Hockla, A., Miller, E., Ran, S., Radisky, D.C., Radisky, E.S., 2014. Tumor cell-produced matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) drives malignant progression and metastasis of basal-like triple negative breast cancer. *Oncotarget* 5, 2736-2749.
- Moffatt, K.A., Johannes, W.U., Miller, G.J., 1999. 1 α ,25dihydroxyvitamin D₃ and platinum drugs act synergistically to inhibit the growth of prostate cancer cell lines. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 5, 695–703.
- Mohammadi, Maryam, Ghanbarzadeh, Babak, Hamishehkar, Hamed, 2014. Formulation of Nanoliposomal Vitamin D₃ for Potential Application in Beverage Fortification. 4, 569-575.
- Moreno, J., Krishnan, A.V., Swami, S., Nonn, L., Peehl, D.M., Feldman, D., 2005. Regulation of Prostaglandin Metabolism by Calcitriol Attenuates Growth Stimulation in Prostate Cancer Cells. *Cancer Res.* 65, 7917–7925.
- Morris, H.A., 2014. Vitamin D Activities for Health Outcomes. *Ann. Lab. Med.* 34, 181.
- Muindi, J.R., Johnson, C.S., Trump, D.L., Christy, R., Engler, K.L., Fakhri, M.G., 2009. A phase I and pharmacokinetics study of intravenous calcitriol in combination with oral dexamethasone and gefitinib in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 65, 33–40.
- Muindi, J.R., Potter, D.M., Peng, Y., Johnson, C.S., Trump, D.L., 2005. Pharmacokinetics of liquid calcitriol formulation in advanced solid tumor patients: comparison with caplet formulation. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 56, 492–496.

- Muindi, J.R., Yu, W.-D., Ma, Y., Engler, K.L., Kong, R.-X., Trump, D.L., Johnson, C.S., 2010. CYP24A1 Inhibition Enhances the Antitumor Activity of Calcitriol. *Endocrinology* 151, 4301–4312.
- Murray, A., Madden, S.F., Synnott, N.C., Klinger, R., O'Connor, D., O'Donovan, N., Gallagher, W., Crown, J., Duffy, M.J., 2017. Vitamin D receptor as a target for breast cancer therapy. *Endocr. Relat. Cancer* 24, 181–195.
- Nakamichi, Y., Udagawa, N., Suda, T., Takahashi, N., 2018. Mechanisms involved in bone resorption regulated by vitamin D. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 177, 70–76.
- Narvaez, C.J., Vanweelden, K., Byrne, I., Welsh, J., 1996. Characterization of a vitamin D₃-resistant MCF-7 cell line. *Endocrinology* 137, 400–409.
- Neveu, I., Naveilhan, P., Menea, C., Wion, D., Brachet, P., Garabédian, M., 1994. Synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ by rat brain macrophages *in vitro*: Synthesis of 1,25-Dihydroxyvitamin D₃. *J. Neurosci. Res.* 38, 214–220.
- Nguyen, T.L.U., Tey, S.Y., Pourgholami, M.H., Morris, D.L., Davis, T.P., Barner-Kowollik, C., Stenzel, M.H., 2007. Synthesis of semi-biodegradable crosslinked microspheres for the delivery of 1,25 dihydroxyvitamin D₃ for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Eur. Polym. J.* 43, 1754–1767.
- Nonn, L., Peng, L., Feldman, D., Peehl, D.M., 2006. Inhibition of p38 by Vitamin D Reduces Interleukin-6 Production in Normal Prostate Cells via Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase 5: Implications for Prostate Cancer Prevention by Vitamin D. *Cancer Res.* 66, 4516–4524.
- Nykjaer, A., Fyfe, J.C., Kozyraki, R., Lehesté, J.-R., Jacobsen, C., Nielsen, M.S., Verroust, P.J., Aminoff, M., de la Chapelle, A., Moestrup, S.K., Ray, R., Gliemann, J., Willnow, T.E., Christensen, E.I., 2001. Cubilin dysfunction causes abnormal metabolism of the steroid hormone 25(OH) vitamin D₃. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 13895–13900.
- Ohnuma, N., Norman, A., 1982. Identification of a new C-23 oxidation pathway of metabolism for 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ present in intestine and kidney. *J. Biol. Chem.* 8261–8271.
- Olmos-Ortiz, A., Avila, E., Durand-Carbajal, M., Díaz, L., 2015. Regulation of Calcitriol Biosynthesis and Activity: Focus on Gestational Vitamin D Deficiency and Adverse Pregnancy Outcomes. *Nutrients* 7, 443–480.
- Osborn, J.L., Schwartz, G.G., Smith, D.C., Bahnson, R., Day, R., Trump, D.L., 1995. Phase II trial of oral 1,25-dihydroxyvitamin D (calcitriol) in hormone refractory prostate cancer. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* 1, 195–198.
- Pálmer, H.G., González-Sancho, J.M., Espada, J., Berciano, M.T., Puig, I., Baulida, J., Quintanilla, M., Cano, A., de Herreros, A.G., Lafarga, M., Muñoz, A., 2001. Vitamin D₃ promotes the differentiation of colon carcinoma cells by the induction of E-cadherin and the inhibition of β -catenin signaling. *J. Cell Biol.* 154, 369–388.
- Patel, M.R., San Martin-Gonzalez, M.F., 2012. Characterization of Ergocalciferol Loaded Solid Lipid Nanoparticles. *J. Food Sci.* 77, N8–N13.
- Pendás-Franco, N., Aguilera, O., Pereira, F., González-Sancho, J.M., Muñoz, A., 2008. Vitamin D and Wnt/beta-catenin pathway in colon cancer: role and regulation of DICKKOPF genes. *Anticancer Res.* 28, 2613–2623.
- Peng, X., Jhaveri, P., Hussain-Hakimjee, E.A., Mehta, R.G., 2006. Overexpression of ER and VDR is not sufficient to make ER-negative MDA-MB231 breast cancer cells responsive to 1 α -hydroxyvitamin D₅. *Carcinogenesis* 28, 1000–1007.
- Pillai, S., Bikle, D.D., Elias, P.M., 1988. Vitamin D and epidermal differentiation: evidence for a role of endogenously produced vitamin D metabolites in keratinocyte differentiation. *Skin Pharmacol. Off. J. Skin Pharmacol. Soc.* 1, 149–160.

- Polar, M.K., Gennings, C., Park, M., Gupta, M.S., Gewirtz, D.A., 2003. Effect of the vitamin D3 analog ILX 23-7553 on apoptosis and sensitivity to fractionated radiation in breast tumor cells and normal human fibroblasts. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 51, 415–421.
- Prié, D., 2015. Os et FGF23. *Ann. Endocrinol.* 76, 302.
- Ramalho, M.J., Loureiro, J.A., Gomes, B., Frasco, M.F., Coelho, M.A.N., Pereira, M.C., 2015. PLGA nanoparticles as a platform for vitamin D-based cancer therapy. *Beilstein J. Nanotechnol.* 6, 1306–1318.
- Ramnath, N., Daignault-Newton, S., Dy, G.K., Muindi, J.R., Adjei, A., Elingrod, V.L., Kalemkerian, G.P., Cease, K.B., Stella, P.J., Brenner, D.E., Troeschel, S., Johnson, C.S., Trump, D.L., 2013. A phase I/II pharmacokinetic and pharmacogenomic study of calcitriol in combination with cisplatin and docetaxel in advanced non-small-cell lung cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 71, 1173–1182.
- Reddy, G.S., Tserng, K.Y., 1989. Calcitriol, end product of renal metabolism of 1,25-dihydroxyvitamin D3 through the C-24 oxidation pathway. *Biochemistry (Mosc.)* 28, 1763–1769.
- Reitsma, P.H., Rothberg, P.G., Astrin, S.M., Trial, J., Bar-Shavit, Z., Hall, A., Teitelbaum, S.L., Kahn, A.J., 1983. Regulation of myc gene expression in HL-60 leukaemia cells by a vitamin D metabolite. *Nature* 306, 492–494.
- Riek, A.E., Oh, J., Bernal-Mizrachi, C., 2013. 1,25(OH)₂ vitamin D suppresses macrophage migration and reverses atherogenic cholesterol metabolism in type 2 diabetic patients. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 136, 309–312.
- Rohan, J.N.P., Weigel, N.L., 2009. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ Reduces c-Myc Expression, Inhibiting Proliferation and Causing G₁ Accumulation in C4-2 Prostate Cancer Cells. *Endocrinology* 150, 2046–2054.
- Rowling, M.J., Kemmis, C.M., Taffany, D.A., Welsh, J., 2006. Megalin-mediated endocytosis of vitamin D binding protein correlates with 25-hydroxycholecalciferol actions in human mammary cells. *J. Nutr.* 136, 2754–2759.
- Rudolph, C.D., Rudolph, A.M., Lister, G.E., First, L.R., Gershon, A.A., 2011. *Rudolph's Pediatrics*, 22nd ed. New York.
- Saracligil, B., Ozturk, B., Unlu, A., Abusoglu, S., Tekin, G., 2017. The effect of vitamin D on MCF-7 breast cancer cell metabolism. *Bratisl. Med. J.* 118, 101–106.
- Schaefer, R.J., Bonor, J.C., Joglekar, M.S., van Golen, K.L., Nohe, A.G., 2013. 1,25 Dihydroxyvitamin D3 uptake is localized at caveolae and requires caveolar function. *J. Biomed. Nanotechnol.* 9, 1707–1715.
- Scher, H.I., Jia, X., Chi, K., de Wit, R., Berry, W.R., Albers, P., Henick, B., Waterhouse, D., Ruether, D.J., Rosen, P.J., Meluch, A.A., Nordquist, L.T., Venner, P.M., Heidenreich, A., Chu, L., Heller, G., 2011. Randomized, Open-Label Phase III Trial of Docetaxel Plus High-Dose Calcitriol Versus Docetaxel Plus Prednisone for Patients With Castration-Resistant Prostate Cancer. *J. Clin. Oncol.* 29, 2191–2198.
- Schwartz, G.G., Hill, C.C., Oeler, T.A., Becich, M.J., Bahnson, R.R., 1995. 1,25-dihydroxy-16-ene-23-yne-vitamin d3 and prostate cancer cell proliferation *in vivo*. *Urology* 46, 365–369.
- Schwartz, G.G., Hulka, B.S., 1990. Is vitamin D deficiency a risk factor for prostate cancer? (Hypothesis). *Anticancer Res.* 10, 1307–1311.
- Schwartz, G.G., Wang, M.H., Zang, M., Singh, R.K., Siegal, G.P., 1997. 1 alpha,25-Dihydroxyvitamin D (calcitriol) inhibits the invasiveness of human prostate cancer cells. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* 6, 727–732.

- Segaert, S., Garmyn, M., Degreef, H., Bouillon, R., 1997. Retinoic Acid Modulates the Anti-Proliferative Effect of 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ in Cultured Human Epidermal Keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 109, 46–54.
- Selvaraj, P., Harishankar, M., Afsal, K., 2015. Vitamin D: Immuno-modulation and tuberculosis treatment. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 93, 377–384.
- Shamseddine, A., Farhat, F.S., Elias, E., Khauli, R.B., Saleh, A., Bulbul, M.A., 2013. High-Dose Calcitriol, Docetaxel and Zoledronic Acid in Patients with Castration-Resistant Prostate Cancer: A Phase II Study. *Urol. Int.* 90, 56–61.
- Sica, A., Allavena, P., Mantovani, A., 2008. Cancer related inflammation: The macrophage connection. *Cancer Lett.* 267, 204–215.
- Simboli-Campbell, M., Narvaez, C.J., VanWeelden, K., Tenniswood, M., Welsh, J., 1997. Comparative effects of 1,25(OH)₂D₃ and EB1089 on cell cycle kinetics and apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* 42, 31–41.
- Slapak, C.A., Desforges, J.F., Fogaren, T., Miller, K.B., 1992. Treatment of acute myeloid leukemia in the elderly with low-dose cytarabine, hydroxyurea, and calcitriol. *Am. J. Hematol.* 41, 178–183.
- Srinivas, S., Feldman, D., 2009. A phase II trial of calcitriol and naproxen in recurrent prostate cancer. *Anticancer Res.* 29, 3605–3610.
- Studzinski, G.P., Reddy, K.B., Hill, H.Z., Bhandal, A.K., 1991. Potentiation of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine cytotoxicity to HL-60 cells by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ correlates with reduced rate of maturation of DNA replication intermediates. *Cancer Res.* 51, 3451–3455.
- Sun, F., Ju, C., Chen, J., Liu, S., Liu, N., Wang, K., Liu, C., 2012. Nanoparticles Based on Hydrophobic Alginate Derivative as Nutraceutical Delivery Vehicle: Vitamin D₃ Loading. *Artif. Cells Blood Substit. Biotechnol.* 40, 113–119.
- Sundaram, S., Sea, A., Feldman, S., Strawbridge, R., Hoopes, P.J., Demidenko, E., Binderup, L., Gewirtz, D.A., 2003. The combination of a potent vitamin D₃ analog, EB 1089, with ionizing radiation reduces tumor growth and induces apoptosis of MCF-7 breast tumor xenografts in nude mice. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 9, 2350–2356.
- Swami, S., Krishnan, A.V., Wang, J.Y., Jensen, K., Horst, R., Albertelli, M.A., Feldman, D., 2012. Dietary Vitamin D₃ and 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (Calcitriol) Exhibit Equivalent Anticancer Activity in Mouse Xenograft Models of Breast and Prostate Cancer. *Endocrinology* 153, 2576–2587.
- Swami, S., Krishnan, A.V., Wang, J.Y., Jensen, K., Peng, L., Albertelli, M.A., Feldman, D., 2011. Inhibitory Effects of Calcitriol on the Growth of MCF-7 Breast Cancer Xenografts in Nude Mice: Selective Modulation of Aromatase Expression *in vivo*. *Horm. Cancer* 2, 190–202.
- Takeda, S., Yoshizawa, T., Nagai, Y., Yamato, H., Fukumoto, S., Sekine, K., Kato, S., Matsumoto, T., Fujita, T., 1999. Stimulation of Osteoclast Formation by 1,25-Dihydroxyvitamin D Requires Its Binding to Vitamin D Receptor (VDR) in Osteoblastic Cells: Studies Using VDR Knockout Mice. *Endocrinology* 140, 1005–1008.
- Thill, M., Cordes, T., Hoellen, F., Becker, S., Dittmer, C., Kümmel, S., Salehin, D., Friedrich, M., Diedrich, K., Köster, F., 2012. Influence of calcitriol on prostaglandin- and vitamin D-metabolising enzymes in benign and malignant breast cell lines. *Anticancer Res.* 32, 359–365.
- Ting, H.-J., Hsu, J., Bao, B.-Y., Lee, Y.-F., 2007. Docetaxel-induced growth inhibition and apoptosis in androgen independent prostate cancer cells are enhanced by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. *Cancer Lett.* 247, 122–129.

- Torres, R., Calle, C., Aller, P., Mata, F., 2000. Etoposide stimulates 1,25-dihydroxyvitamin D₃ differentiation activity, hormone binding and hormone receptor expression in HL-60 human promyelocytic cells. *Mol. Cell. Biochem.* 208, 157–162.
- Trochoutsou, A., Kloukina, V., Samitas, K., Xanthou, G., 2015. Vitamin-D in the Immune System: Genomic and Non-Genomic Actions. *Mini-Rev. Med. Chem.* 15, 953–963.
- Trump, D.L., 2018. Calcitriol and cancer therapy: A missed opportunity. *Bone Rep.* 9, 110-119.
- Tuohimaa, P., Lou, Y.-R., 2012. Optimal serum calcidiol concentration for cancer prevention. *Anticancer Res.* 32, 373–381.
- van Driel, M., Koedam, M., Buurman, C.J., Hewison, M., Chiba, H., Uitterlinden, A.G., Pols, H.A.P., van Leeuwen, J.P.T.M., 2006. Evidence for auto/paracrine actions of vitamin D in bone: 1 α -hydroxylase expression and activity in human bone cells. *FASEB J.* 20, 2417–2419.
- Vink-van Wijngaarden, T., Pols, H.A., Buurman, C.J., van den Bemd, G.J., Dorssers, L.C., Birkenhäger, J.C., van Leeuwen, J.P., 1994. Inhibition of breast cancer cell growth by combined treatment with vitamin D₃ analogues and tamoxifen. *Cancer Res.* 54, 5711–5717.
- Wahler, J., So, J.Y., Kim, Y.C., Liu, F., Maehr, H., Uskokovic, M., Suh, N., 2014. Inhibition of the Transition of Ductal Carcinoma In Situ to Invasive Ductal Carcinoma by a Gemini Vitamin D Analog. *Cancer Prev. Res. (Phila. Pa.)* 7, 617–626.
- Wang, X., Rao, J., Studzinski, G.P., 2000. Inhibition of p38 MAP Kinase Activity Up-Regulates Multiple MAP Kinase Pathways and Potentiates 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-Induced Differentiation of Human Leukemia HL60 Cells. *Exp. Cell Res.* 258, 425–437.
- Welsh, J., 2017. Vitamin D and breast cancer: Past and present. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 177, 15-20.
- Welsh, J., 2011. Vitamin D metabolism in mammary gland and breast cancer. *Mol. Cell. Endocrinol.* 347, 55–60.
- Westin, S., Kurokawa, R., Nolte, R.T., Wisely, G.B., McInerney, E.M., Rose, D.W., Milburn, M.V., Rosenfeld, M.G., Glass, C.K., 1998. Interactions controlling the assembly of nuclear-receptor heterodimers and co-activators. *Nature* 395, 199–202.
- Woloszynska-Read, A., Johnson, C.S., Trump, D.L., 2011. Vitamin D and cancer: Clinical aspects. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 25, 605–615.
- Xie, S.P., James, S.Y., Colston, K.W., 1997. Vitamin D derivatives inhibit the mitogenic effects of IGF-I on MCF-7 human breast cancer cells. *J. Endocrinol.* 154, 495–504.
- Yamada, K., Mizusawa, M., Harima, A., Kajiwara, K., Hamaki, T., Hoshi, K., Kozai, Y., Kodo, H., 2006. Induction of remission of relapsed acute myeloid leukemia after unrelated donor cord blood transplantation by concomitant low-dose cytarabine and calcitriol in adults. *European Journal of Haematology* 77, 345–348. <https://doi.org/10.1111/j.0902-4441.2006.t01-1-EJH2570.x>
- Yu, W.D., McElwain, M.C., Modzelewski, R.A., Russell, D.M., Smith, D.C., Trump, D.L., Johnson, C.S., 1998. Enhancement of 1,25-dihydroxyvitamin D₃-mediated antitumor activity with dexamethasone. *J. Natl. Cancer Inst.* 90, 134–141.
- Yuan, L., Jiang, R., Yang, Y., Ding, S., Deng, H., 2012. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ inhibits growth of the breast cancer cell line MCF-7 and downregulates cytochrome P4501B1 through the COX-2/PGE₂ pathway. *Oncol. Rep.* 28, 2131–2137.

Chapitre II : Potentiel thérapeutique des macrophages

C'est au 19^{ème} siècle que les macrophages furent pour première fois décrits (Linehan et Fitzgerald, 2015). Leur nom est associé à leur rôle puisque le terme macrophage vient du grec macro, signifiant « gros » et phage, signifiant « mangeur ». Depuis, leur implication dans de nombreuses pathologies incluant des infections bactériennes (tuberculose), virales (VIH), ou parasitaires (Leishmaniose) ; des maladies auto-immunes (sclérose en plaques, arthrite rhumatoïde) ; ou encore le cancer, a été identifiée. Ils font donc l'objet de nombreux travaux visant à diminuer leur nombre, à modifier leur phénotype, ou encore à les utiliser en tant que vecteurs d'agents thérapeutiques. La stratégie majeure de ciblage des macrophages repose sur l'utilisation de nanovecteurs encapsulant des principes actifs, exploitant le rôle de phagocytose des macrophages. En effet, les macrophages peuvent internaliser des nanoparticules chargées d'actif (Gustafson *et al.*, 2015; Binnemars-Postma *et al.*, 2017). Plusieurs travaux ont d'ailleurs suggéré une implication des macrophages à l'activité des actifs encapsulés. En particulier, Miller *et al.* ont démontré *in vivo* que la réduction du nombre de macrophages associés aux tumeurs réduisait l'accumulation de nanoparticules et l'efficacité de l'actif encapsulé TAM (Miller *et al.*, 2015). La surface des nanoparticules peut être modifiée pour améliorer l'efficacité du ciblage des sous-populations des macrophages concernés après administration IV et limiter la toxicité de tels vecteurs suite à leur accumulation dans les organes du système réticulo-endothélial (foie, rate, moelle osseuse, ganglions lymphatiques), riches en macrophages. L'amélioration de l'efficacité du ciblage induite par la fonctionnalisation de surface des nanovecteurs permet également la délivrance locale d'une dose adéquate en actif d'intérêt.

Les mécanismes régissant les interactions entre les nanoparticules et les macrophages seront explicités dans ce chapitre. Les stratégies thérapeutiques exploitant les macrophages seront également abordées. Enfin, des exemples de vecteurs ayant démontré un intérêt vis-à-vis du ciblage des macrophages ainsi que leur application thérapeutique seront présentés.

II.1. Rôle biologique des macrophages

Les macrophages sont des cellules du système immunitaire existant aussi bien de manière permanente, en tant que macrophages résidents (cellules de Kupffer dans le foie, macrophages alvéolaires dans les poumons, ostéoclastes dans le tissu osseux,...), qu'en réponse à un stimuli où leurs précurseurs, les monocytes, sont alors recrutés localement au niveau du tissu enflammé et différenciés

en macrophages. Ils jouent un rôle dans l'immunité innée et dans l'immunité acquise (Classen *et al.*, 2009). Le recrutement local des macrophages a bien été décrit dans le cadre du cancer et est principalement dépendant de la chimiokine « C-C chemokine ligand 2 » (CCL2), aussi appelée protéine chimiotactique monocytaire-1 (MCP-1), ainsi que du facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages (GM-CSF en anglais, Mantovani et Locati, 2013). En effet, le GM-CSF est l'acteur principal de la maturation des monocytes, et de la prolifération et de la survie des macrophages. Ces derniers sont dotés de diverses fonctions :

- Phagocytose des organismes pathogènes et des cellules infectées, en apoptose, ou en nécrose.
- Présentation des antigènes en association avec le complexe majeur d'histocompatibilité, aboutissant à l'activation des lymphocytes T et des cellules « Natural Killer » (NK) qui vont participer à la défense de l'organisme.
- Participation à la réponse inflammatoire. Les macrophages interviennent à la fois lors de la première étape de la réaction inflammatoire en tant qu'immunostimulants et à la fin de l'inflammation pour assurer la cicatrisation des tissus concernés (Martinez et Gordon, 2014; Murray et Wynn, 2011). Les macrophages agissent par le biais de la production de divers facteurs. Par exemple, l'activité immunostimulante des macrophages est associée à une production de cytokines telles que le facteur de nécrose tumorale (tumor necrosis factor en anglais, ou TNF), ainsi que diverses interleukines (IL-1, IL-6, IL-8, et IL-12) (Arango Duque et Descoteaux, 2014).

Outre ces actions, les macrophages peuvent paradoxalement contribuer au développement de certaines pathologies, développées dans le paragraphe II.2. En effet, leur rôle est contrôlé par leur phénotype. Or, il existe une diversité phénotypique importante, et les macrophages ont un comportement dit « plastique ». En effet, ils ont la capacité d'acquérir un phénotype spécifique puis de changer de phénotype en fonction des stimulus locaux (cytokines, chimiokines et facteurs de croissance, Cui *et al.*, 2016).

II.2. Diversité phénotypique des macrophages

Sous l'influence de stimulus endogènes, les monocytes et macrophages circulants sont recrutés localement. Les monocytes sont alors différenciés en macrophages qui sont par la suite activés. Par ailleurs, le travail réalisé par De Palma *et al.* a démontré l'impact du phénotype des monocytes circulants sur le rôle des macrophages après différenciation (De Palma *et al.*, 2005). Récemment, des progrès ont été faits au niveau de la compréhension des mécanismes moléculaires régissant l'activation des macrophages. Celle-ci se fait en plusieurs étapes dont la première est l'activation de facteurs de transcription, les protéines cytoplasmiques latentes STAT (Signal

Transducers and Activators of Transcription), suite à l'interaction des interleukines, chimiokines, interférons et autres stimulus endogènes sécrétés localement avec leurs récepteurs membranaires (Mantovani et Locati, 2013). Les protéines STAT agissent en synergie avec d'autres facteurs de transcription, et sont impliqués dans l'expression des gènes régissant le phénotype des macrophages. De nombreux phénotypes ont été ainsi identifiés aussi bien chez l'Homme que dans les modèles murins en fonction des marqueurs exprimés à la surface des macrophages et du type de facteurs sécrétés régissant leur activité. Les macrophages produisent en effet des chimiokines, cytokines et autres molécules effectrices en partie responsables du maintien de leur phénotype et de leur multiplication. Ainsi, il existe un continuum d'états fonctionnels des macrophages dont les phénotypes immunostimulants (macrophages M1) et immunosuppresseurs (macrophages M2) sont les représentants extrêmes (Mantovani et Locati, 2013).

Les macrophages acquerraient un phénotype M1 après exposition à l'interféron IFN- γ , au lipopolysaccharide LPS et/ou à certaines cytokines (tumor necrosis factor- α (TNF- α) et granulocyte-macrophage colony-stimulating factor). Les macrophages M1 sont à l'origine de la production de cytokines pro-inflammatoires, notamment les interleukines IL-1 β , IL 12, IL 15, IL18, IL-23, MCP-1, le facteur TNF- α , l'interféron IFN- γ , des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS), ainsi que de la COX-2. Les M1, par le biais de la production de l'interféron IFN- γ , induisent la polarisation Th1 des lymphocytes T. Cette cascade de réactions fait des M1 des acteurs clé dans l'élimination de pathogènes, ainsi que dans la réponse anti-tumorale (Noy et Pollard, 2014). Cependant, les M1 sont à l'origine d'une destruction tissulaire et s'opposent à la régénération tissulaire ainsi qu'au phénomène de cicatrisation. L'état d'inflammation chronique maintenu par les M1 est contrebalancé par des mécanismes régulateurs aboutissant à une réponse anti-inflammatoire faisant intervenir les macrophages M2.

La différenciation en macrophages M2, anti-inflammatoires, serait quant à elle induite par les interleukines de type « Th2 » : IL-4 et IL-13 après activation des STAT6. Les macrophages M2 sont dotés d'une capacité de phagocytose importante permettant l'élimination de cellules apoptotiques et de débris cellulaires, et favorisent les phénomènes de réparation tissulaire et de cicatrisation par le biais d'actions pro-angiogènes et pro-fibrotiques (Noy et Pollard, 2014). Dans certaines études, les macrophages dont la fonction est dédiée à la cicatrisation sont différenciés des macrophages M2 et sont appelés « wound healing macrophages » (Mosser et Edwards, 2008). De manière générale, les M2 produisent ainsi les interleukines IL-8, IL-10, le tumor growth factor TGF- β , la molécule pro-angiogène VEGF (vascular endothelial growth factor en anglais), notamment responsable de la vascularisation tumorale, la métalloprotéase matricielle MMP-9 responsable du remodelage de la matrice extracellulaire et impliquée dans l'angiogenèse. Ils sont, par opposition aux M1, responsables de la polarisation Th2 des lymphocytes T (Noy et Pollard, 2014). Les lymphocytes Th2 soutiennent la différenciation des lymphocytes B pour la production d'anticorps et produisent ainsi divers facteurs

incluant les interleukines IL-4, et IL-10, maintenant le recrutement des monocytes et leur différenciation en macrophages M2 immunosuppresseurs (Cui *et al.*, 2016).

Les stimulus à l'origine de l'activation des macrophages sont produits par les cellules du système immunitaire inné (cellules dendritiques, Natural Killer, granulocytes) ou du système immunitaire adaptatif (Lymphocytes T auxiliaires et régulateurs) ainsi que par d'autres facteurs (Figure 12) (Mosser et Edwards, 2008).

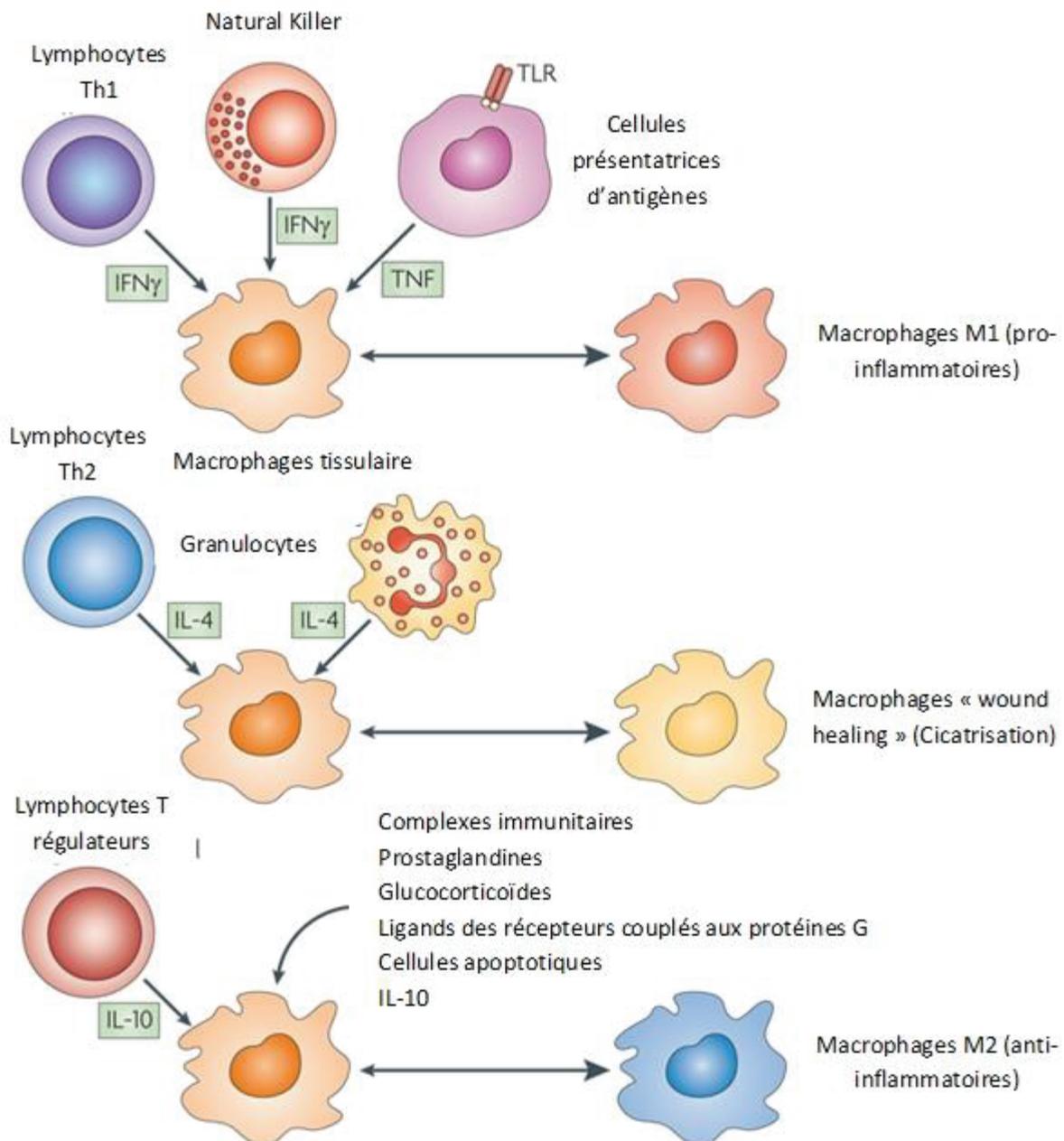


Figure 12. Polarisation des macrophages en réponse à la sécrétion de cytokines par les cellules immunitaires ou à d'autres facteurs (Mosser *et al.*, 2008)

Par ailleurs, le phénotype des macrophages dépend de leur localisation tissulaire (Gordon *et al.*, 2014). Ils sont également propres à chaque pathologie. Par exemple, l'arthrite rhumatoïde se caractérise par la présence de macrophages M1 (Szekanecz et Koch, 2007), l'infection par *Mycobacterium tuberculosis* se caractérise par la présence de macrophages M2 (El Kasmi *et al.*, 2008) et l'asthme par la présence de macrophages « wound healing » (Girodet *et al.*, 2016). Dans le cancer, les macrophages M1 et M2 sont simultanément présents, dépendamment de l'étape de la maladie et de leur localisation au sein de la tumeur (Zhang *et al.*, 2014).

Plusieurs études ont démontré la capacité des macrophages à changer de phénotype : c'est la plasticité phénotypique (Moghaddam *et al.*, 2018). Cette propriété est particulièrement intéressante dans le cadre du traitement des pathologies impliquant les macrophages puisqu'elle autorise une modulation de leurs fonctions, permettant une action thérapeutique sur long terme.

II.3. Nanoparticules et macrophages

Les macrophages étant reconnus pour leur capacité de phagocytose, les nano- et micro-particules ont fait l'objet d'un intérêt croissant pour le ciblage ou l'évitement de sous-populations de macrophages. De nombreuses études ont ainsi porté sur les mécanismes d'internalisation des particules ainsi que sur l'impact des propriétés physicochimiques de tels vecteurs, incluant leur taille, leur forme ou encore leurs propriétés de surface, sur leur internalisation et leur persistance au sein des macrophages. Elles feront l'objet des paragraphes II.3.1. et II.3.2. D'autres études ont porté sur l'évaluation de l'intérêt thérapeutique des vecteurs encapsulant des principes actifs dans le cas des pathologies pour lesquelles les macrophages jouent un rôle central (paragraphe II.4.).

II.3.1. Mécanismes d'internalisation

Lorsque les nanoparticules sont injectées par voie intraveineuse, elles sont rapidement éliminées de la circulation sanguine par les macrophages du système réticulo-endothélial, principalement par les macrophages du foie et de la rate qui les reconnaissent comme corps étrangers (Moghimi *et al.*, 2012). De nombreuses études ont été entreprises pour identifier les mécanismes d'internalisation des nanoparticules par les macrophages. Deux voies d'internalisation ont ainsi été identifiées : la phagocytose, voie majoritaire d'internalisation cellulaire des NPs, ainsi que le pinocytose (Figure 13) (Gustafson *et al.*, 2015; Mayor et Pagano, 2007).

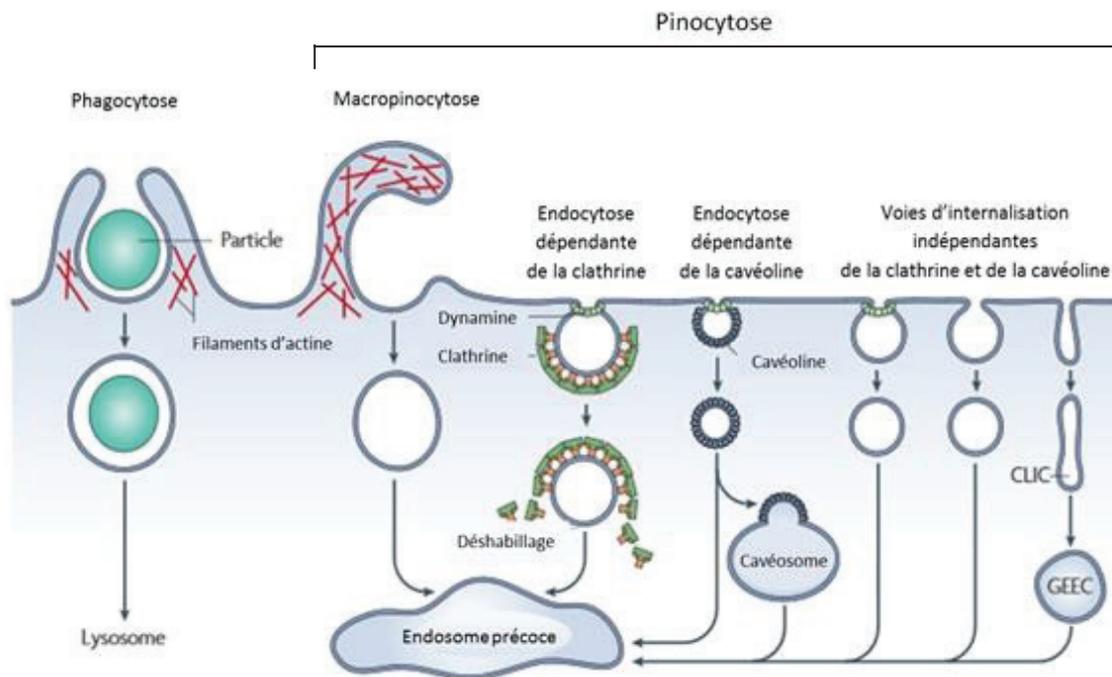


Figure 13 : Schématisation des différentes voies d'internalisation cellulaire des nanoparticules, d'après Mayor et Pagano, 2007

II.3.1.1. Phagocytose

La phagocytose est le mécanisme principal d'internalisation des NPs. C'est un mécanisme mis en place par les cellules du système immunitaire, y compris les macrophages, qui est constitué de 4 étapes : reconnaissance des NPs par les macrophages, adhésion des NPs à la surface des macrophages, ingestion et dégradation des NPs par les macrophages.

Ainsi, il a été démontré *in vivo* que la reconnaissance de tels systèmes par le système réticulo-endothélial requerrait au préalable l'adsorption de protéines sériques, les opsonines, à leur surface (Jenkin et Rowley, 1961). Les opsonines sont majoritairement représentées par les protéines du complément C3, C4 et C5 ainsi que les immunoglobulines, mais également par d'autres protéines sériques telles que la laminine, la fibronectine, la protéine C-réactive ou encore le collagène de type I (Owens et Peppas, 2006). Cette étape, aussi appelée opsonisation, est un processus rapide pouvant se faire en seulement quelques secondes (Owens et Peppas, 2006). La rencontre des opsonines avec les nanoparticules après injection IV se fait par le biais des mouvements Browniens qu'elles subissent. Ce sont ensuite diverses forces attractives telles que les forces de van der Waals, électrostatiques, ioniques ou encore hydrophobes/hydrophiles qui permettent l'adsorption des opsonines à la surface des nanoparticules (Owens et Peppas, 2006). Il est cependant possible de retarder ce phénomène en modifiant les propriétés physicochimiques des nanomatériaux (Gustafson *et al.*, 2015).

L'étape suivante de la phagocytose est l'adhésion des nanomatériaux opsonisés à la surface des macrophages, induite par l'activation de récepteurs tels que les récepteurs Fc ou les récepteurs au complément C3. Trois mécanismes pourraient donc intervenir dans cette deuxième étape, à savoir un changement conformationnel des opsonines présentes à la surface des nanomatériaux permettant leur activation et donc leur reconnaissance par les récepteurs aux opsonines présents à la surface des macrophages, l'adhésion non spécifique des phagocytes aux protéines sériques liées à des particules hydrophobes, ou encore l'activation du système complément (Gustafson *et al.*, 2015).

Enfin, les nanoparticules sont internalisées par les phagocytes par le biais d'une endocytose induite par l'invagination de la membrane des macrophages, permettant l'englobement des matériaux étrangers dans une vésicule appelée phagosome. Ce phénomène dépend de réorganisations de l'actine et de la membrane plasmique des macrophages. C'est alors dans le cytoplasme des macrophages qu'a lieu l'étape ultime de la phagocytose, qui consiste en la fusion du phagosome contenant les vecteurs, avec des lysosomes riches en enzymes digestives (hydrolases acides) et en dérivés réactifs de l'oxygène. C'est ainsi que sont formés les « phagolysosomes », permettant la digestion enzymatique du contenu du phagosome, en l'occurrence des nanoparticules.

Néanmoins, il est important de souligner que les NPs non biodégradables ne peuvent pas être dégradées par les macrophages et sont donc soit éliminées par le système rénal soit stockées dans un des organes du système réticulo-endothélial entraînant des toxicités. C'est pour cette raison que dans le cadre d'une application thérapeutique des vecteurs, le choix se porte communément sur l'utilisation de polymères biodégradables tels que l'acide poly(D,L)lactique (PLA), l'acide polyglycolique (PGA), l'acide poly-D,L- (lactique-co-glycolique) (PLGA), la polycaprolactone (PCL), ou le poly(alkylcyanoacrylates) (PACA). L'hydrolyse de ces polymères permet également de libérer le principe actif encapsulé et donc son action. Cependant, cette hydrolyse n'est pas favorable dans le cas de l'encapsulation de principes actifs sensibles à la dégradation enzymatique, en particulier l'ADN. C'est pourquoi des stratégies d'échappement du système endo-lysosomal ont été développées. Par exemple, l'environnement lysosomal étant très acide, l'échappement à ce compartiment est possible de par une inversion pH dépendante de la charge de surfaces des nanoparticules polymères de PLGA (Panyam *et al.*, 2002). Panyam *et al.* ont ainsi démontré que l'inversement de la charge (anionique vers cationique) des nanoparticules permettait une interaction de ces dernières avec la membrane endo-lysosomale et leur transport jusque dans le cytosol (Panyam *et al.*, 2002).

II.3.1.2. Pinocytose

La pinocytose est un mécanisme commun à toutes les cellules, et elle peut être divisée en deux sous-types, dépendamment de la taille des éléments internalisés. Ainsi, pour les matériaux de taille

comprise entre 0,5 et 5 μm , on parle de macropinocytose, et de micropinocytose pour des tailles inférieures. Dans ce dernier cas, les mécanismes impliqués peuvent être clathrine-dépendants ou indépendants (Figure 13) (Doherty et McMahon, 2009). La macropinocytose, bien que ne nécessitant pas d'opsonisation, est assez similaire à la phagocytose puisqu'elle implique aussi une déformation membranaire induite par des réarrangements de l'actine, sans toutefois former une vésicule à part entière (Kou *et al.*, 2013).

L'endocytose dépendante de la clathrine requiert la reconnaissance des nanomatériaux par les récepteurs au mannose, « scavengers » ou « toll like », présents à la surface des cellules (Rejman *et al.*, 2004). Par la suite, la membrane s'invagine et est recouverte d'un manteau de protéines « clathrine-1 ». L'activité GTPase de la dynamine permet l'individualisation d'une vésicule dont le manteau de clathrine-1 est par la suite dégradé, on parle de « déshabillage ». La dernière étape de la pinocytose clathrine-dépendante consiste en la fusion de la vésicule avec les endosomes, l'acidification du milieu interne de ces derniers et la digestion du contenu des endosomes, en l'occurrence les NPs, par les lysosomes.

L'endocytose dépendante de la cavéoline, activée par des ligands de la cavéoline ou des récepteurs exprimés au niveau des radeaux lipidiques (cf revue de Kiss et Botos (2009)), est également à l'origine de la formation d'une vésicule recouverte d'un manteau de cavéoline, fusionnant par la suite avec des cavéosomes. Les microtubules permettent le transport de ces derniers vers le réticulum endoplasmique dans le cytosol, puis jusque dans le noyau. Ce type d'endocytose permet donc l'échappement aux mécanismes de dégradations enzymatiques.

Des voies d'endocytose indépendantes de la clathrine et de la cavéoline ont également été décrites (Mayor et Pagano, 2007). Trois mécanismes ont été identifiés en fonction des GTPases impliquées, les classant en tant que voies CDC42-, RhoA- et ARF6-dépendantes. Ces voies ainsi que la voie dépendante de la clathrine requièrent notamment l'intervention du cholestérol (Kuhn *et al.*, 2014).

II.3.2. Propriétés des micro- et nano-particules influençant leur internalisation

L'internalisation des particules et leur biodistribution est modulée par leurs propriétés physicochimiques, comme illustré dans la Figure 14. L'impact de la taille et de la morphologie des particules ainsi que de leurs propriétés sur leur phagocytose sera discuté dans ce paragraphe.

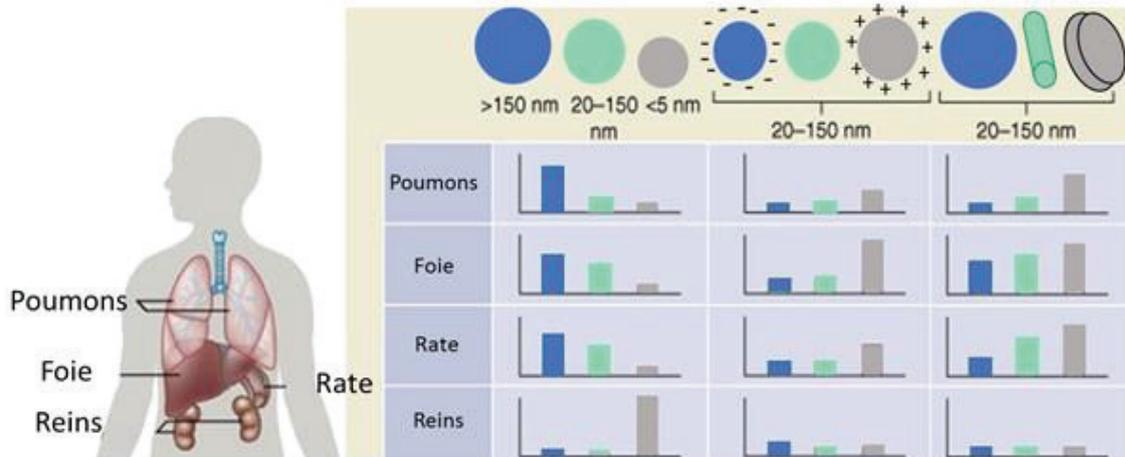


Figure 14 : Exemple illustrant l’influence de la taille, de la charge de surface, et de la morphologie de NPs sur leur biodistribution. Les graphiques représentent le pourcentage d’internalisation des NPs en fonction de leurs propriétés, d’après Blanco *et al.*, 2015

II.3.2.1. Taille

Il est généralement accepté que la voie d’internalisation des particules par les macrophages est corrélée à leur taille. Ainsi, les macrophages, mesurant entre 20 et 60 μm selon leur localisation, ne peuvent pas phagocyter de particules de taille supérieure à la leur. Beaucoup d’études ont ainsi étudié l’impact de la taille des particules sur leur phagocytose par les macrophages (Gustafson *et al.*, 2015). Tabata et Ikada ont étudié la phagocytose de sphères de polystyrène de tailles comprises entre 0,5 et 4,6 μm par des macrophages péritonéaux murins et ont observé une phagocytose maximale pour les particules mesurant 1,7 μm de diamètre (Tabata et Ikada, 1988). Sharma *et al.* ont observé ce phénomène de phagocytose avec des particules de polystyrène de tailles comprises entre 0,5 et 3,6 μm (Sharma *et al.*, 2010). Néanmoins, les auteurs ont observé que la phagocytose des plus grosses particules (3,6 μm) était moindre et qu’elle était moins importante pour les particules de taille intermédiaire (1 μm) par rapport aux nanoparticules de 0,5 μm de diamètre. De la même manière, la persistance des particules dans les macrophages est corrélée à leur taille, avec une persistance moindre des plus grosses particules (Sharma *et al.*, 2010).

Toujours en utilisant des particules de polystyrène, Champion *et al.* ont étudié l’impact de la taille des microparticules (1–6 μm) sur la capacité phagocytaire de macrophages alvéolaires de rats. Ils ont démontré une phagocytose maximale pour les particules de taille intermédiaire (2-3 μm), s’expliquant par un plus grand attachement des particules à la surface des macrophages (Champion *et al.*, 2008). Il est généralement accepté que l’internalisation des nanoparticules de taille inférieure à

200 nm se fait par endocytose dépendante de la clathrine (Oh *et al.*, 2009; Rejman *et al.*, 2004) et que celle des nanoparticules de taille inférieure à 80 nm se fait par endocytose dépendante de la cavéoline (Kou *et al.*, 2013). Cependant, Kuhn *et al.* ont observé que plusieurs voies étaient mises en place pour l'internalisation de nanoparticules de polystyrène de 40 nm par des macrophages murins (J774A.1), notamment la phagocytose, la macropinocytose, et l'endocytose dépendante de la clathrine (Kuhn *et al.*, 2014). De la même manière, Jiang *et al.* ont observé la participation de deux voies pour l'internalisation de NPs de chitosane de 250 nm de diamètre par des macrophages murins, à savoir l'endocytose dépendante de la clathrine et la phagocytose (Jiang *et al.*, 2017).

II.3.2.2. Propriétés de surface des nanoparticules

Compte tenu du fait que l'internalisation des macrophages se fait majoritairement par phagocytose, que celle-ci requiert leur opsonisation, et que cette dernière résulte d'interactions ioniques ou hydrophobes/hydrophiles entre les opsonines et la surface des nanoparticules, l'internalisation des nanoparticules est notamment reliée à leur charge de surface et la présence de groupements hydrophobes ou hydrophiles à leur surface (Owensiii et Peppas, 2006).

La PEGylation des nanoparticules est une stratégie largement utilisée pour l'échappement du système réticulo-endothélial, permettant le ciblage de sites d'intérêt, notamment dans le cas du cancer (Chen *et al.*, 2016). En effet, la PEGylation diminue la charge et l'hydrophobicité de surface des NPs qui sont alors dites furtives du fait de l'augmentation de leur durée de vie dans la circulation. Walkey *et al.* ont démontré *in vitro* que l'augmentation de la densité des PEG (masse moléculaire = 5000 Da) greffés à des nanoparticules d'or (0-10 PEG/nm²) diminuait l'adsorption des protéines sériques de par l'encombrement stérique provoqué par les chaînes PEG, suggérant l'importance de l'opsonisation des NPs dans le phénomène d'internalisation cellulaire (Figure 15) (Walkey *et al.*, 2012). Cela a également été observé dans le cas de liposomes unilamellaires mesurant de 10 à 150 nm de diamètre (Senior *et al.*, 1991).

De la même manière, Blunk *et al.* ont modifié la surface de nanoparticules de polystyrène (60 nm) en adsorbant à leur surface des copolymères d'hydrophilie croissante : les poloxamères 184, 188 et 407 (Blunk *et al.*, 1993). Les auteurs ont alors observé une plus forte opsonisation des nanoparticules plus hydrophobes (Blunk *et al.*, 1993).

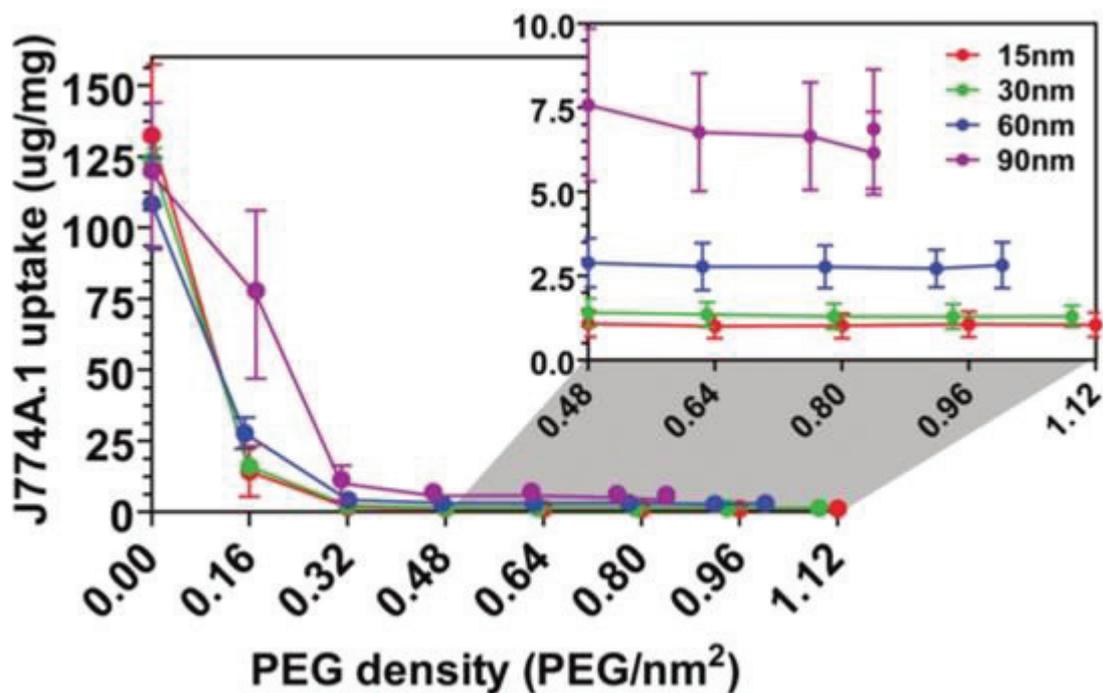


Figure 15. Impact de la PEGylation de nanoparticules d'or sur leur internalisation par les macrophages murins J774A.1. L'internalisation cellulaire, exprimée en μg de nanoparticules par mg des protéines cellulaires totales, a été mesurée après 5 heures d'exposition (Walkey *et al.*, 2012)

Il est généralement accepté que les nanoparticules chargées positivement sont plus internalisées que les NPs neutres ou chargées négativement du fait d'interactions électrostatiques avec les membranes cellulaires, dont la majorité sont chargées négativement. He *et al.* ont étudié l'impact de la charge de nanoparticules polymères sur leur internalisation par des macrophages murins péritonéaux et ont observé une augmentation de l'internalisation cellulaire avec la charge de surface des nanoparticules, qu'elle soit négative ou positive (He *et al.*, 2010). Cependant, les auteurs ont observé une internalisation plus importante des nanoparticules chargées positivement par les macrophages *in vitro* mais un ciblage tumoral d'autant plus efficace pour des NPs peu chargées négativement *in vivo* (He *et al.*, 2010). Cette dernière observation peut s'expliquer par une phagocytose moindre des NPs par le système réticulo-endothélial et est en accord avec deux autres études (Rattan *et al.*, 2017; Walkey *et al.*, 2012).

Rattan *et al.* ont acétylé des NPs à base de dendrimères et fonctionnalisées avec de l'acide folique pour neutraliser la charge de surface des NPs. Ils ont démontré *in vitro* que cette fonctionnalisation de surface permettait de diminuer les interactions avec le système réticulo-endothélial, représenté par une lignée de macrophages murins classiques (RAW264.7) (Rattan *et al.*,

2017). De plus, Rattan *et al.* ont démontré par le biais d'études d'internalisation que l'acétylation des dendrimères conjugués ne modifiait pas leur capacité à être internalisés par la lignée cellulaire de carcinome KB surexprimant le récepteur à l'acide folique, contrairement à la PEGylation.

II.3.2.3. Morphologie

Sharma *et al.* ont évalué l'impact de la forme de microparticules polymères (1 μm) sur la capacité phagocytaire des macrophages en utilisant la lignée de macrophages murins RAW264.7. Les auteurs ont ainsi démontré que les particules de forme « ellipsoïde oblique » étaient plus facilement phagocytées par les macrophages que les particules sphériques (Sharma *et al.*, 2010).

Champion *et al.* ont quant à eux observé l'impact de la capacité de macrophages alvéolaires à internaliser des microparticules de polystyrène de différentes morphologies (sphères, disques, ellipsoïdes). Ils ont démontré que la phagocytose des microparticules était dépendante de l'angle de contact initial entre les microparticules et la membrane du macrophage, donc à la fois de la morphologie des microparticules et de leur orientation lors du contact avec les macrophages (Champion *et al.*, 2008). Ce phénomène dépend de la déformation membranaire induite par l'actine nécessaire pour l'internalisation. Ainsi, dans le cas des particules ellipsoïdes, lorsque celle-ci est orientée de manière à initier un contact avec sa partie plus courbée (pointe) avec le macrophage, la vésicule entourée d'actine se forme : il y a phagocytose. Dans le cas où le contact entre cette même particule et le macrophage se fait sur sa face plate, l'attachement se fait mais la phagocytose n'a pas lieu (Figure 16) (Champion *et al.*, 2008).

II.3.2.4. Rigidité

La rigidité des particules est également un paramètre important dans la modulation de leur internalisation. Les études s'accordent sur le fait que les nanoparticules rigides sont plus facilement phagocytées par les macrophages. Ainsi, Beningo *et al.* ont observé une internalisation 6 fois plus importante des microparticules de poly-acrylamide (1 à 6 μm) rigides par des macrophages murins en comparaison aux mêmes particules souples (Beningo et Wang, 2002). Des résultats similaires ont été obtenus pour des nanoparticules PEGylées rigides d'environ 200 nm (Anselmo *et al.*, 2015). Anselmo *et al.* ont démontré *in vitro* sur une lignée de macrophages murins J774 cells que les NPs rigides étaient 4 fois plus internalisées que leurs analogues souples (Anselmo *et al.*, 2015). Ce phénomène peut s'expliquer par l'impact de la rigidité des NPs sur leur voie d'internalisation, leur opsonisation, ou encore par l'étape d'invagination membranaire induite par l'actine.

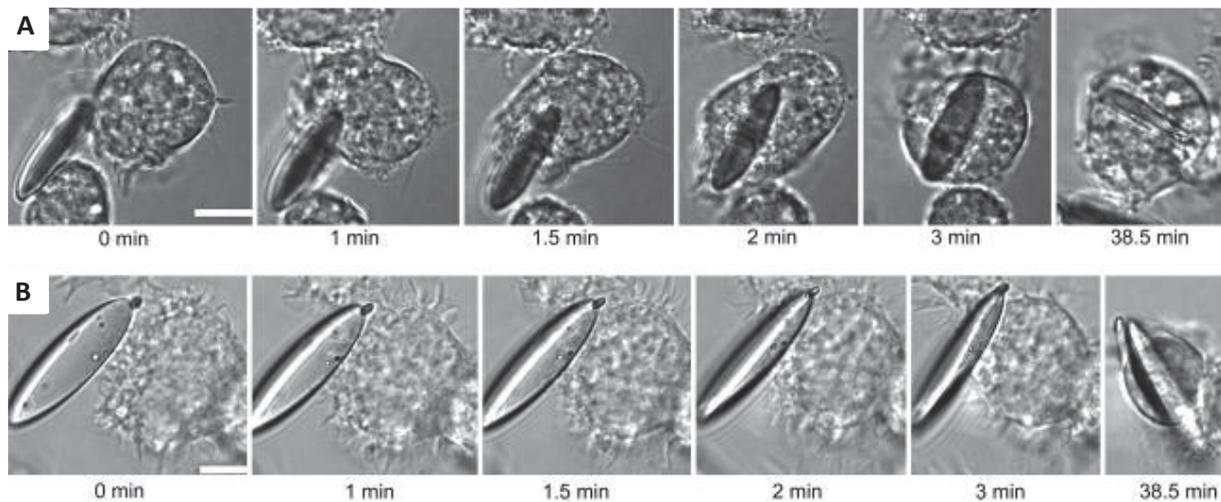


Figure 16. Influence de l'orientation des particules lors de leur contact avec des macrophages sur leur capacité à être phagocytées par ces derniers, d'après Champion *et al.*, 2008. Images de microscopie capturées en temps réel durant 39 min, mettant en évidence les interactions entre des macrophages et des particules ellipsoïdes identiques (axe majeur de la particule : 14 μm , axe mineur/pointe : 3 μm) à partir de deux orientations différentes. **(A)** Le macrophage se fixe le long de l'axe principal d'une particule ellipsoïde et l'internalise complètement en 3 min. **(B)** Le macrophage se fixe à la face plate de cette même particule ellipsoïde mais n'internalise pas la particule (Barres d'échelle: 10 μm).

II.4. Intérêt thérapeutique des macrophages

Les macrophages sont fortement impliqués dans le développement de diverses pathologies, faisant d'eux des cibles thérapeutiques d'intérêt. Leur ciblage et la modulation de leurs activités ont fait l'objet d'une multitude d'études dont les principales, menées dans le cadre du traitement de maladies inflammatoires, infectieuses ou du cancer, seront présentées dans ce paragraphe.

II.4.1. Maladies inflammatoires

Quelques travaux traitent du ciblage des macrophages pour le traitement des maladies inflammatoires, le but thérapeutique étant de limiter voire d'inhiber l'inflammation. Ainsi, Howard *et al.* ont développé des nanoparticules de chitosane pour la vectorisation de petits ARN interférents spécifiques du TNF- α , aux macrophages. Ces petits ARN interférents sont capables d'inhiber sélectivement la traduction des ARNm codant pour les protéines TNF- α , renversant alors leur activité pro-inflammatoire pour le traitement de l'arthrite (Howard *et al.*, 2009). Les auteurs ont ainsi démontré *in vitro* l'inhibition de la production de TNF- α par les macrophages après exposition aux NPs

ainsi qu'une diminution locale et systémique de la colite après injection intrapéritonéale de ces dernières à un modèle murin d'arthrite (Howard *et al.*, 2009).

Des nanoparticules d'alginate de calcium fonctionnalisées par l'ajout de L-thréonyl-L-lysyl-L-prolyl-L-arginine à leur surface et encapsulant un plasmide contenant l'ADN codant pour l'IL-10 ont été développées pour le ciblage des macrophages dans le cadre du traitement de l'arthrite (Jain *et al.*, 2015). L'efficacité de ciblage du tissu enflammé a été démontré *in vivo* chez des rats atteints d'arthrite après administration intrapéritonéale des NPs. De la même manière, Jain *et al.* ont démontré l'efficacité thérapeutique des NPs avec une réduction locale et systémique de la production de cytokine pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , et IL-6) et environ 66% de macrophages anti-inflammatoire après traitement contre seulement 9% chez les rats non traités. Ces résultats suggèrent donc une repolarisation des macrophages pro-inflammatoires vers un phénotype anti-inflammatoire (Jain *et al.*, 2015).

Gan *et al.* ont quant à eux conjugué des nanoparticules de dioxyde de silicium à des glucomannanes (30 nm) afin de cibler et activer les récepteurs au mannose surexprimés à la surface des macrophages immunosupresseurs (Gan *et al.*, 2018). Les auteurs ont démontré *in vitro* que l'exposition de macrophages dérivés de moelle osseuse aux NPs induisait la production de protéines anti-inflammatoires IL-10 et TGF- β sans toutefois diminuer la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL-6 et IL-12) par rapport aux macrophages non exposés. Par ailleurs, l'injection locale des NPs au niveau du côlon à un modèle murin de maladie inflammatoire de l'intestin a permis d'observer une augmentation d'IL-10, une diminution de la production de TNF- α , IL-1 β , IL-6 et IL-12 et une atténuation des symptômes inflammatoires par rapport aux souris non traitées (Gan *et al.*, 2018).

II.4.2. Maladies infectieuses

II.4.2.1. Infections bactériennes

La bactérie *Mycobacterium tuberculosis*, responsable de la tuberculose, infecte les macrophages alvéolaires de son hôte et s'y multiplie. Les macrophages permettent à *Mycobacterium tuberculosis* d'échapper au contact avec les agents anti-tuberculose (isoniazide, rifampicine, pyrazinamide, ethambutol, streptomycine), rendant le traitement contre la tuberculose inefficace. C'est pour cette raison que la vectorisation des agents utilisés pour le traitement de cette pathologie a été envisagée. Ainsi, l'avantage de microparticules polymères de PLA encapsulant à la fois l'isoniazide et la rifampicine a été démontré *in vitro* et *in vivo* avec une augmentation de la concentration intracellulaire en actifs après administration par inhalation à des rats en comparaison aux principes

actifs libres administrés par voie IV (Sharma *et al.*, 2001). Quelques années plus tard, Pandey *et al.* ont développé des nanoparticules polymères d'acide poly(lactique-co-glycolique) mesurant de 186 à 290 nm et encapsulant l'isoniazide, la rifampicine et la pyrazinamide (Pandey *et al.*, 2003). L'administration par voie orale de ces NPs à des souris infectées par le pathogène a permis de démontrer une persistance des molécules encapsulées dans la circulation sanguine jusqu'à 9 jours après administration, et une élimination complète du pathogène après 5 doses à raison d'une dose administrée tous les 10 jours. La même équipe a démontré une amélioration de la biodisponibilité des principes actifs après administration par voie sous-cutanée à des souris en comparaison aux molécules non encapsulées (Pandey, 2004). De nombreux autres systèmes encapsulant des principes actifs anti-tuberculeux ont démontré un intérêt thérapeutique, notamment des nanoparticules lipidiques solides, des liposomes, ou encore des microémulsions, comme reviewé par Nasiruddin *et al.* (Nasiruddin *et al.*, 2017).

Par ailleurs, l'intérêt de l'encapsulation de la rifampicine dans des nanoparticules de polybutylcyanoacrylate vis-à-vis de son activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus* et *Mycobacterium avium* a été démontrée *in vitro* et *in vivo* (Skidan *et al.*, 2003). Les nanoparticules ont permis de tripler la concentration de rifampicine internalisée par des macrophages *in vitro* par rapport à sa forme libre. *In vivo*, l'administration des NPs encapsulant la rifampicine à des souris atteintes de salmonellose a permis 80% de survie contre 10% de survie après administration d'une dose deux fois plus importante de rifampicine libre (50 mg/Kg) (Skidan *et al.*, 2003).

Des nanogels à base de polycaprolactone sensibles aux lipases bactériennes et chargés en vancomycine, utilisée comme molécule modèle des antibiotiques hydrophiles, ont été étudiés dans le cas de l'infection à *Staphylococcus aureus* (Xiong *et al.*, 2012). Après internalisation du nanogel par les macrophages, une libération de la vancomycine permettant une inhibition de la croissance bactérienne a été observée (Xiong *et al.*, 2012).

Par ailleurs, l'encapsulation d'antibiotiques dans des nanocapsules est efficace pour le traitement de l'infection à *Helicobacter pylori* aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Jain *et al.*, 2009).

II.4.2.2. Infections virales

L'avantage des nanomédecines pour le ciblage des macrophages a été largement étudié dans le cas du virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Il n'est actuellement pas possible d'éliminer de manière radicale le virus de par son stockage dans les macrophages notamment (Mamo *et al.*, 2010). L'intérêt de l'encapsulation de l'éfavirenz, antirétroviral utilisé dans le traitement contre le VIH, dans des nanovecteurs à base de dendrimères de poly(propylèneimine) fonctionnalisés avec du mannose a

été étudié *in vitro* (Dutta *et al.*, 2007). Une plus forte internalisation de l'éfavirenz par les macrophages après encapsulation a été observée puisque celle-ci a été multipliée par 12 en comparaison à l'actif libre (Dutta *et al.*, 2007).

Des nanocapsules polymères de poly(iso-butylcyanoacrylate) encapsulant l'azidothymidine ont aussi démontré un ciblage important des macrophages par rapport à l'actif libre, avec une internalisation 30 fois plus importante *in vitro* de la forme encapsulée de l'azidothymidine (Hillaireau *et al.*, 2006)

Des liposomes encapsulant l'azidothymidine ont permis un ciblage du système réticulo-endothélial, intéressant dans le cas du traitement contre le VIH compte tenu de la réplication du virus au sein des macrophages (Phillips et Tsoukas, 1992).

L'internalisation de nanoparticules de poly (*n*-hexylcyanoacrylate) encapsulant l'azidothymidine par les macrophages du système réticulo-endothélial a été étudiée lors d'une étude menée par Löbenberg et Kreuter (Löbenberg et Kreuter, 1996). Après injection IV de l'azidothymidine libre ou encapsulée, les chercheurs ont observé une augmentation considérable de la concentration en azidothymidine dans les organes du système réticulo-endothélial (foie et rate) après encapsulation (Löbenberg et Kreuter, 1996).

L'implication des macrophages dans l'activité de nanosuspensions d'indinavir a par ailleurs été démontrée dans une étude *in vivo* menée chez des souris infectées par le VIH de type 1 (Dou *et al.*, 2006). En effet, les auteurs ont chargé des macrophages dérivés de moelle osseuse avec des nanosuspensions d'indinavir recouvertes par des phospholipides *ex vivo* et ont injecté par voie IV ces NPs chez des souris. Les auteurs ont observé un maintien de l'activité de l'indinavir pendant 14 jours avec une réduction du nombre de cellules infectées dans le plasma, les noeuds lymphatiques, les poumons, ainsi que dans le foie et la rate (Dou *et al.*, 2006).

II.4.2.3. Infections parasitaires

La leishmaniose est une maladie causée par les parasites *Leishmania*. Ces derniers profitent des macrophages pour subsister dans l'organisme et se développer. En effet, le parasite *Leishmania* n'est pas dégradé du fait du blocage de la formation de phagosomes. L'efficacité des traitements anti-leishmaniens reste à ce jour limitée par leur internalisation cellulaire. Les médicaments actuels employés pour le traitement de la leishmaniose se présentent sous la forme de dispersion colloïdales d'amphotéricine B par injection IV (Fungizone[®], Abelcet[®] et Amphocil[®]) ou de liposomes de 60 à 70 nm de diamètre (AmBisome[®]) (Torrado *et al.*, 2008). La formulation AmBisome[®] présente une

pharmacocinétique bien plus avantageuse de l'amphotéricine ainsi qu'une toxicité réduite par rapport à sa forme libre (Bekersky *et al.*, 2002; Wijnant *et al.*, 2017).

La rifampicine est un autre actif utilisé pour le traitement de la leishmaniose. Elle a été encapsulée dans des nanoparticules à base de chitosane fonctionnalisées par du mannose afin d'évaluer l'avantage de tel nanovecteurs vis-à-vis du ciblage des macrophages du système réticulo-endothélial (Chaubey et Mishra, 2014). L'étude *in vivo* de la biodistribution des NPs et de la rifampicine libre chez des rats a permis de démontrer une plus forte accumulation des NPs dans les organes riches en macrophages, notamment le foie et rate par rapport à l'actif libre (Chaubey et Mishra, 2014).

Kansal *et al.* ont développé des nanocapsules fonctionnalisées avec de la phosphatidylsérine pour l'encapsulation de la doxorubicine afin de cibler les récepteurs « scavengers » des macrophages (Khatik *et al.*, 2014). Une accumulation des nanocapsules encapsulant la doxorubicine au niveau des macrophages a été observée *in vitro* et au niveau des organes riches en macrophages *in vivo* chez des rats. De plus, l'activité anti-leishmanienne de la doxorubicine a été évaluée *in vivo* chez des hamsters porteurs du parasite et a démontré une activité bien plus importante après encapsulation avec $85 \pm 4\%$ et $43 \pm 2\%$ d'inhibition de la charge parasitaire splénique après administration, respectivement de la doxorubicine encapsulée et libre (Khatik *et al.*, 2014).

Enfin, l'efficacité de l'amphotéricine B encapsulée dans des nanoparticules fonctionnalisées avec du thiolate et du mannose contre le développement de *Leishmania donovani* a été évaluée *in vitro* et *in vivo* (Shahnaz *et al.*, 2017). *In vitro*, il a été observé que l'encapsulation augmentait 71 fois l'internalisation de l'amphotéricine B dans les macrophages infectés par rapport à l'actif libre et que l'IC₅₀ était diminuée de 13 fois, indiquant un intérêt thérapeutique majeur des nanovecteurs. Ceci a été confirmé *in vivo* chez un modèle murin de leishmaniose (Shahnaz *et al.*, 2017).

II.4.3. Cancer

II.4.3.1. Les macrophages associés aux tumeurs (TAMs)

Les tumeurs sont assimilées à des organes du fait de la diversité cellulaire qui les constituent, à savoir les cellules cancéreuses, les cellules souches cancéreuses, les fibroblastes, les cellules endothéliales et des cellules immunitaires, et de la communication entre ces types cellulaires. Parmi elles, la population de cellules immunitaires joue un rôle central dans l'inflammation associée au développement tumoral. En effet, plusieurs études épidémiologiques et cliniques ont démontré une prédisposition de patients atteints de maladies inflammatoires chroniques augmentant le risque de cancer, au niveau du même organe ou site anatomique, suggérant l'implication de cellules du système immunitaire dans le développement tumoral. En particulier, la relation entre un fort degré

d'infiltration des tumeurs par les macrophages avec une plus faible survie des patients a été observée dans le cas de cancers du sein, gastrique, digestif, ovarien, ou de la vessie, ou encore dans le cas de la leucémie (Cavnar *et al.*, 2017; Lewis et Pollard, 2006; Sica *et al.*, 2008). Les macrophages infiltrés dans les tumeurs, aussi appelés TAMs (tumor-associated macrophages en anglais) peuvent représenter jusqu'à 50% de la population tumorale et présentent majoritairement un phénotype pro-tumoral initié par le microenvironnement tumoral, participant ainsi à la progression de la maladie (Sica *et al.*, 2000). Les interactions des TAMs avec les autres cellules présentes au niveau tumoral tendent à renforcer cette activité pro-tumorale (Figure 17).



Figure 17. Exemples d'interaction entre les TAMs et les cellules tumorales ainsi que les cellules du système immunitaire infiltrées dans les tumeurs, d'après Zheng *et al.* (2017)

L'influence du microenvironnement tumoral sur la polarisation phénotypique des TAMs a notamment été démontrée *ex vivo* en cultivant des monocytes avec le milieu de culture de cellules de cancer du sein, aboutissant à la différenciation des monocytes en macrophages immunosuppresseurs (Sousa *et al.*, 2015b). De la même manière, Zhang *et al.* ont observé la polarisation de macrophages exposés au milieu de culture de cellules de cancer du côlon en macrophages immunosuppresseurs, suggérant l'implication de facteurs solubles dans l'activation et la polarisation des macrophages (Zhang *et al.*, 2016). Récemment, des monocytes exprimant un récepteur Tie2 ont été identifiés dans les cancers du sein (Guex *et al.*, 2015), colorectal, et du poumon (Venneri *et al.*, 2007). Ces monocytes sont préférentiellement recrutés à un stade précoce du développement tumoral et confèrent aux macrophages issus de leur différenciation une activité pro-angiogène. Les macrophages immunostimulants sont cependant également présents au niveau tumoral (Zhang *et al.*, 2014). Il a récemment été démontré *in vivo* que les facteurs sécrétés par les M1 stimulaient les cellules souches

mésenchymateuses présentes au niveau tumoral à recruter et différencier les macrophages circulants en M2 afin de réguler la réaction inflammatoire par le biais d'effets immunosuppresseurs menant à une croissance tumorale (Jia *et al.*, 2016). Les TAMs induisent la production de cathepsine dans certains cancers (pancréas, sein), ce phénomène étant favorisé par l'IL-4, elle-même responsable d'une induction du phénotype M2 des macrophages. L'induction de cathepsine est donc attribuée aux TAMs de phénotype M2, et est associée à une amélioration de la capacité des cellules cancéreuses à proliférer et se disséminer, et donc à la formation de métastases (Gocheva *et al.*, 2010). Par ailleurs, dans les zones hypoxiques de la tumeur, les cellules néoplasiques sécrètent des facteurs chimio-attractants induisant le recrutement des macrophages tels que le facteur HIF-1 (Werno *et al.*, 2010), MCP-1, les chimiokines CC, en particulier CCL2 (Hultgren *et al.*, 2017), le facteur de stimulation des colonies de macrophages CSF-1 (Lin *et al.*, 2001), ou encore la protéine MCP-1. Dépendamment de ces facteurs, de diverses cytokines et chimiokines, et de la nature de la tumeur, les macrophages acquièrent un phénotype immunosuppresseur/pro-tumoral ou immunostimulant/anti-tumoral, pouvant évoluer au cours de la progression tumorale (Yuan *et al.*, 2015). Ainsi, l'évolution du cancer tend à une polarisation des macrophages vers un phénotype immunosuppresseur. Les TAMs immunosuppresseurs sont impliqués dans les différentes étapes du développement tumoral, notamment la formation tissulaire, la croissance tumorale, l'angiogenèse et l'invasion par le biais de la sécrétion de divers facteurs (Figure 18).

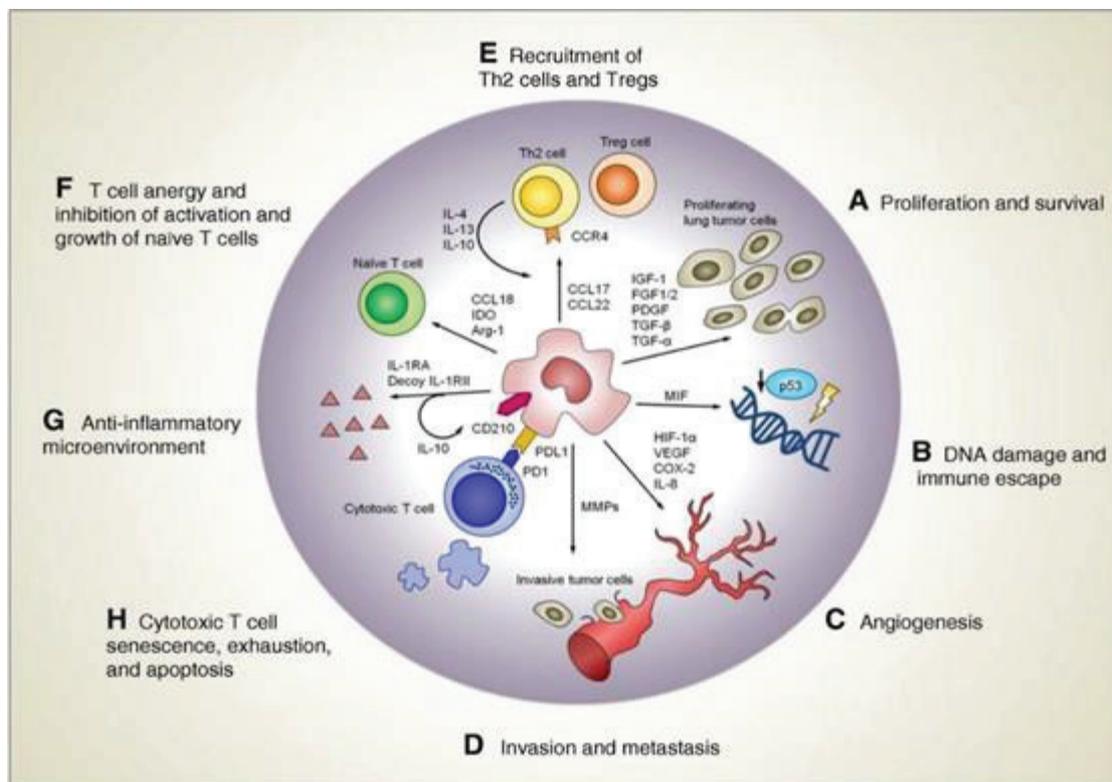


Figure 18. Fonctions pro-tumorales des TAMs et mécanismes associés (Conway *et al.*, 2016)

II.4.3.2. Stratégies thérapeutiques ciblant les TAMs

Compte tenu de l'implication des TAMs dans le développement tumoral, dans la diminution de la survie des patients atteints du cancer, et dans la résistance à la chimiothérapie, diverses approches thérapeutiques basées sur le ciblage des TAMs ont été envisagées (Figure 19) (Olson *et al.*, 2017; Petty et Yang, 2017; Ruffell et Coussens, 2015).

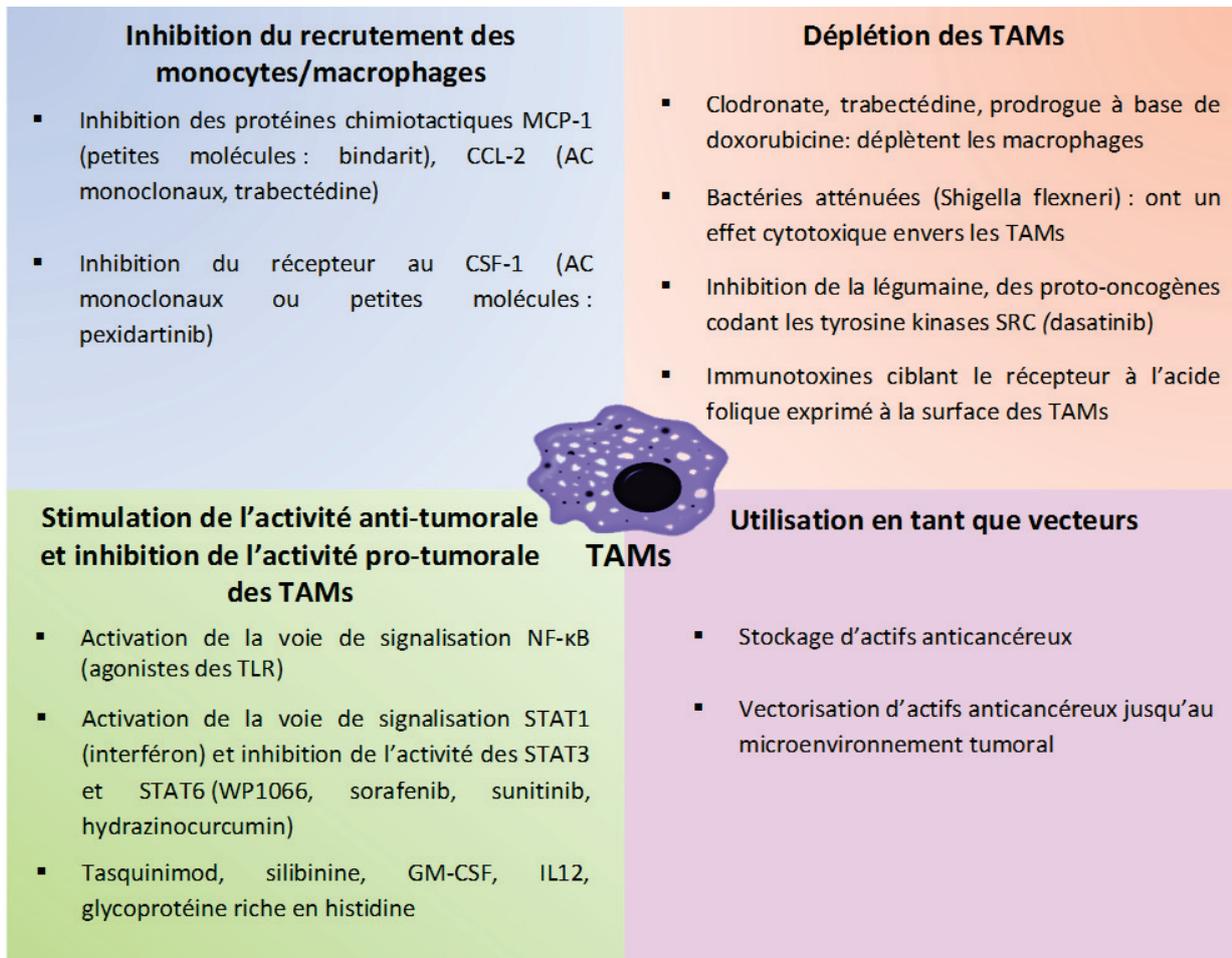


Figure 19. Stratégies thérapeutiques ciblant les TAMs et molécules associées

II.4.3.2.1. Inhibition du recrutement des monocytes/macrophages

Gazzaniga *et al.* ont inhibé la protéine chimio-attractante des monocytes MCP-1 avec du bindarit et ont évalué l'impact de cette inhibition *in vitro* et *in vivo* sur un modèle murin de mélanome (Gazzaniga *et al.*, 2007). Après administration de bindarit aux animaux, les auteurs ont observé une inhibition du recrutement des macrophages au niveau tumoral associée à une croissance tumorale moindre par rapport aux souris non traitées (Gazzaniga *et al.*, 2007).

Le recrutement des monocytes et macrophages peut également être limité par une inhibition de la chimiokine CCL-2. Fridlender *et al.* ont observé une diminution de la croissance cellulaire ainsi que l'inhibition de la formation de métastases après administration d'anticorps monoclonaux dirigés

contre CCL-2 chez un modèle murin de cancer du poumon non à petites cellules et métastasé (Fridlender *et al.*, 2011). Germano *et al.* ont traité différents modèles murins (fibrosarcome, carcinome ovarien, carcinome pulmonaire de Lewis) avec de la trabectédine, couramment utilisée en chimiothérapie (Germano *et al.*, 2013). Les auteurs ont observé une diminution de la production de chimiokines CCL-2 suite au traitement, et du recrutement de monocytes/macrophages circulants et des macrophages résidents de la rate, associés à une réduction de l'angiogenèse (Germano *et al.*, 2013).

Lin *et al.* ont observé l'avantage de l'inhibition du facteur stimulant de colonie CSF-1 chez des souris présentant une mutation du gène de CSF-1, rendant le facteur silencieux, et atteintes de tumeurs mammaires. Chez ces souris, les auteurs ont observé une infiltration moindre des tumeurs par les macrophages par rapport aux souris ne présentant pas de mutations, retardant ainsi l'invasion et la formation de métastases (Lin *et al.*, 2001). L'inhibition du récepteur au CSF-1 a également démontré des résultats prometteurs dans le cas de la thérapie anti-cancéreuse et fait actuellement l'objet de plusieurs études cliniques, par le biais de l'utilisation de petites molécules, notamment le pexidartinib (étude clinique de phase 3 en cours, NCT02371369) (Tap *et al.*, 2015), ou d'anticorps monoclonaux dirigés contre le récepteur (étude clinique de phase 2 en cours, NCT01643850) (Papadopoulos *et al.*, 2017). L'avantage de ces derniers a été suggéré à la suite de plusieurs études cliniques de phase 1 réalisées chez des patients atteints de tumeurs solides, et de cancers du sein ou de la prostate, comme reviewé par Cannarile *et al.*, 2017.

II.4.3.2.2. Déplétion

Plusieurs études reportent l'activité cytotoxique du clodronate envers les TAMs et son impact sur la croissance tumorale. Le clodronate fait partie de la famille des bisphosphonates qui sont prescrits pour le traitement de maladies et complications osseuses (ostéoporoses, métastases osseuses,...) ainsi que les hypercalcémies (De Rosa *et al.*, 2013). Ils sont également utilisés en clinique pour leur affinité pour le tissu osseux qui leur permet de traiter les métastases osseuses (cf chapitre III, paragraphe III.3.4.1.).

Gazzaniga *et al.* ont démontré que les liposomes encapsulant du clodronate exerçaient une activité cytotoxique envers les TAMs, limitant le développement tumoral *in vivo* chez un modèle murin de mélanome (Gazzaniga *et al.*, 2007).

Fritz *et al.* ont démontré que l'administration de liposomes encapsulant du clodronate à des modèles murins de cancer du poumon diminuait de plus de moitié la population de macrophages alvéolaires en comparaison aux souris non traitées. De la même manière, une diminution de plus de 50% de la charge tumorale a été observée chez les souris traitées, ainsi qu'une inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses (Fritz *et al.*, 2014).

Bader *et al.* ont également observé l'activité cytotoxique de liposomes encapsulant du clodronate envers les TAMs *in vivo* et la diminution consécutive de la croissance tumorale chez un modèle murin de cancer du côlon (Bader *et al.*, 2018).

Par ailleurs, Wu *et al.* ont démontré que l'administration de liposomes encapsulant du clodronate chez un modèle murin de Lymphome cutané épidermotrope agressif à cellules T permettait de diminuer le nombre de TAMs, menant à une croissance tumorale limitée par rapport aux souris traitées avec les liposomes non chargés. De plus, ils ont démontré *in vitro* la capacité ciblant des liposomes vis-à-vis de la population pro-tumorale des TAMs (Wu *et al.*, 2014).

Zeisberger *et al.* ont développé des liposomes encapsulant le clodronate afin d'évaluer leur intérêt thérapeutique pour le traitement du tératocarcinome et du rhabdomyosarcome (Zeisberger *et al.*, 2006). L'administration des clodrolip® aux modèles murins correspondants a permis une réduction de la croissance tumorale supérieure à 75% associée à une réduction de la vascularisation tumorale de par la déplétion des TAMs (Zeisberger *et al.*, 2006).

L'administration IV de trabectédine à différents modèles murins (fibrosarcome, carcinome ovarien, carcinome pulmonaire de Lewis) permet, en plus de l'inhibition du recrutement des monocytes et macrophages circulants (paragraphe II.4.3.2.1.), une réduction de la densité en TAMs pouvant s'expliquer par un rôle cytotoxique de l'actif vis-à-vis des macrophages (Germano *et al.*, 2013).

Galmbacher *et al.* se sont quant à eux intéressés à la bactérie *Shigella flexneri*, connue pour induire spécifiquement l'apoptose chez les macrophages (Galmbacher *et al.*, 2010). Dans le but d'évaluer l'impact de cette activité sur la régression tumorale, les auteurs ont injecté par voie IV une souche atténuée de la bactérie chez un modèle murin de cancer du sein. Un ciblage des TAMs consécutif à l'administration IV de la souche bactérienne a été observé, ainsi qu'une déplétion des TAMs associée à une réduction de plus de 70% du volume tumoral (Galmbacher *et al.*, 2010).

II.4.3.2.3. Polarisation des TAMs en macrophages anti-tumoraux

Comme décrit dans le paragraphe II.2., dépendamment de stimulus, les macrophages sont polarisés vers différents phénotypes leur conférant un large spectre d'activités. Considérant en plus leur plasticité phénotypique, il est aisé de les polariser ou de les repolariser vers un phénotype anti-tumoral, voire d'induire spécifiquement une de leurs actions.

L'ADN bactérien possède des effets immunostimulants régis par l'activation de la réponse des lymphocytes T auxiliaires (CD4⁺) dépendant de la présence de CpG-oligodéoxynucleotides non méthylés (Hemmi *et al.*, 2000). Hemmi *et al.* ont démontré que le mécanisme moléculaire mis en jeu dans l'action des CpG-oligodéoxynucleotides non méthylés présentes dans l'ADN bactérien incluait l'induction de la production de cytokines par les macrophages (TNF- α , IL-6, IL-12) ainsi qu'une

activation de la voie NF- κ B dépendante de sa liaison aux récepteurs de type Toll (TLR), notamment TLR9 (Hemmi *et al.*, 2000).

La polarisation des TAMs en macrophages anti-tumoraux est également favorisée par l'inhibition du facteur de transcription STAT-3 dans les macrophages. L'utilisation d'inhibiteurs de tyrosine kinases tels que le sorafenib et le sunitinib ont démontré des résultats prometteurs *in vitro* sur des cellules de carcinome rénal métastatique (Xin *et al.*, 2009). Edwards et Emens ont démontré que l'action du sorafenib dépendait de l'activation du phénotype anti-tumoral des TAMs, caractérisé par une augmentation notable de la production IL-12 et une inhibition de l'expression d'IL-10 *in vitro* (Edwards et Emens, 2010).

Huang *et al.* ont étudié l'intérêt thérapeutique de nanocomplexes conjuguant le polysaccharide cationique de *Bletilla striata* pourvu de nombreuses fonctions mannose permettant un ciblage des TAMs pro-tumoraux, et le microARN synthétique let-7b, connu pour se lier au TLR-7 et inhiber la production d'IL-10 (Huang *et al.*, 2016). Les auteurs ont décoré les nanocomplexes avec du PHA (PEG-histamine-modified alginate), sensible au pH acide du microenvironnement tumoral. Les nanocomplexes décorés ont démontré *in vitro* une stimulation de la production d'IL-12 et une diminution de l'expression d'IL-10, témoignant du phénotype anti-tumoral des TAMs. De plus, l'exposition des TAMs aux nanocomplexes décorés a provoqué une diminution des marqueurs des macrophages pro-tumoraux (Arg-1 et récepteur au mannose) et une augmentation des marqueurs des macrophages anti-tumoraux (iNOS), suggérant une repolarisation des TAMs M2 en M1. L'avantage de tels mécanismes a été confirmé *in vivo* chez un modèle murin de cancer du sein, avec une accumulation du complexe au niveau tumoral, une inhibition du développement tumoral ainsi qu'un doublement du temps de survie des souris après injection IV du système (Huang *et al.*, 2016).

Dans une étude clinique menée par Smith *et al.*, la capacité de l'imiquimod à induire une augmentation de la population des TAMs anti-tumoraux après application cutanée de l'actif chez 10 patients atteints de carcinomes à cellules squameuses a été démontrée (Smith *et al.*, 2004).

II.4.3.2.4. Transport et stockage d'actifs anti-cancéreux libres ou encapsulés dans des NPs

Plus récemment, des chercheurs se sont intéressés à l'utilisation des macrophages en tant que vecteurs d'actifs. Choi *et al.* ont marqué des macrophages *ex-vivo* avec de l'oxyde de fer qu'ils ont administré par voie intraveineuse à un modèle murin de carcinome pulmonaire (Choi *et al.*, 2012). Ils ont ainsi démontré par imagerie par résonance magnétique l'accumulation des macrophages marqués au niveau tumoral 2 à 5 jours après injection. Les auteurs ont ensuite chargé des macrophages avec des liposomes d'environ 150 nm de diamètre et encapsulant la doxorubicine *in vitro*, qu'ils ont administré aux souris par voie IV. Ils ont observé une accumulation plus importante de doxorubicine

au niveau tumoral par rapport aux liposomes encapsulant la doxorubicine et ont démontré une croissance tumorale moindre dans le groupe de souris ayant reçu le système macrophages-liposomes-doxorubicine par rapport aux autres traitements (Figure 20) (Choi *et al.*, 2012).

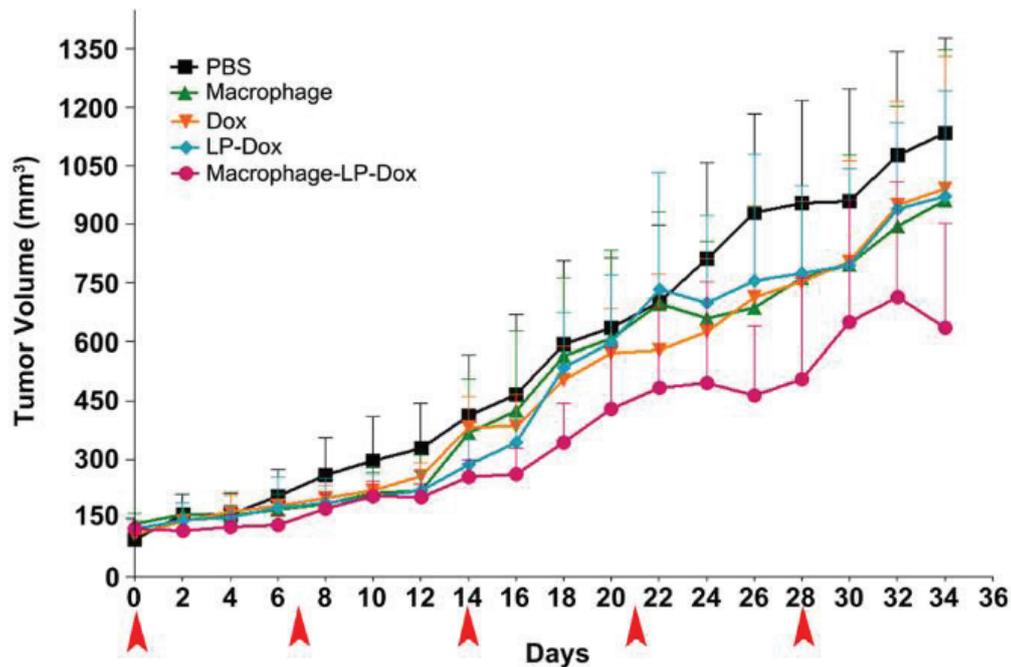


Figure 20. Intérêt des macrophages vis-à-vis de l'impact de la doxorubicine sur la croissance tumorale chez un modèle murin de xélogreffe de carcinome pulmonaire (Choi *et al.*, 2012)

Soma *et al.* ont quant à eux encapsulé la doxorubicine dans des NPs de poly-alkylcyanoacrylate (PACA) et ont démontré qu'elles maintenaient l'activité cytotoxique de l'actif *in vitro* sur une lignée de cellules de sarcome ovarien (M5076) en mono- et co-cultures avec des macrophages (Soma *et al.*, 2000). Les auteurs ont démontré que les macrophages permettaient un stockage des NPs et une libération de l'actif aux cellules cancéreuses.

Compte tenu du recrutement des macrophages et monocytes circulants au niveau tumoral, ces résultats sont prometteurs et laissent envisager l'utilisation de ces cellules en tant que vecteurs de NPs (Huang *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2015; Pang *et al.*, 2016). Le recrutement de ces cellules immunitaires peut d'ailleurs être induit par l'initiation d'une inflammation locale, possible par la radiothérapie notamment (Jiang *et al.*, 2015).

II.4.3.3. Ciblage des TAMs par les NPs

Diverses études ont démontré l'intérêt thérapeutique du ciblage des TAMs par les nanoparticules. La capacité de ciblage, passif ou actif, d'une large variété de nanovecteurs a ainsi été évaluée. Les études majeures sont présentées dans le paragraphe suivant.

II.4.3.3.1. Ciblage passif

De par leur fonction, les macrophages sont capables de reconnaître et d'internaliser les NPs par des mécanismes décrits dans les paragraphes II.3.1. et II.3.2. Le ciblage passif des macrophages repose sur deux approches, à savoir sur l'utilisation de nanovecteurs de 1^{ère} génération, c'est-à-dire de NPs ne présentant aucune modification de surface, ou sur l'utilisation de NPs 2^{ème} génération.

II.4.3.3.1.1. Nanovecteurs de première génération

Les nanoparticules de 1^{ère} génération ne permettent pas de ciblage tumoral (sauf foie/rate) après administration par voie IV, puisqu'elles sont rapidement éliminées de la circulation sanguine par les macrophages du système réticulo-endothélial. De ce fait, cette voie d'administration peut être intéressante dans le cas du ciblage de cancers et de métastases au niveau du foie ou de la rate. L'administration locale de ces NPs de première génération est donc nécessaire pour un ciblage des TAMs (Chellat *et al.*, 2005).

Tanei *et al.* ont évalué l'intérêt de rediriger les nanoparticules d'albumine liées au paclitaxel vers les macrophages en les vectorisant dans un nanovecteur multicouches à base de particules poreuses de silicone (MSV-nAb-PTX, 1 μ m). Ces NPs ont été utilisées pour le traitement de métastases hépatiques pour lesquelles aucun traitement efficace n'existe à ce jour du fait de leur faible vascularisation limitant la délivrance locale d'actifs. *In vivo*, l'administration intraveineuse des MSV-nAb-PTX a permis une accumulation 3 fois plus importante du paclitaxel au niveau du foie par rapport aux nanoparticules d'albumine liée au paclitaxel 1 jour après administration, avec une co-localisation des MSV-nAb-PTX avec les macrophages. La capacité des macrophages à internaliser, stocker, et libérer le paclitaxel pour qu'il exerce son activité cytotoxique a été démontrée *in vitro* sur une lignée cellulaire de cancer du sein (4T1). L'efficacité anti-tumorale des nanovecteurs a également été observée *in vivo* sur des modèles murins de cancers du sein et du poumon métastasés, avec un impact positif sur le temps de survie des souris (Tanei *et al.*, 2016).

Cullis *et al.* ont quant à eux démontré que les nanoparticules d'albumine liées au paclitaxel (Abraxane[®]), couramment utilisé en traitement de première ligne du cancer du pancréas en association avec la gemcitabine, étaient plus efficacement internalisés par les macrophages RAW 264.7 *in vitro* après 30 minutes d'exposition que le paclitaxel libre (Cullis *et al.*, 2017). Les auteurs ont également mis en évidence que le paclitaxel induisait l'expression génique et la production de cytokines anti-tumorales (IL1- α , IL1- β , IL6, et TNF- α) 8 heures après exposition par le biais du récepteur TLR4, indiquant une polarisation des macrophages vers un phénotype anti-tumoral. Ils ont d'ailleurs démontré que la liaison du paclitaxel à l'albumine potentialisait son action. Cette immunomodulation a été confirmée *in vivo* après injection intrapéritonéale de l'abraxane[®] chez un modèle murin de cancer du pancréas (Cullis *et al.*, 2017).

Zhao *et al.* ont conjugué des nanotubes de carbone à des CpG-oligodéoxynucleotides (CNT-CpG), qui exercent une action immunostimulante sur les TAMs afin d'évaluer leur potentiel anti-tumoral chez des souris porteuses de gliomes (Zhao *et al.*, 2011). L'administration intra-tumorale des CNT-CpG au modèle murin a démontré une amélioration de l'activité des CpG-oligodéoxynucleotides vis-à-vis des TAMs. Les auteurs ont aussi observé la stimulation d'une réponse immunitaire anti-tumorale suite à l'administration des CNT-CpG aux souris, résultant de leur internalisation par les cellules du système immunitaire associées au gliome, principalement les TAMs, comme démontré *in vitro* (Zhao *et al.*, 2011).

Bien que de nombreux vecteurs de première génération aient démontré une efficacité thérapeutique résultant d'une action sur les TAMs dans différents modèles tumoraux, ces vecteurs sont également reconnus par les cellules du système réticulo-endothélial, y compris par les macrophages de ce système, pouvant limiter la concentration en actif délivrée au niveau du site d'intérêt et provoquer des effets toxiques (Qie *et al.*, 2016). Pour permettre un ciblage plus efficace des TAMs, des modifications de surface des nanovecteurs ont été envisagées.

II.4.3.3.1.2. Nanovecteurs de 2^{ème} génération

Les nanovecteurs de deuxième génération se caractérisent par l'ajout de PEG à leur surface par adsorption ou par co-polymérisation avec le polymère formant les NPs, permettant de prolonger leur durée de vie dans la circulation et d'échapper au système réticulo-endothélial (Chen *et al.*, 2016). La furtivité de ces nanovecteurs de 2^{ème} génération leur permet d'atteindre le tissu tumoral après administration par voie IV puisqu'il se caractérise par une vascularisation importante, un endothélium vasculaire plus perméable avec des espaces intercellulaires allant jusqu'à 4 µm permettant la diffusion des NPs dans la tumeur, et un drainage lymphatique moindre permettant la rétention des NPs : c'est l'effet EPR (« *enhanced permeability and retention* ») (Figure 21) (Greish, 2010).

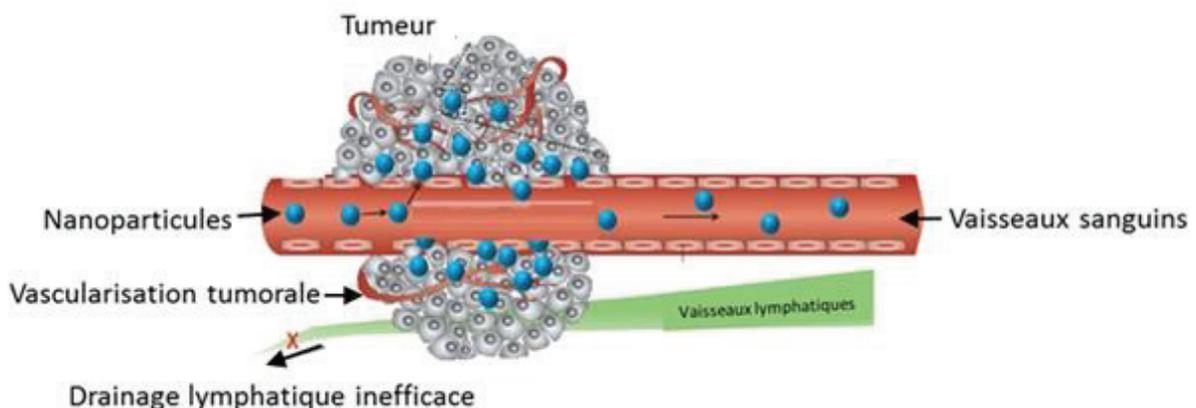


Figure 21. Illustration de l'effet EPR, permettant le ciblage tumoral passif par les nanoparticules PEGylées après administration IV (d'après Chinen *et al.*, 2015)

Ainsi, Miller *et al.* ont étudié l'impact des TAMs sur l'activité d'un composé dérivé de platine, actuellement utilisé en chimiothérapie, après encapsulation dans des nanoparticules de PLGA-PEG (Miller *et al.*, 2015). Les auteurs ont démontré que la déplétion des TAMs *in vivo* chez un modèle murin de fibrosarcome induite par l'administration de liposomes encapsulant le clodronate, diminuait l'accumulation intra-tumorale des NPs et leur efficacité thérapeutique suggérant l'implication importante des TAMs dans l'activité des NPs (Figure 22) (Miller *et al.*, 2015).

Shmeeda *et al.* ont développé des liposomes PEGylés (75-100 nm) encapsulant l'alendronate et la doxorubicine (PLAD) (Shmeeda *et al.*, 2016). L'administration IV des PLAD chez un modèle murin de carcinome du poumon résistant à la doxorubicine (greffe sous cutanée de cellules M109R) a démontré une efficacité anti-tumorale plus importante que les actifs libres, ces derniers n'ayant montré aucune réponse tumorale. Les PLAD ont également démontré une activité anti-tumorale supérieure à celle provoquée par le traitement des souris avec les liposomes n'encapsulant que l'un ou l'autre des actifs, indiquant une synergie entre l'alendronate et la doxorubicine. L'effet de ces liposomes a également été démontré sur des modèles de cancer ovarien et du col de l'utérus. L'effet anti-tumoral des liposomes PLAD est attribué à la repolarisation des TAMs pro-tumoraux en macrophages anti-tumoraux grâce à l'action de l'alendronate ainsi qu'à la cytotoxicité de la doxorubicine sur les cellules tumorales (Shmeeda *et al.*, 2016).

Dans une autre étude, l'efficacité anti-tumorale de liposomes PEGylés encapsulant la simvastatine (LCL-SIM) a été évaluée chez un modèle murin de mélanome (Alupei *et al.*, 2015). La simvastatine est couramment utilisée dans le traitement de l'hypercholestérolémie mais agit aussi en tant qu'actif anti-cancéreux de par une action sur les TAMs, à savoir la réduction du stress oxydatif induit par ces derniers. Chez le groupe de souris ayant reçu les LCL-SIM, une inhibition de la croissance tumorale importante (85%) a été observée, contrairement au groupe de souris ayant reçu la simvastatine libre pour lequel aucune activité anti-cancéreuse n'a été observée (Alupei *et al.*, 2015).

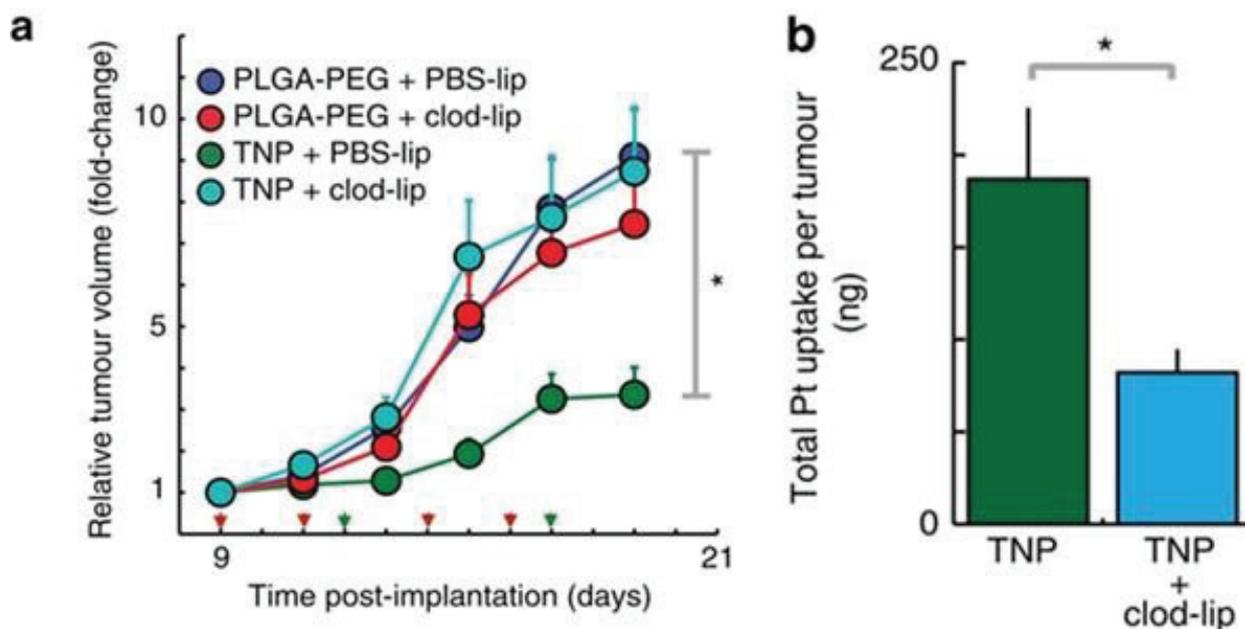


Figure 22. Activité et accumulation intra-tumorale des nanoparticules encapsulant un dérivé de platine. (a) La croissance tumorale chez un modèle murin de fibrosarcome a été évaluée après injection par voie IV de NPs blanches (PLGA-PEG) ou encapsulant le dérivé de platine (TNP). Les mêmes conditions ont été réalisées après déplétion des TAMs chez les souris par injection intrapéritonéale de liposomes encapsulant du clodronate (clod-lip). (b) Quantité intra-tumorale de dérivés de platine encapsulée (TNP), mesurée par spectrométrie d'absorption atomique. La même expérience est réalisée après déplétion des TAMs chez les souris (Miller *et al.*, 2015)

II.4.3.3.2. Ciblage actif

Des vecteurs de troisième génération ont également été développés dans le but de potentialiser l'efficacité du ciblage des TAMs. Ils se caractérisent par le greffage de ligands d'intérêt à leur surface, capables de reconnaître des récepteurs spécifiquement présents ou surexprimés au niveau tumoral. Parmi les ligands de choix pour le ciblage actif des TAMs, le peptide Lyp-1 et les polysaccharides tels que le mannose sont les deux stratégies les plus documentées.

En effet, les TAMs surexpriment la protéine p32 à leur surface, à laquelle le peptide Lyp-1 se lie spécifiquement. Sharma *et al.* ont développé des NPs polymères (PLGA) PEGylées fonctionnalisées avec le peptide Lyp-1 (190-270 nm) pour la distribution de clodronate au sein des TAMs (Sharma *et al.*, 2013). Bien que la libération du clodronate soit très rapide (80% dans les premières 24 heures), Sharma *et al.* ont observé une accumulation des NPs-LyP1 au niveau tumoral après administration IV à un modèle murin de xéno greffe de cancer du sein, ainsi qu'une diminution du nombre de TAMs. Ces travaux ont donné lieu à la publication d'un brevet pour les NPs polymères ainsi que les liposomes

(brevet US 2011/0311616 A1) (Sharma *et al.*, 2013). Le ciblage des TAMs après fonctionnalisation avec ce ligand a également été démontré avec des liposomes PEGylés encapsulant la doxorubicine sur un modèle murin de tumeur lymphatique métastatique (Yan *et al.*, 2012).

Les TAMs surexpriment aussi à leur surface le récepteur au mannose, appelé CD206 chez la souris et MRC-1 chez l'Homme. Des nanoparticules fonctionnalisées avec du mannose ont donc été développées et leur capacité de ciblage a été évaluée. Locke *et al.* ont ainsi démontré par imagerie l'accumulation de liposomes mannosylés au niveau tumoral 6 heures après administration IV chez un modèle murin d'adénocarcinome pulmonaire, alors que leurs analogues non mannosylés étaient distribués plus largement dans le tissu pulmonaire (Locke *et al.*, 2012).

Ortega *et al.* ont complexé des micelles polymères tri-blocs (butyl méthacrylate (BMA), poly(acide acrylique) (PAA), et acrylate de diméthylaminoéthyle (DMAEMA)) mannosylées avec des petits ARN interférents (Ortega *et al.*, 2015). Les micelles développées sont pH sensibles puisqu'à faible pH, les résidus carboxylate du PAA sont protonés, permettant un échappement endosomal. Par ailleurs, le DMAEMA possède des charges poly-cationiques capables de condenser les oligonucléotides poly-anioniques de l'ARN et donc leur rétention dans les micelles à pH physiologique. A faible pH, les micelles sont donc transportées dans le cytoplasme où la libération des ARN interférents fonctionnels a lieu. La capacité de ciblage des TAMs par les nanovecteurs a été confirmée *in vivo* chez des modèles murins de cancers du sein et ovarien (Ortega *et al.*, 2015).

Dans une autre étude, la capacité de ciblage des TAMs par des micelles polymères PEGylées et mannosylées pour la libération locale de petits ARN interférents a été évaluée (Yu *et al.*, 2013). Dans cette étude, les auteurs ont associé deux stratégies, l'une étant la furtivité des NPs jusqu'à l'arrivée des NPs dans le microenvironnement tumoral, par le biais d'une PEGylation sensible au pH acide du microenvironnement tumoral (6,8 vs 7,2 pour le pH sanguin) rendue possible grâce à la présence d'un bloc sensible au pH dans les copolymères tri-blocs (Figure 23), et l'autre étant le ciblage des récepteurs au mannose des TAMs. Yu *et al.* ont observé une augmentation de la libération des petits ARN interférents à des macrophages murins par rapport aux micelles non mannosylées et aux ARN libres, se traduisant par une fluorescence intracellulaire 40 et 4 fois plus importante qu'après exposition aux ARN libres et aux micelles non mannosylées, respectivement (Yu *et al.*, 2013).

Bien que cette étude ait montré des résultats prometteurs, elle est critiquable compte tenu de la faible variation de pH et du manque d'étude de stabilité des ARN. Une autre étude a démontré la capacité de ciblage des TAMs par des nanoparticules polymères (PLGA) PEGylées et mannosylées (Zhu *et al.*, 2013). Dans cette étude, Zhu *et al.* se sont également intéressés à la PEGylation sensible au pH acide grâce à une liaison hydrazone entre les chaînes PEG et le PLGA. Ils ont observé une accumulation plus importante des NPs PEGylées mannosylées dans les TAMs par rapports aux NPs PEGylées non mannosylées 12h après administration IV à un modèle murin de mélanome, ainsi qu'une accumulation

moins dans les organes du système réticulo-endothélial 6 h après injection à des souris (foie et rate) (Zhu *et al.*, 2013).

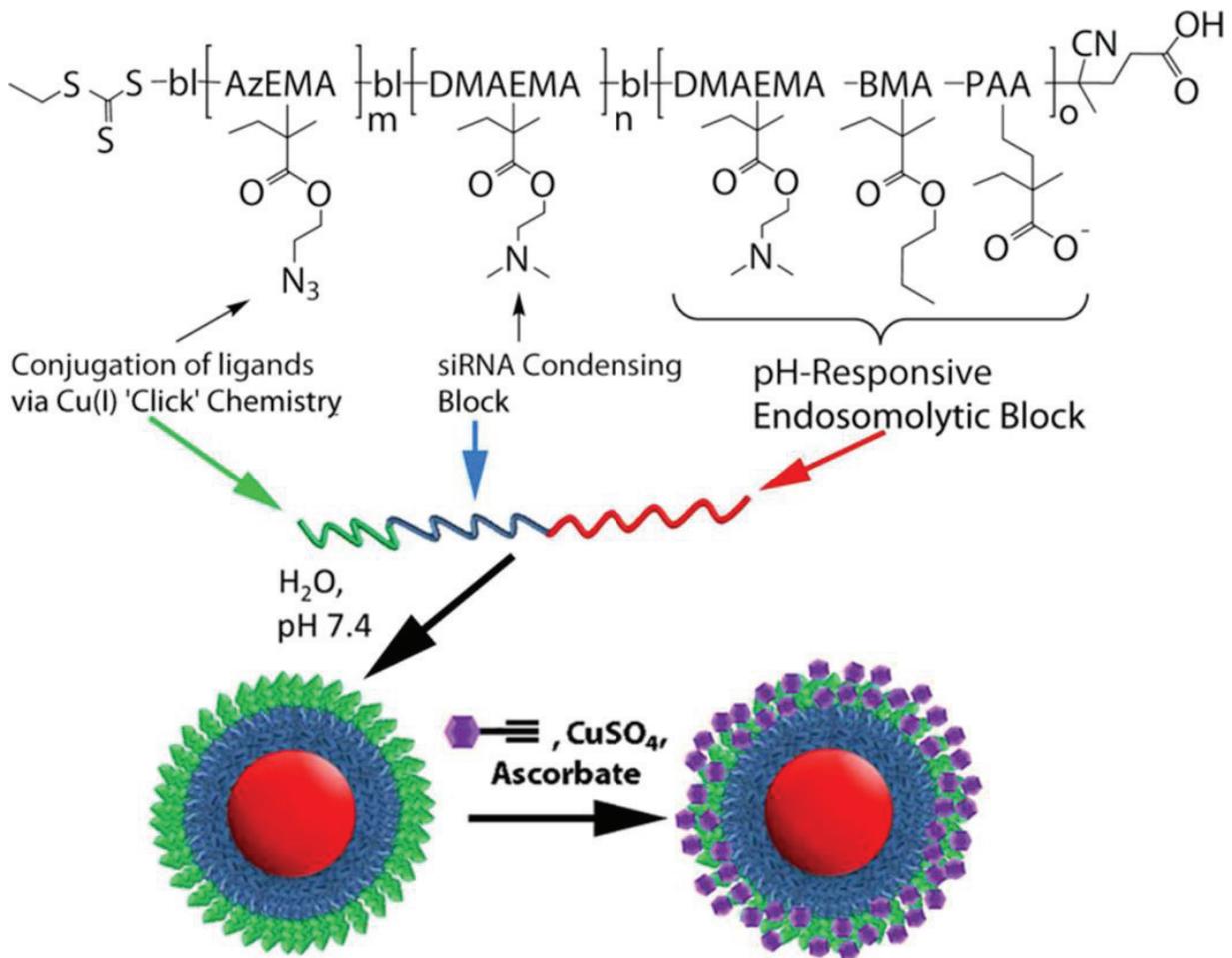


Figure 23. Structure des micelles polymères développées par Yu *et al.* (2013).

L'intérêt thérapeutique de NPs similaires a été évalué chez un modèle murin de cancer du sein « triple négatif », hautement infiltré par les macrophages par Niu *et al.* (Niu *et al.*, 2016). Niu *et al.* ont ainsi développé des NPs polymères (PLGA) d'environ 150 nm recouvertes d'un manteau de PEG sensible au pH et mannosylé. L'équipe a démontré la diminution de la densité en TAMs de près de 50% dans les 2 jours suivant l'administration IV des NPs contre moins de 15% après administration de doxorubicine libre. De plus, Niu *et al.* ont observé une inhibition de la croissance tumorale de manière plus importante chez les souris traitées aux NPs fonctionnalisées en comparaison aux souris traitées avec des NPs non fonctionnalisées ou avec la doxorubicine libre (Niu *et al.*, 2016).

D'autres ligands d'intérêt pour le ciblage des TAMs et du microenvironnement tumoral ont été identifiés, notamment avec le folate (Turk *et al.*, 2004), la légumine (Y. Lin *et al.*, 2013), ou le CD 163 (Etzerodt *et al.*, 2012).

II.5. Conclusion

Les macrophages jouent un rôle central dans la progression de diverses pathologies et constituent de ce fait une cible thérapeutique intéressante. Du fait du rôle phagocytaire des macrophages, différents types de nanovecteurs ont ainsi été développés pour l'encapsulation d'actifs et leur délivrance locale au niveau des sites pathologiques d'intérêt riches en macrophages. Le ciblage des TAMs est possible de manière passive par le biais de l'utilisation de nanoparticules de 1^{ère} ou de 2^{ème} génération. Le ciblage des TAMs par les NPs de 1^{ère} génération est efficace après administration locale des nanovecteurs, mais est restreint pour les autres voies d'administration du fait de leur capture et leur dégradation par les cellules phagocytaires du système réticulo-endothélial. La PEGylation (NPs de 2^{ème} génération) améliore ce ciblage puisqu'elle rend les NPs furtives, ce qui permet un ciblage tumoral après administration IV et l'échappement des macrophages du système réticulo-endothélial, mais pas de manière absolue. La quantité d'actifs délivrée au niveau tumoral, et par conséquent l'efficacité thérapeutique du traitement, est donc limitée. La fonctionnalisation de surface des nanoparticules a donc été développée pour permettre un ciblage actif des macrophages, efficace même après administration parentérale. Des résultats prometteurs quant au ciblage des macrophages ont ainsi été obtenus *in vitro* et *in vivo* dans le cadre de différentes approches thérapeutiques pour le traitement de maladies infectieuses telles que la leishmaniose ou le VIH, ainsi que pour le traitement du cancer notamment. Néanmoins, les mécanismes survenant après phagocytose des nanoparticules ne sont pas toujours clairement établis et nécessitent des études complémentaires.

II.6. Références

- Alupej, M.C., Licarete, E., Patras, L., Banciu, M., 2015. Liposomal simvastatin inhibits tumor growth via targeting tumor-associated macrophages-mediated oxidative stress. *Cancer Lett.* 356, 946–952.
- Anselmo, A.C., Zhang, M., Kumar, S., Vogus, D.R., Menegatti, S., Helgeson, M.E., Mitragotri, S., 2015. Elasticity of Nanoparticles Influences Their Blood Circulation, Phagocytosis, Endocytosis, and Targeting. *ACS Nano* 9, 3169–3177.
- Arango Duque, G., Descoteaux, A., 2014. Macrophage Cytokines: Involvement in Immunity and Infectious Diseases. *Front. Immunol.* 5, 491-502.
- Bader, J.E., Enos, R.T., Velázquez, K.T., Carson, M.S., Nagarkatti, M., Nagarkatti, P.S., Chatzistamou, I., Davis, J.M., Carson, J.A., Robinson, C.M., Murphy, E.A., 2018. Macrophage depletion using clodronate liposomes decreases tumorigenesis and alters gut microbiota in the AOM/DSS mouse model of colon cancer. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* 314, G22–G31.
- Bekersky, I., Fielding, R.M., Dressler, D.E., Lee, J.W., Buell, D.N., Walsh, T.J., 2002. Pharmacokinetics, Excretion, and Mass Balance of Liposomal Amphotericin B (AmBisome) and Amphotericin B Deoxycholate in Humans. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 828–833.
- Beningo, K.A., Wang, Y., 2002. Fc-receptor-mediated phagocytosis is regulated by mechanical properties of the target. *J. Cell Sci.* 115, 849–856.

- Blanco, E., Shen, H., Ferrari, M., 2015. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nat. Biotechnol.* 33, 941–951.
- Blunk, T., Hochstrasser, D.F., Sanchez, J.C., Müller, B.W., Müller, R.H., 1993. Colloidal carriers for intravenous drug targeting: plasma protein adsorption patterns on surface-modified latex particles evaluated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis* 14, 1382–1387.
- Cannarile, M.A., Weisser, M., Jacob, W., Jegg, A.-M., Ries, C.H., Rüttinger, D., 2017. Colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) inhibitors in cancer therapy. *J. Immunother. Cancer* 5, 53-65.
- Cavnar, M.J., Turcotte, S., Katz, S.C., Kuk, D., Gönen, M., Shia, J., Allen, P.J., Balachandran, V.P., D’Angelica, M.I., Kingham, T.P., Jarnagin, W.R., DeMatteo, R.P., 2017. Tumor-Associated Macrophage Infiltration in Colorectal Cancer Liver Metastases is Associated With Better Outcome. *Ann. Surg. Oncol.* 24, 1835–1842.
- Champion, J.A., Walker, A., Mitragotri, S., 2008. Role of Particle Size in Phagocytosis of Polymeric Microspheres. *Pharm. Res.* 25, 1815–1821.
- Chaubey, P., Mishra, B., 2014. Mannose-conjugated chitosan nanoparticles loaded with rifampicin for the treatment of visceral leishmaniasis. *Carbohydr. Polym.* 101, 1101–1108.
- Chen, S., Yang, K., Tuguntaev, R.G., Mozhi, A., Zhang, J., Wang, P.C., Liang, X.-J., 2016. Targeting tumor microenvironment with PEG-based amphiphilic nanoparticles to overcome chemoresistance. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 12, 269–286.
- Chinen, A.B., Guan, C.M., Ferrer, J.R., Barnaby, S.N., Merkel, T.J., Mirkin, C.A., 2015. Nanoparticle Probes for the Detection of Cancer Biomarkers, Cells, and Tissues by Fluorescence. *Chem. Rev.* 115, 10530–10574.
- Choi, J., Kim, H.-Y., Ju, E.J., Jung, J., Park, J., Chung, H.-K., Lee, J.S., Lee, J.S., Park, H.J., Song, S.Y., Jeong, S.-Y., Choi, E.K., 2012. Use of macrophages to deliver therapeutic and imaging contrast agents to tumors. *Biomaterials* 33, 4195–4203.
- Classen, A., Lloberas, J., Celada, A., 2009. Macrophage Activation: Classical Vs. Alternative, in: Reiner, N.E. (Ed.), *Macrophages and Dendritic Cells*. Humana Press 531, 29–43.
- Conway, E.M., Pikor, L.A., Kung, S.H.Y., Hamilton, M.J., Lam, S., Lam, W.L., Bennewith, K.L., 2016. Macrophages, Inflammation, and Lung Cancer. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 193, 116–130.
- Cui, R., Yue, W., Lattime, E.C., Stein, M.N., Xu, Q., Tan, X.-L., 2016. Targeting tumor-associated macrophages to combat pancreatic cancer. *Oncotarget* 7, 50735-50754.
- De Palma, M., Venneri, M.A., Galli, R., Sergi, L.S., Politi, L.S., Sampaolesi, M., Naldini, L., 2005. Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer Cell* 8, 211–226.
- De Rosa, G., Misso, G., Salzano, G., Caraglia, M., 2013. Bisphosphonates and Cancer: What Opportunities from Nanotechnology? *J. Drug Deliv.* 2013, 1–17.
- Doherty, G.J., McMahon, H.T., 2009. Mechanisms of Endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 857–902.
- Dou, H., Destache, C.J., Morehead, J.R., Mosley, R.L., Boska, M.D., Kingsley, J., Gorantla, S., Poluektova, L., Nelson, J.A., Chaubal, M., Werling, J., Kipp, J., Rabinow, B.E., Gendelman, H.E., 2006. Development of a macrophage-based nanoparticle platform for antiretroviral drug delivery. *Blood* 108, 2827–2835.
- Dutta, T., Agashe, H.B., Garg, M., Balasubramaniam, P., Kabra, M., Jain, N.K., 2007. Poly(propyleneimine) dendrimer based nanocontainers for targeting of efavirenz to human monocytes/macrophages *in vitro*: Research Paper. *J. Drug Target.* 15, 89–98.
- Edwards, J.P., Emens, L.A., 2010. The multikinase inhibitor Sorafenib reverses the suppression of IL-12 and enhancement of IL-10 by PGE2 in murine macrophages. *Int. Immunopharmacol.* 10, 1220–1228.

- El Kasmi, K.C., Qualls, J.E., Pesce, J.T., Smith, A.M., Thompson, R.W., Henao-Tamayo, M., Basaraba, R.J., König, T., Schleicher, U., Koo, M.-S., Kaplan, G., Fitzgerald, K.A., Tuomanen, E.I., Orme, I.M., Kanneganti, T.-D., Bogdan, C., Wynn, T.A., Murray, P.J., 2008. Toll-like receptor–induced arginase 1 in macrophages thwarts effective immunity against intracellular pathogens. *Nat. Immunol.* 9, 1399–1406.
- Etzerodt, A., Maniecki, M.B., Graversen, J.H., Møller, H.J., Torchilin, V.P., Moestrup, S.K., 2012. Efficient intracellular drug-targeting of macrophages using stealth liposomes directed to the hemoglobin scavenger receptor CD163. *J. Controlled Release* 160, 72–80.
- Fridlender, Z.G., Kapoor, V., Buchlis, G., Cheng, G., Sun, J., Wang, L.-C.S., Singhal, S., Snyder, L.A., Albelda, S.M., 2011. Monocyte Chemoattractant Protein–1 Blockade Inhibits Lung Cancer Tumor Growth by Altering Macrophage Phenotype and Activating CD8⁺ Cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 44, 230–237.
- Fritz, J.M., Tennis, M.A., Orlicky, D.J., Lin, H., Ju, C., Redente, E.F., Choo, K.S., Staab, T.A., Bouchard, R.J., Merrick, D.T., Malkinson, A.M., Dwyer-Nield, L.D., 2014. Depletion of Tumor-Associated Macrophages Slows the Growth of Chemically Induced Mouse Lung Adenocarcinomas. *Front. Immunol.* 5, 587-598.
- Galmbacher, K., Heisig, M., Hotz, C., Wischhusen, J., Galmiche, A., Bergmann, B., Gentschev, I., Goebel, W., Rapp, U.R., Fensterle, J., 2010. Shigella Mediated Depletion of Macrophages in a Murine Breast Cancer Model Is Associated with Tumor Regression. *PLoS ONE* 5, e9572.
- Gan, J., Dou, Y., Li, Y., Wang, Z., Wang, L., Liu, S., Li, Q., Yu, H., Liu, C., Han, C., Huang, Z., Zhang, J., Wang, C., Dong, L., 2018. Producing anti-inflammatory macrophages by nanoparticle-triggered clustering of mannose receptors. *Biomaterials* 178, 95–108.
- Gazzaniga, S., Bravo, A.I., Guglielmotti, A., van Rooijen, N., Maschi, F., Vecchi, A., Mantovani, A., Mordoh, J., Wainstok, R., 2007. Targeting Tumor-Associated Macrophages and Inhibition of MCP-1 Reduce Angiogenesis and Tumor Growth in a Human Melanoma Xenograft. *J. Invest. Dermatol.* 127, 2031–2041.
- Germano, G., Frapolli, R., Belgiovine, C., Anselmo, A., Pesce, S., Liguori, M., Erba, E., Uboldi, S., Zucchetti, M., Pasqualini, F., Nebuloni, M., van Rooijen, N., Mortarini, R., Beltrame, L., Marchini, S., Fuso Nerini, I., Sanfilippo, R., Casali, P.G., Pilotti, S., Galmarini, C.M., Anichini, A., Mantovani, A., D’Incalci, M., Allavena, P., 2013. Role of Macrophage Targeting in the Antitumor Activity of Trabectedin. *Cancer Cell* 23, 249–262.
- Girodet, P.-O., Nguyen, D., Mancini, J.D., Hundal, M., Zhou, X., Israel, E., Cernadas, M., 2016. Alternative Macrophage Activation Is Increased in Asthma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 55, 467–475.
- Gordon, S., Plüddemann, A., Martinez Estrada, F., 2014. Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions. *Immunol. Rev.* 262, 36–55.
- Greish, K., 2010. Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect for Anticancer Nanomedicine Drug Targeting, in: Grobmyer, S.R., Moudgil, B.M. (Eds.), *Cancer Nanotechnology*. Humana Press, 524, 25–37.
- Guex, N., Crespo, I., Bron, S., Ifticene-Treboux, A., Faes-van’t Hull, E., Kharoubi, S., Liechti, R., Werffeli, P., Ibberson, M., Majo, F., Nicolas, M., Laurent, J., Garg, A., Zaman, K., Lehr, H.-A., Stevenson, B.J., Rüegg, C., Coukos, G., Delaloye, J.-F., Xenarios, I., Doucey, M.-A., 2015. Angiogenic Activity of Breast Cancer Patients’ Monocytes Reverted by Combined Use of Systems Modeling and Experimental Approaches. *PLoS Comput. Biol.* 11, e1004050.
- Gustafson, H.H., Holt-Casper, D., Grainger, D.W., Ghandehari, H., 2015. Nanoparticle uptake: The phagocyte problem. *Nano Today* 10, 487–510.
- He, C., Hu, Y., Yin, L., Tang, C., Yin, C., 2010. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials* 31, 3657–3666.

- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., Akira, S., 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408, 740–745.
- Hillaireau, H., Le Doan, T., Appel, M., Couvreur, P., 2006. Hybrid polymer nanocapsules enhance *in vitro* delivery of azidothymidine-triphosphate to macrophages. *J. Controlled Release* 116, 346–352.
- Howard, K.A., Paludan, S.R., Behlke, M.A., Besenbacher, F., Deleuran, B., Kjems, J., 2009. Chitosan/siRNA Nanoparticle-mediated TNF- α Knockdown in Peritoneal Macrophages for Anti-inflammatory Treatment in a Murine Arthritis Model. *Molecular Therapy* 17, 162–168.
- Huang, W.-C., Chiang, W.-H., Cheng, Y.-H., Lin, W.-C., Yu, C.-F., Yen, C.-Y., Yeh, C.-K., Chern, C.-S., Chiang, C.-S., Chiu, H.-C., 2015. Tumortropic monocyte-mediated delivery of echogenic polymer bubbles and therapeutic vesicles for chemotherapy of tumor hypoxia. *Biomaterials* 71, 71–83.
- Huang, Z., Gan, J., Long, Z., Guo, G., Shi, X., Wang, C., Zang, Y., Ding, Z., Chen, J., Zhang, J., Dong, L., 2016. Targeted delivery of let-7b to reprogramme tumor-associated macrophages and tumor infiltrating dendritic cells for tumor rejection. *Biomaterials* 90, 72–84.
- Hultgren, E.M., Patrick, M.E., Evans, R.L., Stoos, C.T., Eglund, K.A., 2017. SUSD2 promotes tumor-associated macrophage recruitment by increasing levels of MCP-1 in breast cancer. *PLOS ONE* 12, e0177089.
- Jain, P., Jain, S., Prasad, K.N., Jain, S.K., Vyas, S.P., 2009. Polyelectrolyte Coated Multilayered Liposomes (Nanocapsules) for the Treatment of Helicobacter pylori Infection. *Mol. Pharm.* 6, 593–603.
- Jain, S., Tran, T.-H., Amiji, M., 2015. Macrophage repolarization with targeted alginate nanoparticles containing IL-10 plasmid DNA for the treatment of experimental arthritis. *Biomaterials* 61, 162–177.
- Jenkin, C.R., Rowley, D., 1961. The role of opsonins in the clearance of living and inert particles by cells of the reticuloendothelial system. *J. Exp. Med.* 114, 363–374.
- Jia, X., Feng, G., Wang, Z., Du, Y., Shen, C., Hui, H., Peng, D., Li, Z., Kong, D., Tian, J., 2016. Activation of mesenchymal stem cells by macrophages promotes tumor progression through immune suppressive effects. *Oncotarget* 7, 20934-20944.
- Jiang, L.Q., Wang, T.Y., Webster, T.J., Duan, H.-J., Qiu, J.Y., Zhao, Z.M., Yin, X.-X., Zheng, C.L., 2017. Intracellular disposition of chitosan nanoparticles in macrophages: intracellular uptake, exocytosis, and intercellular transport. *Int. J. Nanomedicine* Volume 12, 6383–6398.
- Jiang, P.-S., Yu, C.-F., Yen, C.-Y., Woo, C.W., Lo, S.-H., Huang, Y.-K., Hong, J.-H., Chiang, C.-S., 2015. Irradiation Enhances the Ability of Monocytes as Nanoparticle Carrier for Cancer Therapy. *PloS One* 10, e0139043.
- Khatik, R., Dwivedi, P., Khare, P., Kansal, S., Dube, A., Mishra, P.R., Dwivedi, A.K., 2014. Development of targeted 1,2-diacyl-sn-glycero-3-phospho- L -serine-coated gelatin nanoparticles loaded with amphotericin B for improved *in vitro* and *in vivo* effect in leishmaniasis. *Expert Opin. Drug Deliv.* 11, 633–646.
- Kiss, A.L., Botos, E., 2009. Endocytosis via caveolae: alternative pathway with distinct cellular compartments to avoid lysosomal degradation? *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 13, 1228–1237.
- Kou, L., Sun, J., Zhai, Y., He, Z., 2013. The endocytosis and intracellular fate of nanomedicines: Implication for rational design. *Asian J. Pharm. Sci.* 8, 1–10.
- Kuhn, D.A., Vanhecke, D., Michen, B., Blank, F., Gehr, P., Petri-Fink, A., Rothen-Rutishauser, B., 2014. Different endocytotic uptake mechanisms for nanoparticles in epithelial cells and macrophages. *Beilstein J. Nanotechnol.* 5, 1625–1636.

- Lewis, C.E., Pollard, J.W., 2006. Distinct Role of Macrophages in Different Tumor Microenvironments. *Cancer Res.* 66, 605–612.
- Lin, E.Y., Nguyen, A.V., Russell, R.G., Pollard, J.W., 2001. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J. Exp. Med.* 193, 727–740.
- Lin, Y., Wei, C., Liu, Y., Qiu, Y., Liu, C., Guo, F., 2013. Selective ablation of tumor-associated macrophages suppresses metastasis and angiogenesis. *Cancer Sci.* 104, 1217–1225.
- Linehan, E., Fitzgerald, D., 2015. Ageing and the immune system: focus on macrophages. *Eur. J. Microbiol. Immunol.* 5, 14–24.
- Löbenberg, R., Kreuter, J., 1996. Macrophage targeting of azidothymidine: a promising strategy for AIDS therapy. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 12, 1709–1715.
- Locke, L.W., Mayo, M.W., Yoo, A.D., Williams, M.B., Berr, S.S., 2012. PET imaging of tumor associated macrophages using mannose coated ⁶⁴Cu liposomes. *Biomaterials* 33, 7785–7793.
- Mamo, T., Moseman, E.A., Kolishetti, N., Salvador-Morales, C., Shi, J., Kuritzkes, D.R., Langer, R., Andrian, U. von, Farokhzad, O.C., 2010. Emerging nanotechnology approaches for HIV/AIDS treatment and prevention. *Nanomed.* 5, 269–285.
- Mantovani, A., Locati, M., 2013. Tumor-Associated Macrophages as a Paradigm of Macrophage Plasticity, Diversity, and Polarization: Lessons and Open Questions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33, 1478–1483.
- Martinez, F.O., Gordon, S., 2014. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* 6, 13–25.
- Mayor, S., Pagano, R.E., 2007. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 603–612.
- Miller, M.A., Zheng, Y.-R., Gadde, S., Pfirschke, C., Zope, H., Engblom, C., Kohler, R.H., Iwamoto, Y., Yang, K.S., Askevold, B., Kolishetti, N., Pittet, M., Lippard, S.J., Farokhzad, O.C., Weissleder, R., 2015. Tumour-associated macrophages act as a slow-release reservoir of nano-therapeutic Pt(IV) pro-drug. *Nat. Commun.* 6, 8692–9004.
- Moghaddam, A.S., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaeili, S.-A., Mardani, F., Seifi, B., Mohammadi, A., Afshari, J.T., Sahebkar, A., 2018. Macrophage plasticity, polarization and function in health and disease: Macrophages in Health and Disease. *J. Cell. Physiol.* 233, 6425–6440.
- Moghimi, S.M., Parhamifar, L., Ahmadvand, D., Wibroe, P.P., Andresen, T.L., Farhangrazi, Z.S., Hunter, A.C., 2012. Particulate Systems for Targeting of Macrophages: Basic and Therapeutic Concepts. *J. Innate Immun.* 4, 509–528.
- Mosser, D.M., Edwards, J.P., 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 958–969.
- Murray, P.J., Wynn, T.A., 2011. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 723–737.
- Nasiruddin, M., Neyaz, M.K., Das, S., 2017. Nanotechnology-Based Approach in Tuberculosis Treatment. *Tuberc. Res. Treat.* 2017, 1–12.
- Niu, M., Valdes, S., Naguib, Y.W., Hursting, S.D., Cui, Z., 2016. Tumor-Associated Macrophage-Mediated Targeted Therapy of Triple-Negative Breast Cancer. *Mol. Pharm.* 13, 1833–1842.
- Noy, R., Pollard, J.W., 2014. Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy. *Immunity* 41, 49–61.
- Oh, J.-M., Choi, S.-J., Lee, G.-E., Kim, J.-E., Choy, J.-H., 2009. Inorganic Metal Hydroxide Nanoparticles for Targeted Cellular Uptake Through Clathrin-Mediated Endocytosis. *Chem. - Asian J.* 4, 67–73.

- Olson, O.C., Kim, H., Quail, D.F., Foley, E.A., Joyce, J.A., 2017. Tumor-Associated Macrophages Suppress the Cytotoxic Activity of Antimitotic Agents. *Cell Rep.* 19, 101–113.
- Ortega, R.A., Barham, W.J., Kumar, B., Tikhomirov, O., McFadden, I.D., Yull, F.E., Giorgio, T.D., 2015. Biocompatible mannosylated endosomal-escape nanoparticles enhance selective delivery of short nucleotide sequences to tumor associated macrophages. *Nanoscale* 7, 500–510.
- Owensiii, D., Peppas, N., 2006. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 307, 93–102.
- Pandey, R., 2004. Subcutaneous nanoparticle-based antitubercular chemotherapy in an experimental model. *J. Antimicrob. Chemother.* 54, 266–268.
- Pandey, R., Zahoor, A., Sharma, S., Khuller, G., 2003. Nanoparticle encapsulated antitubercular drugs as a potential oral drug delivery system against murine tuberculosis. *Tuberculosis* 83, 373–378.
- Pang, L., Qin, J., Han, L., Zhao, W., Liang, J., Xie, Z., Yang, P., Wang, J., 2016. Exploiting macrophages as targeted carrier to guide nanoparticles into glioma. *Oncotarget* 7, 37081-37091.
- Panyam, J., Zhou, W.-Z., Prabha, S., Sahoo, S.K., Labhasetwar, V., 2002. Rapid endo-lysosomal escape of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles: implications for drug and gene delivery. *FASEB J.* 16, 1217–1226.
- Papadopoulos, K.P., Gluck, L., Martin, L.P., Olszanski, A.J., Tolcher, A.W., Ngarmchamnanrith, G., Rasmussen, E., Amore, B.M., Nagorsen, D., Hill, J.S., Stephenson, J., 2017. First-in-Human Study of AMG 820, a Monoclonal Anti-Colony-Stimulating Factor 1 Receptor Antibody, in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clin. Cancer Res.* 23, 5703–5710.
- Petty, A.J., Yang, Y., 2017. Tumor-associated macrophages: implications in cancer immunotherapy. *Immunotherapy* 9, 289–302.
- Phillips, N.C., Tsoukas, C., 1992. Liposomal encapsulation of azidothymidine results in decreased hematopoietic toxicity and enhanced activity against murine acquired immunodeficiency syndrome. *Blood* 79, 1137–1143.
- Qie, Y., Yuan, H., von Roemeling, C.A., Chen, Y., Liu, X., Shih, K.D., Knight, J.A., Tun, H.W., Wharen, R.E., Jiang, W., Kim, B.Y.S., 2016. Surface modification of nanoparticles enables selective evasion of phagocytic clearance by distinct macrophage phenotypes. *Sci. Rep.* 6, 26269-26279.
- Rattan, R., Bhattacharjee, S., Zong, H., Swain, C., Siddiqui, M.A., Visovatti, S.H., Kanthi, Y., Desai, S., Pinsky, D.J., Goonewardena, S.N., 2017. Nanoparticle-macrophage interactions: A balance between clearance and cell-specific targeting. *Bioorg. Med. Chem.* 25, 4487–4496.
- Rejman, J., Oberle, V., Zuhorn, I.S., Hoekstra, D., 2004. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem. J.* 377, 159–169.
- Ruffell, B., Coussens, L.M., 2015. Macrophages and Therapeutic Resistance in Cancer. *Cancer Cell* 27, 462–472.
- Senior, J., Delgado, C., Fisher, D., Tilcock, C., Gregoriadis, G., 1991. Influence of surface hydrophilicity of liposomes on their interaction with plasma protein and clearance from the circulation: Studies with poly(ethylene glycol)-coated vesicles. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1062, 77–82.
- Shahnaz, G., Edagwa, B.J., McMillan, J., Akhtar, S., Raza, A., Qureshi, N.A., Yasinzai, M., Gendelman, H.E., 2017. Development of mannose-anchored thiolated amphotericin B nanocarriers for treatment of visceral leishmaniasis. *Nanomed.* 12, 99–115.
- Sharma, G., Karmali, P.P., Sugahara, K.N., Xie, H., Kotamraju, V.R., Ruoslahti, E., Smith, J.W., 2013. Depletion of tumor-associated macrophages with clodronate-loaded PLGA nanoparticles. *Nano LIFE* 3, 1343005.

- Sharma, G., Valenta, D.T., Altman, Y., Harvey, S., Xie, H., Mitragotri, S., Smith, J.W., 2010. Polymer particle shape independently influences binding and internalization by macrophages. *J. Controlled Release* 147, 408–412.
- Sharma, R., Saxena, D., Dwivedi, A.K., Misra, A., 2001. Inhalable microparticles containing drug combinations to target alveolar macrophages for treatment of pulmonary tuberculosis. *Pharm. Res.* 18, 1405–1410.
- Shmeeda, H., Amitay, Y., Gorin, J., Tzemach, D., Mak, L., Stern, S.T., Barenholz, Y., Gabizon, A., 2016. Coencapsulation of alendronate and doxorubicin in pegylated liposomes: a novel formulation for chemoimmunotherapy of cancer. *J. Drug Target.* 24, 878–889.
- Sica, A., Allavena, P., Mantovani, A., 2008. Cancer related inflammation: The macrophage connection. *Cancer Lett.* 267, 204–215.
- Sica, A., Saccani, A., Bottazzi, B., Polentarutti, N., Vecchi, A., Damme, J.V., Mantovani, A., 2000. Autocrine Production of IL-10 Mediates Defective IL-12 Production and NF- κ B Activation in Tumor-Associated Macrophages. *J. Immunol.* 164, 762–767.
- Skidan, I.N., Gel'perina, S.E., Severin, S.E., Guliaev, A.E., 2003. [Enhanced activity of rifampicin loaded with polybutyl cyanoacrylate nanoparticles in relation to intracellularly localized bacteria]. *Antibiot. Khimioterapiia Antibiot. Chemoterapy Sic* 48, 23–26.
- Smith, K.J., Hamza, S., Skelton, H., 2004. Topical imidazoquinoline therapy of cutaneous squamous cell carcinoma polarizes lymphoid and monocyte/macrophage populations to a Th1 and M1 cytokine pattern. *Clin. Exp. Dermatol.* 29, 505–512.
- Soma, C.E., Dubernet, C., Barratt, G., Benita, S., Couvreur, P., 2000. Investigation of the role of macrophages on the cytotoxicity of doxorubicin and doxorubicin-loaded nanoparticles on M5076 cells *in vitro*. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 68, 283–289.
- Sousa, S., Brion, R., Lintunen, M., Kronqvist, P., Sandholm, J., Mönkkönen, J., Kellokumpu-Lehtinen, P.-L., Lanttia, S., Tynninen, O., Joensuu, H., Heymann, D., Määttä, J.A., 2015. Human breast cancer cells educate macrophages toward the M2 activation status. *Breast Cancer Res.* 17, 101-114.
- Szekanecz, Z., Koch, A.E., 2007. Macrophages and their products in rheumatoid arthritis: *Curr. Opin. Rheumatol.* 19, 289–295.
- Tabata, Y., Ikada, Y., 1988. Effect of the size and surface charge of polymer microspheres on their phagocytosis by macrophage. *Biomaterials* 9, 356–362.
- Tanei, T., Leonard, F., Liu, X., Alexander, J.F., Saito, Y., Ferrari, M., Godin, B., Yokoi, K., 2016. Redirecting Transport of Nanoparticle Albumin-Bound Paclitaxel to Macrophages Enhances Therapeutic Efficacy against Liver Metastases. *Cancer Res.* 76, 429–439.
- Tap, W.D., Wainberg, Z.A., Anthony, S.P., Ibrahim, P.N., Zhang, C., Healey, J.H., Chmielowski, B., Staddon, A.P., Cohn, A.L., Shapiro, G.I., Keedy, V.L., Singh, A.S., Puzanov, I., Kwak, E.L., Wagner, A.J., Von Hoff, D.D., Weiss, G.J., Ramanathan, R.K., Zhang, J., Habets, G., Zhang, Y., Burton, E.A., Visor, G., Sanftner, L., Severson, P., Nguyen, H., Kim, M.J., Marimuthu, A., Tsang, G., Shellooe, R., Gee, C., West, B.L., Hirth, P., Nolop, K., van de Rijn, M., Hsu, H.H., Peterfy, C., Lin, P.S., Tong-Starksen, S., Bollag, G., 2015. Structure-Guided Blockade of CSF1R Kinase in Tenosynovial Giant-Cell Tumor. *N. Engl. J. Med.* 373, 428–437.
- Torrado, J.J., Espada, R., Ballesteros, M.P., Torrado-Santiago, S., 2008. Amphotericin B Formulations and Drug Targeting. *J. Pharm. Sci.* 97, 2405–2425.
- Turk, M.J., Waters, D.J., Low, P.S., 2004. Folate-conjugated liposomes preferentially target macrophages associated with ovarian carcinoma. *Cancer Lett.* 213, 165–172.

- van Rooijen, N., Sanders, A., van den Berg, T.K., 1996. Apoptosis of macrophages induced by liposome-mediated intracellular delivery of clodronate and propamidine. *J. Immunol. Methods* 193, 93–99.
- Venneri, M.A., Palma, M.D., Ponzoni, M., Pucci, F., Scielzo, C., Zonari, E., Mazzieri, R., Doglioni, C., Naldini, L., 2007. Identification of proangiogenic TIE2-expressing monocytes (TEMs) in human peripheral blood and cancer. *Blood* 109, 5276–5285.
- Walkey, C.D., Olsen, J.B., Guo, H., Emili, A., Chan, W.C.W., 2012. Nanoparticle Size and Surface Chemistry Determine Serum Protein Adsorption and Macrophage Uptake. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 2139–2147.
- Werno, C., Menrad, H., Weigert, A., Dehne, N., Goerdts, S., Schledzewski, K., Kzhyshkowska, J., Brüne, B., 2010. Knockout of HIF-1 in tumor-associated macrophages enhances M2 polarization and attenuates their pro-angiogenic responses. *Carcinogenesis* 31, 1863–1872.
- Wijnant, G.-J., Van Bocxlaer, K., Yardley, V., Harris, A., Murdan, S., Croft, S.L., 2017. Relation between Skin Pharmacokinetics and Efficacy in AmBisome Treatment of Murine Cutaneous Leishmaniasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 62, e02009-e02017.
- Wu, X., Schulte, B.C., Zhou, Y., Haribhai, D., Mackinnon, A.C., Plaza, J.A., Williams, C.B., Hwang, S.T., 2014. Depletion of M2-Like Tumor-Associated Macrophages Delays Cutaneous T-Cell Lymphoma Development *In vivo*. *J. Invest. Dermatol.* 134, 2814–2822.
- Xin, H., Zhang, C., Herrmann, A., Du, Y., Figlin, R., Yu, H., 2009. Sunitinib Inhibition of Stat3 Induces Renal Cell Carcinoma Tumor Cell Apoptosis and Reduces Immunosuppressive Cells. *Cancer Res.* 69, 2506–2513.
- Xiong, M.-H., Li, Y.-J., Bao, Y., Yang, X.-Z., Hu, B., Wang, J., 2012. Bacteria-Responsive Multifunctional Nanogel for Targeted Antibiotic Delivery. *Adv. Mater.* 24, 6175–6180.
- Yan, Z., Wang, F., Wen, Z., Zhan, C., Feng, L., Liu, Y., Wei, X., Xie, C., Lu, W., 2012. LyP-1-conjugated PEGylated liposomes: A carrier system for targeted therapy of lymphatic metastatic tumor. *J. Controlled Release* 157, 118–125.
- Yu, S.S., Lau, C.M., Barham, W.J., Onishko, H.M., Nelson, C.E., Li, H., Smith, C.A., Yull, F.E., Duvall, C.L., Giorgio, T.D., 2013. Macrophage-Specific RNA Interference Targeting via “Click”, Mannosylated Polymeric Micelles. *Mol. Pharm.* 10, 975–987.
- Yuan, A., Hsiao, Y.-J., Chen, H.-Y., Chen, H.-W., Ho, C.-C., Chen, Y.-Y., Liu, Y.-C., Hong, T.-H., Yu, S.-L., Chen, J.J.W., Yang, P.-C., 2015. Opposite Effects of M1 and M2 Macrophage Subtypes on Lung Cancer Progression. *Sci. Rep.* 5, 14273-14284.
- Zeisberger, S.M., Odermatt, B., Marty, C., Zehnder-Fjällman, A.H.M., Ballmer-Hofer, K., Schwendener, R.A., 2006. Clodronate-liposome-mediated depletion of tumour-associated macrophages: a new and highly effective antiangiogenic therapy approach. *Br. J. Cancer* 95, 272–281.
- Zhang, M., He, Y., Sun, X., Li, Q., Wang, W., Zhao, A., Di, W., 2014. A high M1/M2 ratio of tumor-associated macrophages is associated with extended survival in ovarian cancer patients. *J. Ovarian Res.* 7, 19-34.
- Zhang, W., Chen, L., Ma, K., Zhao, Y., Liu, X., Wang, Y., Liu, M., Liang, S., Zhu, H., Xu, N., 2016. Polarization of macrophages in the tumor microenvironment is influenced by EGFR signaling within colon cancer cells. *Oncotarget* 7, 75366-75378.
- Zhao, D., Alizadeh, D., Zhang, L., Liu, W., Farrukh, O., Manuel, E., Diamond, D.J., Badie, B., 2011. Carbon Nanotubes Enhance CpG Uptake and Potentiate Antiglioma Immunity. *Clin. Cancer Res.* 17, 771–782.
- Zheng, X., Turkowski, K., Mora, J., Brüne, B., Seeger, W., Weigert, A., Savai, R., 2017. Redirecting tumor-associated macrophages to become tumoricidal effectors as a novel strategy for cancer therapy. *Oncotarget* 8, 48436-48452.

Zhu, S., Niu, M., O'Mary, H., Cui, Z., 2013. Targeting of Tumor-Associated Macrophages Made Possible by PEG-Sheddable, Mannose-Modified Nanoparticles. *Mol. Pharm.* 10, 3525–3530.

Chapitre III : Vectorisation d'immunomodulateurs pour une application en thérapie anti-cancéreuse

L'immunité se définit comme étant la capacité d'un organisme à se défendre contre les corps étrangers et les agents pathogènes ainsi qu'à éliminer les débris cellulaires, s'opposant ainsi au développement d'infections et de pathologies diverses. Cependant, dans certains cas, le système immunitaire connaît des dysfonctionnements pouvant être à l'origine soit de sa stimulation incongrue, comme dans le cas du diabète, soit de son incapacité à être activé comme dans le cas du cancer. Le ciblage du système immunitaire est donc une stratégie intéressante et est à ce jour au cœur de nombreuses études, notamment dans le cas du traitement du cancer. Bien que l'immunothérapie anti-cancéreuse ne soit à ce jour pas proposée comme traitement de première ligne, elle a démontré un intérêt certain en association avec la chimiothérapie notamment. Par ailleurs, l'identification d'inhibiteurs de points de contrôle du système immunitaire et les résultats prometteurs obtenus en clinique avec de telles molécules, ainsi que l'identification du rôle immunomodulateur de différentes molécules et de leur intérêt dans le cadre du traitement du cancer pourraient faire de l'immunothérapie une stratégie de premier choix.

Ce chapitre décrira brièvement l'implication du système immunitaire dans diverses maladies, en particulier le cancer. Puis, les stratégies principales au cœur de l'immunothérapie anti-cancéreuse seront présentées, avec un focus sur les immunomodulateurs et leurs systèmes d'encapsulation favorisant le ciblage tumoral notamment.

III.1. Les maladies impliquant le système immunitaire

Les phagocytes (cellules dendritiques, monocytes, macrophages), les lymphocytes (B, T, « natural killer »), et les granulocytes sont autant de cellules impliquées dans le fonctionnement de la première ligne de défense de l'organisme contre divers pathogènes : le système immunitaire. Paradoxalement, le système immunitaire joue un rôle central dans le développement de diverses maladies chroniques telles que le diabète de type 1, l'athérosclérose, ou le cancer. Par ailleurs, le dysfonctionnement de ce système peut être à l'origine de maladies auto-immunes telles que la sclérose en plaques, la polyarthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn ou encore le psoriasis. Cela implique différents mécanismes. Par exemple, dans le cas du diabète, l'activation anormale des lymphocytes T et des cellules dendritiques stimule la présentation des antigènes des cellules bêta aux

lymphocytes T (Wållberg et Cooke, 2013). L'activation des lymphocytes T CD4⁺ par les cellules dendritiques induit la destruction des cellules bêta des îlots de Langerhans du pancréas par les macrophages et la production d'anticorps dirigés contre ces cellules par les lymphocytes B. L'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8⁺ est par ailleurs potentialisée par la production de cytokines pro-inflammatoires. Les cellules bêta ne sont alors plus en mesure de produire l'insuline, facteur clé de la régulation de la glycémie, aboutissant à une hyperglycémie (Wållberg et Cooke, 2013). Par ailleurs, c'est une inflammation chronique due à l'infiltration de la muqueuse intestinale par les lymphocytes T auxiliaires de type Th1 qui est à l'origine de la maladie de Crohn (Plevy, 2002). Cet état d'inflammation chronique est maintenu par la production de diverses cytokines pro-inflammatoires (IL-12, IL-17, TNF- α , IFN- γ) (Plevy, 2002). Enfin, dans le cas de l'athérosclérose, la paroi des vaisseaux est anormalement infiltrée par des monocytes et des lymphocytes T du fait de l'extravasation des lipoprotéines de basse densité (LDL) et leur oxydation dans l'espace sous-endothélial, induisant l'expression de molécules d'adhérence et de récepteurs aux chimiokines attractives à la surface des cellules endothéliales (Galkina et Ley, 2009). Il y a alors un recrutement local permanent des monocytes et macrophages, une internalisation des LDL oxydées et la transformation des macrophages en cellules spumeuses. Les cellules spumeuses produisent alors diverses cytokines permettant le recrutement des lymphocytes T, aboutissant à un état pathologique d'inflammation chronique. L'accumulation des cellules spumeuses et des LDL dans la paroi artérielle constitue alors l'athérome, responsable d'un rétrécissement du vaisseau sanguin (sténose) pouvant mener à son obturation complète (thrombose) (Galkina et Ley, 2009). Dans le cas du cancer, le site tumoral est également caractérisé par une inflammation chronique, qui joue cependant un rôle complexe, détaillé dans le paragraphe suivant.

III.2. Le double rôle du système immunitaire dans le cancer

Le système immunitaire joue un rôle double dans le développement du cancer puisqu'il peut aussi bien agir en faveur de la maladie qu'en sa défaveur. C'est en 1909 que la théorie de l'immunosurveillance des tumeurs fut établie. Paul Ehrlich a ainsi proposé une corrélation entre les mécanismes de défense de l'organisme, *i.e.* le système immunitaire, et la prévention du développement tumoral (Ribatti, 2017). C'est seulement par la suite que la mise en jeu d'antigènes tumoraux à la surface des cellules cancéreuses permettant leur reconnaissance et leur élimination par le système immunitaire fut mis en évidence par Frank Mac Farlane Burnet (Burnet, 1970). Des études épidémiologiques menées chez des patients atteints de divers cancers (côlon, glioblastome, intestin, mélanome, ovarien, prostate, rectal, sein, vessie) sont allées dans ce sens puisqu'elles ont permis de mettre en évidence une survie plus longue des patients présentant un nombre important de lymphocytes (B, T, et « natural killer ») (Epstein et Fatti, 1976; Nacopoulou *et al.*, 1981; Deligdisch *et*

al., 1982; Jass, 1986; Rilke *et al.*, 1991; Lipponen *et al.*, 1992; Clemente *et al.*, 1996). A l'inverse, des études ont observé une relation entre une infiltration importante des tumeurs par les lymphocytes T et une plus faible survie des patients, notamment dans le cas du lymphome et de cancers du sein et ovarien (Sato *et al.*, 2005; Yan *et al.*, 2011; Nakayama *et al.*, 2017). De plus, comme présenté dans le chapitre 2, l'infiltration des tumeurs par les macrophages semble avoir un effet délétère sur la survie des patients, notamment dans le cas des cancers du sein, gastrique, oral, ovarien, ou de la vessie, ou encore dans le cas de la leucémie (Cavnar *et al.*, 2017; Lewis et Pollard, 2006; Sica *et al.*, 2008).

La théorie des 3E a ainsi été émise, proposant 3 types d'implication du système immunitaire dans le développement du cancer, résultant de l'interaction entre les cellules immunitaires et les cellules cancéreuses (Figure 24) (Dunn *et al.*, 2002) :

- « Elimination », correspondant à l'immunosurveillance
- « Equilibre », résultant de la mise en place de mécanismes aboutissant à la maîtrise de la croissance tumorale sans toutefois de cytotoxicité envers les cellules tumorales
- « Echappement », correspondant à la résistance des cellules tumorales au système immunitaire. Cet état ne résulte pas seulement du recrutement de cellules immunosuppressives (lymphocytes T régulateurs, macrophages immunosuppresseurs, cellules myéloïdes suppressives) puisqu'il est également influencé par divers autres mécanismes décrits dans la Figure 24 (Ventola, 2017; Wang *et al.*, 2017).

Au vu de ce rôle central du système immunitaire dans le développement tumoral, de nombreuses recherches visant à développer des stratégies thérapeutiques ciblant le système immunitaire, notamment lors de l'étape d'échappement tumoral au cours de laquelle son rôle est particulièrement délétère, ont été entreprises.

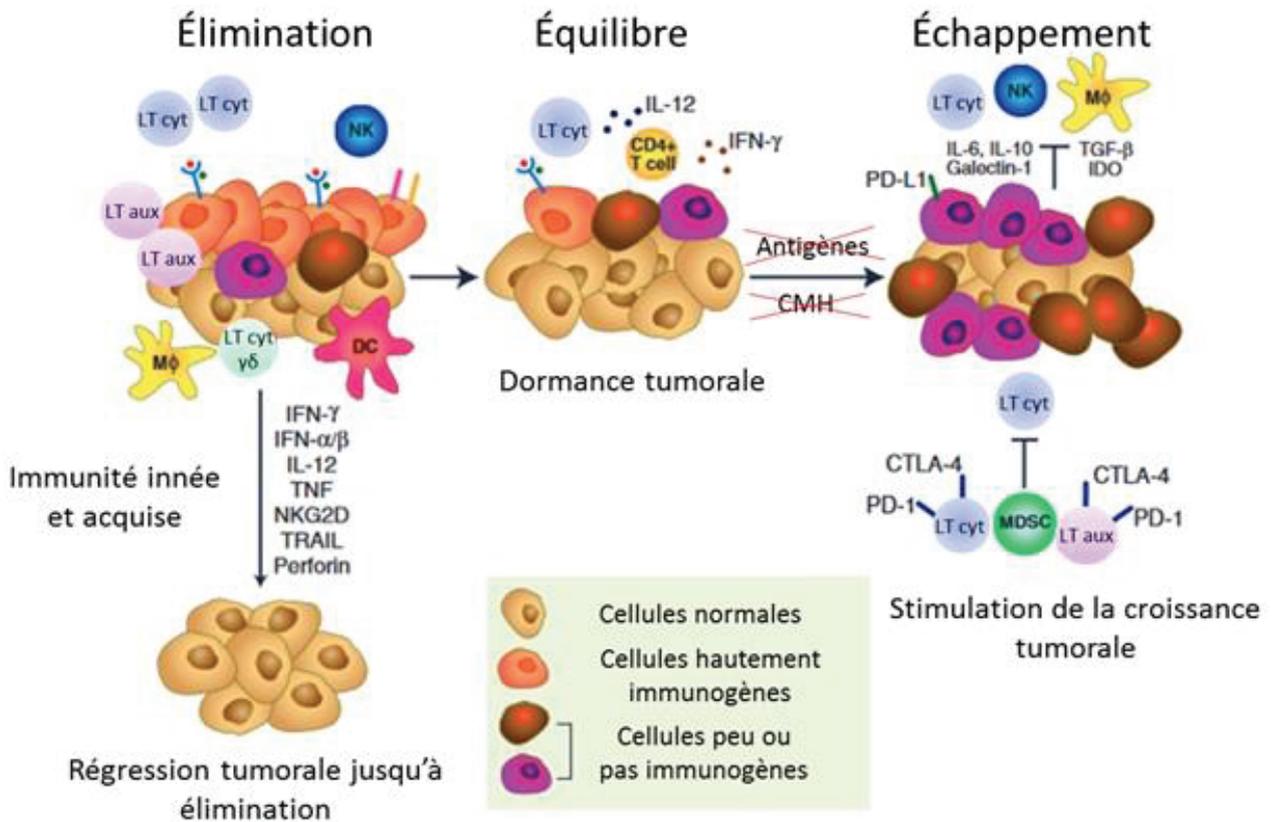


Figure 24. La théorie des 3 E. Le cancer est associée à un mécanisme inflammatoire provoquant le recrutement des cellules du système immunitaire inné (cellules dendritiques (DC), macrophages (Mφ), la sous population de lymphocytes T cytotoxiques $\gamma\delta$ (LT cyt $\gamma\delta$) et les cellules Natural Killer (NK)) ainsi que celles du système immunitaire adaptatif (lymphocytes T cytotoxiques (LT cyt) et auxiliaires (LT aux)), agissant en faveur de la suppression tumorale par le biais de mécanismes cytotoxiques et de la sécrétion de cytokines anti-tumorales (IL-12, IFN, TNF- α , perforine, ...). Lors de l'état d'équilibre tumoral, les cellules cancéreuses résistantes à l'attaque du système immunitaire entrent alors en quiescence : c'est la dormance tumorale. Se met ensuite en place l'échappement tumoral. Les cellules cancéreuses développent alors des mécanismes leur permettant de ne pas être reconnues en tant que cellules anormales vis-à-vis du système immunitaire, par le biais d'une perte des antigènes tumoraux associée à une élimination des protéines du complexe majeur d'histocompatibilité dont le rôle est de présenter les antigènes tumoraux aux lymphocytes T. De plus, des mécanismes immunosuppresseurs sont mis en place avec l'expression de molécules immunosuppressives, aussi appelées « points de contrôle du système immunitaire » à la surface des lymphocytes T ou des TAMs (PD-1, CTLA-4), l'inhibition des lymphocytes T cytotoxiques par les cellules myéloïdes suppressives (MDSC) résultant en une inhibition de l'apoptose cellulaire induite par ces lymphocytes, ainsi que la sécrétion de cytokines pro-tumorales (IL-10, TGF- β , ...). Adapté de (Schreiber *et al.*, 2011).

III.3. Immunothérapies anti-cancéreuses

Ces dernières années, l'immunothérapie anti-cancéreuse a donc fait l'objet d'un intérêt croissant en tant que stratégie alternative durable en complément à la chimiothérapie anti-tumorale, l'ablation chirurgicale de la tumeur, ou les radiations. A l'inverse des thérapies anti-cancéreuses de première ligne, l'immunothérapie a pour avantage de prévenir la formation de métastases, et donc l'invasion tumorale, ainsi que d'agir de manière durable contre la maladie. Diverses approches ont ainsi été évaluées dans le cadre du développement d'immunothérapies anti-cancéreuses. Une de ces approches repose sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux ciblant les cellules du système immunitaire, les facteurs pro-tumoraux sécrétés au niveau du microenvironnement tumoral, et plus récemment les points de contrôle du système immunitaire ou « checkpoints immunitaires ». Des vaccins anti-cancéreux ont également été développés pour stimuler le système immunitaire contre le cancer. Une autre approche concerne l'emploi de molécules immunomodulatrices pouvant notamment moduler la fonction des macrophages associés aux tumeurs, majoritairement pro-tumorale, vers une activité anti-tumorale (Velcheti et Schalper, 2016; Ventola, 2017; Zhang et Chen, 2018). La vectorisation de ces actifs immunomodulateurs a fait l'objet de plusieurs études visant à potentialiser leur action par une amélioration de leur biodisponibilité au niveau tumoral ainsi que de leur internalisation cellulaire notamment. Le traitement à base de cytokines anti-tumorales (GM-CSF, interleukines telles que IL-2 et IFN- α) soit en monothérapie, soit par le biais de la vaccination, est une autre approche envisageable qui a d'ailleurs donné lieu à l'approbation de la FDA pour deux d'entre elles (IL-2 et IFN- α) mais ne sera pas développée dans cette thèse (voir la revue complète de Waldmann, 2017).

III.3.1. Anticorps monoclonaux

Les anticorps (AC) monoclonaux, capables de reconnaître spécifiquement un unique épitope d'un antigène présenté par un type de cellules du système immunitaire ont démontré leur efficacité dans de nombreux cancers. Ils peuvent être dirigés contre des cellules du système immunitaire dont la surproduction est à l'origine du cancer (lymphocytes B), ou contre des cytokines pro-tumorales, résultant en une inhibition de l'angiogenèse par exemple.

Différents anticorps monoclonaux non conjugués sont actuellement approuvés par la « Food and Drug Administration » (FDA), et utilisés en clinique seuls ou en combinaison avec des actifs de chimiothérapie (Tableau 2).

Tableau 2. Exemples d'anticorps monoclonaux approuvés pour une immunothérapie anti-cancéreuse

Anticorps monoclonal	Antigène cible	Cancer	Références
Ibritumomab tiuxetan	CD20 des lymphocytes B	Lymphome	(Grillo-López, 2002)
Ofatumumab	CD20 des lymphocytes B	Leucémie chronique lymphocytaire	(Lemery <i>et al.</i> , 2010)
Rituximab	CD20 des lymphocytes B	lymphome folliculaire non hodgkinien	(Leget et Czuczman, 1998)
Alemtuzumab	CD52 des lymphocytes B et T	Leucémie chronique lymphocytaire	(Demko <i>et al.</i> , 2008)
Cetuximab	Récepteur EGF	Cancer colorectal	(Jonker <i>et al.</i> , 2007)
Panitumumab	Récepteur EGF	Cancer colorectal	(Giusti <i>et al.</i> , 2007)
Bevacizumab	VEGF	Cancer du col de l'utérus	(Tewari <i>et al.</i> , 2014)
		Cancer colorectal	(Grothey <i>et al.</i> , 2008)
		Glioblastome	(Cohen <i>et al.</i> , 2009)
		Cancer du poumon non à petites cellules	(Cohen <i>et al.</i> , 2007)
		Carcinome rénal	(Summers <i>et al.</i> , 2010)
Trastuzumab	HER2 (récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain)	Cancer du sein	(Amiri-Kordestani <i>et al.</i> , 2014)

L'efficacité anti-cancéreuse des anticorps monoclonaux reste cependant limitée et nécessite la combinaison avec des agents cytotoxiques. De ce fait, des anticorps conjugués à d'autres actifs, notamment des agents cytotoxiques ou des particules radioactives, ont été développés permettant une activité cytotoxique ciblée contre les cellules tumorales (Sapra *et al.*, 2011).

III.3.2. Immunothérapie ciblant les points de contrôle du système immunitaire

Le 21^{ème} siècle a été considérablement marqué par les avancées en immunothérapie anti-tumorale avec le développement d'inhibiteurs des points de contrôle du système immunitaire (Neves et Kwok, 2015). Ces points de contrôle sont en effet à l'origine du blocage des réponses lymphocytaires comme notamment démontré dans le cas du carcinome squameux de la tête et du cou (Lyford-Pike *et al.*, 2013). Les principales molécules mises en jeu dans ces points de contrôle, et donc ciblées par l'immunothérapie, sont les marqueurs de surface CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 en anglais) et PD-1 (programmed death 1 en anglais) notamment présents à la surface des lymphocytes T, mais aussi identifiés plus récemment à la surface des TAMs pro-tumoraux, ainsi que le marqueur de surface PDL-1 (programmed death-ligand 1 en anglais), présent à la surface des cellules néoplasiques (Seidel *et al.*, 2018). Les inhibiteurs de ces points de contrôle permettent de bloquer la suppression immunitaire contre la croissance tumorale, permettant ainsi l'activation des lymphocytes T, et donc leur activité cytotoxique envers les cellules néoplasiques. Les mécanismes mis en jeu dans la suppression immunitaire et dans la levée de cette dernière par les inhibiteurs des points de contrôle immunitaire sont schématisés en Figure 25 avec l'exemple des PD-L1 et PD-1.

En 2011, l'ipilumab a été le premier agent ciblant les points de contrôle immunitaires approuvé par la FDA pour le traitement du mélanome métastatique (Lipson et Drake, 2011). L'ipilumab permet de lever l'inhibition des lymphocytes T cytotoxiques par le biais d'un ciblage du récepteur CTLA-4 présent à leur surface. Ainsi, dans une étude clinique de phase 3 menée chez 676 patients atteints de mélanome, l'administration de 3 mg/kg toutes les 3 semaines, jusqu'à 4 cycles d'ipilimumab seul ou en combinaison avec un vaccin contenant un antigène tumoral, à savoir le peptide gp100, a permis d'augmenter la survie globale moyenne des patients de plus de 3 mois (10,1 mois pour la combinaison thérapeutique contre 6,4 mois pour le vaccin seul) (Lipson et Drake, 2011)

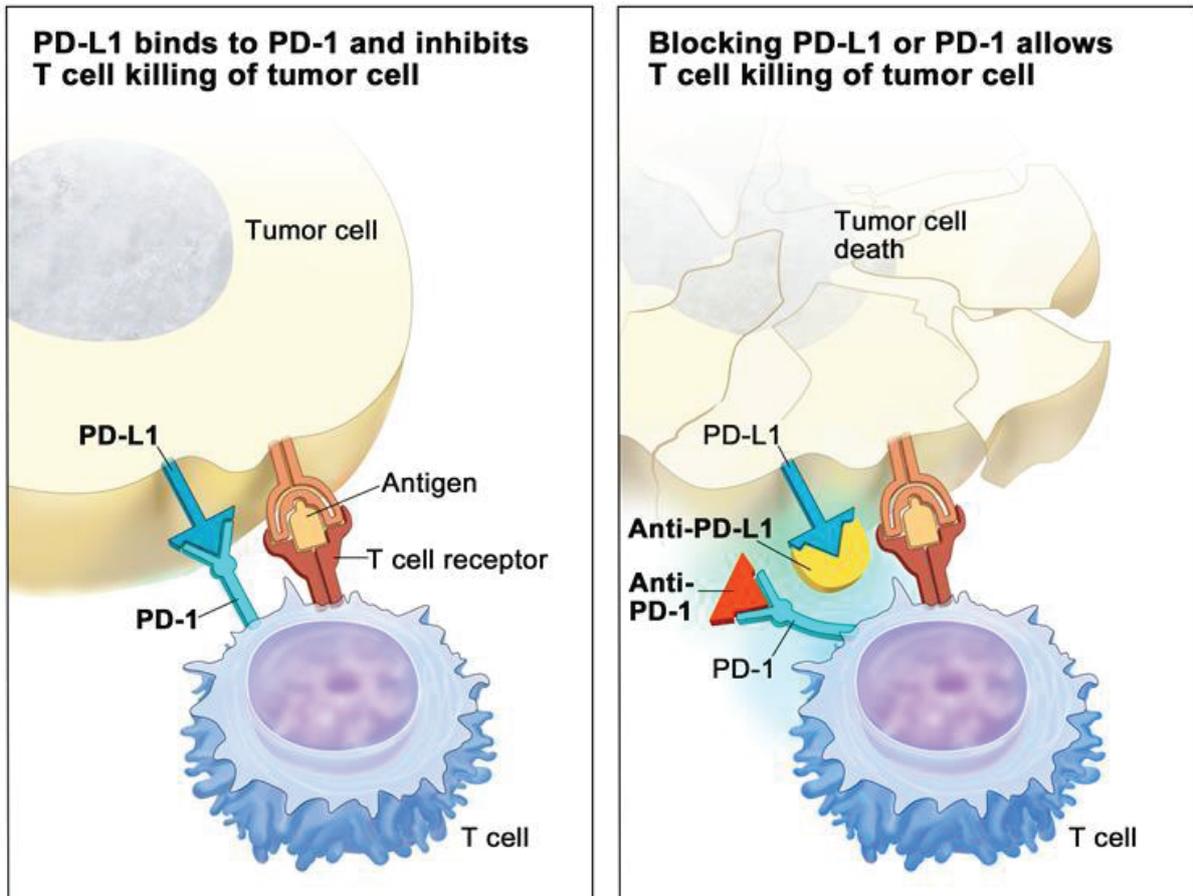


Figure 25. Mécanisme d'échappement au système immunitaire des points de contrôle immunitaire PD-1/PD-L1 et inhibition de ces derniers, d'après le site internet www.visualsonline.cancer.gov

Trois ans plus tard, deux autres inhibiteurs des points de contrôle immunitaires ciblant cette fois la protéine 1 de mort cellulaire programmée (PD1) exprimée par les lymphocytes activés ont été approuvés par la FDA pour le traitement du mélanome métastatique : le pembrolizumab et le nivolumab. Dans l'étude clinique PN006, 834 patients atteints de mélanome métastatique ont reçu 10 mg/kg de pembrolizumab par voie intraveineuse toutes les 2 à 3 semaines ou de l'ipilimumab (3 mg/kg toutes les 3 semaines, jusqu'à 4 cycles). Un taux de réponse objective, correspondant à la proportion de patients pour lesquels une stabilisation ou une régression tumorale sont observées, a été noté chez 34% des patients ayant reçu le pembrolizumab pendant 2 semaines et chez 33% des patients ayant été traités pendant 3 semaines (Barone *et al.*, 2017). Depuis, le pembrolizumab a été approuvé pour le traitement du cancer du poumon non à petites cellules métastatique, des carcinomes épidermoïdes (tête et cou), du col de l'utérus, et du lymphome. Quant au nivolumab, c'est à la suite d'une étude clinique de phase 3 menée chez 370 patients atteints de mélanome métastatique ou non résecable qu'il a été approuvé par la FDA (Raedler, 2015). Un taux de réponse objective a été observé chez 32%

des patients ayant reçu 3 mg/kg de nivolumab toutes les 3 semaines, et 87% des patients ont répondu au traitement durant 2,6 à plus de 10 mois (Raedler, 2015).

En 2016, l'atezolizumab a été approuvé par la FDA pour le traitement du cancer de la vessie (Ning *et al.*, 2017). L'atezolizumab est un inhibiteur du ligand de la protéine 1 de mort cellulaire programmée (PD-L1), exprimé à la surface des cellules tumorales et permettant leur liaison aux lymphocytes T cytotoxiques, à l'origine de leur inactivation (Figure 25). C'est à la suite d'une étude clinique menée chez 310 patients atteints de carcinome urothélial métastatique que l'atezolizumab a été approuvé à raison d'une dose de 1,2 g injectée par voie intraveineuse toutes les 3 semaines. Dans cette étude, un taux de réponse objective de 14,8% a été observé chez tous les patients avec des réponses durant jusqu'à près de 14 mois. Depuis, l'atezolizumab a également été approuvé pour le traitement du cancer du poumon métastatique.

Les inhibiteurs des points de contrôle immunitaires font ainsi l'objet d'un engouement certain du fait des résultats prometteurs dont ils ont fait preuve dans le cas de divers cancers, avec à ce jour plus d'une centaine d'études cliniques en cours. Cependant, bien qu'ils aient démontré une efficacité anti-cancéreuse remarquable, les inhibiteurs des points de contrôle immunitaires sont associés à des effets secondaires importants tels qu'une hyper-activation des lymphocytes T endommageant les tissus sains de divers organes (peau, poumons, tractus gastro-intestinal, foie) de par leur action sur toutes les cellules du système immunitaire, nécessitant l'administration de corticostéroïdes et l'arrêt du traitement (Ciccarese *et al.*, 2016).

III.3.3. Vaccins anti-cancéreux

Les vaccins anti-cancéreux ont pour but d'induire une réponse immunitaire par le biais de la sécrétion d'anticorps ciblant des antigènes tumoraux et des protéines oncogènes ou anormalement exprimées au niveau tumoral. Les vaccins anti-cancéreux peuvent être préventifs, dans le cas des cancers induits par le virus du papillome humain (VIH) ou par l'hépatite B, ou curatifs. Il existe divers types de vaccins curatifs : les vaccins peptidiques, les vaccins à base de cellules dendritiques et les vaccins à base de cellules tumorales.

Les vaccins peptidiques permettent la reconnaissance des antigènes présents à la surface des cellules tumorales et l'activation des lymphocytes T cytotoxiques (Parmiani *et al.*, 2014). Cependant, ils présentent de nombreuses limites incluant le fait que les antigènes présents à la surface des cellules tumorales diffèrent selon les individus, que les petits peptides présentent une faible demi-vie dans la circulation sanguine et peuvent se lier à des cellules présentatrices d'antigènes non activatrices de la réponse immunitaire (Slingluff, 2011).

Les vaccins à base de monocytes du patient activés *ex vivo* avec un antigène tumoral représentent une autre approche intéressante pour la stimulation du système immunitaire contre les cellules cancéreuses. Le principe de ces vaccins repose sur la réinjection de monocytes possédant un antigène tumoral au patient, permettant la différenciation des monocytes en cellules dendritiques qui vont présenter les antigènes tumoraux aux lymphocytes T, entraînant leur multiplication et leur activation pour une réponse cytotoxique dirigée contre cet antigène tumoral. La présentation d'antigènes tumoraux par les cellules dendritiques permet par ailleurs l'activation des lymphocytes T mémoire permettant une réponse anti-tumorale sur du long terme, diminuant ainsi le risque de récurrence (Banchereau et Palucka, 2005). Parmi ces vaccins, le sipuleucel-T, dirigé contre le cancer de la prostate, a été le premier à avoir été approuvé par la FDA (Figure 26) (Garcia and Dreicer, 2011).

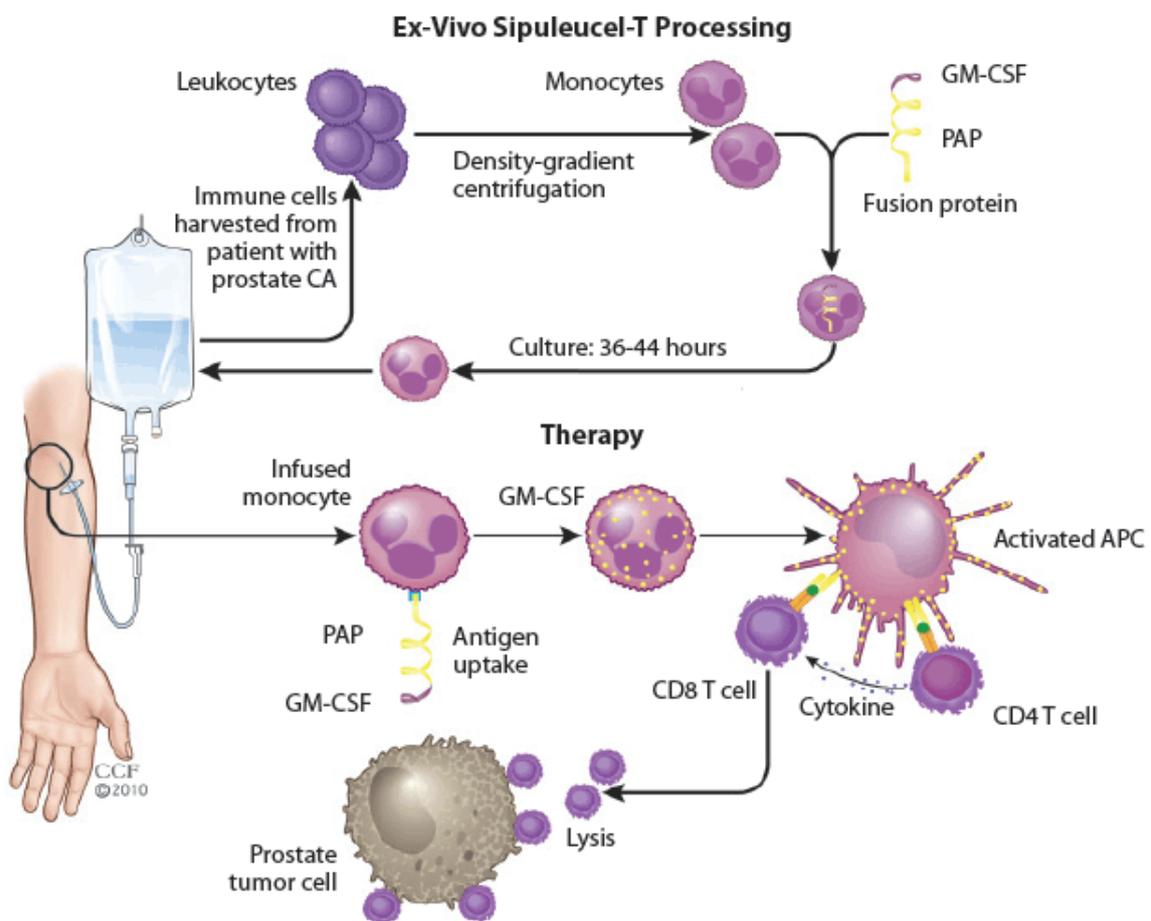


Figure 26. Représentation schématique de la méthode de préparation du vaccin Sipuleucel-T et des mécanismes mis en jeu après vaccination du patient. Avec APC : cellules présentatrices d'antigènes, GM-CSF : facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages, PAP : phosphatase acide prostatique (Garcia et Dreicer, 2011)

Lors de l'étude clinique de phase III (IMPACT) réalisée chez 512 patients atteints de cancer de la prostate résistants à la castration, le sipuleucel-T a permis de prolonger leur survie médiane de 4,1 mois en comparaison aux patients ayant reçu un placebo (Cheever et Higano, 2011). Cependant, de tels vaccins nécessitent le prélèvement de cellules leucocytaires du patient, limitant le nombre de vaccinations envisageables.

Les vaccins à base de cellules tumorales sont quant à eux obtenus à partir des cellules du patient dans la mesure du possible, ou d'un autre patient dans le cas d'un cancer en phase précoce lors duquel il est difficile d'obtenir un nombre suffisant de cellules tumorales pour établir le vaccin (Copier et Dalgleish, 2006). La plupart des cellules tumorales étant peu immunogènes, elles sont irradiées *ex vivo* puis mélangées à des adjuvants bactériens stimulant le système immunitaire, tel que le bacille de Calmette et Guérin (BCG). Un exemple de cette stratégie est le vaccin commercialisé sous le nom de M-VAX, à base de dinitrophényl et efficace contre le mélanome (Berd, 2004).

Cependant, quels qu'ils soient, l'efficacité des vaccins anti-cancéreux reste encore limitée, notamment du fait du caractère immunosuppresseur du microenvironnement tumoral.

III.3.4. Immunomodulateurs et apport de leur vectorisation

Diverses molécules ont été décrites pour leur influence sur le phénotype des macrophages ainsi que le recrutement et/ou l'activation des cellules du système immunitaire, faisant d'elles des actifs d'intérêt dans le cadre de l'immunothérapie anti-cancéreuse. L'utilisation de ces molécules est une alternative thérapeutique intéressante aux autres immunothérapies décrites dans ce chapitre, dont l'efficacité est limitée ou qui sont associées à des toxicités importantes (Guan *et al.*, 2014 ; Hahn *et al.*, 2017 ; Varricchi, 2017). Les principales molécules et leur mode d'action sont présentés dans le Tableau 3. L'état de l'art des systèmes développés pour leur vectorisation, qu'ils aient été conçus pour l'immunothérapie anti-cancéreuse ou pour une autre application, sera ensuite établi afin de démontrer la faisabilité de leur vectorisation. Un intérêt particulier sera accordé à la famille des bisphosphonates compte tenu des nombreuses études faisant état de leurs interactions avec les macrophages.

Tableau 3 : Exemples d'immunomodulateurs, de leurs mécanismes d'action ainsi que des cancers pour lesquels une telle action est décrite. Ils sont classés en fonction de leur nature, biologique (nucléotides/ADN/ARN/protéines, bactéries) ou chimique.

ACTIF	CANCER	MECANISME MOLECULAIRE	ACTIONS	REFERENCES
Oligonucléotides CpG (CpG-ODN)	carcinome bronchique, carcinome du côlon, Fibrosarcome, mastocytome, mélanome	Agoniste des TLR (TLR-9) : Activation du facteur pro-inflammatoire NF-κB, différenciation des cellules myéloïdes suppressives en macrophages anti-tumoraux	Repolarisation des macrophages TAMs protumoraux en TAMs anti-tumoraux (augmentation de la production des IL-2, IL-6 et IL-13, inhibition des MMP9 et VEGF), différenciation des macrophages en macrophages anti-tumoraux, activation de lymphocytes T cytotoxiques mémoire	(Kawarada <i>et al.</i> , 2001; Heckelsmiller <i>et al.</i> , 2002; Yuan <i>et al.</i> , 2017)
Acide polyinosinique-polycytidilique (poly(I:C))	Cancer du sein, cancer du poumon	Agoniste des TLR (TLR3): activation du facteur pro-inflammatoire NF-κB	Activation des macrophages, inhibition de la fonction immunosuppressive des cellules myéloïdes suppressives, augmentation de l'activité cytotoxique des lymphocytes T	(Shime <i>et al.</i> , 2012; Forghani et Waller, 2015)
Micro ARN	Cancer du sein	Stimulation de l'expression du gène Fra-1 inhibant l'expression de VEGF et STAT3	Inhibition de la polarisation des TAMs en TAMs pro-tumoraux	(Yang <i>et al.</i> , 2014; Essandoh <i>et al.</i> , 2016)
Glycoprotéine riche en histidine	Cancer du sein, fibrosarcome, cancer pancréatique	Inhibition de la sécrétion de facteur de croissance placentaire (PIGF)	Repolarisation des TAMs pro-tumoraux en TAMs anti-tumoraux (augmentation de la production de facteurs anti-tumoraux : IFN-γ, IL-6, IL-12, cxcl9, prolifération des lymphocytes T cytotoxiques, activation des cellules dendritiques, inhibition de la production de VEGF	(Rolny <i>et al.</i> , 2011)

<i>Listeria monocytogenes</i> atténuée	Carcinome ovarien	Production de monoxyde d'azote (de manière NOS2 dépendante)	Repolarisation des TAMs pro-tumoraux en TAMs anti-tumoraux (augmentation de la production des facteurs anti-tumoraux : TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12 et CXCL10)	(Lizotte <i>et al.</i> , 2014)
Souche <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Carcinome gastrique	Activation de la voie NF- κ B	Différenciation des macrophages en macrophages anti-tumoraux, prolifération des lymphocytes T auxiliaires et activation en Th1 (production des facteurs anti-tumoraux IFN- γ et TNF- α)	(Wang <i>et al.</i> , 2016)
5,6-diméthylxanthénone-4-acide acétique (DMXAA)	Cancer du poumon non à petites cellules, mésothéliome	Activation de la protéine STING (stimulateur de gènes d'interféron)	Repolarisation des TAMs pro-tumoraux en TAMs anti-tumoraux (production de TNF- α et des protéines inflammatoires des macrophages de type 2), recrutement des monocytes/macrophages, activation des lymphocytes T cytotoxiques	(Jassar <i>et al.</i> , 2005; Fridlender <i>et al.</i> , 2013)
Acide corosolique	Glioblastome	Inhibition des voies STAT3 et NF- κ B	Inhibition de la polarisation des macrophages en macrophages pro-tumoraux (diminution du marqueur de surface CD163 et de la sécrétion d'IL-10) et de la fonction immunosuppressive des cellules myéloïdes suppressives	(Fujiwara <i>et al.</i> , 2011; Horlad <i>et al.</i> , 2013)
Acide rétinoïque	Ostéosarcome, carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou	Inhibition du récepteur activé par les proliférateurs de peroxydases (PPAR γ)	Inhibition de la polarisation des TAMs en macrophages pro-tumoraux (inhibition de la production de MMP-12 et de la sécrétion de VEGF et d'IL-8, diminution de la sécrétion de TGF- β), stimulation de la différenciation des cellules myéloïdes suppressives	(Liss <i>et al.</i> , 2002; Zhou <i>et al.</i> , 2017)

Bisphosphonates (2 ^{ème} et 3 ^{ème} génération)	Cancers du sein et de la vessie	Inhibition de la voie mévalonate	Repolarisation des TAMs, activation d'une sous- population de lymphocytes T cytotoxiques (lymphocytes T $\gamma\delta$), inhibition de la prolifération et de la migration des lymphocytes T régulateurs	(Vantourout et <i>al.</i> , 2009; Coscia et <i>al.</i> , 2010; Benzaïd et <i>al.</i> , 2012; Liu et <i>al.</i> , 2016)
Hydrazinocurcumine	Cancer du sein	Inhibition de la phosphorylation des STAT3	Repolarisation des TAMs pro-tumoraux en TAMs anti- tumoraux (diminution de la production d'IL-10 et de TGF- β , et augmentation de la production d'IL-12)	(Wang et <i>al.</i> , 2012; Zhang et <i>al.</i> , 2013)
Méthylglyoxal	sarcome	Stimulation de la NADPH oxydase (synthèse de dérivés actifs de l'oxygène) et d'oxyde nitrique synthase (synthèse de monoxyde d'azote)	Recrutement et activation de la capacité phagocytaire des macrophages, augmentation de la production d'IFN- γ , de TNF- α , IL-1 β , IL-6, et de l'expression de M- CSF, TLR-4 et TLR-9	(Bhattacharyya et <i>al.</i> , 2008; Chakrabarti et <i>al.</i> , 2014)
N-(2- hydroxyacétophénone) glycinate de cuivre (CuNG)	Carcinome, sarcome	Activation de la voie MAP kinases p38	Repolarisation des macrophages TAMs protumoraux en TAMs anti-tumoraux (augmentation de la sécrétion d'IL-12, TNF- β et IFN- γ , diminution de la sécrétion d'IL- 10)	(Mookerjee, 2006; Chatterjee et <i>al.</i> , 2009)

Rifampicine	Pas de cancer pour lequel cette activité immunomodulatrice est décrite	Métabolisme de l'oxygène	Activation des macrophages (augmentation de la sécrétion de facteurs anti-tumoraux : IL-12, TNF- α , IFN- γ et cytotoxiques : production de dérivés actifs de l'oxygène et d'azote)	(Dube <i>et al.</i> , 2014)
-------------	--	--------------------------	---	-----------------------------

III.3.4.1.2. Mécanismes d'action

Des travaux *in vitro* et *in vivo* ont permis d'identifier les mécanismes impliqués dans l'action des bisphosphonates mais ils restent controversés. Ainsi, les bisphosphonates de 1^{ère} génération sont cytotoxiques du fait d'une accumulation intracellulaire de ces derniers à l'origine de dommages cellulaires irréversibles, et donc à l'apoptose (Rogers *et al.*, 2000 ; Streitbuenger *et al.*, 2011). En revanche, le groupement amine des bisphosphonates de 2^{ème} et 3^{ème} génération interviendrait dans l'inhibition de la farnésyl disphosphate (Farnésyl-PP) synthèse de la voie mévalonate (Figure 28) (Kunzmann *et al.*, 1999).

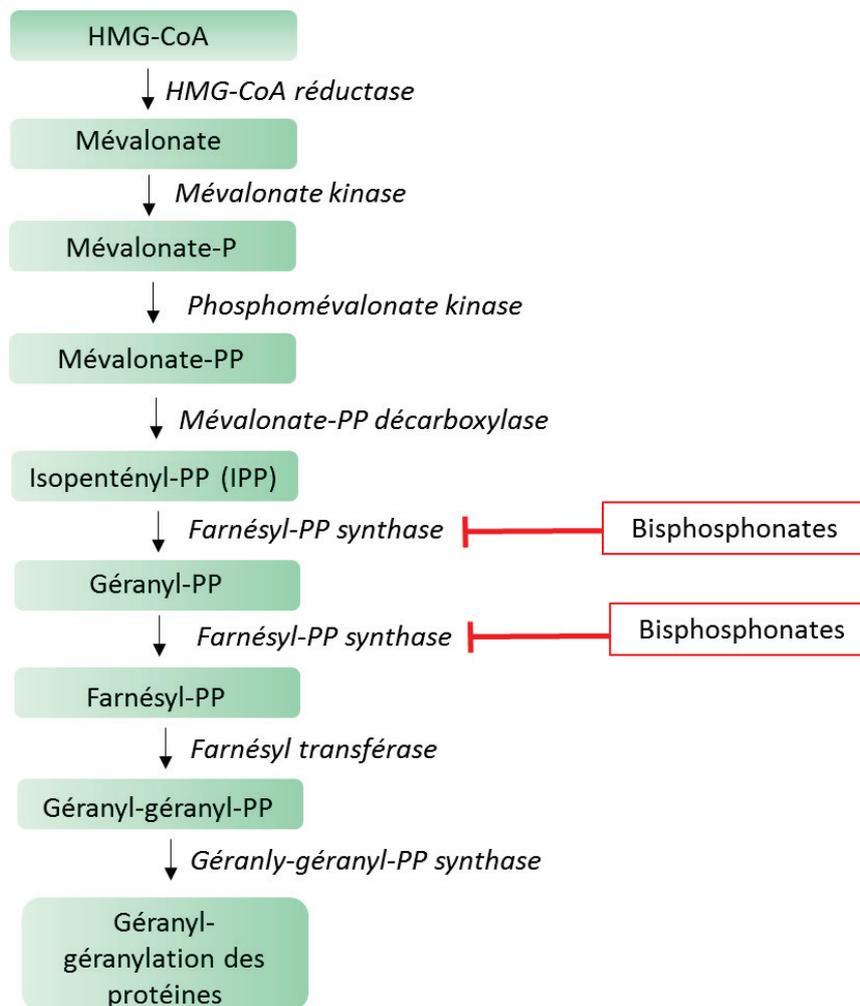


Figure 28. Action des bisphosphonates sur la voie mévalonate

Ce mécanisme d'action semble donner lieu à plusieurs activités des bisphosphonate (Figure 29). Ainsi, l'IPP accumulé à la suite de l'inhibition de la farnésyl-PP synthase par les bisphosphonates est converti en APPPI qui inhibe la translocase de nucléotides à adénine mitochondriale (Sousa *et al.*, 2015a). L'inhibition de cette dernière est responsable de l'accumulation intracellulaire d'analogues de

l'adénosine triphosphate (ATP) toxiques et non hydrolysables, induisant alors l'apoptose des cellules cibles (Kunzmann *et al.*, 1999). Ce mécanisme semble avoir lieu dans divers types cellulaires incluant les cellules présentatrices d'antigènes, y compris les macrophages, ainsi que les cellules néoplasiques, ce qui est intéressant pour le traitement du cancer (Thurnher *et al.*, 2012). Les cellules néoplasiques présentant la mutation du gène p53 à l'origine d'une augmentation de l'activité de la voie mévalonate seraient d'autant plus sensibles à l'action des bisphosphonates. En effet, la protéine codée par ce gène a pour rôles d'induire l'arrêt du cycle cellulaire entre la phase G1 et la phase S et l'apoptose, or la mutation p53 inactive cette protéine. Par ailleurs, l'accumulation d'isopentényl-pyrophosphate (IPP) active une sous-population de lymphocytes T cytotoxiques: les lymphocytes T $\gamma\delta$ (Figure 29) (Vantourout *et al.*, 2009).

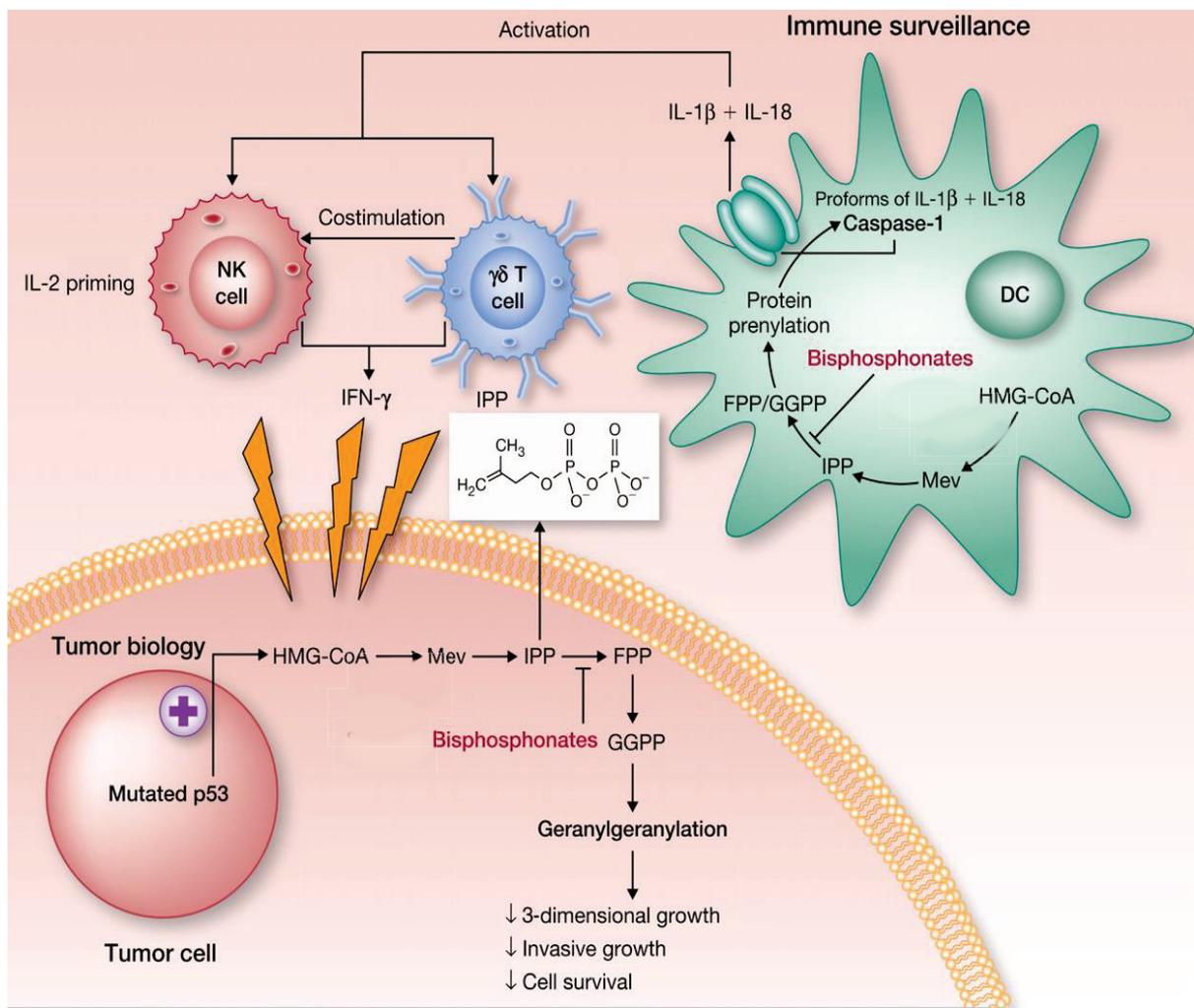


Figure 29. Inhibition de la voie mévalonate par les bisphosphonates de 2^{ème} et 3^{ème} génération et mécanismes biologique et immunitaires associés (Thurnher *et al.*, 2012)

Une étude a ainsi démontré l'induction de la prolifération des lymphocytes T $\gamma\delta$ *in vitro* par l'acide zolédronique et le risédronate dans des cellules mononucléées périphériques humaines (Benzaid *et al.*, 2012). Dans cette même étude, une réduction du volume tumoral de 46% a été observée chez un modèle murin de cancer du sein traité avec du risédronate (Benzaid *et al.*, 2012). Par ailleurs, Maniar *et al.* ont démontré que l'activation des lymphocytes T $\gamma\delta$ par l'acide zolédronique potentialisait l'activité cytotoxique induite par les Natural Killer (Maniar *et al.*, 2010). Des études pré-cliniques et cliniques ont également mis en évidence cette activité. Ainsi, des études pré-cliniques menées sur différents modèles tumoraux (sein, vessie) ont observé une sensibilisation des cellules tumorales à l'activité cytotoxique des lymphocytes T $\gamma\delta$ après administration d'acide zolédronique, comme reviewé par Hamilton *et al.* (Hamilton *et al.*, 2011). Par ailleurs, une étude clinique a démontré l'activation des lymphocytes T $\gamma\delta$ chez des patientes atteintes de cancer du sein après administration d'acide zolédronique (4 mg) (Santini *et al.*, 2009). L'activation de telles cellules témoigne du rôle immunomodulateur de ces derniers (Ang *et al.*, 2016).

Cette action immunomodulatrice n'est pas uniquement induite par l'activation de cette sous-population de lymphocytes. En effet, Liu *et al.* ont observé une activité antiproliférative de l'acide zolédronique *in vitro* (10 μ M) vis-à-vis des lymphocytes T régulateurs, avec une réduction de plus de 28% des cellules après 12 jours par rapport aux cellules non exposées (Liu *et al.*, 2016). De plus, les auteurs ont mis en évidence que l'acide zolédronique inhibait la migration de cellules de cancer du sein de par l'action immunosuppressive des lymphocytes T régulateurs (Liu *et al.*, 2016).

Coscia *et al.* ont démontré l'activité immunomodulatrice de l'acide zolédronique vis-à-vis des TAMs *in vivo* (Coscia *et al.*, 2010). Ainsi, l'administration intraveineuse d'acide zolédronique aux doses thérapeutiques recommandées pour le traitement des anomalies osseuses (100 μ g/kg 1 fois par semaine pendant 4 semaines, puis 3 semaines sans traitement suivies d'1 injection par semaine) chez un modèle murin de cancer mammaire a permis de limiter la croissance tumorale et d'augmenter la survie médiane des souris par rapport aux souris non traitées. Coscia *et al.* ont défini *in vitro* et *in vivo* les mécanismes impliqués dans l'activité anti-cancéreuse de l'acide zolédronique (1-100 μ M), à savoir l'inhibition du recrutement et la diminution du nombre de TAMs, la repolarisation des TAMs pro-tumoraux en macrophages anti-tumoraux, l'inhibition de la voie mévalonate, et l'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses ainsi que de l'angiogenèse (Coscia *et al.*, 2010). Cette étude a permis de mettre en évidence le potentiel thérapeutique de l'acide zolédronique à renverser l'immunosuppression du microenvironnement tumoral, responsable de la croissance tumorale, vers un environnement anti-tumoral. Malgré les résultats prometteurs précédemment décrits, l'intérêt thérapeutique de l'acide zolédronique en tant que modulateur du phénotype des TAMs nécessite des études supplémentaires, notamment dans le but d'identifier les mécanismes impliqués dans cette action, encore mal connus.

Enfin, des études ont mis en évidence l'activité anti-angiogène des bisphosphonates (Clézardin, 2013; Tamanoi *et al.*, 2017).

III.3.4.1.3. Etudes cliniques de l'utilisation des bisphosphonates en thérapie anti-cancéreuse

L'intérêt thérapeutique des bisphosphonates dans la thérapie anti-cancéreuse a été évaluée dans de nombreuses études cliniques (150 études terminées ou en cours pour l'acide zolédronique), principalement vis-à-vis de métastases osseuses. Ainsi, outre l'acide zolédronique (Zometa®), le pamidronate (Aredia®) et le clodronate (Lytos®) sont notamment commercialisés pour la prévention et le traitement de métastases osseuses. Cependant, leur utilisation clinique en tant qu'anti-cancéreux n'est que peu reportée, dans des études peu concluantes.

L'utilisation des liposomes encapsulant le clodronate a fait l'objet de plusieurs études cliniques mais une méta-analyse révèle que son administration orale chez des patients atteints de cancer du sein ne permet pas une augmentation significative de leur survie globale (Ha et Li, 2007). L'acide zolédronique a également fait l'objet d'études cliniques. Ainsi, une étude clinique de phase III a été réalisée chez 3360 patients atteints de cancer du sein (stade précoce) ayant reçu 4 mg par perfusion intraveineuse d'acide zolédronique à raison de 3 semaines toutes les 4 semaines durant 6 cycles puis 3 mois tous les 6 mois jusqu'à atteindre 5 ans de traitement (Coleman *et al.*, 2011). Dans cette étude, l'acide zolédronique n'a pas démontré d'effet anti-cancéreux convenable puisque la survie globale des patients traités était identique à celle des patients n'ayant pas reçu de traitement (Coleman *et al.*, 2011).

L'échec de ces études cliniques peut s'expliquer par le fait que les bisphosphonates présentent une faible demi-vie dans la circulation sanguine (15 minutes pour l'acide zolédronique) et ciblent naturellement le tissu osseux (Caraglia *et al.*, 2010). En effet, cette capacité ciblant le tissu osseux fait des bisphosphonates des molécules d'intérêt pour le ciblage des métastases osseuses, notamment en tant que ligand de surface de nanoparticules mais s'oppose à leur disponibilité au niveau tumoral (He *et al.*, 2017). Dans le cadre de la thérapie anti-cancéreuse, l'encapsulation de ces molécules hydrophiles permettrait donc d'augmenter leur biodisponibilité au niveau tumoral et de favoriser leur internalisation cellulaire.

III.3.4.1.3. Vectorisation des bisphosphonates

Comme discuté dans le paragraphe III.3.4.1. de ce chapitre, les bisphosphonates sont des molécules hydrophiles et ne peuvent de ce fait pas traverser la membrane cellulaire. De plus, leur structure chimique est telle qu'ils ciblent le tissu osseux, s'opposant à leur biodisponibilité au niveau tumoral. Afin de potentialiser leur activité et bien que l'encapsulation des molécules hydrophiles reste

à ce jour un challenge, plusieurs travaux portent sur la vectorisation des bisphosphonates pour une application à la thérapie anti-cancéreuse.

III.3.4.1.3.1. Acide zolédronique

Marra *et al.* ont encapsulé l'acide zolédronique dans des liposomes à base de lécithine d'œuf, de cholestérol et de 1,2-diacyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine-N[méthoxy(polyéthylène glycol)-2000] (DSPE-PEG 2000) dans le but de contrer le ciblage osseux de l'actif au profit d'un ciblage tumoral (Marra *et al.*, 2011). Les auteurs ont modulé les ratios de ces 3 lipides, obtenant ainsi des liposomes de tailles variables, avec des diamètres moyens de 203 ± 26 nm (331 ± 97 nm après lyophilisation) pour les liposomes contenant 10 fois moins de DSPE-PEG et de 241 ± 36 nm (265 ± 64 nm après lyophilisation) pour les liposomes contenant 10 fois plus de DSPE-PEG. Par ailleurs, l'efficacité d'encapsulation de l'acide zolédronique dans ces systèmes est limitée puisqu'elle n'excède pas $5,2 \pm 0,1\%$, toutes conditions confondues. L'internalisation cellulaire des liposomes encapsulant l'acide zolédronique a été confirmée *in vitro* sur des lignées de cancer de la prostate hormono- et non hormono-dépendantes après co-encapsulation d'une molécule fluorescente dans ces liposomes. Par ailleurs, l'activité antiproliférative des liposomes encapsulant l'acide zolédronique a été évaluée sur différentes lignées cellulaires (cancers de la prostate, du sein, des reins, du cou et de la tête, du poumon ou du pancréas, mélanome, et myélome multiple humain) par un test MTT. Cette étude a démontré une activité plus importante de l'acide zolédronique encapsulé par rapport à sa forme libre sur la quasi-totalité des lignées testées avec une différence particulièrement notable sur les lignées de cancer des reins 769P et de mélanome M14 résistante à la doxorubicine pour les deux formules développées (Marra *et al.*, 2011). Finalement, l'avantage de l'encapsulation vis-à-vis de l'activité anti-cancéreuse de l'acide zolédronique a été confirmé *in vivo* sur un modèle murin de xénotransplante de myélome et sur un modèle murin de xénotransplante de cancer de la prostate (Figure 30) (Marra *et al.*, 2011).

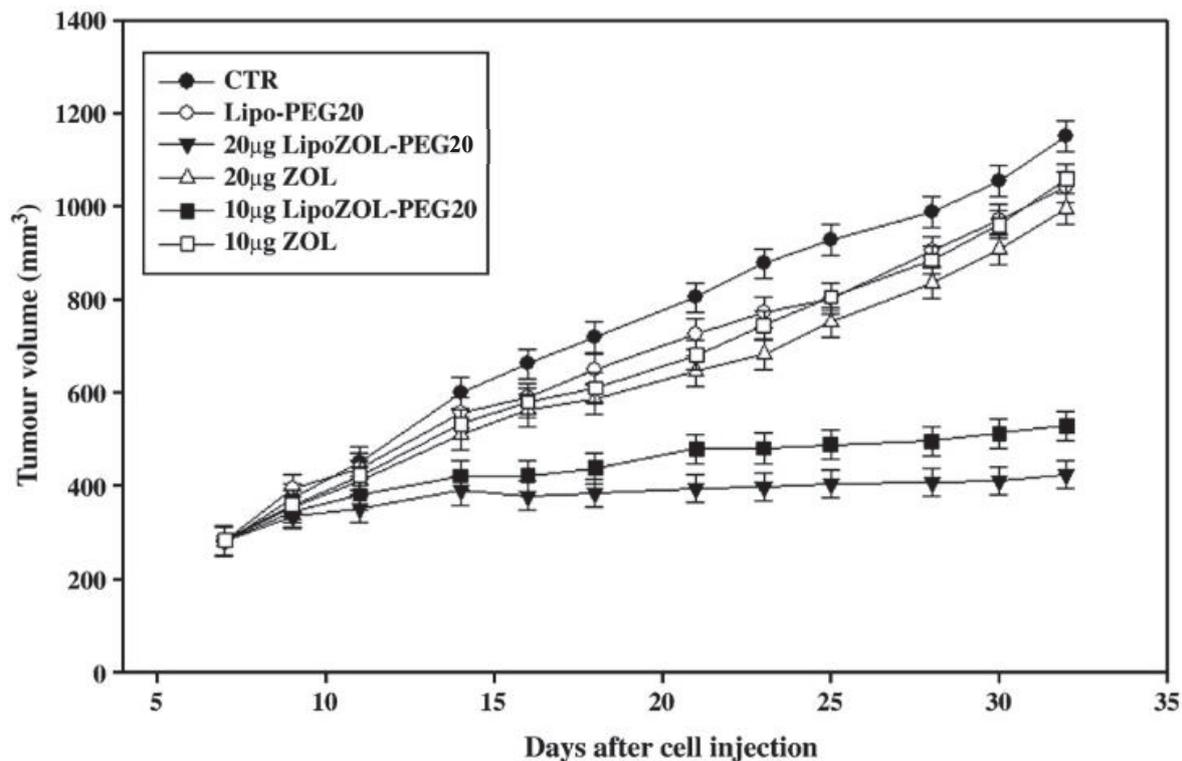


Figure 30. Activité anti-tumorale de l'acide zolédronique sur un modèle murin de xélogreffe de cancer de la prostate (PC3). Les souris ont reçu du tampon phosphate (CTR), 10 ou 20 µg de liposomes vides (Lipo-PEG20), 10 ou 20 µg de liposomes encapsulant l'acide zolédronique (LipoZOL-PEG), ou 10 ou 20 µg d'acide zolédronique vide par voie IV 3 fois par semaine pendant 3 semaines (moyenne ± SD, n=6) (Marra *et al.*, 2011).

La même équipe a complexé l'acide zolédronique avec des nanoparticules de phosphate de calcium (CaPZ NPs, 182 ± 18 nm) qu'ils ont recouvert de liposomes cationiques PEGylés (pré-PLCaPZ NPs, 148 ± 7 nm) ou qu'ils ont mélangé avec des liposomes cationiques puis PEGylé (post-PLCaPZ NPs, 309 ± 163 nm) (Salzano *et al.*, 2011). Ces deux stratégies ont été testées par Salzano *et al.* afin d'évaluer l'impact de la méthode de PEGylation sur la stabilité galénique des formules. L'activité antiproliférative des nanovecteurs a ensuite été évaluée sur différentes lignées cellulaires (cancers de la prostate, du sein, du cou et de la tête, du poumon ou du pancréas, et myélome multiple humain), toujours par le biais d'un test MTT. Les auteurs ont ainsi observé une activité plus importante de l'acide zolédronique encapsulé, quelle que soit la formule considérée, en comparaison à sa forme libre, indépendamment de la lignée cellulaire, avec une participation variable des nanovecteurs de manière intrinsèque (NPs blanches). Les pré-PLCaPZ ont toutefois été sélectionnées pour une étude *in vivo* du fait de leurs caractéristiques physicochimiques plus adaptées ainsi que la toxicité moindre des nanoparticules blanches. L'administration intraveineuse du traitement (20 µg d'acide zolédronique /souris 3 fois par

semaine durant 3 semaines) à un modèle murin de xénogreffe de cancer de la prostate a démontré une efficacité supérieure des pré-PLCaPZ NPs par rapport à l'acide zolédronique libre avec respectivement 45% et 15% de réduction de la masse tumorale par rapport aux souris non traitées (Salzano *et al.*, 2011). Par ailleurs, l'efficacité de tels vecteurs de l'acide zolédronique sur des tumeurs résistantes à la chimiothérapie, dites « MDR », a également été proposée (Kopecka, 2015).

Dans une autre étude, la même équipe a comparé l'efficacité de deux formules encapsulant l'acide zolédronique, à savoir des liposomes à base de phosphatidylcholine, de cholestérol, et de 1,2-diacyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine-N[méthoxy(polyéthylène glycol)] (DSPE-PEG) avec celle de NPs de phosphate de calcium recouvertes par des liposomes cationiques de composition similaire hormis la phosphatidylcholine, remplacée par du (N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium) (DOTAP) sur 2 lignées de cancer de la prostate PC-3 et DU-145 (Schiraldi *et al.*, 2014). Les auteurs ont observé une augmentation de l'activité antiproliférative de l'acide zolédronique sur la lignée cellulaire PC-3 après encapsulation, d'autant plus pour les liposomes. Bien que l'activité antiproliférative de l'acide zolédronique ait été peu (liposomes) ou pas (NPs) améliorée par son encapsulation sur l'autre lignée cellulaire (DU-145), une augmentation de son activité cytotoxique après encapsulation dans les liposomes a été observée (Schiraldi *et al.*, 2014).

L'acide zolédronique a aussi été encapsulé dans des liposomes PEGylés (PEG 3350) mesurant environ 157 nm de diamètre à base de cholestérol et de phosphatidylcholine obtenus par la technique d'évaporation en phase inverse (Naseri *et al.*, 2015). Naseri *et al.* ont observé une activité des liposomes encapsulant l'acide zolédronique supérieure à celle de l'acide zolédronique libre sur la lignée cellulaire de cancer du sein 4T1, en particulier à de faibles concentrations. Cependant, bien que les auteurs aient caractérisé cette activité comme une cytotoxicité, des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer la nature de cette action compte tenu du test utilisé (MTT), qui permet aussi l'observation d'une action antiproliférative (Naseri *et al.*, 2015).

Dans une autre étude, Sousa *et al.* ont développé des liposomes encapsulant soit le clodronate, soit l'acide zolédronique et mesurant moins de 300 nm de diamètre afin de contrer leur affinité à l'os et ainsi permettre le ciblage tumoral (Sousa *et al.*, 2015a). Les auteurs ont démontré *in vitro* sur des macrophages murins (J774) exposés au milieu de culture de cellules de cancer du sein (4T1) que les liposomes chargés d'acide zolédronique augmentaient la sécrétion de TNF- α par les macrophages (J774) en comparaison aux macrophages non exposés. Les auteurs ont donc émis l'hypothèse que l'acide zolédronique permettait une polarisation des TAMs en macrophages immunostimulants et donc anti-tumoraux. Cependant, l'expression d'autres cytokines ne vont pas dans le sens de cette hypothèse et mériteraient des études supplémentaires (Sousa *et al.*, 2015a). Cette étude est donc la seule ayant à ce jour abordé l'activité immunomodulatrice de l'acide zolédronique encapsulé.

III.3.4.1.3.2. Clodronate

Le clodronate étant hydrosoluble ($\text{LogP} = -2,4$), comme tous les bisphosphonates, il lui est impossible de passer la membrane cellulaire, donc d'exercer une quelconque activité. C'est pour ces raisons que Van Rooijen *et al.* ont développé des liposomes encapsulant pour l'encapsuler (Clodrolip®), permettant d'améliorer sa perméabilité membranaire et de ce fait son utilisation thérapeutique (van Rooijen *et al.*, 1996). Désormais, de nombreux travaux traitent de l'encapsulation du clodronate dans des liposomes (Fritz *et al.*, 2014; Gazzaniga *et al.*, 2007).

Par exemple, Mönkkönen *et al.* ont préparé des liposomes encapsulant le clodronate et à base de 1,2-distéaroyl-sn-glycéro-3-phosphoglycérol et de cholestérol par évaporation en phase inverse (Mönkkönen et Heath, 1993; Mönkkönen *et al.*, 1994). Les auteurs ont démontré une internalisation 50 fois plus importante de la forme encapsulée du clodronate par rapport à sa forme libre par la lignée de macrophages murins RAW.264 (Mönkkönen et Heath, 1993). Ils ont aussi démontré que les liposomes encapsulant le clodronate étaient responsables d'une modulation du phénotype de ces mêmes macrophages *in vitro* au profit d'un phénotype immunosuppresseur avec une inhibition de la production des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF, ce qui est intéressant dans le cas des maladies inflammatoires mais n'est pas souhaité dans le cas du traitement du cancer. Cependant, cette action semble s'atténuer avec le temps d'exposition aux macrophages et requiert des analyses complémentaires (Mönkkönen *et al.*, 1994).

Sousa *et al.* ont exposé *in vitro* sur des macrophages murins (J774) exposés au milieu de culture de cellules de cancer du sein (4T1) à du clodronate libre ou à des liposomes unilamellaires anioniques encapsulant du clodronate (Sousa *et al.*, 2015a). De manière inattendue, les auteurs ont observé une diminution de différents marqueurs des macrophages pro-inflammatoires après exposition des macrophages au clodronate, notamment des ARNm codant pour le monoxyde d'azote, IL-6, and IL-12 et M-CSF ainsi que de leur expression protéique. De plus, l'activité cytotoxique du clodronate envers les macrophages a été observée 48 heures après exposition. Une potentialisation de cette activité après encapsulation a été mise en évidence avec des concentrations efficaces médianes (EC_{50}) de respectivement 73-143 μM et de 2-4 μM pour les formes libre et encapsulée du clodronate (Sousa *et al.*, 2015a).

Ces liposomes ont par ailleurs été employés pour le développement de modèles *in vivo* déficients en TAMs afin de démontrer l'implication de ces derniers dans le développement tumoral, ou dans l'activité des actifs anti-cancéreux (Zeisberger *et al.*, 2006; Miller *et al.*, 2015; Bader *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2014). Afin de diminuer le nombre de TAMs chez un modèle murin de rhabdomyosarcome, 24 heures après inoculation des cellules néoplasiques, chaque souris a reçu par voie intrapéritonéale une dose initiale de 2 mg de clodronate puis 1 mg de clodronate tous les 4 jours, soit sous forme de solution dans du tampon phosphate pour sa forme libre, soit encapsulé dans des

liposomes par voie intrapéritonéale (Zeisberger *et al.*, 2006). Les souris ont été sacrifiées au bout de 22 jours puis des analyses immunohistochimiques issues des coupes de tissu cancéreux prélevées chez ces dernières ont été réalisées. Elles ont démontré une déplétion efficace des TAMs par les liposomes encapsulant le clodronate avec une réduction des TAMs activés (F4/80) de 93% et de 90% pour les TAMs de la rate (MOMA1) (Figure 31).

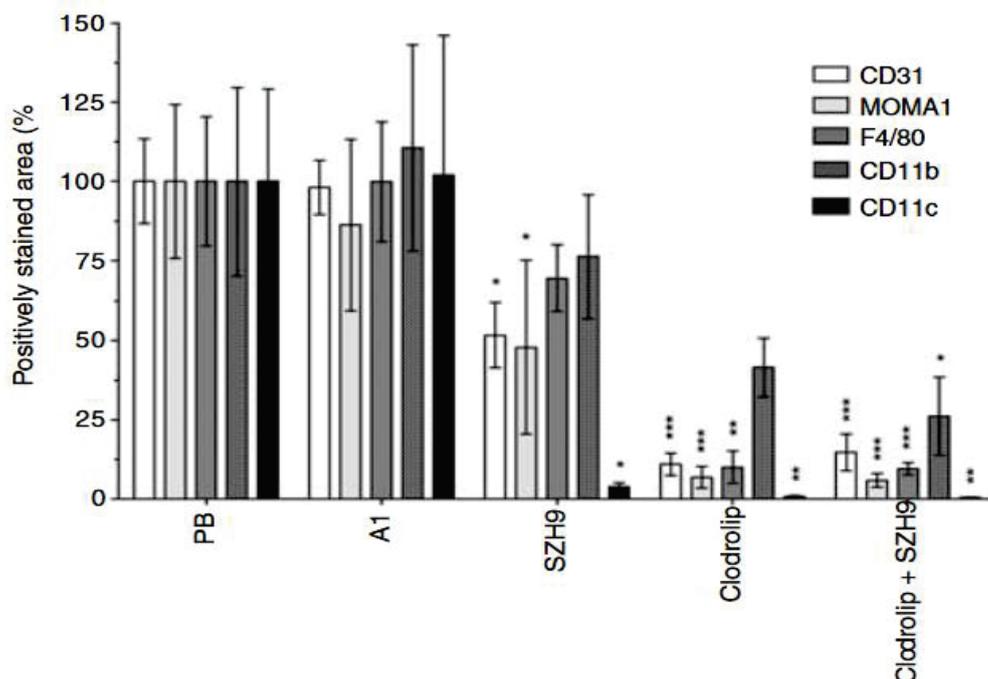


Figure 31. Analyse immunohistochimique de la déplétion des TAMs chez un modèle murin de rhabdomyosarcome. 5 groupes de souris ont été établis : 1 groupe contrôle traité avec du tampon phosphate (PB), 2 groupes traités avec des anticorps anti-VEGF (A1 et SZH9), 1 groupe traité avec des liposomes encapsulant du clodronate (Clodrolip) et 1 groupe ayant reçu des liposomes encapsulant du clodronate et l'anticorps anti-VEGF SZH9 (Clodrolip + SZH9). Différentes cellules ont été quantifiées (% du contrôle PB) : CD 31 : cellules endothéliales, MOMA1 : TAMs, F4/80 : TAMs activés, CD11b : TAMs, CD11c : cellules dendritiques. Les résultats (moyenne \pm SEM, n=7) sont significativement différents avec $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) et $p < 0,001$ (***).

Au-delà des liposomes, d'autres systèmes ont été développés pour l'encapsulation du clodronate. Ainsi, Sharma *et al.* ont évalué l'activité anti-cancéreuse de nanoparticules polymères (PLGA) encapsulant le clodronate et fonctionnalisées ou non avec le peptide LyP-1 connu pour cibler la protéine p32 présente à la surface des TAMs (Sharma *et al.*, 2013). Les nanoparticules obtenues par l'équipe mesurant entre 190 et 270 nm de diamètre et encapsulant moins de 6% (m/m) de clodronate présentent un profil de libération biphasique avec 50% d'actif libéré après 4 heures et 80% après 24 heures. Dans cette étude, les auteurs ont observé une réduction notable de la viabilité de macrophages

murins (RAW 264.7) après 24 heures d'exposition aux nanoparticules encapsulant le clodronate de manière concentration dépendante avec 80% de mort cellulaire contre seulement 20% pour les cellules exposées au clodronate libre (175 μ M). Sharma *et al.* ont également observé un ciblage efficace des TAMs par les nanoparticules fonctionnalisées avec LyP-1 *in vivo* chez un modèle murin de cancer du sein, permettant une réduction du nombre de TAMs de 50% après injection intraveineuse de 150 mg de clodronate/kg de poids corporel et par jour pendant 16 jours. Cependant, bien que ces résultats soient prometteurs, le traitement des souris avec le clodronate n'a pas permis une réduction de la croissance tumorale, ceci pouvant s'expliquer par le modèle particulièrement agressif choisi (Sharma *et al.*, 2013).

III.3.4.1.3.3. Acide alendronique

Dans une étude menée par Zhan *et al.*, l'alendronate a été conjugué à un glucomannane issu de *Bletilla striata* afin de cibler spécifiquement les TAMs, qui surexpriment le récepteur au mannose à leur surface (Zhan *et al.*, 2014). Les auteurs ont démontré un ciblage et une déplétion des TAMs aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* sur un modèle murin de sarcome après injection intratumorale de 10 mg d'acide alendronique conjugué/kg de poids corporels tous les 3 jours sur 3 cycles. En revanche, dans les mêmes conditions, l'acide alendronique n'a pas démontré d'activité anti-cancéreuse, avec une croissance tumorale (diamètre, masse) et une survie similaire à celles des souris non traitées (Zhan *et al.*, 2014).

Shmeeda *et al.* ont co-encapsulé l'alendronate et la doxorubicine, couramment utilisée en chimiothérapie anti-cancéreuse, dans des liposomes PEGylés afin d'associer immuno- et chimiothérapies pour une application au traitement du cancer (Shmeeda *et al.*, 2016). Les liposomes, à base de phosphatidylcholine, de méthyl PEG-1,2-distéaroyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine et de cholestérol, présentent des tailles de 75 à 100 nm et des efficacités d'encapsulation de seulement 3% pour l'alendronate et de plus de 80% pour la doxorubicine (Shmeeda *et al.*, 2016). Les liposomes co-encapsulant l'alendronate et la doxorubicine ont démontré une activité cytotoxique significativement plus importante par rapport à celle des liposomes n'encapsulant que la doxorubicine *in vitro* sur une lignée cellulaire de cancer ovarien, indiquant une synergie entre les actifs (Shmeeda *et al.*, 2016). Cependant, l'activité cytotoxiques des liposomes nécessite une incubation plus longue avec les cellules par rapport à la doxorubicine libre, probablement en lien avec la cinétique de libération des actifs. La potentialisation de l'activité de la doxorubicine par l'alendronate a également été observée *in vivo* sur des modèles murins de cancers du poumon et du sein. Cependant, l'avantage de l'encapsulation de l'alendronate par rapport à sa forme libre n'a pas été démontré dans cette étude (Shmeeda *et al.*, 2016).

Dans une autre étude, l'efficacité anti-cancéreuse de liposomes encapsulant l'alendronate a été évaluée et a démontré une activation des lymphocytes T cytotoxiques pouvant s'expliquer par une interaction des liposomes avec les TAMs ou les monocytes circulants (Gutman *et al.*, 2012). Par ailleurs, une inhibition de la croissance tumorale a été observée chez un modèle murin de cancer du sein traité avec les liposomes encapsulant l'alendronate (Gutman *et al.*, 2012).

D'autres bisphosphonates ont également été encapsulés (Vaculikova *et al.*, 2014; Ylitalo *et al.*, 1998). En conclusion, bien que les bisphosphonates soient faiblement encapsulés dans les différents vecteurs formulés, leur vectorisation ou leur conjugaison à des ligands ciblant les récepteurs des TAMs permettent d'outrepasser le ciblage du tissu osseux qui s'oppose à leur disponibilité au niveau du microenvironnement tumoral et donc à leur activité anti-cancéreuse (hors métastases osseuses), et d'augmenter leur délivrance intracellulaire puisque leur hydrophilie ne leur permet pas de traverser les membranes cellulaires, de nature lipidique. Les études sont pour la plupart focalisées sur l'activité anti-cancéreuse des bisphosphonates et non sur leur activité immunomodulatrice. Des études complémentaires mettant en évidence l'avantage de l'encapsulation des bisphosphonates vis-à-vis de leur activité immunomodulatrice notamment sont nécessaires.

III.3.4.2. Acide polyinosinique-polycytidilique

L'acide polyinosinique-polycytidilique (Poly(I:C)) est un ARN double brin synthétique connu pour ses activités immunomodulatrices et cytotoxiques mais dont l'application clinique est limitée par sa perte d'activité après administration systémique de par sa dégradation rapide par les ribonucléases, même à de fortes concentrations. Colapicchioni *et al.* ont encapsulé l'acide polyinosinique-polycytidilique (Poly(I:C)) dans des nanoparticules hybrides formées d'un noyau de silice entouré d'une bicouche lipidique cationique mesurant 92 ± 9 nm de diamètre qu'ils ont PEGylé (109 ± 6 nm) pour des études *in vivo* (Colapicchioni *et al.*, 2015). *In vitro*, l'encapsulation du poly(I:C) dans les nanoparticules a permis de potentialiser son activité cytotoxique vis-à-vis des lignées cellulaires de cancer du sein (MCF-7) et de la prostate (PC3) par rapport à sa forme libre (Colapicchioni *et al.*, 2015).

Speth *et al.* ont quant à eux développé des nanoparticules de chitosan mesurant 384 ± 46 nm et encapsulant le poly(I:C) ($88,7 \pm 2,6\%$ d'encapsulation) pour une application au traitement de la tuberculose (Speth *et al.*, 2017). Les auteurs ont mis en évidence que les nanoparticules encapsulant le poly(I:C) étaient plus efficacement internalisées par des macrophages murins issus de moelle osseuse *in vitro* que la forme libre du poly(I:C). De plus, Speth *et al.* ont démontré que les nanoparticules encapsulant le poly(I:C) permettaient la sécrétion d'IFN- α et d'IFN- β , et agissaient de manière synergique avec la Bacille Calmette-Guérin, actuellement employée sous forme de vaccin

pour traiter la tuberculose. Ainsi, une activation de l'activité pro-inflammatoire des macrophages exposés (production de monoxyde d'azote et des facteurs pro-inflammatoires TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12 et de GM-CSF) a été observée, et dans une moindre mesure pour le poly(I :C) libre (Speth *et al.*, 2017).

Les travaux visant à vectoriser le poly(I :C) sont donc très peu nombreux, et aucun ne s'est focalisé sur l'intérêt de cette dernière vis-à-vis de son action immunomodulatrice dans le cadre de l'immunothérapie anti-tumorale.

III.3.4.3. Acide rétinoïque

L'acide rétinoïque est un des métabolites actifs de la vitamine A et est connu pour son rôle dans la modulation de la fonction des macrophages, mais également sur l'activation des lymphocytes T et la différenciation et la migration des cellules dendritiques au niveau tumoral. L'acide rétinoïque a par ailleurs démontré son efficacité anti-cancéreuse au cours d'études cliniques sur différents cancers (cancers du sein, de la prostate, du poumon, du rein ou mélanome) par divers mécanismes incluant des effets anti-prolifératifs et pro-apoptotiques, et une inhibition de l'angiogenèse et de la formation de métastases (Chen *et al.*, 2014). Il a par ailleurs reçu l'approbation de la FDA pour le traitement des lymphomes et des leucémies promyélocyaires aigües (Chen *et al.*, 2014). Cependant, son utilisation clinique reste limitée par sa faible stabilité résultant en une faible demi-vie dans la circulation sanguine (Achkar *et al.*, 1994). Pour passer outre ces inconvénients, l'acide rétinoïque a été encapsulé dans divers types de vecteurs, en particulier des systèmes polymères, des liposomes et des nanoparticules solides lipidiques.

Dans une étude menée par Jeong *et al.*, l'acide rétinoïque a été encapsulé dans des microsphères polymères de PLGA afin d'évaluer son activité cytotoxique sur la lignée cellulaire de gliome U87MG (Jeong, 2003). Dans cette étude, les auteurs ont étudié l'influence de plusieurs paramètres de formulation telles que la concentration en alcool poly-vinyle (PVA) dans la solution aqueuse ou encore la masse moléculaire du PVA ou du PLGA sur les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules et sur leur profil de libération (Jeong, 2003). Ils ont observé une libération lente de l'acide rétinoïque sur plus de 50 jours avec seulement 30% de libération pour la formule présentant la libération la plus lente (concentration maximale en acide rétinoïque testée de 0,8% m/v de la phase organique). Finalement, les auteurs ont démontré *in vitro* que les nanoparticules maintenaient l'activité cytotoxique de l'acide rétinoïque (Jeong, 2003).

La même équipe a encapsulé l'acide rétinoïque dans des nanosphères composées de copolymères di-blocs, à savoir de la poly(ϵ -caprolactone) (PCL) et du poly(éthylène glycol) (PEG) (Jeong *et al.*, 2004). Après optimisation de divers paramètres de formulation incluant la masse moléculaire du copolymère di-blocs et la nature du solvant, les auteurs ont mis au point une formule optimale

mesurant 390 ± 175 nm de diamètre, encapsulant 97,3% (m/m) d'acide rétinoïque et présentant une libération prolongée de ce dernier avec environ 30% d'actif libéré après 16 jours (Jeong *et al.*, 2004). Jeong *et al.* ont démontré par le biais d'un test MTT une activité antiproliférative de l'acide rétinoïque supérieure à celle de sa forme libre sur deux lignées cellulaires de glioblastome (U251MG et U343MG-A) à des concentrations faibles (5-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), et une activité maintenue sur la lignée cellulaire de glioblastome U87MG après 2 jours d'exposition (Jeong *et al.*, 2004). Ces résultats sont donc prometteurs quant à l'avantage de l'encapsulation de l'acide rétinoïque vis-à-vis de son utilisation thérapeutique dans le cadre du glioblastome.

Nastruzzi *et al.* ont évalué l'activité antiproliférative de liposomes d'acide rétinoïque à base de lécithine d'œuf sur des lignées cellulaires de leucémie et de mélanome (Nastruzzi *et al.*, 1990). Les auteurs ont observé une activité antiproliférative de l'acide rétinoïque 350 fois plus importante pour sa forme encapsulée que pour sa forme libre sur la lignée cellulaire de leucémie K562 avec des concentrations inhibitrices de la prolifération (IC_{50}) de respectivement 0,2 μM et 70 μM (Nastruzzi *et al.*, 1990).

Compte tenu de la rémission rapide observée chez les patients atteints de leucémie aigüe à promyélocytes après traitement à l'acide rétinoïque par voie orale, Drach *et al.* ont développé une formule contenant des liposomes encapsulant l'acide rétinoïque adaptée à la voie intraveineuse (Drach *et al.*, 1993). Les auteurs ont démontré l'activité pro-différenciative des liposomes *in vitro* sur les lignées de leucémie myéloïdes humaines HL-60, KG-1 et THP-1. Par la suite, la formule Atragen® à base de liposomes encapsulant l'acide rétinoïque a été développée et a démontré une pharmacocinétique favorable après administration intraveineuse (Ozpolat *et al.*, 2003). L'activité anti-cancéreuse de cette formule a notamment été évaluée chez 69 patients atteints de leucémie aigüe à promyélocytes et a démontré des résultats prometteurs. En effet, l'administration de 90 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{jour}$ de la formulation par voie intraveineuse aux patients a permis d'obtenir 62% de rémission complète chez les patients nouvellement diagnostiqués, 70% chez les patients en rechute n'ayant jamais reçu d'acide rétinoïque ou l'ayant reçu par voie orale pendant au moins 1 an, et 20% chez les patients en rechute et résistants au traitement par voie orale à l'acide rétinoïque (Douer, 2001).

L'activité anti-cancéreuse de l'acide rétinoïque encapsulé dans des nanoparticules lipidiques solides a notamment été évaluée par Akanda *et al.* (Akanda *et al.*, 2015). Les nanoparticules (232 ± 3 nm), présentant une bonne efficacité d'encapsulation de l'acide rétinoïque (>90%) ont été efficacement internalisées *in vitro* par la lignée cellulaire de cancer de la prostate LNCaP sur laquelle elles ont exercé une activité cytotoxique (Akanda *et al.*, 2015). Dans une autre étude, menée par Lim *et al.*, l'encapsulation de l'acide rétinoïque dans des nanoparticules lipidiques solides lyophilisées (246 ± 38 nm) a permis d'améliorer la stabilité de l'acide rétinoïque et de maintenir son activité antiproliférative de l'acide rétinoïque sur les lignées cellulaires humaines HL-60 (leucémie

promyélocytaire), KB (carcinome oral), et MCF-7 (cancer du sein) (Lim *et al.*, 2004). Ces études ne permettent toutefois pas de conclure sur l'avantage de l'encapsulation de l'acide rétinoïque en comparaison à sa forme libre en terme d'activité anti-cancéreuse et nécessitent donc d'être complétées.

Almouazen *et al.* ont encapsulé l'acide rétinoïque dans des nanocapsules de PLA mesurant 193 ± 7 nm de diamètre et présentant un profil de libération biphasique avec $55 \pm 2\%$ de libération durant les premières 24 h suivies d'une libération prolongée menant à 80% de libération après 4 jours (Almouazen *et al.*, 2012). Les auteurs ont mis en évidence l'internalisation des nanocapsules par les macrophages *in vitro* sur des macrophages dérivés de moelle osseuse avec une persistance des nanocapsules au niveau intracellulaire pendant 7 jours. Ces observations ont été confirmées *in vivo* chez un modèle murin de xénogreffe de gliome. Almouazen *et al.* ont également mis en évidence la modulation du profil de sécrétion des macrophages exposés aux nanocapsules encapsulant l'acide rétinoïque *in vitro* (Almouazen *et al.*, 2012).

L'apport de la vectorisation vis-à-vis de l'activité immunomodulatrice de l'acide rétinoïque n'a donc été abordé que dans une étude et requiert de ce fait plus d'investigations.

III.3.4.4. Hydrazinocurcumine

La capacité de l'hydrazinocurcumine à repolariser les TAMs pro-tumoraux vers un phénotype anti-tumoral a été démontrée au cours d'études *in vitro* (Wang *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013). Au-delà de cette activité immunomodulatrice, son activité antiproliférative a été démontrée sur des lignées cellulaires de cancer du sein MCF-7 et MDA-MB-231 ($IC_{50} < 4 \mu M$ après 72 heures d'exposition) (Wang *et al.*, 2012) ainsi que son action inhibitrice de l'angiogenèse et de la formation de métastases ont été suggérées à l'issues d'études *in vitro* (Shim *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2013). Bien que cet analogue de la curcumine, synthétisé pour améliorer sa stabilité, son internalisation cellulaire, et sa biodisponibilité (Rathore *et al.*, 2008) n'ait à ce jour pas fait l'objet d'études cliniques, sa vectorisation est intéressante pour le ciblage tumoral.

Ainsi, Liao *et al.* ont développé des nanoparticules liposomales non fonctionnalisées (110 nm) ou fonctionnalisées avec un inhibiteur de la légumine (RR-11a, 150 nm) encapsulant de l'hydrazinocurcumine afin d'évaluer la capacité de ciblage tumoral de ces nanoparticules (Liao *et al.*, 2011). En effet, la légumine est exprimée à la surface des cellules tumorales dans les tumeurs solides suite au stress hypoxique induit par le microenvironnement tumoral. Les auteurs ont démontré *in vitro* par microscopie à fluorescence que les nanoparticules fonctionnalisées permettaient un ciblage tumoral par rapport aux nanoparticules non fonctionnalisées sur des lignées cellulaires de carcinomes du côlon et du sein sur 6 heures et une réduction de leur accumulation dans les organes du système

réticulo-endothélial (foie, rate, reins) chez les modèles murins correspondants après 24 heures (Liao *et al.*, 2011). Dans une autre étude, l'équipe de chercheurs a démontré l'activité immunomodulatrice de l'hydrazinocurcumine encapsulée vis-à-vis des macrophages murins (RAW264.7) préalablement polarisés en macrophages pro-tumoraux par le biais d'une co-culture avec la lignée cellulaire de cancer du sein 4T1. Zhang *et al.* ont ainsi mis en évidence la repolarisation des macrophages pro-tumoraux en macrophages anti-tumoraux *in vitro* après exposition aux NPs encapsulant l'hydrazinocurcumine (180 μ M, 12 heures) (Zhang *et al.*, 2013). Enfin, l'avantage thérapeutique des nanoparticules a été démontré *in vivo* chez un modèle murin de cancer du sein, avec une inhibition de la croissance tumorale et une survie plus importante des souris traitées avec les nanoparticules encapsulant l'hydrazinocurcumine (80% de souris vivantes après 2 mois) par rapport à sa forme libre (40% de souris vivantes après 2 mois). Ces résultats peuvent s'expliquer par la biodisponibilité de l'actif, améliorée par l'encapsulation (Zhang *et al.*, 2013).

III.3.4.5. Méthylglyoxal

Le méthylglyoxal est un agent anti-cancéreux capable d'induire spécifiquement la mort cellulaire des cellules cancéreuses mais est rapidement dégradé par voie enzymatique *in vivo*. C'est pour cette raison que Chakrabarti *et al.* ont conjugué le méthylglyoxal avec des nanoparticules de chitosan (40-100 nm) (Chakrabarti *et al.*, 2014). *In vitro*, les auteurs ont observé une cytotoxicité des nanoparticules de méthylglyoxal envers la lignée cellulaire de sarcome plus importante (20-60% de viabilité) par rapport au méthylglyoxal libre (60-80% de viabilité). Après injection intraveineuse des nanoparticules à un modèle murin de sarcome, les auteurs ont observé un recrutement des macrophages au niveau du site tumoral ainsi qu'une activation de leur activité de phagocytose, une augmentation de l'expression d'IFN- α et de TNF- α , et la production d'IL-1 β , d'IL-6, de dérivés réactifs de l'oxygène et de M-CSF, indiquant une polarisation des macrophages en macrophages anti-tumoraux (Chakrabarti *et al.*, 2014). Une diminution du volume tumoral a été observé chez le groupe de souris traitées avec les nanoparticules de méthylglyoxal ainsi que chez le groupe traité avec le méthylglyoxal libre avec une diminution respective des volumes tumoraux de 8 et 2,7 fois. La même équipe a également encapsulé avec succès le méthylglyoxal dans des nanoparticules à base de dendrimères PAMAM, ces nanoparticules présentant un avantage thérapeutique similaire à celui des nanoparticules de chitosane (Chakrabarti *et al.*, 2014).

III.3.4.6. Oligodésoxynucléotides à motifs CPG non méthylés

Les oligonucléotides à motifs CpG non méthylés (CpG-ODN), caractéristiques de l'ADN bactérien ou viral, sont décrites pour leur rôle immunomodulateur notamment (Taghavi Pourianazar et Gunduz, 2016). Cependant, elles sont rapidement dégradées par les nucléases sériques et sont difficilement internalisées par les cellules, limitant leur activité au niveau des cellules tumorales. C'est pour cette raison que Taghavi Pourianazar *et al.* ont conjugué les CpG-ODN à des nanoparticules magnétiques composées d'un noyau magnétique (Fe_3O_4) recouvert d'une croûte intermédiaire en amino-silane (APTS) puis d'une deuxième croûte constituée de dendrimères de poly(amidoamine) cationiques (PAMAM) mesurant 40 ± 10 nm de diamètre (Taghavi Pourianazar et Gunduz, 2016). Les auteurs ont observé une internalisation des nanoparticules par les lignées cellulaires de cancer du sein MDA-MB-231 et SKBR3 ainsi qu'une augmentation considérable de l'activité antiproliférative des CpG-ODN après encapsulation en comparaison à leur forme libre (Taghavi Pourianazar et Gunduz, 2016). Lin *et al.* ont conjugué les CpG-ODN à des nanoparticules d'or afin de garantir un ciblage des TAMs (A. Y. Lin *et al.*, 2013). Les nanoparticules d'or sont en effet connues pour s'accumuler préférentiellement dans les cellules du système immunitaire. Trois types de nanoparticules mesurant 15, 30, ou 80 nm de diamètre ont ainsi été développées en fonction de la liaison des CpG-ODN à la surface des nanoparticules (Figure 32) : liaison directe (CpG-SH), liaison à une queue nucléotidique poly-T (CpG-T11-SH) ou liaison à un triéthylène glycol et à une queue nucléotidique poly-T (CpG-TEG-T11-SH) (A. Y. Lin *et al.*, 2013).

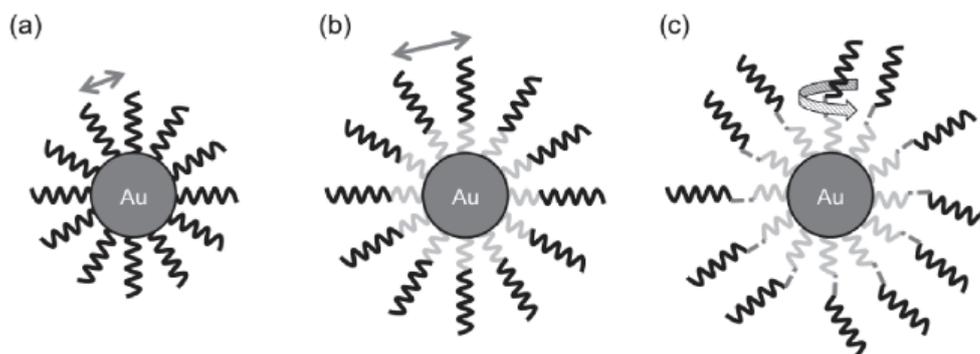


Figure 32. Représentation schématique des différents conjugués de CpG-ODN à des nanoparticules d'or. (a) Le design 1 correspond à la liaison directe des CpG-ODN (lignes noires) à la surface des nanoparticules, (b) Le design 2 correspond à la liaison des CpG-ODN (lignes noires) aux nanoparticules par le biais d'une queue nucléotidique poly-T (CpG-T11-SH) (lignes gris clair), (c) Le design 3 correspond à la liaison des CpG-ODN (lignes noires) aux nanoparticules par le biais d'un triéthylène glycol (pointillés) lié à une queue nucléotidique poly-T (CpG-TEG-T11-SH) (lignes gris clair) (A. Y. Lin *et al.*, 2013).

Les auteurs ont exposé des macrophages murins J774.A1 *in vitro* aux différents types de nanoparticules et ont observé une production importante de TNF- α , d'IL-6 et de G-CSF par les macrophages, particulier à un phénotype anti-tumoral, en particulier pour les nanoparticules CpG-TEG-T11-SH de 15 nm, ce qui n'était pas le cas pour les macrophages exposés aux CpG-ODN libres. L'avantage des nanoparticules encapsulant les CpG-ODN par rapport à leur forme libre a également été démontrée *in vivo* chez des souris après injection intratumorale, avec une inhibition importante de la croissance tumorale et un prolongement de la survie résultant notamment d'une infiltration de la tumeur par les cellules immunitaires (macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes T). Cependant, l'injection intratumorale ne permet pas d'évaluer le ciblage tumoral, ce qui nécessiterait une étude complémentaire (A. Y. Lin *et al.*, 2013).

Bourquin *et al.* ont encapsulé les CpG-ODN dans des nanoparticules de gélatine cationiques (272 ± 33 nm) (Bourquin *et al.*, 2008). Les auteurs ont démontré que les nanoparticules chargées en CpG-ODN stimulaient l'activation de lymphocytes T cytotoxiques et induisaient une réponse anti-tumorale protectrice chez un modèle murin de mélanome. De plus, Bourquin *et al.* ont démontré que l'encapsulation des CpG-ODN permettait un ciblage des cellules présentatrices d'antigènes au niveau des nœuds lymphatiques, macrophages et cellules dendritiques par exemple, évitant ainsi la stimulation généralisée néfaste du système immunitaire (Bourquin *et al.*, 2008).

III.3.4.7. Rifampicine

La rifampicine, usuellement prescrite en tant qu'antibiotique pour le traitement de diverses infections bactériennes incluant la tuberculose, a également été décrite pour son activité inhibitrice de l'angiogenèse au niveau du tissu hépatique, la rendant intéressante pour le traitement des métastases hépatiques (Shichiri *et al.*, 2009) et son activité immunomodulatrice (Dube *et al.*, 2014). La rifampicine n'a cependant pas fait l'objet d'études cliniques pour son activité anti-cancéreuse.

Plusieurs systèmes d'encapsulation de la rifampicine ont été développés, exclusivement pour une application au traitement de la tuberculose. Ainsi, la rifampicine a été encapsulée dans des nanoparticules polymères de PLGA (228 nm) (Kalluru *et al.*, 2013), des nanoparticules lipidiques solides (100 nm) (Aboutaleb *et al.*, 2012), des nanoparticules de polybutyl cyanoacrylate (Skidan *et al.*, 2003), ou encore des nanoparticules lipidiques mannosylées d'environ 315 nm (Vieira *et al.*, 2017). De plus, Dube *et al.* ont encapsulé la rifampicine dans des nanoparticules hybrides de 280 nm constituées d'un cœur polymère composé de PLGA et d'une croûte composée de chitosan et fonctionnalisée avec du 1,3- β -glucane pour le ciblage des macrophages dans le cadre du traitement de la tuberculose (Dube *et al.*, 2014). Les auteurs ont démontré *in vitro* que les nanoparticules permettaient de délivrer 4 fois plus de rifampicine aux macrophages alvéolaires que la rifampicine libre. De plus, après exposition des

macrophages aux nanoparticules encapsulant la rifampicine, une augmentation des concentrations en IL-12, TNF- α et IFN- γ a été observée, avec des concentrations respectivement 3, 16 et 23 fois plus importantes que pour les macrophages non exposés après 24 heures, témoignant d'une polarisation des macrophages vers un phénotype pro-inflammatoire (Dube *et al.*, 2014).

Bien que quelques travaux aient abordé la vectorisation de molécules immunomodulatrices et aient démontré des résultats prometteurs vis-à-vis de leur stabilité, du ciblage des macrophages, ou encore de l'activité biologique de ces dernières, très peu d'études ont abordé l'intérêt de la vectorisation vis-à-vis de leur activité immunomodulatrice. Quoiqu'il en soit, les études décrites dans ce chapitre démontrent la faisabilité de la vectorisation de ces dernières, ce qui est une stratégie intéressante pour potentialiser l'activité de ces actifs par une amélioration de leur biodisponibilité au niveau tumoral ainsi que de leur délivrance cellulaire. Par ailleurs, des travaux ont démontré la capacité immunomodulatrice intrinsèque des nanoparticules, variable selon leur nature, comme reviewé par Jiao *et al.* (Jiao *et al.*, 2014). A titre d'exemple, Fallarini *et al.* ont démontré une activation des macrophages RAW 264.7 après exposition à des nanoparticules d'or de 5 nm fonctionnalisées avec des disaccharides *in vitro* (production de TNF- α , prolifération des lymphocytes T et augmentation de la production d'IL-2) (Fallarini *et al.*, 2013). Par ailleurs, Huang *et al.* ont démontré que la poly-éthylénimine et le dextran, deux polymères cationiques, repolarisaient les TAMs vers un phénotype anti-tumoral *in vitro* et *in vivo* par le biais d'une action sur les Toll-like receptor (TLR) (Huang *et al.*, 2013).

III.4. Conclusion

Le rôle central du système immunitaire dans le développement de diverses maladies en fait une cible thérapeutique d'intérêt dans le cadre du traitement du cancer notamment. En effet, le cancer est associé à un dysfonctionnement du système immunitaire soutenant le développement de la maladie. Ainsi, l'immunothérapie anti-tumorale, visant à stimuler le système immunitaire afin d'éliminer les cellules cancéreuses, a connu des avancées majeures ces dernières années. Contrairement aux thérapies usuelles, à savoir la chimiothérapie, la chirurgie ou la radiothérapie, l'immunothérapie anti-tumorale permet une action anti-cancéreuse sur du long terme. De nombreuses molécules, déjà connues pour leurs effets anti-cancéreux, voire même utilisées en clinique pour certaines, sont également dotées d'une activité immunomodulatrice, permettant une reprogrammation des TAMs pro-tumoraux en macrophages anti-tumoraux par exemple. D'autres immunomodulateurs agissent de manière générale sur les cellules immunitaires du

microenvironnement tumoral et s'opposent ainsi à la croissance et la progression tumorale. Bon nombre de ces molécules ont démontré une activité intéressante et ont été encapsulées dans différents micro- ou nano-systèmes, mais l'application des vecteurs en immunothérapie anti-tumorale est peu documentée. Des études complémentaires sont donc nécessaires pour évaluer l'intérêt de cette vectorisation vis-à-vis de l'activité immunomodulatrice de ces actifs dans le cadre de l'immunothérapie anti-tumorale.

III.5. Références

- Aboutaleb, E., Noori, M., Gandomi, N., Atyabi, F., Fazeli, M.R., Jamalifar, H., Dinarvand, R., 2012. Improved antimycobacterial activity of rifampin using solid lipid nanoparticles. *Int. Nano Lett.* 2, 33–40.
- Achkar, C.C., Bentel, J.M., Boylan, J.F., Scher, H.I., Gudas, L.J., Miller, W.H., 1994. Differences in the pharmacokinetic properties of orally administered all-trans-retinoic acid and 9-cis-retinoic acid in the plasma of nude mice. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 22, 451–458.
- Akanda, M.H., Rai, R., Slipper, I.J., Chowdhry, B.Z., Lamprou, D., Getti, G., Douroumis, D., 2015. Delivery of retinoic acid to LNCap human prostate cancer cells using solid lipid nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 493, 161–171.
- Almouazen, E., Bourgeois, S., Boussaïd, A., Valot, P., Mallevall, C., Fessi, H., Nataf, S., Briançon, S., 2012. Development of a nanoparticle-based system for the delivery of retinoic acid into macrophages. *Int. J. Pharm.* 430, 207–215.
- Amiri-Kordestani, L., Blumenthal, G.M., Xu, Q.C., Zhang, L., Tang, S.W., Ha, L., Weinberg, W.C., Chi, B., Candau-Chacon, R., Hughes, P., Russell, A.M., Miksinski, S.P., Chen, X.H., McGuinn, W.D., Palmby, T., Schrieber, S.J., Liu, Q., Wang, J., Song, P., Mehrotra, N., Skarupa, L., Clouse, K., Al-Hakim, A., Sridhara, R., Ibrahim, A., Justice, R., Pazdur, R., Cortazar, P., 2014. FDA Approval: Ado-Trastuzumab Emtansine for the Treatment of Patients with HER2-Positive Metastatic Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* 20, 4436–4441.
- Ang, C., Doyle, E., Branch, A., 2016. Bisphosphonates as potential adjuvants for patients with cancers of the digestive system. *World J. Gastroenterol.* 22, 906–916.
- Bader, J.E., Enos, R.T., Velázquez, K.T., Carson, M.S., Nagarkatti, M., Nagarkatti, P.S., Chatzistamou, I., Davis, J.M., Carson, J.A., Robinson, C.M., Murphy, E.A., 2018. Macrophage depletion using clodronate liposomes decreases tumorigenesis and alters gut microbiota in the AOM/DSS mouse model of colon cancer. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* 314, G22–G31.
- Baeke, F., Takiishi, T., Korf, H., Gysemans, C., Mathieu, C., 2010. Vitamin D: modulator of the immune system. *Curr. Opin. Pharmacol.* 10, 482–496.
- Banchereau, J., Palucka, A.K., 2005. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 296–306.
- Barone, A., Hazarika, M., Theoret, M.R., Mishra-Kalyani, P., Chen, H., He, K., Sridhara, R., Subramaniam, S., Pfuma, E., Wang, Y., Li, H., Zhao, H., Zirkelbach, J.F., Keegan, P., Pazdur, R., 2017. FDA Approval Summary: Pembrolizumab for the Treatment of Patients with Unresectable or Metastatic Melanoma. *Clin. Cancer Res.* 23, 5661–5665.

- Bener, G., J. Félix, A., Sánchez de Diego, C., Pascual Fabregat, I., Ciudad, C.J., Noé, V., 2016. Silencing of CD47 and SIRP α by Polypurine reverse Hoogsteen hairpins to promote MCF-7 breast cancer cells death by PMA-differentiated THP-1 cells. *BMC Immunol.* 17, 32–43.
- Benzaid, I., Monkkonen, H., Bonnelye, E., Monkkonen, J., Clezardin, P., 2012. *In vivo* Phosphoantigen Levels in Bisphosphonate-Treated Human Breast Tumors Trigger V 9V 2 T-cell Antitumor Cytotoxicity through ICAM-1 Engagement. *Clin. Cancer Res.* 18, 6249–6259.
- Berd, D., 2004. M-Vax: an autologous, hapten-modified vaccine for human cancer. *Expert Rev. Vaccines* 3, 521–527.
- Bhattacharyya, N., Pal, A., Patra, S., Haldar, A.K., Roy, S., Ray, M., 2008. Activation of macrophages and lymphocytes by methylglyoxal against tumor cells in the host. *Int. Immunopharmacol.* 8, 1503–1512.
- Binnemars-Postma, K., Storm, G., Prakash, J., 2017. Nanomedicine Strategies to Target Tumor-Associated Macrophages. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 979-1005.
- Bourquin, C., Anz, D., Zwioerek, K., Lanz, A.-L., Fuchs, S., Weigel, S., Wurzenberger, C., von der Borch, P., Golic, M., Moder, S., Winter, G., Coester, C., Endres, S., 2008. Targeting CpG Oligonucleotides to the Lymph Node by Nanoparticles Elicits Efficient Antitumoral Immunity. *J. Immunol.* 181, 2990–2998.
- Bruns, H., Buttner, M., Fabri, M., Mougiakakos, D., Bittenbring, J.T., Hoffmann, M.H., Beier, F., Pasemann, S., Jitschin, R., Hofmann, A.D., Neumann, F., Daniel, C., Maurberger, A., Kempkes, B., Amann, K., Mackensen, A., Gerbitz, A., 2015. Vitamin D-dependent induction of cathelicidin in human macrophages results in cytotoxicity against high-grade B cell lymphoma. *Sci. Transl. Med.* 7, 282ra47-282ra47.
- Burnet, F.M., 1970. The Concept of Immunological Surveillance, in: Schwartz, R.S. (Ed.), *Progress in Tumor Research.* S. Karger AG 13, 1–27.
- Cao, D., Liang, L., Xu, Y., Sun, J., Lei, M., Wang, M., Wei, Y., Sun, Z., 2018. Tumor associated macrophages and angiogenesis dual-recognizable nanoparticles for enhanced cancer chemotherapy. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 14, 651-659.
- Caraglia, M., Marra, M., Naviglio, S., Botti, G., Addeo, R., Abbruzzese, A., 2010. Zoledronic acid: an unending tale for an antiresorptive agent. *Expert Opin. Pharmacother.* 11, 141–154.
- Cavnar, M.J., Turcotte, S., Katz, S.C., Kuk, D., Gönen, M., Shia, J., Allen, P.J., Balachandran, V.P., D’Angelica, M.I., Kingham, T.P., Jarnagin, W.R., DeMatteo, R.P., 2017. Tumor-Associated Macrophage Infiltration in Colorectal Cancer Liver Metastases is Associated With Better Outcome. *Ann. Surg. Oncol.* 24, 1835–1842.
- Chakrabarti, A., Talukdar, D., Pal, A., Ray, M., 2014. Immunomodulation of macrophages by methylglyoxal conjugated with chitosan nanoparticles against Sarcoma-180 tumor in mice. *Cell. Immunol.* 287, 27–35.
- Chatterjee, S., Mookerjee, A., Mookerjee Basu, J., Chakraborty, P., Ganguly, A., Adhikary, A., Mukhopadhyay, D., Ganguli, S., Banerjee, R., Ashraf, M., Biswas, J., Das, P.K., Sa, G., Chatterjee, M., Das, T., Choudhuri, S.K., 2009. A Novel Copper Chelate Modulates Tumor Associated Macrophages to Promote Anti-Tumor Response of T Cells. *PLoS ONE* 4, e7048.
- Chawla, J.S., Amiji, M.M., 2003. Cellular uptake and concentrations of tamoxifen upon administration in poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles. *AAPS PharmSci* 5, 28–34.
- Cheever, M.A., Higano, C.S., 2011. PROVENGE (Sipuleucel-T) in Prostate Cancer: The First FDA-Approved Therapeutic Cancer Vaccine. *Clin. Cancer Res.* 17, 3520–3526.
- Chen, M.-C., Hsu, S.-L., Lin, H., Yang, T.-Y., 2014. Retinoic acid and cancer treatment. *BioMedicine* 4, 1-6.

- Ciccarese, C., Alfieri, S., Santoni, M., Santini, D., Brunelli, M., Bergamini, C., Licitra, L., Montironi, R., Tortora, G., Massari, F., 2016. New toxicity profile for novel immunotherapy agents: focus on immune-checkpoint inhibitors. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 12, 57–75.
- Clemente, C.G., Mihm, M.C., Bufalino, R., Zurrida, S., Collini, P., Cascinelli, N., 1996. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer* 77, 1303–1310.
- Clézardin, P., 2013. Mechanisms of action of bisphosphonates in oncology: a scientific concept evolving from antiresorptive to anticancer activities. *BoneKEy Rep.* 2, 1-7.
- Cohen-Lahav, M., Shany, S., Tobvin, D., Chaimovitz, C., Douvdevani, A., 2006. Vitamin D decreases NFκB activity by increasing IκBα levels. *Nephrol. Dial. Transplant.* 21, 889–897.
- Cohen, M.H., Gootenberg, J., Keegan, P., Pazdur, R., 2007. FDA Drug Approval Summary: Bevacizumab (Avastin(R)) Plus Carboplatin and Paclitaxel as First-Line Treatment of Advanced/Metastatic Recurrent Nonsquamous Non-Small Cell Lung Cancer. *The Oncologist* 12, 713–718.
- Cohen, M.H., Shen, Y.L., Keegan, P., Pazdur, R., 2009. FDA Drug Approval Summary: Bevacizumab (Avastin(R)) as Treatment of Recurrent Glioblastoma Multiforme. *The Oncologist* 14, 1131–1138.
- Colapicchioni, V., Palchetti, S., Pozzi, D., Marini, E.S., Riccioli, A., Ziparo, E., Papi, M., Amenitsch, H., Caracciolo, G., 2015. Killing cancer cells using nanotechnology: novel poly(I:C) loaded liposome–silica hybrid nanoparticles. *J. Mater. Chem. B* 3, 7408–7416.
- Coleman, R.E., Marshall, H., Cameron, D., Dodwell, D., Burkinshaw, R., Keane, M., Gil, M., Houston, S.J., Grieve, R.J., Barrett-Lee, P.J., Ritchie, D., Pugh, J., Gaunt, C., Rea, U., Peterson, J., Davies, C., Hiley, V., Gregory, W., Bell, R., 2011. Breast-Cancer Adjuvant Therapy with Zoledronic Acid. *N. Engl. J. Med.* 365, 1396–1405.
- Copier, J., Dalglish, A., 2006. Overview of Tumor Cell–Based Vaccines. *Int. Rev. Immunol.* 25, 297–319.
- Coscia, M., Quaglino, E., Iezzi, M., Curcio, C., Pantaleoni, F., Riganti, C., Holen, I., Mönkkönen, H., Boccadoro, M., Forni, G., Musiani, P., Bosia, A., Cavallo, F., Massaia, M., 2010. Zoledronic acid repolarizes tumour-associated macrophages and inhibits mammary carcinogenesis by targeting the mevalonate pathway. *J. Cell. Mol. Med.* 14, 2803–2815.
- Cullis, J., Siolas, D., Avanzi, A., Barui, S., Maitra, A., Bar-Sagi, D., 2017. Macropinocytosis of Nab-paclitaxel Drives Macrophage Activation in Pancreatic Cancer. *Cancer Immunol. Res.* 5, 182–190.
- Deeb, K.K., Trump, D.L., Johnson, C.S., 2007. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat. Rev. Cancer* 7, 684–700.
- De Rosa, G., Misso, G., Salzano, G., Caraglia, M., 2013. Bisphosphonates and Cancer: What Opportunities from Nanotechnology? *J. Drug Deliv.* 2013, 1–17.
- Deligdisch, L., Jacobs, A.J., Cohen, C.J., 1982. Histologic correlates of virulence in ovarian adenocarcinoma. II. Morphologic correlates of host response. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 144, 885–889.
- Demko, S., Summers, J., Keegan, P., Pazdur, R., 2008. FDA Drug Approval Summary: Alemtuzumab as Single-Agent Treatment for B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *The Oncologist* 13, 167–174.
- Douer, D., 2001. Treatment of newly diagnosed and relapsed acute promyelocytic leukemia with intravenous liposomal all-trans retinoic acid. *Blood* 97, 73–80.
- Drach, J., Lopez-Berestein, G., McQueen, T., Andreeff, M., Mehta, K., 1993. Induction of differentiation in myeloid leukemia cell lines and acute promyelocytic leukemia cells by liposomal all-trans-retinoic acid. *Cancer Res.* 53, 2100–2104.

- Drake, M.T., Clarke, B.L., Khosla, S., 2008. Bisphosphonates: Mechanism of Action and Role in Clinical Practice. *Mayo Clin. Proc.* 83, 1032–1045.
- Dube, A., Reynolds, J.L., Law, W.-C., Maponga, C.C., Prasad, P.N., Morse, G.D., 2014. Multimodal nanoparticles that provide immunomodulation and intracellular drug delivery for infectious diseases. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 10, 831–838.
- Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., Schreiber, R.D., 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* 3, 991–998.
- Edagwa, B.J., Guo, D., Puligujja, P., Chen, H., McMillan, J., Liu, X., Gendelman, H.E., Narayanasamy, P., 2014. Long-acting antituberculous therapeutic nanoparticles target macrophage endosomes. *FASEB J.* 28, 5071–5082.
- Epstein, N.A., Fatti, L.P., 1976. Prostatic carcinoma: some morphological features affecting prognosis. *Cancer* 37, 2455–2465.
- Essandoh, K., Li, Y., Huo, J., Fan, G.-C., 2016. MiRNA-Mediated Macrophage Polarization and its Potential Role in the Regulation of Inflammatory Response: *SHOCK* 46, 122–131.
- Ezzati Nazhad Dolatabadi, J., Hamishehkar, H., Eskandani, M., Valizadeh, H., 2014. Formulation, characterization and cytotoxicity studies of alendronate sodium-loaded solid lipid nanoparticles. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 117, 21–28.
- Fallarini, S., Paoletti, T., Battaglini, C.O., Ronchi, P., Lay, L., Bonomi, R., Jha, S., Mancin, F., Scrimin, P., Lombardi, G., 2013. Factors affecting T cell responses induced by fully synthetic glyco-gold-nanoparticles. *Nanoscale* 5, 390–400.
- Forghani, P., Waller, E.K., 2015. Poly (I: C) modulates the immunosuppressive activity of myeloid-derived suppressor cells in a murine model of breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 153, 21–30.
- Fridlender, Z.G., Jassar, A., Mishalian, I., Wang, L.-C., Kapoor, V., Cheng, G., Sun, J., Singhal, S., Levy, L., Albelda, S.M., 2013. Using macrophage activation to augment immunotherapy of established tumours. *Br. J. Cancer* 108, 1288–1297.
- Fritz, J.M., Tennis, M.A., Orlicky, D.J., Lin, H., Ju, C., Redente, E.F., Choo, K.S., Staab, T.A., Bouchard, R.J., Merrick, D.T., Malkinson, A.M., Dwyer-Nield, L.D., 2014. Depletion of Tumor-Associated Macrophages Slows the Growth of Chemically Induced Mouse Lung Adenocarcinomas. *Front. Immunol.* 5, 587-598.
- Fujiwara, Y., Komohara, Y., Ikeda, T., Takeya, M., 2011. Corosolic acid inhibits glioblastoma cell proliferation by suppressing the activation of signal transducer and activator of transcription-3 and nuclear factor-kappa B in tumor cells and tumor-associated macrophages. *Cancer Sci.* 102, 206–211.
- Galkina, E., Ley, K., 2009. Immune and Inflammatory Mechanisms of Atherosclerosis. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 165–197.
- Garcia, J.A., Dreicer, R., 2011. Immunotherapy in castration-resistant prostate cancer: integrating sipuleucel-T into our current treatment paradigm. *Oncol. Williston Park N* 25, 242–249.
- García-Quiroz, J., García-Becerra, R., Santos-Martínez, N., Avila, E., Larrea, F., Díaz, L., 2016. Calcitriol stimulates gene expression of cathelicidin antimicrobial peptide in breast cancer cells with different phenotype. *J. Biomed. Sci.* 23, 78–84.
- Gazzaniga, S., Bravo, A.I., Guglielmotti, A., van Rooijen, N., Maschi, F., Vecchi, A., Mantovani, A., Mordoh, J., Wainstok, R., 2007. Targeting Tumor-Associated Macrophages and Inhibition of MCP-1 Reduce Angiogenesis and Tumor Growth in a Human Melanoma Xenograft. *J. Invest. Dermatol.* 127, 2031–2041.

- Giusti, R.M., Shastri, K.A., Cohen, M.H., Keegan, P., Pazdur, R., 2007. FDA Drug Approval Summary: Panitumumab (Vectibix™). *The Oncologist* 12, 577–583.
- Gombart, A.F., 2009. The vitamin D–antimicrobial peptide pathway and its role in protection against infection. *Future Microbiol.* 4, 1151–1165.
- Grace, V.M.B., Siddikuzzaman, null, Rimashree, B., 2015. Liposome encapsulated all trans retinoic acid (ATRA) has enhanced immunomodulatory and inflammation reducing activities in mice model. *Anticancer Agents Med. Chem.* 15, 196–205.
- Grillo-López, A.J., 2002. Zevalin: the first radioimmunotherapy approved for the treatment of lymphoma. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 2, 485–493.
- Grothey, A., Sugrue, M.M., Purdie, D.M., Dong, W., Sargent, D., Hedrick, E., Kozloff, M., 2008. Bevacizumab Beyond First Progression Is Associated With Prolonged Overall Survival in Metastatic Colorectal Cancer: Results From a Large Observational Cohort Study (BRiTE). *J. Clin. Oncol.* 26, 5326–5334.
- Gutman, D., Epstein-Barash, H., Tsurriel, M., Golomb, G., 2012. Alendronate Liposomes for Antitumor Therapy: Activation of $\gamma\delta$ T Cells and Inhibition of Tumor Growth, in: Zahavy, E., Ordentlich, A., Yitzhaki, S., Shafferman, A. (Eds.), *Nano-Biotechnology for Biomedical and Diagnostic Research*. Springer Netherlands, Dordrecht, 733, 165–179.
- Ha, T.C., Li, H., 2007. Meta-analysis of clodronate and breast cancer survival. *Br. J. Cancer* 96, 1796–1801.
- Hamilton, E., Clay, T.M., Blackwell, K.L., 2011. New Perspectives on Zoledronic Acid in Breast Cancer: Potential Augmentation of Anticancer Immune Response. *Cancer Invest.* 29, 533–541.
- He, Y., Huang, Y., Huang, Z., Jiang, Y., Sun, X., Shen, Y., Chu, W., Zhao, C., 2017. Bisphosphonate-functionalized coordination polymer nanoparticles for the treatment of bone metastatic breast cancer. *J. Controlled Release* 264, 76–88.
- Heckelsmiller, K., Rall, K., Beck, S., Schlamp, A., Seiderer, J., Jahrsdorfer, B., Krug, A., Rothenfusser, S., Endres, S., Hartmann, G., 2002. Peritumoral CpG DNA Elicits a Coordinated Response of CD8 T Cells and Innate Effectors to Cure Established Tumors in a Murine Colon Carcinoma Model. *J. Immunol.* 169, 3892–3899.
- Horlad, H., Fujiwara, Y., Takemura, K., Ohnishi, K., Ikeda, T., Tsukamoto, H., Mizuta, H., Nishimura, Y., Takeya, M., Komohara, Y., 2013. Corosolic acid impairs tumor development and lung metastasis by inhibiting the immunosuppressive activity of myeloid-derived suppressor cells. *Mol. Nutr. Food Res.* 57, 1046–1054.
- Huang, Z., Yang, Y., Jiang, Y., Shao, J., Sun, X., Chen, J., Dong, L., Zhang, J., 2013. Anti-tumor immune responses of tumor-associated macrophages via toll-like receptor 4 triggered by cationic polymers. *Biomaterials* 34, 746–755.
- Jass, J.R., 1986. Lymphocytic infiltration and survival in rectal cancer. *J. Clin. Pathol.* 39, 585–589.
- Jassar, A.S., Suzuki, E., Kapoor, V., Sun, J., Silverberg, M.B., Cheung, L., Burdick, M.D., Strieter, R.M., Ching, L.-M., Kaiser, L.R., Albelda, S.M., 2005. Activation of Tumor-Associated Macrophages by the Vascular Disrupting Agent 5,6-Dimethylxanthenone-4-Acetic Acid Induces an Effective CD8⁺ T-Cell-Mediated Antitumor Immune Response in Murine Models of Lung Cancer and Mesothelioma. *Cancer Res.* 65, 11752–11761.
- Jeong, Y., 2003. Preparation of poly(α -lactide-co-glycolide) microspheres encapsulating all-trans retinoic acid. *Int. J. Pharm.* 259, 79–91.

- Jeong, Y.-I., Kang, M.-K., Sun, H.-S., Kang, S.-S., Kim, H.-W., Moon, K.-S., Lee, K.-J., Kim, S.-H., Jung, S., 2004. All-trans-retinoic acid release from core-shell type nanoparticles of poly(ϵ -caprolactone)/poly(ethylene glycol) diblock copolymer. *Int. J. Pharm.* 273, 95–107.
- Jiao, Q., Li, L., Mu, Q., Zhang, Q., 2014. Immunomodulation of Nanoparticles in Nanomedicine Applications. *BioMed Res. Int.* 2014, 1–19.
- Jonker, D.J., O'Callaghan, C.J., Karapetis, C.S., Zalcberg, J.R., Tu, D., Au, H.-J., Berry, S.R., Krahn, M., Price, T., Simes, R.J., Tebbutt, N.C., van Hazel, G., Wierzbicki, R., Langer, C., Moore, M.J., 2007. Cetuximab for the Treatment of Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med.* 357, 2040–2048.
- Kalluru, R., Fenaroli, F., Westmoreland, D., Ulanova, L., Maleki, A., Roos, N., Paulsen Madsen, M., Koster, G., Egge-Jacobsen, W., Wilson, S., Roberg-Larsen, H., Khuller, G.K., Singh, A., Nystrom, B., Griffiths, G., 2013. Poly(lactide-co-glycolide)-rifampicin nanoparticles efficiently clear *Mycobacterium bovis* BCG infection in macrophages and remain membrane-bound in phago-lysosomes. *J. Cell Sci.* 126, 3043–3054.
- Kawarada, Y., Ganss, R., Garbi, N., Sacher, T., Arnold, B., Hammerling, G.J., 2001. NK- and CD8+ T Cell-Mediated Eradication of Established Tumors by Peritumoral Injection of CpG-Containing Oligodeoxynucleotides. *J. Immunol.* 167, 5247–5253.
- Kopecka, J., 2015. Self-assembling nanoparticles encapsulating zoledronic acid revert multidrug resistance in cancer cells. *Oncotarget* 6, 31461-31478.
- Krishnan, A.V., Swami, S., Feldman, D., 2012. The potential therapeutic benefits of vitamin D in the treatment of estrogen receptor positive breast cancer. *Steroids* 77, 1107–1112.
- Kunzmann, V., Bauer, E., Wilhelm, M., 1999. γ/δ T-Cell Stimulation by Pamidronate. *N. Engl. J. Med.* 340, 737–738.
- Leget, G.A., Czuczman, M.S., 1998. Use of rituximab, the new FDA-approved antibody. *Curr. Opin. Oncol.* 10, 548–551.
- Lemery, S.J., Zhang, J., Rothmann, M.D., Yang, J., Earp, J., Zhao, H., McDougal, A., Pilaro, A., Chiang, R., Gootenberg, J.E., Keegan, P., Pazdur, R., 2010. U.S. Food and Drug Administration Approval: Ofatumumab for the Treatment of Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia Refractory to Fludarabine and Alemtuzumab. *Clin. Cancer Res.* 16, 4331–4338.
- Lewis, C.E., Pollard, J.W., 2006. Distinct Role of Macrophages in Different Tumor Microenvironments. *Cancer Res.* 66, 605–612.
- Liao, D., Liu, Z., Wrasidlo, W., Chen, T., Luo, Y., Xiang, R., Reisfeld, R.A., 2011. Synthetic enzyme inhibitor: a novel targeting ligand for nanotherapeutic drug delivery inhibiting tumor growth without systemic toxicity. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 7, 665–673.
- Lim, S.-J., Lee, M.-K., Kim, C.-K., 2004. Altered chemical and biological activities of all-trans retinoic acid incorporated in solid lipid nanoparticle powders. *J. Controlled Release* 100, 53–61.
- Lin, A.Y., Mattos Almeida, J.P., Bear, A., Liu, N., Luo, L., Foster, A.E., Drezek, R.A., 2013. Gold Nanoparticle Delivery of Modified CpG Stimulates Macrophages and Inhibits Tumor Growth for Enhanced Immunotherapy. *PLoS ONE* 8, e63550.
- Lipponen, P.K., Eskelinen, M.J., Jauhiainen, K., Harju, E., Terho, R., 1992. Tumour infiltrating lymphocytes as an independent prognostic factor in transitional cell bladder cancer. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 29A, 69–75.
- Lipson, E.J., Drake, C.G., 2011. Ipilimumab: An Anti-CTLA-4 Antibody for Metastatic Melanoma. *Clin. Cancer Res.* 17, 6958–6962.

- Liss, C., Fekete, M.J., Hasina, R., Lingen, M.W., 2002. Retinoic acid modulates the ability of macrophages to participate in the induction of the angiogenic phenotype in head and neck squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer* 100, 283–289.
- Liu, H., Wang, S.-H., Chen, S.-C., Chen, C.-Y., Lo, J.-L., Lin, T.-M., 2016. Immune modulation of CD4+CD25+ regulatory T cells by zoledronic acid. *BMC Immunol.* 17, 45-54.
- Lizotte, P.H., Baird, J.R., Stevens, C.A., Lauer, P., Green, W.R., Brockstedt, D.G., Fiering, S.N., 2014. Attenuated *Listeria monocytogenes* reprograms M2-polarized tumor-associated macrophages in ovarian cancer leading to iNOS-mediated tumor cell lysis. *OncolImmunology* 3, e28926.
- Lucas, A.T., White, T.F., Deal, A.M., Herity, L.B., Song, G., Santos, C.M., Zamboni, W.C., 2017. Profiling the relationship between tumor-associated macrophages and pharmacokinetics of liposomal agents in preclinical murine models. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 13, 471–482.
- Lyford-Pike, S., Peng, S., Young, G.D., Taube, J.M., Westra, W.H., Akpeng, B., Bruno, T.C., Richmon, J.D., Wang, H., Bishop, J.A., Chen, L., Drake, C.G., Topalian, S.L., Pardoll, D.M., Pai, S.I., 2013. Evidence for a Role of the PD-1:PD-L1 Pathway in Immune Resistance of HPV-Associated Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Res.* 73, 1733–1741.
- Maniar, A., Zhang, X., Lin, W., Gastman, B.R., Pauza, C.D., Strome, S.E., Chapoval, A.I., 2010. Human gammadelta T lymphocytes induce robust NK cell-mediated antitumor cytotoxicity through CD137 engagement. *Blood* 116, 1726–1733.
- Mantovani, A., Locati, M., 2013. Tumor-Associated Macrophages as a Paradigm of Macrophage Plasticity, Diversity, and Polarization: Lessons and Open Questions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33, 1478–1483.
- Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., Sica, A., 2002. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 23, 549–555.
- Marra, M., Salzano, G., Leonetti, C., Tassone, P., Scarsella, M., Zappavigna, S., Calimeri, T., Franco, R., Liguori, G., Cigliana, G., Ascani, R., La Rotonda, M.I., Abbruzzese, A., Tagliaferri, P., Caraglia, M., De Rosa, G., 2011. Nanotechnologies to use bisphosphonates as potent anticancer agents: the effects of zoledronic acid encapsulated into liposomes. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 7, 955–964.
- Miller, M.A., Zheng, Y.-R., Gadde, S., Pfirschke, C., Zope, H., Engblom, C., Kohler, R.H., Iwamoto, Y., Yang, K.S., Askevold, B., Kolishetti, N., Pittet, M., Lippard, S.J., Farokhzad, O.C., Weissleder, R., 2015. Tumour-associated macrophages act as a slow-release reservoir of nano-therapeutic Pt(IV) pro-drug. *Nat. Commun.* 6, 8692-9004.
- Mönkkönen, J., Heath, T.D., 1993. The effects of liposome-encapsulated and free clodronate on the growth of macrophage-like cells *in vitro*: the role of calcium and iron. *Calcif. Tissue Int.* 53, 139–146.
- Mönkkönen, J., Pennanen, N., Lapinjoki, S., Urtti, A., 1994. Clodronate (dichloromethylene bisphosphonate) inhibits LPS-stimulated IL-6 and TNF production by RAW 264 cells. *Life Sci.* 54, 229-234.
- Mookerjee, A., 2006. Overcoming Drug-Resistant Cancer by a Newly Developed Copper Chelate through Host-Protective Cytokine-Mediated Apoptosis. *Clin. Cancer Res.* 12, 4339–4349.
- Nacopoulou, L., Azaris, P., Papacharalampous, N., Davaris, P., 1981. Prognostic significance of histologic host response in cancer of the large bowel. *Cancer* 47, 930–936.
- Nakayama, S., Yokote, T., Akioka, T., Hiraoka, N., Nishiwaki, U., Miyoshi, T., Iwaki, K., Takayama, A., Masuda, Y., Hatooka, J., Fujimoto, M., Nishimura, Y., Tsuji, M., 2017. Infiltration of effector regulatory T cells predicts poor prognosis of diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified. *Blood Adv.* 1, 486–493.

- Naseri, M., Akbarzadeh, A., Saffari, Z., Ebrahimi Shahmabadi, H., 2015. The efficiency of Zoledronic acid loaded liposomal nanoparticles on breast cancer: an *in vitro* study. *J. Curr. Pharma Res.* 1586–1590.
- Nastruzzi, C., Walde, P., Menegatti, E., Gambari, R., 1990. Liposome-associated retinoic acid. Increased *in vitro* antiproliferative effects on neoplastic cells. *FEBS Lett.* 259, 293–296.
- Neves, H., Kwok, H.F., 2015. Recent advances in the field of anti-cancer immunotherapy. *BBA Clin.* 3, 280–288.
- Ngambenjawong, C., Gustafson, H.H., Pun, S.H., 2017b. Progress in tumor-associated macrophage (TAM)-targeted therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 114, 206–221.
- Nicolete, R., Santos, D.F. dos, Faccioli, L.H., 2011. The uptake of PLGA micro or nanoparticles by macrophages provokes distinct *in vitro* inflammatory response. *Int. Immunopharmacol.* 11, 1557–1563.
- Ning, Y., Suzman, D., Maher, V.E., Zhang, L., Tang, S., Ricks, T., Palmby, T., Fu, W., Liu, Q., Goldberg, K.B., Kim, G., Pazdur, R., 2017. FDA Approval Summary: Atezolizumab for the Treatment of Patients with Progressive Advanced Urothelial Carcinoma after Platinum-Containing Chemotherapy. *The Oncologist* 22, 743–749.
- Ozpolat, B., Lopez-Berestein, G., Adamson, P., Fu, C.J., Williams, A.H., 2003. Pharmacokinetics of intravenously administered liposomal all-trans-retinoic acid (ATRA) and orally administered ATRA in healthy volunteers. *J. Pharm. Pharm. Sci. Publ. Can. Soc. Pharm. Sci. Soc. Can. Sci. Pharm.* 6, 292–301.
- Pang, L., Qin, J., Han, L., Zhao, W., Liang, J., Xie, Z., Yang, P., Wang, J., 2016. Exploiting macrophages as targeted carrier to guide nanoparticles into glioma. *Oncotarget* 7, 37081–37091.
- Parmiani, G., Russo, V., Maccalli, C., Parolini, D., Rizzo, N., Maio, M., 2014. Peptide-based vaccines for cancer therapy. *Hum. Vaccines Immunother.* 10, 3175–3178.
- Penn, C.A., Yang, K., Zong, H., Lim, J.-Y., Cole, A., Yang, D., Baker, J., Goonewardena, S.N., Buckanovich, R.J., 2018. Therapeutic Impact of Nanoparticle Therapy Targeting Tumor-Associated Macrophages. *Mol. Cancer Ther.* 17, 96–106.
- Perugini, P., Genta, I., Conti, B., Modena, T., Pavanetto, F., 2001. Long-term release of clodronate from biodegradable microspheres. *AAPS PharmSciTech* 2, 6-14.
- Plevy, S., 2002. The immunology of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 31, 77–92.
- Raedler, L.A., 2015. Opdivo (Nivolumab): Second PD-1 Inhibitor Receives FDA Approval for Unresectable or Metastatic Melanoma. *Am. Health Drug Benefits* 8, 180–183.
- Rathore, R., Jain, J.P., Srivastava, A., Jachak, S.M., Kumar, N., 2008. Simultaneous determination of hydrazinocurcumin and phenol red in samples from rat intestinal permeability studies: HPLC method development and validation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 46, 374–380.
- Ribatti, D., 2017. The concept of immune surveillance against tumors: The first theories. *Oncotarget* 8, 7175-7180.
- Rigby, W.F., Shen, L., Ball, E.D., Guyre, P.M., Fanger, M.W., 1984. Differentiation of a human monocytic cell line by 1,25-dihydroxyvitamin D3 (calcitriol): a morphologic, phenotypic, and functional analysis. *Blood* 64, 1110–1115.
- Rilke, F., Colnaghi, M.I., Cascinelli, N., Andreola, S., Baldini, M.T., Bufalino, R., Della Porta, G., Ménard, S., Pierotti, M.A., Testori, A., 1991. Prognostic significance of HER-2/neu expression in breast cancer and its relationship to other prognostic factors. *Int. J. Cancer* 49, 44–49.
- Rogers, M.J., Gordon, S., Benford, H.L., Coxon, F.P., Luckman, S.P., Monkkonen, J., Frith, J.C., 2000. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer* 88, 2961–2978.

- Rolny, C., Mazzone, M., Tugues, S., Laoui, D., Johansson, I., Coulon, C., Squadrito, M.L., Segura, I., Li, X., Knevels, E., Costa, S., Vinckier, S., Dresselaer, T., Åkerud, P., De Mol, M., Salomäki, H., Phillipson, M., Wyns, S., Larsson, E., Buyschaert, I., Botling, J., Himmelreich, U., Van Ginderachter, J.A., De Palma, M., Dewerchin, M., Claesson-Welsh, L., Carmeliet, P., 2011. HRG Inhibits Tumor Growth and Metastasis by Inducing Macrophage Polarization and Vessel Normalization through Downregulation of PlGF. *Cancer Cell* 19, 31–44.
- Salzano, G., Marra, M., Porru, M., Zappavigna, S., Abbruzzese, A., La Rotonda, M.I., Leonetti, C., Caraglia, M., De Rosa, G., 2011. Self-assembly nanoparticles for the delivery of bisphosphonates into tumors. *Int. J. Pharm.* 403, 292–297.
- Santini, D., Martini, F., Fratto, M.E., Galluzzo, S., Vincenzi, B., Agrati, C., Turchi, F., Piacentini, P., Rocci, L., Manavalan, J.S., Tonini, G., Poccia, F., 2009. *In vivo* effects of zoledronic acid on peripheral $\gamma\delta$ T lymphocytes in early breast cancer patients. *Cancer Immunol. Immunother.* 58, 31–38.
- Sapra, P., Hooper, A.T., O'Donnell, C.J., Gerber, H.-P., 2011. Investigational antibody drug conjugates for solid tumors. *Expert Opin. Investig. Drugs* 20, 1131–1149.
- Sato, E., Olson, S.H., Ahn, J., Bundy, B., Nishikawa, H., Qian, F., Jungbluth, A.A., Frosina, D., Gnjatic, S., Ambrosone, C., Kepner, J., Odunsi, T., Ritter, G., Lele, S., Chen, Y.-T., Ohtani, H., Old, L.J., Odunsi, K., 2005. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 18538–18543.
- Schiraldi, C., Zappavigna, S., D'Agostino, A., Porto, S., Gaito, O., Lusa, S., Lamberti, M., De Rosa, M., De Rosa, G., Caraglia, M., 2014. Nanoparticles for the delivery of zoledronic acid to prostate cancer cells: A comparative analysis through time lapse video-microscopy technique. *Cancer Biol. Ther.* 15, 1524–1532.
- Schreiber, R.D., Old, L.J., Smyth, M.J., 2011. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science* 331, 1565–1570.
- Seidel, J.A., Otsuka, A., Kabashima, K., 2018. Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 Therapies in Cancer: Mechanisms of Action, Efficacy, and Limitations. *Front. Oncol.* 8, 86–99.
- Sharma, G., Karmali, P.P., Sugahara, K.N., Xie, H., Kotamraju, V.R., Ruoslahti, E., Smith, J.W., 2013. Depletion of tumor-associated macrophages with clodronate-loaded plga nanoparticles. *Nano LIFE* 3, 1343005-1343015.
- Shichiri, M., Fukai, N., Kono, Y., Tanaka, Y., 2009. Rifampicin as an oral angiogenesis inhibitor targeting hepatic cancers. *Cancer Res.* 69, 4760–4768.
- Shim, J.S., Kim, D.H., Jung, H.J., Kim, J.H., Lim, D., Lee, S.-K., Kim, K.-W., Ahn, J.W., Yoo, J.-S., Rho, J.-R., Shin, J., Kwon, H.J., 2002. Hydrazinocurcumin, a novel synthetic curcumin derivative, is a potent inhibitor of endothelial cell proliferation. *Bioorg. Med. Chem.* 10, 2439–2444.
- Shime, H., Matsumoto, M., Oshiumi, H., Tanaka, S., Nakane, A., Iwakura, Y., Tahara, H., Inoue, N., Seya, T., 2012. Toll-like receptor 3 signaling converts tumor-supporting myeloid cells to tumoricidal effectors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 2066–2071.
- Shmeeda, H., Amitay, Y., Gorin, J., Tzemach, D., Mak, L., Stern, S.T., Barenholz, Y., Gabizon, A., 2016. Coencapsulation of alendronate and doxorubicin in pegylated liposomes: a novel formulation for chemoimmunotherapy of cancer. *J. Drug Target.* 24, 878–889.
- Sica, A., Allavena, P., Mantovani, A., 2008. Cancer related inflammation: The macrophage connection. *Cancer Lett.* 267, 204–215.
- Skidan, I.N., Gel'perina, S.E., Severin, S.E., Guliaev, A.E., 2003. [Enhanced activity of rifampicin loaded with polybutyl cyanoacrylate nanoparticles in relation to intracellularly localized bacteria]. *Antibiot. Khimioterapiia Antibiot. Chemoterapy Sic* 48, 23–26.

- Slingluff, C.L., 2011. The Present and Future of Peptide Vaccines for Cancer: Single or Multiple, Long or Short, Alone or in Combination? *Cancer J.* 17, 343–350.
- Soma, C.E., Dubernet, C., Barratt, G., Benita, S., Couvreur, P., 2000. Investigation of the role of macrophages on the cytotoxicity of doxorubicin and doxorubicin-loaded nanoparticles on M5076 cells *in vitro*. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 68, 283–289.
- Sousa, S., Auriola, S., Mönkkönen, J., Määttä, J., 2015. Liposome encapsulated zoledronate favours M1-like behaviour in murine macrophages cultured with soluble factors from breast cancer cells. *BMC Cancer* 15, 4-14.
- Speth, M.T., Repnik, U., Müller, E., Spanier, J., Kalinke, U., Corthay, A., Griffiths, G., 2017. Poly(I:C)-Encapsulating Nanoparticles Enhance Innate Immune Responses to the Tuberculosis Vaccine Bacille Calmette–Guérin (BCG) via Synergistic Activation of Innate Immune Receptors. *Mol. Pharm.* 14, 4098–4112.
- Streitbuerger, A., Henrichs, M., Ahrens, H., Lanvers-Kaminzky, C., Gouin, F., Gosheger, G., Harges, J., 2011. Cytotoxic effect of clodronate and zoledronate on the chondrosarcoma cell lines HTB-94 and CAL-78. *Int Orthop* 35, 1369–1373.
- Summers, J., Cohen, M.H., Keegan, P., Pazdur, R., 2010. FDA Drug Approval Summary: Bevacizumab plus Interferon for Advanced Renal Cell Carcinoma. *The Oncologist* 15, 104–111.
- Szymczak, I., Pawliczak, R., 2016. The Active Metabolite of Vitamin D 3 as a Potential Immunomodulator. *Scand. J. Immunol.* 83, 83–91.
- Taghavi Pourianazar, N., Gunduz, U., 2016. CpG oligodeoxynucleotide-loaded PAMAM dendrimer-coated magnetic nanoparticles promote apoptosis in breast cancer cells. *Biomed. Pharmacother.* 78, 81–91.
- Tamanoi, F., Azizian, M., Ashrafi, M., Bathaie, S., 2017. Mevalonate Pathway and Human Cancers. *Curr. Mol. Pharmacol.* 10, 77–85.
- Tewari, K.S., Sill, M.W., Long, H.J., Penson, R.T., Huang, H., Ramondetta, L.M., Landrum, L.M., Oaknin, A., Reid, T.J., Leitao, M.M., Michael, H.E., Monk, B.J., 2014. Improved Survival with Bevacizumab in Advanced Cervical Cancer. *N. Engl. J. Med.* 370, 734–743.
- Thurnher, M., Nussbaumer, O., Gruenbacher, G., 2012. Novel Aspects of Mevalonate Pathway Inhibitors as Antitumor Agents. *Clin. Cancer Res.* 18, 3524–3531.
- Townsend, K., Evans, K.N., Campbell, M.J., Colston, K.W., Adams, J.S., Hewison, M., 2005. Biological actions of extra-renal 25-hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase and implications for chemoprevention and treatment. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 97, 103–109.
- Vaculikova, E., Placha, D., Pisarcik, M., Peikertova, P., Dedkova, K., Devinsky, F., Jampilek, J., 2014. Preparation of Risedronate Nanoparticles by Solvent Evaporation Technique. *Molecules* 19, 17848–17861.
- van Rooijen, N., Sanders, A., van den Berg, T.K., 1996. Apoptosis of macrophages induced by liposome-mediated intracellular delivery of clodronate and propamidine. *J. Immunol. Methods* 193, 93–99.
- Vantourout, P., Mookerjee-Basu, J., Rolland, C., Pont, F., Martin, H., Davrinche, C., Martinez, L.O., Perret, B., Collet, X., Perigaud, C., Peyrottes, S., Champagne, E., 2009. Specific Requirements for V 9V 2 T Cell Stimulation by a Natural Adenylated Phosphoantigen. *J. Immunol.* 183, 3848–3857.
- Velcheti, V., Schalper, K., 2016. Basic Overview of Current Immunotherapy Approaches in Cancer. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book* 36, 298–308.
- Ventola, C.L., 2017. Cancer Immunotherapy, Part 1: Current Strategies and Agents. *P T Peer-Rev. J. Formul. Manag.* 42, 375–383.

- Vieira, A.C., Magalhães, J., Rocha, S., Cardoso, M.S., Santos, S.G., Borges, M., Pinheiro, M., Reis, S., 2017. Targeted macrophages delivery of rifampicin-loaded lipid nanoparticles to improve tuberculosis treatment. *Nanomed.* 12, 2721–2736.
- Vinogradov, S., Warren, G., Wei, X., 2014. Macrophages associated with tumors as potential targets and therapeutic intermediates. *Nanomed.* 9, 695–707.
- Waldmann, T.A., 2017. Cytokines in Cancer Immunotherapy. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 10, 1-23.
- Wållberg, M., Cooke, A., 2013. Immune mechanisms in type 1 diabetes. *Trends Immunol.* 34, 583–591.
- Wang, C., Hu, Z., Zhu, Z., Zhang, X., Wei, Z., Zhang, Y., Hu, D., Cai, Q., 2016. The MSHA strain of *Pseudomonas aeruginosa* (PA-MSHA) inhibits gastric carcinoma progression by inducing M1 macrophage polarization. *Tumor Biol.* 37, 6913–6921.
- Wang, M., Zhang, C., Song, Y., Wang, Z., Wang, Y., Luo, F., Xu, Y., Zhao, Y., Wu, Z., Xu, Y., 2017. Mechanism of immune evasion in breast cancer. *OncoTargets Ther.* Volume 10, 1561–1573.
- Wang, X., Zhang, Y., Zhang, X., Tian, W., Feng, W., Chen, T., 2012. The curcumin analogue hydrazinocurcumin exhibits potent suppressive activity on carcinogenicity of breast cancer cells via STAT3 inhibition. *Int. J. Oncol.* 40, 1189–1195.
- Ward, R., Sims, A.H., Lee, A., Lo, C., Wynne, L., Yusuf, H., Gregson, H., Lisanti, M.P., Sotgia, F., Landberg, G., Lamb, R., 2015. Monocytes and macrophages, implications for breast cancer migration and stem cell-like activity and treatment. *Oncotarget* 6, 14687–14699.
- Weigert, A., Tzieply, N., von Knethen, A., Johann, A.M., Schmidt, H., Geisslinger, G., Brune, B., 2007. Tumor Cell Apoptosis Polarizes Macrophages Role of Sphingosine-1-Phosphate. *Mol. Biol. Cell* 18, 3810–3819.
- Wu, X., Schulte, B.C., Zhou, Y., Haribhai, D., Mackinnon, A.C., Plaza, J.A., Williams, C.B., Hwang, S.T., 2014. Depletion of M2-Like Tumor-Associated Macrophages Delays Cutaneous T-Cell Lymphoma Development *In vivo*. *J. Invest. Dermatol.* 134, 2814–2822.
- Yan, M., Jene, N., Byrne, D., Millar, E.K., O’Toole, S.A., McNeil, C.M., Bates, G.J., Harris, A.L., Banham, A.H., Sutherland, R.L., Fox, S.B., 2011. Recruitment of regulatory T cells is correlated with hypoxia-induced CXCR4 expression, and is associated with poor prognosis in basal-like breast cancers. *Breast Cancer Res.* 13, 47-56.
- Yang, J., Zhang, Z., Chen, C., Liu, Y., Si, Q., Chuang, T.-H., Li, N., Gomez-Cabrero, A., Reisfeld, R.A., Xiang, R., Luo, Y., 2014. MicroRNA-19a-3p inhibits breast cancer progression and metastasis by inducing macrophage polarization through downregulated expression of Fra-1 proto-oncogene. *Oncogene* 33, 3014–3023.
- Ylitalo, R., Mönkkönen, J., Ylä-Herttuala, S., 1998. Effects of liposome-encapsulated bisphosphonates on acetylated LDL metabolism, lipid accumulation and viability of phagocytosing cells. *Life Sci.* 62, 413–422.
- Yuan, R., Li, S., Geng, H., Wang, X., Guan, Q., Li, X., Ren, C., Yuan, X., 2017. Reversing the polarization of tumor-associated macrophages inhibits tumor metastasis. *Int. Immunopharmacol.* 49, 30–37.
- Zanganeh, S., Hutter, G., Spitler, R., Lenkov, O., Mahmoudi, M., Shaw, A., Pajarinen, J.S., Nejadnik, H., Goodman, S., Moseley, M., Coussens, L.M., Daldrup-Link, H.E., 2016. Iron oxide nanoparticles inhibit tumour growth by inducing pro-inflammatory macrophage polarization in tumour tissues. *Nat. Nanotechnol.* 11, 986–994.
- Zeisberger, S.M., Odermatt, B., Marty, C., Zehnder-Fjällman, A.H.M., Ballmer-Hofer, K., Schwendener, R.A., 2006. Clodronate-liposome-mediated depletion of tumour-associated macrophages: a new and highly effective antiangiogenic therapy approach. *Br. J. Cancer* 95, 272–281.

Zhan, X., Jia, L., Niu, Y., Qi, H., Chen, X., Zhang, Q., Zhang, J., Wang, Y., Dong, L., Wang, C., 2014. Targeted depletion of tumour-associated macrophages by an alendronate–glucomannan conjugate for cancer immunotherapy. *Biomaterials* 35, 10046–10057.

Zhang, H., Chen, J., 2018. Current status and future directions of cancer immunotherapy. *J. Cancer* 9, 1773–1781.

Zhang, X., Tian, W., Cai, X., Wang, X., Dang, W., Tang, H., Cao, H., Wang, L., Chen, T., 2013. Hydrazinocurcumin Encapsulated Nanoparticles “Re-Educate” Tumor-Associated Macrophages and Exhibit Anti-Tumor Effects on Breast Cancer Following STAT3 Suppression. *PLoS ONE* 8, 65896-65905.

Zheng, X., Turkowski, K., Mora, J., Brüne, B., Seeger, W., Weigert, A., Savai, R., 2017. Redirecting tumor-associated macrophages to become tumoricidal effectors as a novel strategy for cancer therapy. *Oncotarget* 8, 48436-48452.

Zhou, Q., Xian, M., Xiang, S., Xiang, D., Shao, X., Wang, J., Cao, J., Yang, X., Yang, B., Ying, M., He, Q., 2017. All-Trans Retinoic Acid Prevents Osteosarcoma Metastasis by Inhibiting M2 Polarization of Tumor-Associated Macrophages. *Cancer Immunol. Res.* 5, 547–559.

PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre IV : Développement de nanoparticules encapsulant le calcitriol et prolongeant son activité anti-cancéreuse

IV.1. Introduction

Les travaux visant à encapsuler le calcitriol en tant qu'actif anti-cancéreux dans des nanoparticules et à évaluer ses activités antiproliférative et cytotoxique vis-à-vis d'une lignée d'adénocarcinome mammaire humain (MCF-7) feront l'objet de ce chapitre. L'objectif de cette étude est d'obtenir des nanoparticules d'une taille proche de 200 nm, présentant un rendement d'encapsulation du calcitriol élevé ainsi qu'une activité anti-cancéreuse prolongée de ce dernier.

Le calcitriol, métabolite actif de la vitamine D, possède une activité anti-cancéreuse modulée par des effets anti-prolifératifs, pro-apoptotiques, pro-différenciatifs, et immunomodulateurs (Deeb *et al.*, 2007). Cependant, son utilisation clinique en chimiothérapie anti-cancéreuse est limitée par les doses supraphysiologiques requises pour qu'il soit efficace en tant que tel, à l'origine d'effets secondaires (Woloszynska-Read *et al.*, 2011). Les nanoparticules représentent donc une approche thérapeutique intéressante pour potentialiser son activité par un ciblage tumoral, pour assurer son internalisation cellulaire, et son activité prolongée tout en limitant ses effets secondaires.

Sur la base d'une précédente étude (Almouazen *et al.*, 2013) et du caractère hydrophobe du calcitriol, nous avons choisi de l'encapsuler dans des nanocapsules polymères. Afin de garantir une libération prolongée du calcitriol, pouvant être à l'origine d'une activité biologique prolongée, nous avons porté un intérêt particulier à la polarité de l'huile utilisée pour former le cœur des nanocapsules ainsi qu'au ratio-polymère:huile, définis dans la littérature comme étant des paramètres d'intérêt pour varier le profil de libération des molécules hydrophobes (Mora-Huertas, 2010).

Afin de vérifier la possibilité d'une action prolongée du calcitriol, nous avons étudié ses activités antiproliférative et cytotoxiques *in vitro* sur la lignée d'adénocarcinome mammaire humain MCF-7 pour laquelle la sensibilité au calcitriol est reconnue (Chouvet *et al.*, 1986; Simboli-Campbell *et al.*, 1997; Welsh, 2011; Almouazen *et al.*, 2013; Saracligil *et al.*, 2017). Bien que l'intérêt de l'encapsulation du calcitriol dans des nanosystèmes ait fait l'objet de plusieurs travaux (Almouazen *et al.*, 2013; Ramalho *et al.*, 2015; Sabzichi *et al.*, 2017), aucun n'a démontré un quelconque intérêt d'une libération prolongée de ce dernier vis-à-vis de son activité anti-cancéreuse. Conjointement au fait que

ces études considèrent un temps d'exposition long des cellules cancéreuses au calcitriol (> 72 heures) et aux travaux ayant démontré l'impact négatif d'une réduction de ce temps d'exposition sur l'activité des molécules, nous avons choisi d'évaluer l'activité antiproliférative du calcitriol après 2 temps d'exposition : 24 heures (temps court) et 96 heures (temps long) (Chouvet *et al.*, 1986 ; Rajh *et al.*, 2016). Par ailleurs, sur la base des travaux de Chouvet *et al.* (1986), nous avons défini une durée d'expérimentation de 10 jours.

Nous avons finalement évalué l'activité cytotoxique du calcitriol libre et encapsulé afin de vérifier l'impact du protocole et l'intérêt de l'encapsulation vis-à-vis de cette deuxième activité du calcitriol.

La première partie de ce chapitre sera consacrée à la présentation des résultats obtenus à l'issue de ces différentes études et sera présentée sous forme d'article. La deuxième partie abordera quant à elle les résultats complémentaires à notre étude, avec notamment la poursuite des essais *in vitro* avec un essai *in vivo* de suivi de la calcémie post-injection du calcitriol chez des souris.

Faits marquants de l'étude

- ✓ La présence simultanée d'huile et de polymère permet d'augmenter l'efficacité d'encapsulation du calcitriol et de réduire son burst release, faisant des nanocapsules polymères une forme galénique d'intérêt pour cet actif.
 - ✓ L'augmentation de la concentration en polymère des nanoparticules limite le « burst release » du calcitriol encapsulé.
 - ✓ La nature du cœur huileux des nanocapsules, en particulier sa polarité, influence largement la solubilisation et la rétention du calcitriol, et donc son efficacité d'encapsulation ainsi que son profil de libération.
 - ✓ La rétention du calcitriol dans le cœur huileux est favorisée par la présence d'une coque dans laquelle il est faiblement soluble.
 - ✓ Le calcitriol possède des activités antiproliférative et cytotoxique vis-à-vis de la lignée cellulaire d'adénocarcinome mammaire humain MCF-7.
 - ✓ Le profil de libération du calcitriol est corrélé à son activité. Une libération lente de ce dernier est associée à une potentialisation de son activité antiproliférative pendant au moins 10 jours. Une libération immédiate importante du calcitriol est au contraire associée à une réponse rapide et non durable de ce dernier.
-

IV.2. Publication

Polymeric nanocapsules as drug carriers for sustained anticancer activity of calcitriol in breast cancer cells

Article publié dans *International Journal of Pharmaceutics*, doi : 10.1016/j.ijpharm.2018.08.022

Sabrina Nicolas ^a, Marie-Alexandrine Bolzinger ^a, Lars Petter Jordheim ^b, Yves Chevalier ^a,

Hatem Fessi ^a, Eyad Almouazen ^{a,*}

^a Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, LAGEP UMR 5007, 43 boulevard du 11 novembre 1918, F-69622 Villeurbanne, France

^b Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, 69008 Lyon, France

* Corresponding author. E-mail address: eyad.al-mouazen@univ-lyon1.fr (E. Almouazen).

IV.2.1. Abstract

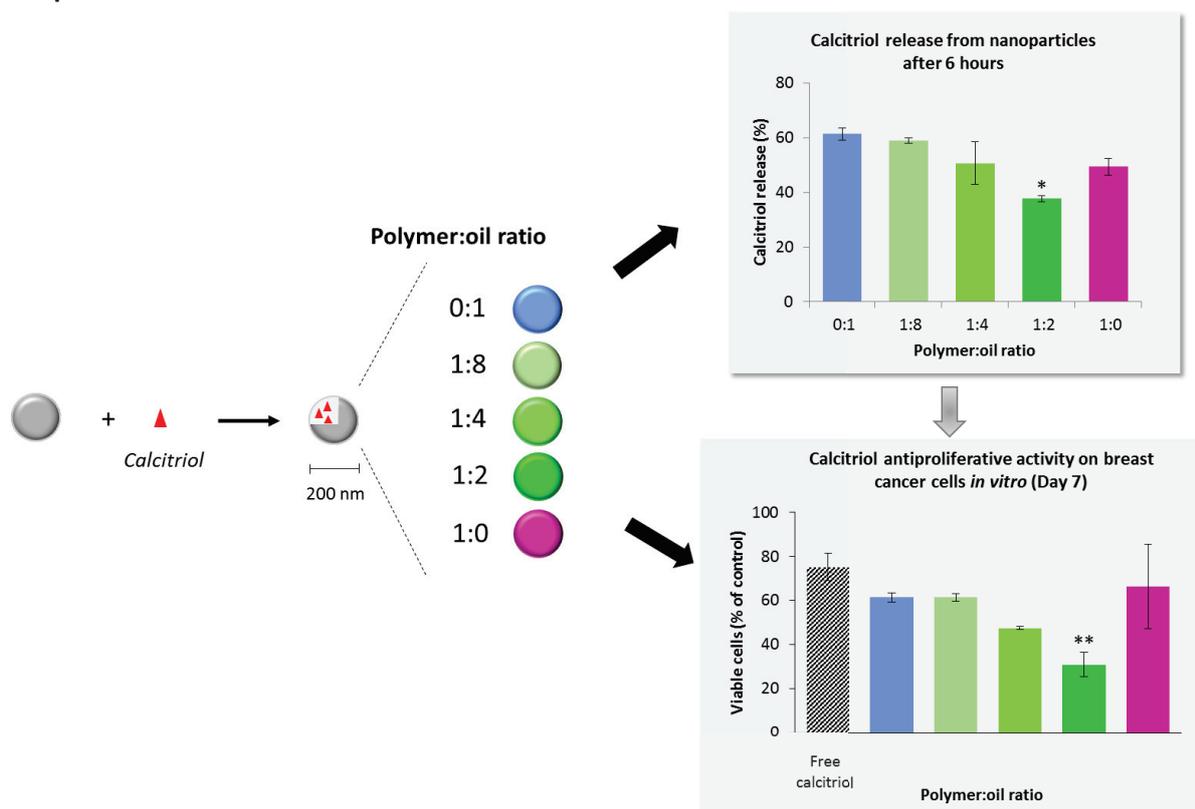
Clinical use of calcitriol (1,25-dihydroxyvitamin D₃) as an anticancer agent is currently limited by the requirement of supraphysiological doses and associated hypercalcemia. Nanoencapsulation of calcitriol is a strategy to overcome these drawbacks, allowing reduced administered doses and/or frequency, while retaining the therapeutic activity towards cancer cells. For this purpose, we investigated the impact of calcitriol encapsulation on its antiproliferative activity and optimized formulation parameters with that respect.

Calcitriol-loaded polymeric nanoparticles with different polymer:oil ratios were prepared by the nanoprecipitation method. Nanoparticles had similar mean size (200nm) and EE (85%) whereas their release profile strongly depended on formulation parameters. Antiproliferative and cytotoxic activities of formulated calcitriol were evaluated *in vitro* using human breast adenocarcinoma cells

(MCF-7) and showed that calcitriol-induced cell growth inhibition was closely related to its release kinetics. For the most suitable formulation, a sustained cell growth inhibition was observed over 10 days compared to free form.

Advantages of calcitriol encapsulation and the role of formulation parameters on its biological activity *in vitro* were demonstrated. Selected nanoparticle formulation is a promising calcitriol delivery system ensuring a prolonged anticancer activity that could improve its therapeutic efficiency.

Graphical abstract



Keywords

Calcitriol, Cancer, Biodegradable polymeric nanoparticles, Drug delivery, MCF-7 cell line

IV.2.2. Introduction

Calcitriol (1,25-dihydroxyvitamin D₃), the active form of vitamin D, has several biological activities involving its binding to the vitamin D receptor (VDR), a ligand-activated transcription factor of several genes (Deeb *et al.*, 2007). Calcitriol is currently used in clinic for its activity on calcium and phosphorus metabolism. It is marketed for oral administration as capsules (0.25 or 0.50 µg) and solution (1 µg·mL⁻¹). In addition, calcitriol is known for its anti-inflammatory properties, but this has not been translated into clinical practice (Di Rosa *et al.*, 2011). Several studies concluded that low blood

levels of calcitriol were associated with high cancer incidence and low survival, especially for breast cancer (Duffy *et al.*, 2017, Feldman *et al.*, 2014). The anticancer activity of calcitriol has been demonstrated *in vitro* on cancer-derived cell cultures, and *in vivo* upon either calcitriol administration or a vitamin D supplementation of the diet using various animal models (Feldman *et al.*, 2014). Calcitriol exerts its anticancer effects through several mechanisms depending on experimental conditions and tumor types. They include growth inhibition, induction of apoptosis, and stimulation of differentiation (Deeb *et al.*, 2007). The consistency of these findings across cell cultures and animal experiments suggests that calcitriol could be used for cancer treatment, notably in the case of hormone-dependent breast and prostate cancers (Ben-Eltriki *et al.*, 2016, Krishnan *et al.*, 2012).

The anticancer activity of calcitriol has been evaluated in clinical studies in combination with other anticancer agents, including docetaxel, paclitaxel and imatinib, showing additive to synergistic effects (Maj *et al.*, 2015, Woloszynska-Read *et al.*, 2011). However, efficient anticancer activity of calcitriol requires supraphysiological doses (1–1000 nM *in vitro* and >1 nM *in vivo*) that preclude clinical use because of the high risk of hypercalcemia-related side effects (Woloszynska-Read *et al.*, 2011). Even with intermittent dose schedules proposed to limit hypercalcemia, the maximal tolerated dose of calcitriol was as low as 60 µg per os per week. In addition, no actual efficacy was observed in the last large clinical trial (ASCENT-2) conducted on 953 patients with metastatic castration-resistant prostate cancer receiving 45 µg of calcitriol per os per week in combination with docetaxel and dexamethasone (Scher *et al.*, 2011). Calcitriol has a short half-life in bloodstream (10 h for the marketed oral dosage forms and around 5 h for intravenous forms) and a high protein binding ratio, which makes available dosage forms inconvenient for cancer treatment (Ben-Eltriki *et al.*, 2016, Wagner *et al.*, 2013). It is worth considering that actual efficiency relies on the concentration and lifetime of calcitriol inside cancer cells. Thus, the importance of intracellular calcitriol level was demonstrated in experiments on human prostate cancer cell line DU-145 that overexpresses 24-hydroxylase (Ly *et al.*, 1999). Ly *et al.* (1999) showed that liarozole fumarate (CYP24A1 catabolism enzyme inhibitor) prolonged the intracellular half-life of calcitriol from 11 to 31 h and increased its antiproliferative activity.

For these reasons, it is considered that calcitriol encapsulation using NPs is expected suitable for cancer therapy regarding four physiological aspects: i) it may protect calcitriol against degradation or elimination in the bloodstream, ii) it may inhibit calcitriol systemic side effects, notably hypercalcemia, iii) NPs may increase tumor targeting, and iv) NPs may enhance calcitriol cellular delivery and prolong its intracellular residence time by limiting its catabolism and its exocytosis. Data supporting these starting hypotheses come from our previous work showing that encapsulated

calcitriol into polymeric NCs had a rapid release profile and a similar antiproliferative activity over 10 days *in vitro* on MCF-7 cells as compared to free calcitriol (Almouazen *et al.*, 2013). The efficacy of encapsulated calcitriol systems has also been reported in few studies and confirmed the interest of calcitriol nanoencapsulation regarding its anticancer activities (Ramalho *et al.*, 2015, Sabzichi *et al.*, 2017). Ramalho *et al.* demonstrated that encapsulation of calcitriol into PLGA-based nanospheres enhanced its antiproliferative activity on lung carcinoma cells as after 72 h of incubation with free and encapsulated calcitriol (3.2 μ M), 20% and 45% of growth inhibition were observed, respectively (Ramalho *et al.*, 2015).

Similarly, Sabzichi *et al.* found that calcitriol-loaded nanostructured lipid carriers showed significant higher antiproliferative and cytotoxic activities on the human breast cancer cell line MCF-7 than free calcitriol after 24 h of exposure to the compounds (Sabzichi *et al.*, 2017). However, sustained activity of encapsulated calcitriol could not be investigated in these early works, and remains an open question (Almouazen *et al.*, 2013, Ramalho *et al.*, 2015, Sabzichi *et al.*, 2017). It is accepted that nanocapsules are a better choice than nanospheres for encapsulating hydrophobic drugs as reviewed in Mora-Huertas *et al.* (2010). However, the choice of the oil to form NCs core has not been extensively studied. It appears as a crucial parameter as encapsulation efficiency into NCs is correlated to drug solubility in the oily core. Indeed, slow release is correlated with a high affinity of the drug for the oily core (Larsen *et al.*, 2002, Mora-Huertas *et al.*, 2010). These issues are addressed in the present work.

We also evaluated the antiproliferative and cytotoxic activities of calcitriol-loaded NPs on the human breast adenocarcinoma cell line MCF-7. Breast cancers, in particular with positive estrogen receptors, have been well studied for calcitriol anticancer activity and were the subject of several clinical trials (Krishnan *et al.*, 2012). MCF-7 is an estrogen-dependent well-differentiated cell line known to express VDR, which makes it interesting to evaluate nanodelivery systems (Welsh, 2011). Previous studies on MCF-7 highlighted the impact of experimental conditions on growth inhibitory effects of calcitriol in particular cell exposure time to the molecule (Chouvet *et al.*, 1986, Simboli-Campbell *et al.*, 1996). Chouvet *et al.* (1986) reported that a reduction of cell number was not detected before at least 3 days of exposure, and 7 days were needed to achieve statistical significance. They also found that cells grew rapidly after calcitriol removal from the culture medium. As long exposure times are required for a definite antiproliferative activity, long-lasting calcitriol delivery seems necessary for therapeutic uses. Sustained delivery can be achieved by encapsulation of calcitriol. Moreover, long exposure times *in vitro* do not allow an evaluation of the influence of sustained release from encapsulated dosage forms, and experimental protocols have to be adapted using shorter exposure

times closer to *in vivo* conditions, where tumor cells receive punctual massive doses of drug at each administration.

In the present study, these two crucial points were investigated. The composition of the NP oily core and the polymer:oil ratio were modified in order to determine suitable NP formulation parameters allowing the development of a more efficient delivery system of calcitriol. The experimental protocol was optimized in terms of cell exposure time to allow the evaluation of a sustained antiproliferative activity of calcitriol-loaded NPs *in vitro* on MCF-7 cell line. Finally, the cytotoxic activity of the selected NP formulation was evaluated *in vitro*.

IV.2.3. Materials and methods

IV.2.3.1. Chemicals

Calcitriol was purchased from Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA) (purity $\geq 97\%$). Poly(d,l-lactic acid), a biodegradable polymer was used for NP formulations (PLA, Mw 20,000 g·mol⁻¹, Evonik, Germany). Caprylic/capric triglycerides (Labrafac Lipophile[®] WL1349), caprylic/capric triglyceride PEG-4 esters (Labrafac Hydro[®] WL1219), apricot kernel oil PEG-6 esters (Labrafil[®] M1944CS) and PEG-8 caprylic/capric glycerides (Labrasol[®]) were kindly gifted by Gattefossé (Saint-Priest, France). Caprylic/capric/succinic triglycerides (Miglyol[®] 829) was obtained from Cremer. Polysorbate 80 (Montanox[®] 80 VG Premium) and sodium lauryl sulfate were respectively supplied from Seppic (France) and Sigma-Aldrich. Acetonitrile (Fisher Scientific), acetone (Acros Organics) and ultrapure water (resistivity $> 18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ at 25 °C) used throughout the experiments and all other reagents were of analytical or pharmaceutical grades.

IV.2.3.2. Preparation of the calcitriol-loaded polymeric NPs

Calcitriol-loaded NPs were prepared using the nanoprecipitation technique (Fessi *et al.*, 1989). Briefly, polymer (0–0.3%, w/w of the organic phase) and calcitriol (0.01%, w/w of the organic phase) were dissolved in 7 mL of acetone. This organic phase was added dropwise into 14 mL of an aqueous phase containing 0.05% (w/w of the aqueous phase) of Montanox[®] VG80, a nonionic surfactant used to stabilize NP formulation. The NP suspension was stirred moderately for 20 min at room temperature. Finally, acetone and a part of the water were removed from the suspension under vacuum (200 mbar) using a rotary evaporator (Rotavapor[®] R-205, Büchi, Switzerland). Nanocapsules (NCs) were prepared by the same procedure by addition of either Labrasol[®], Labrafil[®] M 1944 CS, Labrafac Lipophile[®] WL1349, Labrafac Hydro[®] WL1219, Miglyol[®] 829, or the mix of these latter two

compounds (0.3% w/w of the organic phase) to the initial organic solution. These compounds form the inner oily core of NCs. Five polymer:oil ratios varying from 0:1 to 1:0 were tested. Similar calcitriol-free formulas were prepared as controls (blank-NP). The NP suspensions were stored at 4 °C in hermetically closed vials.

IV.2.3.3. NP physicochemical characterizations

IV.2.3.3.1. Particle size and zeta potential measurements

The average size, polydispersity index (Pdl), and zeta potential of NPs dispersed in deionized water containing 1 mM of NaCl were measured by dynamic light scattering using a NanoZS instrument (Malvern, UK). The z-average diameter of NPs was calculated using the methods of the cumulants, taking 0.887 mPa·s for the viscosity of water at 25 °C. Formulations with Pdl less than 0.1 were considered as monodisperse.

IV.2.3.3.2. Quantification of calcitriol by HPLC-UV

The collected samples were analyzed in terms of calcitriol content using liquid chromatography with a reverse phase column. The HPLC set up from Waters (St Quentin en Yvelines, France) was composed of a Waters 717 injector, a Waters 600 pump and a Waters 2996 photodiode array UV detector ($\lambda = 266$ nm). A Xselect HSS C18 column (3.5 μm , 4.6 \times 150 mm, Waters, Ireland) was used. An isocratic mobile phase consisting of 10% of acetonitrile, 80% of methanol and 10% of 0.5% acetic acid solution was used with a flow rate of 1 mL·min⁻¹ and a temperature of 30 °C. Sample injection volume was 20 μL . The calibration curve for the quantification of calcitriol was linear over the range of concentrations used from 0.125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ to 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r^2 = 0.9999$). The method was validated according to the ICH guidelines; LOD and LOQ values were 0.06 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and 0.125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ respectively.

IV.2.3.3.3. Determination of the calcitriol encapsulation efficiency

The encapsulation efficiency was defined as the ratio of the encapsulated calcitriol to the total calcitriol concentrations in NP suspensions. For this purpose, NP suspensions were separated in supernatants (non-encapsulated) and pellets (encapsulated) fractions using centrifugation at 62,000g for 30 min. The centrifugation method was optimized and validated to ensure a complete separation of these two fractions. The concentration of encapsulated calcitriol was calculated as the difference of the total concentration and the concentration of free calcitriol (non-encapsulated) present in the supernatants determined by HPLC analysis.

$$\text{Encapsulation efficiency (\%)} = \frac{\text{Total drug concentration} - \text{free drug concentration}}{\text{Total drug concentration}} \times 100$$

All measurements were performed in triplicate.

IV.2.3.4. *In vitro* calcitriol-NPs release studies

The release profile of calcitriol-loaded NPs was determined over 10 days by measurements of the released concentration in the aqueous phase using a centrifugation method as previously described (Almouazen *et al.*, 2013). Calcitriol-loaded NPs were dispersed under moderate magnetic stirring (300 rpm) at 37 °C into a phosphate buffer solution (PBS, pH = 7.4) containing 0.01% of SDS in order to satisfy sink conditions (final concentration of calcitriol = 1 µg·mL⁻¹). Aliquots of 1 mL were collected at predetermined times and centrifuged at 62,000g for 10 min. The drug released from NP was quantified by analysis of the supernatant by HPLC.

IV.2.3.5. Evaluation of the stability of the encapsulated calcitriol

During the storage of the NP suspensions at 4 °C, the stability of calcitriol was assessed for at least one month. The stability of encapsulated calcitriol was also evaluated at 37 °C for 10 days. At predetermined intervals of time, samples of 0.8 mL were collected and analyzed by HPLC to determine the remaining amount of calcitriol.

IV.2.3.6. Solubilizing properties of NC components – theoretical background

The interactions between NCs compounds are governed by their affinity, which can be predicted by their Hansen's solubility parameters that consider the contribution of dispersion (δ_d), polar (δ_p) and hydrogen-bonding (δ_{hb}) interactions (Hansen, 2007). The affinity between the different components of NCs is given by:

$$\delta^2 = \delta_d^2 + \delta_p^2 + \delta_{hb}^2$$

The contributions of each compound were calculated from tables of increments according to Hoftyzer and van Krevelen (Van Krevelen and Te Nijenhuis, 2009). The distance $\overline{\Delta\delta}$ between two compounds A and B is calculated using the following equation:

$$\overline{\Delta\delta}(A-B) = \left[(\delta_d(A) - \delta_d(B))^2 + (\delta_p(A) - \delta_p(B))^2 + (\delta_{hb}(A) - \delta_{hb}(B))^2 \right]^{1/2}$$

The solubility region can approximately be delineated by a circle of radius of about 5 $\overline{\Delta\delta}$ -units: solubility is high if the distance is less than 5 MPa^{1/2} (J^{1/2} cm^{-3/2}).

IV.2.3.7. Partition of calcitriol between polymer and oil

To estimate calcitriol partition between PLA and oil in the different prepared formulations, the organic phases of NCs were prepared as previously described for NPs preparation. After agitation, the acetone part of the solutions was removed using a centrifugal evaporator (miVac, Genevac, UK). Then, the oil was collected and analyzed by HPLC in order to quantify the amount of calcitriol recovered in both oil and polymer. Several polymer:oil ratios (1:8–1:2) were compared using Miglyol® 829 as oil.

IV.2.3.8. *In vitro* biological evaluations of calcitriol activity

IV.2.3.8.1. Cell lines

Human breast adenocarcinoma cells (MCF-7) obtained from American Type Culture Collection (USA) were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Inc) supplemented with fetal bovine serum (10%), penicillin (100 units/mL) and streptomycin (100 µg·mL⁻¹) at 37 °C in the presence of 5% CO₂.

IV.2.3.8.2. Growth inhibitory activity assay

To evaluate the antiproliferative activity of calcitriol *in vitro*, MCF-7 cells were seeded at a density of 1000 cells per well in 96-well plate. After 24 h delay for cell adhesion (Day 0), cells were exposed to various concentrations of free (ethanolic solution) or encapsulated calcitriol (ranging from 10 to 1000 nM). In order to vary exposure periods from 24 h to 96 h, calcitriol was removed at Day 1 or Day 4, respectively, by replacement with a calcitriol-free medium. At days 4, 7 and 10, cell survival was estimated by a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. In similar dilution conditions, ethanol and blank NPs were used as negative controls. The protocol is illustrated in Figure 33.

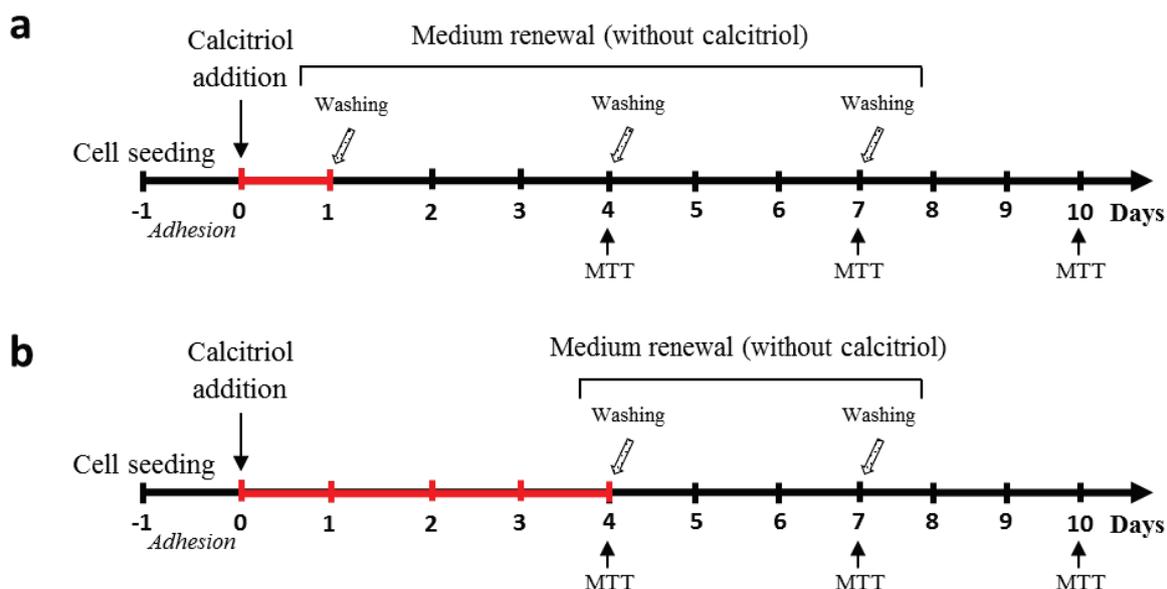


Figure 33. Method for the evaluation of calcitriol antiproliferative activity *in vitro*. At Day -1, MCF-7 cells were seeded at a density of 1000 cells per well in 96-well plate. After 24 h (Day 0), cells were exposed to free or encapsulated calcitriol for (a) 24 h or (b) 96 h and cell medium was changed. Cell exposure period to calcitriol is represented by the red part of the scale. Cell viability of MCF-7 was assessed at Day 4, Day 7 and Day 10 by MTT assays.

Briefly, the MTT solution (5 mg·mL⁻¹, 20 μL) was added to each well and the plates were incubated in darkness for 2 h at 37 °C. Then, the medium was removed and 100 μL of a solution of HCl/isopropanol/H₂O (1/90/9, v/v/v) was added to extract formazan. The optical density values were measured at 540 nm for dark purple intensity and at 690 nm for subtraction of background using a multiwell-scanning spectrophotometer (Multiskan Ascent, Labsystems SA, Cergy-pontoise, France). Results were expressed as percentage of the control (unexposed cells).

IV.2.3.8.3. Cytotoxic activity assay

Cells were stained with AnnexinV/propidium iodide (PI) (Roche) according to the manufacturer's instructions and analyzed by flow activated cell sorting (FACS) on a Becton Dickinson FacsCalibur® (San Jose, CA, USA). Based on the analysis, cells were counted as viable (AnnexinV⁻/PI⁻), early apoptotic (AnnexinV⁺/PI⁻), late apoptotic (AnnexinV⁺/PI⁺) or necrotic (AnnexinV⁻/PI⁺), expressed as percentage of the total amount of studied cells. MCF-7 cells were seeded at a density of 100,000 cells per well in 6-well plate. After 24 h delay for cells adhesion, cells were exposed to 1000 nM of free or encapsulated calcitriol (NC LM, polymer:oil ratio of 1:2) over a period of 24 h. Then, cell culture medium was removed and cells were washed with PBS in order to eliminate calcitriol, and cell culture

medium was replaced by a calcitriol-free medium. The assay was performed at days 4 and 7. Unexposed cells were used as control.

IV.2.3.9. Statistical analysis

Results were evaluated using analysis of variance with subsequent comparisons by Student's test for paired or non-paired data, as appropriate. Statistical significance was defined as $p < 0.05$ (*) and $p < 0.01$ (**). Values are reported as means \pm standard deviation (SD).

IV.2.4. Results

IV.2.4.1. Impact of formulation parameters on calcitriol encapsulation

Five calcitriol-loaded NP formulations were prepared by changing the polymer:oil ratio: nanoemulsions (NE, polymer:oil ratio of 0:1), nanospheres (NS, polymer:oil ratio of 1:0), and nanocapsules (NC, polymer:oil ratios 1:8, 1:4 and 1:2) were obtained (Table 4). As nanoprecipitation is not a conventional method to obtain stable nanoemulsions, the size distribution and surface charge of NE were evaluated for the entire experimental period and confirmed their stability over 10 days (data not shown).

Table 4. Physicochemical properties and encapsulation efficiency of calcitriol-loaded NPs with various polymer:oil ratios. All the formulations contain PLA except from the formulation with a polymer:oil ratio of 0:1. Oily cores of NCs are formed with Miglyol® 829. Data are represented as the mean \pm SD (n = 3).

Polymer:oil ratio	Particle mean size (nm)	Polydispersity Index	Zeta potential (mV)	Encapsulation efficiency (%)
1:0	195 \pm 15	0.107 \pm 0.030	-24.2 \pm 1.6	69 \pm 3
1:8	183 \pm 6	0.068 \pm 0.017	-20.8 \pm 2.1	82 \pm 4
1:4	183 \pm 8	0.083 \pm 0.028	-21.3 \pm 2.4	86 \pm 2
1:2	179 \pm 2	0.064 \pm 0.031	-22.7 \pm 0.8	85 \pm 4
0:1	173 \pm 3	0.059 \pm 0.008	-23.2 \pm 3.6	70 \pm 2

NPs were negatively charged and presented similar size distributions with a mean size of approximately 200 nm and a low polydispersity index (≤ 0.1 , Table 4). Blank NPs presented similar properties (data not shown). Calcitriol was successfully encapsulated in all formulations with encapsulation efficiencies up to $87 \pm 2\%$ (Table 4). As expected, NE and NS encapsulated lower amounts of calcitriol with 70% of encapsulation efficiency. The three NC formulations allowed higher encapsulation efficiency around 85% with no significant differences between them. All NPs exhibited an initial burst release (40% to 60% released after 6 h) depending on the formulation, followed by a plateau over 10 days due to the appearance of an equilibrium between released and entrapped calcitriol (Figure 34). Calcitriol release profiles indicate an influence of the polymer:oil ratio on calcitriol initial release: (i) Calcitriol release after 6 h was around 60% for NE (ii) NS, NC1:8 and NC1:4 released $53 \pm 2\%$, $59 \pm 1\%$ and $50 \pm 7\%$ of calcitriol after 6 h while $41 \pm 5\%$ were found for NC1:2 which exhibited the lowest release (Figure 34). These results indicate the advantage of nanocapsule formulations and that increasing polymer amount (from ratio 1:8 to 1:2) reduced the initial release of calcitriol.

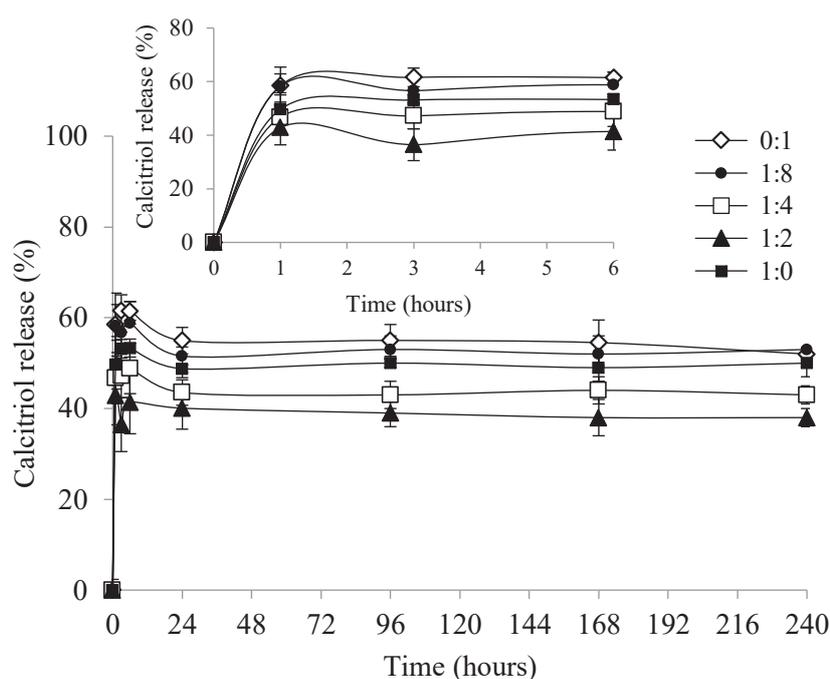


Figure 34. Influence of the polymer:oil ratio on calcitriol release profile from NPs. The amount of drug released from PLA-based NPs were quantified on NPs with various polymer:oil (Miglyol®829) ratios. The percentage of released drug in PBS supplemented with 0.01% of SDS at 37 °C was measured over 10 days. The data is presented as the mean \pm SD (n = 3).

The polymer:oil ratio 1:2 was therefore selected and the influence of the oily core was studied using six different oily phases. Five modified medium chain glycerides, with decreasing polarities, were used: Labrasol® (NC-OL), Labrafil® M 1944 CS (NC-IL), Labrafac Hydro® WL1219 (NC-L), Miglyol® 829 (NC-M), Labrafac Lipophile® WL1349 (NC-L-lip), and the mix of Labrafac Hydro® WL1219 and Miglyol® 829 in equal proportions (NC-LM). All NCs presented adequate size distributions (Pdl < 0.1) and negative zeta potentials (Table 5). NC-OL presented a higher mean size (222 ± 1 nm) compared to the others (< 200 nm). When PEGylated medium chain triglycerides were used (NC-OL, NC-IL and NC-L), zeta potential was lower. Formulations containing Labrafac Hydro® WL1219 and/or Miglyol® 829 presented the same calcitriol encapsulation efficiency (around 85%) and a drug release of 40% after 6 h (Figure 35). Conversely, NC-OL, NC-IL and NC-L-lip allowed lower calcitriol encapsulation, with 76%, 49% and 74% of encapsulated drug, respectively. These three formulations also presented a significantly faster calcitriol release, with around 80% of release after 6 h for NC-OL and NC-IL, which was twice higher than for the other NCs, and 55% for NC-L-lip.

Table 5. Physicochemical properties of NCs with various oil contents. Developed NCs (polymer:oil ratio of 1:2) contain 0.15% of PLA, 0.3% of oil, and 0.01% of calcitriol (w/w of the organic phase).

Data are represented as the mean ± SD (n = 3).

Sample	Oil	Particle mean size (nm)	Polydispersity Index	Zeta potential (mV)
NC-OL	Labrasol®	222 ± 1	0.034 ± 0.007	-15.0 ± 0.5
NC-IL	Labrafil® M 1944 CS	182 ± 1	0.064 ± 0.025	-13.1 ± 0.3
NC-L	Labrafac Hydro® WL1219	197 ± 4	0.070 ± 0.020	-10.5 ± 1.5
NC-LM	Labrafac Hydro® WL1219 + Miglyol® 829	198 ± 8	0.072 ± 0.007	-19.2 ± 3.8
NC-M	Miglyol® 829	179 ± 2	0.064 ± 0.031	-22.7 ± 0.8
NC-L-lip	Labrafac lipophile® WL1349	185 ± 2	0.034 ± 0.024	-19.3 ± 0.2

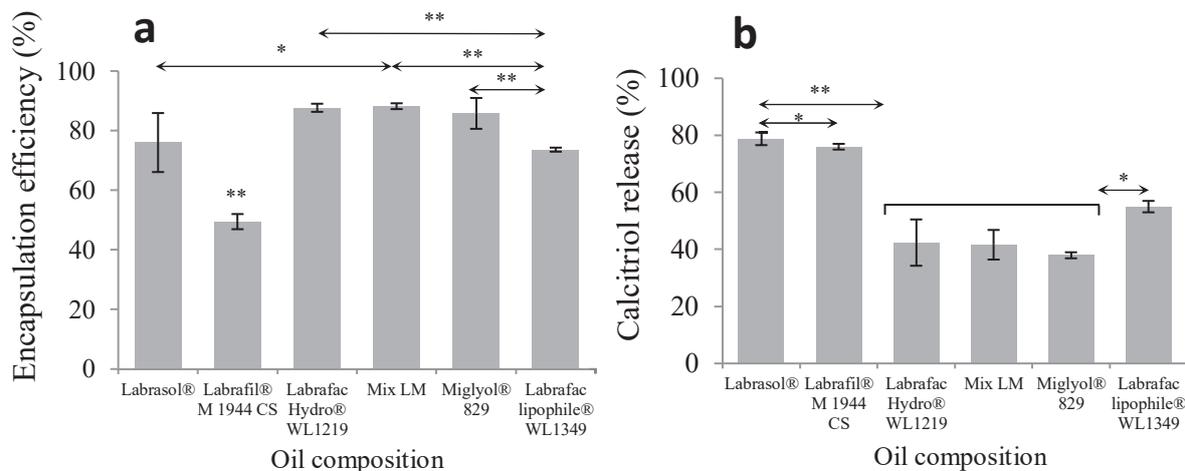


Figure 35. Influence of the oil content of PLA-based NCs on calcitriol encapsulation and release. NCs formulated with polymer:oil ratios of 1:2 were characterized in terms of (a) calcitriol encapsulation efficiency and (b) amount of drug released from NCs. The oily core of NCs “Mix LM” is composed with Labrafac Hydro® WL1219 and Miglyol® 829 in equal proportions. The percentage of released drug in PBS supplemented with 0.01% of SDS at 37 °C was measured after 6 h. The data is presented as the mean \pm SD (n = 3). All differences are statistically significant with $p < 0.05$ (*) and $p < 0.01$ (**).

Stability assessment of calcitriol showed that free and encapsulated drug remained stable over at least 10 days at 37 °C (>60% of the initial amount of calcitriol). However, NC-LM stability was better than that of NC-L and NC-M with respectively $84 \pm 6\%$, $61 \pm 36\%$ and $82 \pm 16\%$ of calcitriol recovery after 7 days. These NC formulations were also stored at 4 °C until use and were found to be stable over at least 1 month in these conditions as the total amount of calcitriol was recovered during this period.

IV.2.4.2. Solubilizing properties of NC components

Encapsulated drug interacts with the polymer and the oil, which respectively form the shell and the core of NCs. Similarly, the polymer and the oil can interact together. Table 6 summarizes contributions to the solubility parameters (δ_d , δ_p , δ_{hb}) of each compound and the resulting distance $\overline{\Delta\delta}$ between them. The lowest distance was found for the pair calcitriol/Miglyol® 829 ($\overline{\Delta\delta} = 3.52$), indicating a good solubility of calcitriol in this oil. The distance between calcitriol and Labrafac Lipophile® WL1349 was higher than with Miglyol® 829 and also larger than $5 \text{ MPa}^{1/2}$, indicating a weaker solubility of the drug in this oil. Similarly, according to solubility parameter calculations, the distance

of calcitriol with PLA predicts a low solubility of the drug in the polymer. Finally, PLA and either Miglyol[®] 829 or Labrafac Lipophile[®] WL1349 are not miscible. The solubility parameters of the other used oils were not calculated due to the heterogeneity of their chemical structure, *i.e.* a mix of modified and non-modified triglyceride medium chains.

Table 6. Solubility parameters δ (MPa^{1/2}) of PLA, Miglyol[®] 829, Labrafac lipophile[®] WL1349 and calcitriol and their contributions δ_d , δ_p , δ_b . The distance between two compounds was calculated according to Hansen (2007).

	Solubility parameters (MPa ^{1/2})			
	δ_d	δ_p	δ_{hb}	Total δ
PLA	15.45	8.51	11.02	20.80
Miglyol [®] 829	16.28	2.04	8.45	18.45
Labrafac lipophile [®] WL1349	16.28	1.45	5.99	17.41
Calcitriol	13.91	1.76	11.04	17.84
	Distance $\bar{\Delta}\delta$ (MPa ^{1/2})			
PLA/Miglyol [®] 829	7.01			
PLA/Labrafac lipophile [®] WL1349	8.71			
PLA/Calcitriol	6.92			
Calcitriol/Miglyol [®] 829	3.52			
Calcitriol/Labrafac lipophile [®] WL1349	5.59			

Miglyol[®] 829 was selected to evaluate calcitriol partition between PLA and oil in the case of different polymer:oil ratios. As shown in Table 7, approximately 70% of calcitriol was found in Miglyol[®] 829 for all tested ratios. These results confirm the affinity between calcitriol and Miglyol[®] 829. Adding more polymer from ratio 1:8 to 1:2 did not alter calcitriol partition but the concentration of calcitriol found into the polymer gradually decreased, confirming the interest of the polymer:oil ratio 1:2.

Table 7. Partition of calcitriol between PLA and Miglyol[®] 829. Calcitriol concentrations and percentages in the oil and polymer were evaluated (n = 2).

Polymer:oil ratio	Concentration in oil ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Percentage in oil (%)	Concentration in polymer ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Percentage in polymer (%)
1:8	9.2 \pm 0.3	73.7 \pm 2.5	26.6 \pm 2.5	26.3 \pm 2.5
1:4	8.7 \pm 0.7	72.2 \pm 5.4	12.1 \pm 0.4	27.8 \pm 5.4
1:2	8.9 \pm 0.1	70.7 \pm 0.1	7.2 \pm 0.1	29.3 \pm 0.1

IV.2.4.3. *In vitro* evaluation of growth inhibitory activities of calcitriol-loaded NP

No significant changes in cell survival were observed for cells exposed to blank NCs (polymer:oil ratio of 1:2) or ethanol during the experiment indicating that they had no impact on cell growth (Figure S1). Calcitriol growth inhibitory activity was observed when cells were exposed to free or encapsulated calcitriol up to 96 h. It was time and concentration dependent (Figure 36a–c). Indeed, cell viability was 49% at Day 4 and ~20% at Day 7 and Day 10 at the highest concentration of calcitriol of 1000 nM. Increasing calcitriol concentration decreased cell viability dramatically. For example, viability gradually decreased at Day 10 from 100% to 16% for calcitriol concentrations ranging from 10 nM to 1000 nM. No significant difference was noticed between free and encapsulated calcitriol when exposure time to drug was 96 h (Figure 36a–c). Cell exposure to 1000 nM of calcitriol for 4 days drastically decreased cell viability to 40% and 49% for encapsulated and free calcitriol, respectively. In the same conditions, 15% and 22% of cell viability were found at Day 7 and a similar activity was observed at Day 10.

Calcitriol encapsulation maintains its antiproliferative activity over 10 days. In order to demonstrate the impact of the sustained release of calcitriol on its antiproliferative activity and to mimic *in vivo* conditions, the exposure time was reduced to 24 h. Cell culture medium containing calcitriol was replaced by calcitriol-free medium after 24 h, and it was renewed regularly over 10 days. Cell exposure to free calcitriol for 24 h had a slight effect on cell proliferation on Day 4 at 100 nM and this effect was totally lost on Day 10 even at the highest concentration (1000 nM) (Figure 36d-f). Conversely, encapsulated calcitriol showed a long-lasting effect on cell proliferation over 10 days for calcitriol concentrations above 100 nM as more than 65% of growth inhibition was reached after this period. In conclusion, encapsulated calcitriol maintained a high antiproliferative activity when cell exposure time was reduced, as a significant difference was observed between free and encapsulated calcitriol. These results confirm that nanocapsules could maintain and sustain the antiproliferative activity of calcitriol when exposure times are reduced in order to mimic conditions of *in vivo* use.

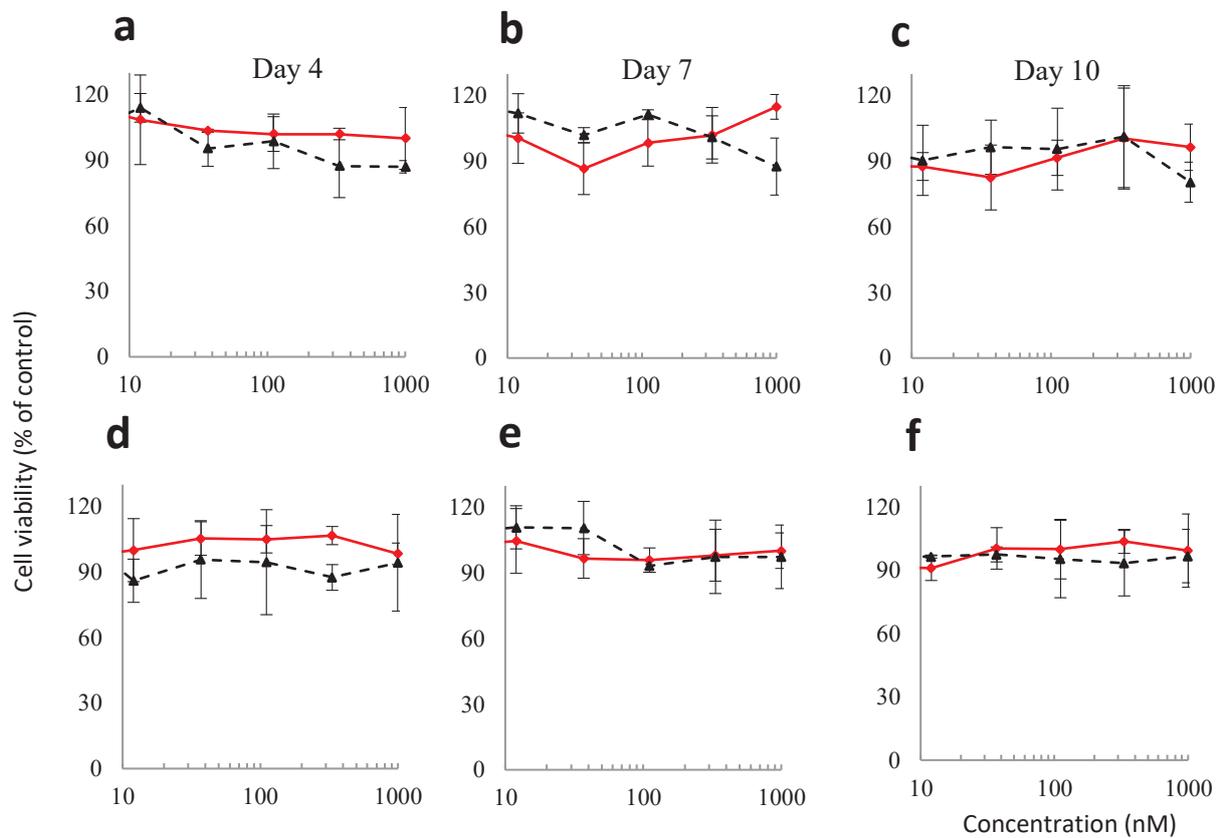


Figure S1. Antiproliferative activity of ethanol (red) and blank NCs (black). At Day 0, MCF-7 cells were exposed to ethanol or blank NCs for 4 days (a, b, c) or 24h (d, e, f) in similar dilution conditions than free and encapsulated calcitriol, respectively. Cell proliferation of MCF-7 was assessed at Day 4, Day 7 and Day 10. Blank NCs contain 0.3% of a mix of Labrafac Hydro® WL1219 and Miglyol® 829 (w/w of the organic phase), and a polymer (PLA):oil ratio of 1:2. Unexposed cells were used as control. The data is presented as the mean \pm SD (n = 3). All differences are statistically significant with $p < 0.05$ (*) and $p < 0.01$ (**).

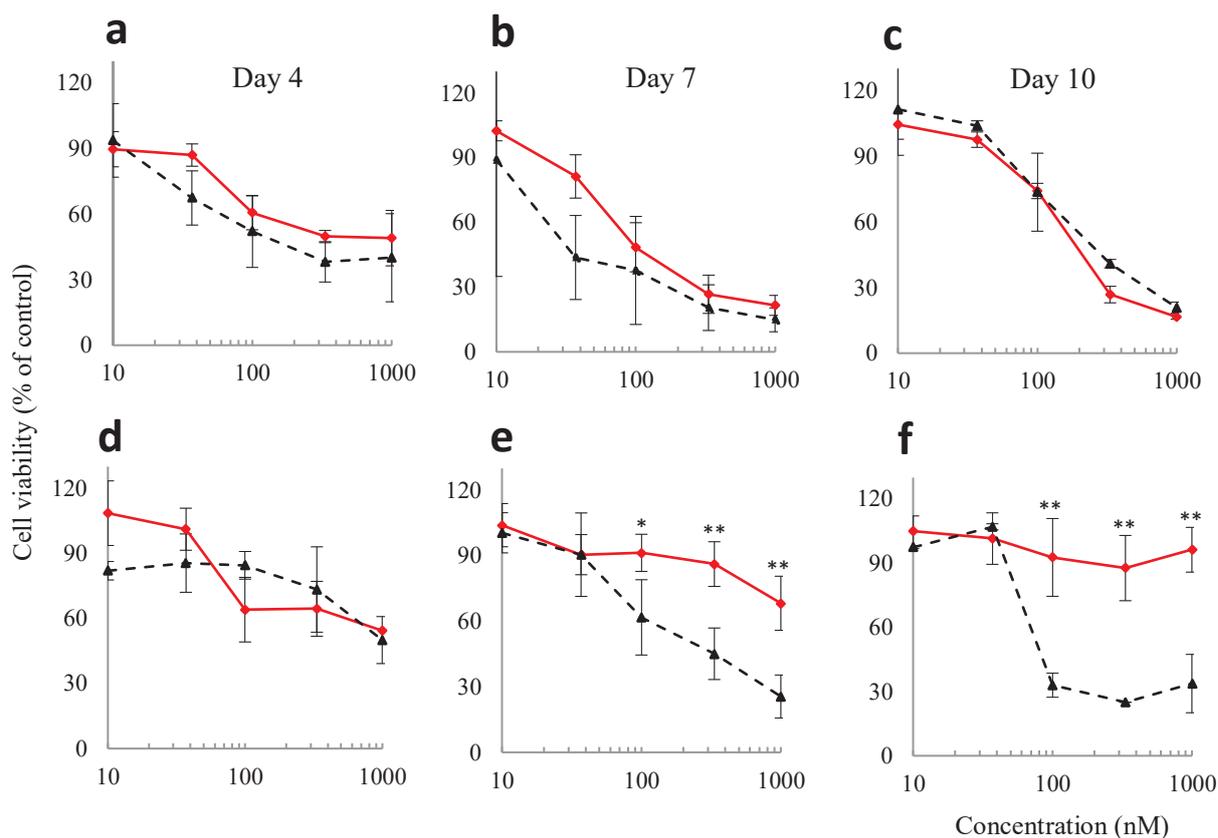


Figure 36. Antiproliferative activity of free (red) and encapsulated (black) calcitriol. At Day 0, MCF-7 cells were exposed to free or encapsulated calcitriol (NC-LM, polymer oil:ratio of 1:2) for 4 days (a, b, c) or 24 h (d, e, f). Cell proliferation of MCF-7 was assessed at Day 4, Day 7 and Day 10. The data is presented as the mean \pm SD (n = 3). All differences are statistically significant with $p < 0.05$ (*) and $p < 0.01$ (**).

IV.2.4.4. *In vitro* evaluation of the cytotoxic activities of calcitriol-loaded NP

To further evaluate the cytotoxic activity of calcitriol, we analyzed the induction of apoptosis at days 4 and 7. Figure 37 shows that a 24 h exposure to both forms of calcitriol had similar cytotoxic effect at Day 4 with approximately 70% of cell death compared to unexposed cells. Moreover, there was no difference in terms of cell state between free and encapsulated calcitriol as the percentages of apoptotic and necrotic cells were similar. Similar results were obtained at Day 7 (data not shown). These results indicate that NCs maintain calcitriol cytotoxicity *in vitro* even for short exposure time.

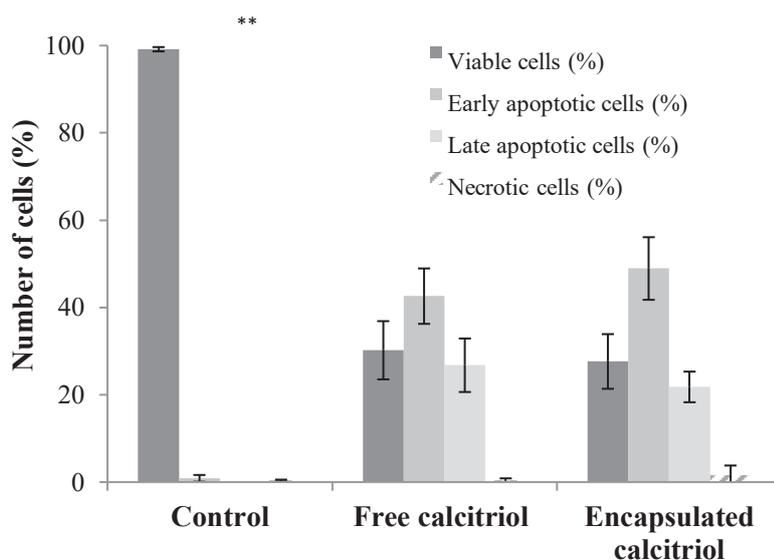


Figure 37. Cytotoxic activity of calcitriol. At Day 0, MCF-7 cells were exposed for 24 h to 1000 nM of free or encapsulated (NC-LM, polymer oil:ratio of 1:2) calcitriol. Cell apoptosis was analyzed at Day 4. Unexposed cells were used as control. The data is presented as the mean \pm SD (n = 3). All differences are statistically significant with $p < 0.01$ (**).

IV.2.4.5. Evaluation of calcitriol release profile impact on its growth inhibitory activity *in vitro*

The impact of the polymer:oil ratio (0:1–1:0) on calcitriol growth inhibitory activity was investigated using MTT assays in experiments where MCF-7 cells were exposed for 24 h to different formulations with 1000 nM calcitriol (Figure 38). Free calcitriol progressively lost its antiproliferative activity as 65%, 75% and 100% cell viability were detected at days 4, 7 and 10 respectively. As expected, the duration of biological activity of encapsulated calcitriol forms was clearly dependent on their release profiles. For NS, NC1:8 and NE, characterized by a high initial release of calcitriol (Figure 34), a significant decrease of the antiproliferative activity was observed over the whole experiment duration until reaching a complete loss of activity at Day 10. NPs having mid-range polymer:oil ratios (1:4 and 1:2), characterized by a low initial release of calcitriol, maintained a higher activity for at least seven days. NC1:2 was the only formulation which maintained an antiproliferative activity over 10 days as 57%, 31%, and 36% of cell viability were found at days 4, 7 and 10 respectively. From all above, it is clear that calcitriol-loaded NP antiproliferative efficacy on MCF-7 cells *in vitro* is dependent on several formulation parameters governing the drug release profile.

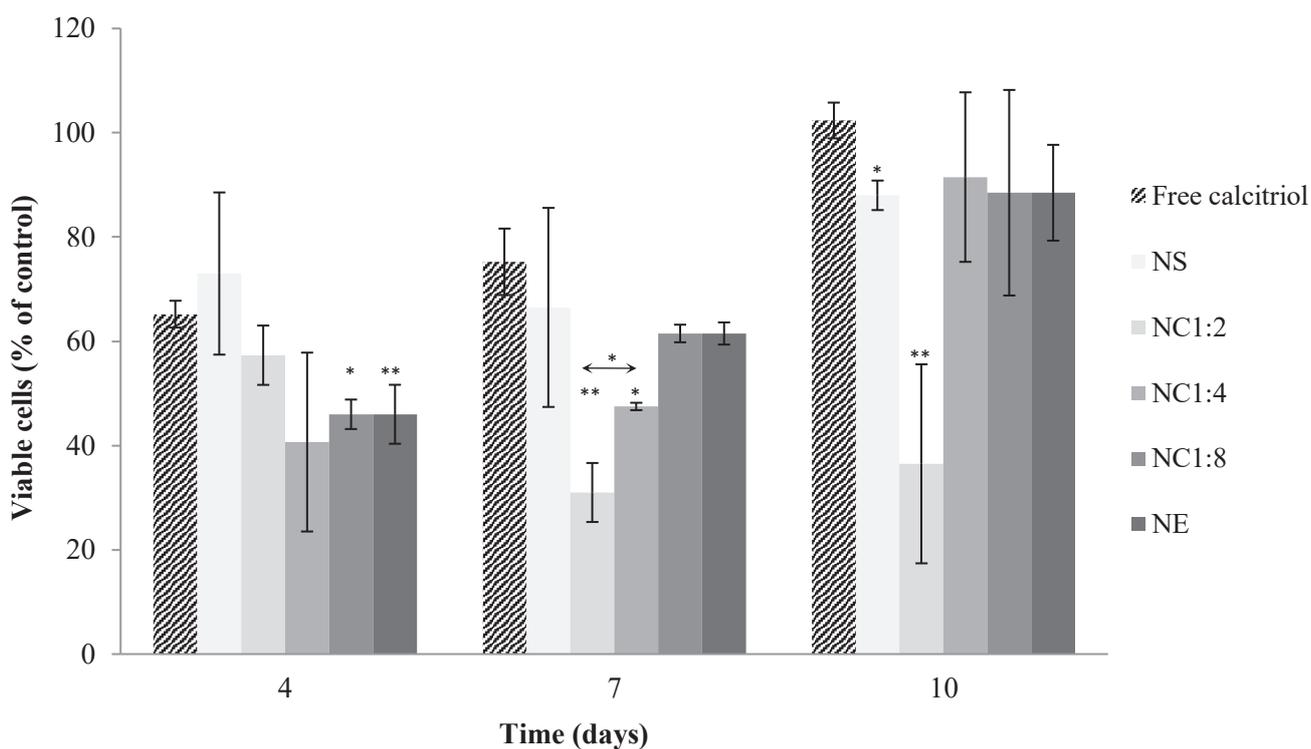


Figure 38. Influence of the NP polymer:oil ratio on calcitriol antiproliferative activity. At Day 0, MCF-7 cells were incubated 24 h with 1000 nM of calcitriol and cell viability was assessed at days 4, 7 and 10. Unexposed cells were used as control. The data is presented as the mean \pm SD (n = 3). All differences are statistically significant with $p < 0.05$ (*) and $p < 0.01$ (**).

IV.2.5. Discussion

Calcitriol nanoencapsulation offers an interesting dosage form in cancer therapy to improve its efficacy while avoiding side effects, which compromises its current clinical use. NPs undergo endocytosis, leading to cellular internalization of the drug. NPs also protect the drug from premature inactivation in the bloodstream, which contributes to a higher bioavailability (Brigger *et al.*, 2012). However, more investigations on formulation parameters are needed to improve the efficacy of such systems, in particular for sustaining calcitriol antiproliferative activity over longer durations by slowing down the release profile of the system. Calcitriol release from nanocapsules is particularly favourable compared to nanospheres as they can act as a drug reservoir depending on the nature of the core, as evidenced by other teams (Barichello *et al.*, 1999, Teixeira *et al.*, 2005). *In vitro* release profiles of NPs depend on a great variety of factors, as reported by Mora-Huertas *et al.* (2010), but at constant drug content, NPs size, and polymer type, the strategy for obtaining a slow release is achieved by controlling the polymer:oil ratio and the nature of the oily core. These parameters control encapsulation efficiency

through drug partition between NPs and external aqueous medium and drug release rate through partition between the shell and the core of NPs. Drug present in the shell of NPs is either adsorbed at the external surface of particles or mixed with the polymer. Such molecules are released fast, possibly as a burst release. Drug present in the oily core is confined inside NPs and show sustained release. This is all governed by the compatibility (solubility) of drug and oily core and the relative amounts of core and shell materials. The polymer:oil ratio can be changed either by modifying the oil or polymer contents. The increase of the polymeric concentration is associated with a thicker shell of NPs, which leads to a decrease of the drug diffusion flux out of the particle and limits burst release effects (Poletto *et al.*, 2008).

The results reported on Table 4 and Figure 34 show the importance of the polymer:oil ratio on drug encapsulation efficiency and release. The highest encapsulation efficiencies were obtained for nanocapsules (Table 4), which may be easily explained by the solubility parameters calculated in the present study (Table 6). The large difference of solubility parameters and the larger distance between PLA and both calcitriol and Miglyol® 829 reveal the poor affinity between the polymer and the drug or the oil, inferring that calcitriol is poorly soluble in PLA. According to Teixeira *et al.*, 2005, Barichello *et al.*, 1999, when the drug has low affinity for the polymer, it diffuses from the organic phase to the external aqueous phase during nanosphere manufacturing, leading to low drug loading capacities. Conversely, the low distance between Miglyol® 829 and calcitriol indicates that the drug and the oil are similarly entrapped within NCs, leading to high encapsulation efficiencies. This observation was confirmed by the 70:30 calcitriol partition coefficient between and Miglyol® 829 and PLA for all nanocapsule formulations (Table 7).

Concerning drug release, NPs exhibited a classical biphasic release profile, composed by a rapid initial release phase during the first hour followed by a plateau (Figure 34). This burst effect is the result of the diffusion of the drug adsorbed at the surface of NPs. Then, the plateau can be attributed to an equilibrium due to calcitriol partition between NPs core/shell and the release medium, depending on the relative volume of both phases and the concentration of surfactants in the release medium as previously described for calcitriol and other drugs (Almouazen *et al.*, 2013, Calvo *et al.*, 1996, Teixeira *et al.*, 2005). Nanospheres achieved a high calcitriol release, which is the consequence of two mechanisms: the contribution of the non-encapsulated calcitriol and the higher release from polymer, which is a worse solvent for calcitriol. Laredj *et al.* (2017) have observed the same trend for retinol loaded PLA-b-PEG frozen micelles (Laredj-Bourezg *et al.*, 2017). Retinol loaded in PLA-b-PEG micelles displayed a higher release into the skin compared to PCL-b-PEG micelles. The authors explained this result by the solubility parameters of PLA and retinol and their respective distance $\overline{\Delta\delta}$ in the Hansen's space close to 5 MPa^{1/2} ($\overline{\Delta\delta} = 4.9$ MPa^{1/2}). This suggests that PLA is a poor solvent

medium for retinol and is not able to retain this drug inside NPs, resulting in a better release into the external medium (Laredj-Bourezg *et al.*, 2017).

If NCs are considered, the high distance $\overline{\Delta\delta}$ between PLA and both Miglyol® 829 and calcitriol indicates that calcitriol is highly soluble in Miglyol® 829 as previously noticed, but that both of them are poorly soluble in the polymer avoiding plasticization of PLA that would cause a facilitated release of calcitriol through the polymer shell. The combined effect of both oil and polymer amount has therefore a drastic effect on drug release. Calcitriol solved in the oil should cross the polymeric shell to diffuse out of the NC, while it has no affinity with the polymer. Our results are inconsistent with those obtained by some other groups, as Calvo *et al.* (1996), who found no differences between NE, NS and NC formulated with low polymer percentage (up to 1% m/v of the organic phase). They concluded that the drug diffusion rate through thin polymeric barrier was not a limiting process for low polymer contents (Calvo *et al.*, 1996), and suggested that the polymer-coating of NCs does not form a consistent polymeric shell but rather a thin film without impact on drug release. On the contrary, Poletto *et al.* (2008) found a significant contribution of the polymer content, even when poorly present, with indomethacin ethyl ester entrapped in nanocapsules (Poletto *et al.*, 2008). In the case of indomethacin as active substance, the same authors did not observe significant release differences between indomethacin-loaded nanocapsules, nanospheres or nanoemulsion because this hydrophilic drug was simply adsorbed on the polymeric shell rather than encapsulated (Cruz *et al.*, 2006). However, the same authors reported that the full entrapment of an ethyl ester of indomethacin in the inner core of the NP led to significant differences between the three colloids with a slower release from NCs, which is consistent with our observations (Cruz *et al.*, 2006). The authors suggested that the presence of the polymer (NCs or NSs) reduced the burst release of the ethyl ester of indomethacin, while the presence of oil prolonged the sustained phases in a significant manner. The influence of the polymer:oil ratio can be easily explained by the higher polymeric shell thickness and the low concentration of calcitriol in the polymer. Thus, the oily phase was found to retain 70% of calcitriol into the core of the nanocarriers no matter the tested polymer:oil ratio (Table 7). At constant calcitriol partition coefficient of 70:30 between Miglyol® 829 and PLA, calcitriol concentration in polymer was three times lower for the ratio 1:2 as compared to 1:8 (Table 7). These results indicate that increasing the polymer content is a good strategy to decrease drug concentration in the polymeric shell, which in turn may lead to a low burst effect. In order to investigate the contribution of the composition of the oily core on calcitriol encapsulation, unmodified triglycerides (Labrafac Lipophile® WL1349 and Miglyol® 829) and PEGylated ones with increasing polarities, from PEG4 to PEG8, were used (Figure 35). PEGylated medium chain triglycerides were found to slightly decrease the charge of NPs, which can be attributed to the adsorption of some PEG moieties on NC surface, which is consistent with results obtained by Dong and Feng (2006) about the pegylation of PLA-based nanoparticles and

by Mouzouvi *et al.* (2017) with PEG-15 hydroxystearate coated lipid nanocapsules. The ether function of the PEG moieties can interact with the hydroxyl groups of the drug and reinforce the interaction between them. In return, increasing the oily phase polarity can also rise between the oil and the drug, consequently making the polymer soluble and calcitriol less soluble in the oily phase. We observed this phenomenon with the most polar triglycerides, which gave rise to lower encapsulation efficiencies and higher release. A supplementary contribution to the higher calcitriol release from Labrasol® and even Labrafil M1944 CS could be due to solubilization of calcitriol inside micelles of Polysorbate 80 swollen by these oils. This phenomenon might also explain the lower encapsulation efficiency obtained with these oils (< 80%). When Labrafac Lipophile® WL1349 was used, $\overline{\Delta\delta}$ increased (Table 6) inducing also higher initial release of calcitriol up to 55%.

From all above, the mid-range polymer:oil ratios (1:2 and 1:4) were the most suitable to ensure better interactions between calcitriol and the polymer-oil system, improving encapsulation efficiency and limiting initial release. Conversely to our previous results obtained with cholecalciferol where the polymer:oil ratio of 1:4 ratio was selected, the present ratio of 1:2 is optimal with calcitriol. A mixture of Miglyol® 829 and Labrafac Hydro® WL1219 in equal proportions was selected because it provided optimum stability.

Then, the antiproliferative activity of calcitriol was evaluated *in vitro* on MCF-7 cells with two different exposure times (24 h and 96 h). Under long exposure time (96 h), no significant differences were noticed between free and encapsulated calcitriol as evidenced in Figure 36a-c. This result shows the maintenance of its activity after encapsulation with approximately 80% of antiproliferative activity after 10 days. Additionally, NC-LM presented similar antiproliferative activities in comparison to the formulation developed within our previous study (Almouazen *et al.*, 2013). These results indicate that these experimental conditions were inappropriate because they were unable to reflect the contribution of the intracellular concentration of calcitriol as free calcitriol was present continuously in the culture medium, which maintained its intracellular concentration and influenced cell growth. This relationship between cellular time exposure to drugs and drug activity was also observed with different active substances and cell lines (Rajh *et al.*, 2016). Considering previous experiments indicating that calcitriol removal from the MCF-7 cell culture medium is followed by a rapid cell growth (Chouvet *et al.*, 1986), we designed our *in vitro* experiments by exposing cells to calcitriol for 24 h. These new conditions allow the measurement of the antiproliferative activity of the internalized part of calcitriol. After 24 h of cell exposure to calcitriol, we observed a loss of activity of free calcitriol over 10 days while NC-LM maintained calcitriol activity.

This difference in cell growth inhibitory activity between free and encapsulated form can be explained by NC internalization by MCF-7 and the slow release of calcitriol, leading to a higher and sustained intracellular amount of the molecule, while limiting its exocytosis and catabolism. Indeed,

we have previously demonstrated that fluorescently labelled NPs were well internalized and persisted inside MCF-7 for 10 days (Almouazen *et al.*, 2013), which is in accordance with several other studies highlighting the interest of NPs to sustain paclitaxel intracellular concentration and growth inhibition activity on the same cell line (Drozdek *et al.*, 2016, Sahoo *et al.*, 2004). However, there is still a missing proof of this phenomenon for calcitriol because authors who investigated the advantages of nanosystems to encapsulate vitamin D compounds did not perform *in vitro* evaluation of its activity beyond 72 h, resulting in a similar activity between free and encapsulated forms (Ramalho *et al.*, 2015, Sabzichi *et al.*, 2017).

Both *in vitro* and *in vivo* studies have shown that calcitriol and some of its analogues were able to induce apoptosis in cancer cells, including breast cancer cells (Krishnan *et al.*, 2012, Simboli-Campbell *et al.*, 1996). It was important to verify if the slow release of calcitriol decreased its cytotoxic activity. Thus, its cytotoxic activity was investigated by AnnexinV/PI staining, allowing the identification of the proportions of viable, apoptotic and necrotic cells. This complementary assay highlights that encapsulated calcitriol exerts a similar cytotoxic activity against MCF-7 cells in comparison to the free form. Indeed, MCF-7 cell viability was reduced from 70% after 24 h of exposure to free or encapsulated calcitriol (1000 nM), compared to unexposed cells at Day 4 after 24 h of exposure. Our results provide evidence that calcitriol encapsulation into polymeric NCs maintains its cytotoxic activity.

Finally, NPs extended calcitriol activity as a consequence of their sustained release profile. Sethi *et al.* (2014) have recently highlighted the incidence of the drug release on NPs efficacy and toxicity using crosslinkable lipid shell NPs encapsulating docetaxel and wortmannin (Sethi *et al.*, 2014). They showed that a slower drug release was associated with a higher activity and a lower toxicity of the encapsulated substances both *in vitro* and *in vivo*, which could enhance drug bioavailability at the tumor site (Sethi *et al.*, 2014). As expected, NC1:2, which showed the slowest release profile extended calcitriol activity while other formulations exhibited a loss of activity over 10 days similar to free drug. The loss of calcitriol activity was delayed for NC1:4 leading to 30% lower cell viability compared to free calcitriol at Day 7. From all above, we highlighted the importance of the NP oil content to optimize calcitriol encapsulation and hence its activity.

IV.2.6. Conclusion

The influence of formulation parameters such as the polymer:oil ratio and the polarity of the oil on the encapsulation of calcitriol and its release profile has been demonstrated. We demonstrated a relationship between the release profile of the encapsulated drug from NPs and its therapeutic activity. Limiting burst release from nanocapsules by optimizing polymer and oil contents improved

drug activity. Such formulation-activity relationships allowed the development of a promising NP dosage form ensuring a sustained antiproliferative activity (10 days) and maintaining cytotoxicity of calcitriol towards breast cancer cells. *In vitro* studies should be supplemented by the evaluation of possible interactions between calcitriol-loaded nanosystems and other tumor microenvironment constituents, including tumor-associated macrophages. *In vivo* studies would ultimately validate the suitability of the developed system for anticancer applications.

Acknowledgments

This work received financial support of the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche for the PhD scholarship (France).

IV.3. Résultats complémentaires

IV.3.1. Validation de la méthode d'évaluation de la libération

Dans nos travaux, la libération du calcitriol en dehors des nanosystèmes a été évaluée par une méthode de centrifugation qui a fait l'objet d'une validation. Cette méthode repose sur la centrifugation des nanoparticules permettant de séparer les nanoparticules (culot) de l'actif libre (surnageant) (paragraphe IV.2.3.4.).

D'une part, l'impact de la vitesse de centrifugation a été évalué en maintenant une durée fixe de centrifugation de 30 minutes, principalement d'un point de vue technique au regard de la durée nécessaire pour l'arrêt de la centrifugation à hautes vitesses (> 62 000 g). Les différentes formulations ont ainsi été centrifugées à des vitesses de centrifugation variables, à savoir 9200 g, 21 000 g, 36 670 g, 62 000 g et de 444 000 g. Ce paramètre n'a démontré aucun impact sur la libération puisque des fractions libérées similaires ont été observées pour une même formule. La vitesse de 62 000 g a ainsi été sélectionnée afin de maintenir une marge de sécurité garantissant l'exactitude des résultats.

D'autre part, l'impact de la durée de centrifugation sur la fraction libérée de calcitriol a été évalué en fixant la vitesse de centrifugation préalablement sélectionnée, à savoir 62 000 g. Les nanoformulations ont ainsi été centrifugées pendant 10, 20, 30 ou 60 minutes. Les observations n'ont démontré aucun impact sur la fraction de calcitriol libérée.

Les paramètres de centrifugation validés pour le calcul de la fraction de calcitriol libérée associent donc une vitesse de 62 000 g et une durée de centrifugation de 10 minutes.

IV.3.2. Influence de la concentration en calcitriol sur les propriétés des nanocapsules

L'impact de la concentration en calcitriol sur les propriétés physicochimiques des nanoparticules ainsi que sur l'efficacité d'encapsulation et le profil de libération du calcitriol a été étudié. Pour ce faire, des concentrations en calcitriol de 0,001%, 0,005% et 0,01% (m/m de la phase organique) ont été testées. Dans cette gamme de concentrations, aucune modification des propriétés physicochimiques des nanocapsules ni de l'efficacité d'encapsulation de la molécule n'a été observée (Tableau 8). En revanche, en diminuant la concentration en calcitriol jusqu'à 0,001% (m/m de la phase organique), une augmentation significative de la fraction de calcitriol libérée après 3 heures a été mise en évidence, passant ainsi d'environ 40% à 60% ($p < 0,01$). Ces résultats indiquent qu'à une très faible concentration (0,001%), le calcitriol diffuserait plus facilement au travers de la couche polymère pour atteindre la phase de plateau de sa libération. Par ailleurs, la variation de la concentration en calcitriol n'a plus d'effet sur sa libération au-delà d'une certaine valeur (0,005%). Ce plateau correspond à un équilibre entre la fraction de calcitriol conservée dans les nanocapsules et libérée dans le milieu de libération au-delà d'une certaine concentration.

Tableau 8. Propriétés des nanocapsules encapsulant le calcitriol formulées avec différentes concentrations en actif. Les nanocapsules sont composées de PLA (0,07% m/m de la phase

Concentration en calcitriol (%)	Taille des nanocapsules (nm)	Indice de polydispersité	Potentiel zêta (mV)	Efficacité d'encapsulation (%)	Libération après 3 heures (%)
0,001	182 ± 7	0,063 ± 0,020	-22,3 ± 1,2	82 ± 4	60 ± 1
0,005	194 ± 6	0,047 ± 0,031	-20,6 ± 3,1	88 ± 4	42 ± 1
0,01	183 ± 8	0,083 ± 0,028	-21,3 ± 2,4	86 ± 2	37 ± 1

organique) et de miglyol® 829 (0,3% m/m de la phase organique). Le pourcentage de calcitriol libéré a été évalué dans du PBS contenant 0,01% de SDS de manière à respecter les conditions sink à 37 °C après 3 heures. Les données représentent les moyennes ± écart-type (n=3).

IV.3.3. Evaluation de l'activité cytotoxique du calcitriol *in vitro*

De manière similaire aux études d'évaluation de l'activité antiproliférative du calcitriol, l'étude de son activité cytotoxique a été prolongée pendant 10 jours. La Figure 39 complète les résultats présentés dans notre étude lors de laquelle l'activité n'avait été présentée qu'à J4 (Nicolas *et al.*, 2018). Ces résultats vont dans le sens de ceux observés à J4 avec un maintien de l'activité cytotoxique du calcitriol après encapsulation. Ainsi, environ 25% des cellules sont viables à J7 et 55%

à J10 pour les deux formes du calcitriol, indiquant par ailleurs une perte de son activité cytotoxique au cours du temps (Figure 39).

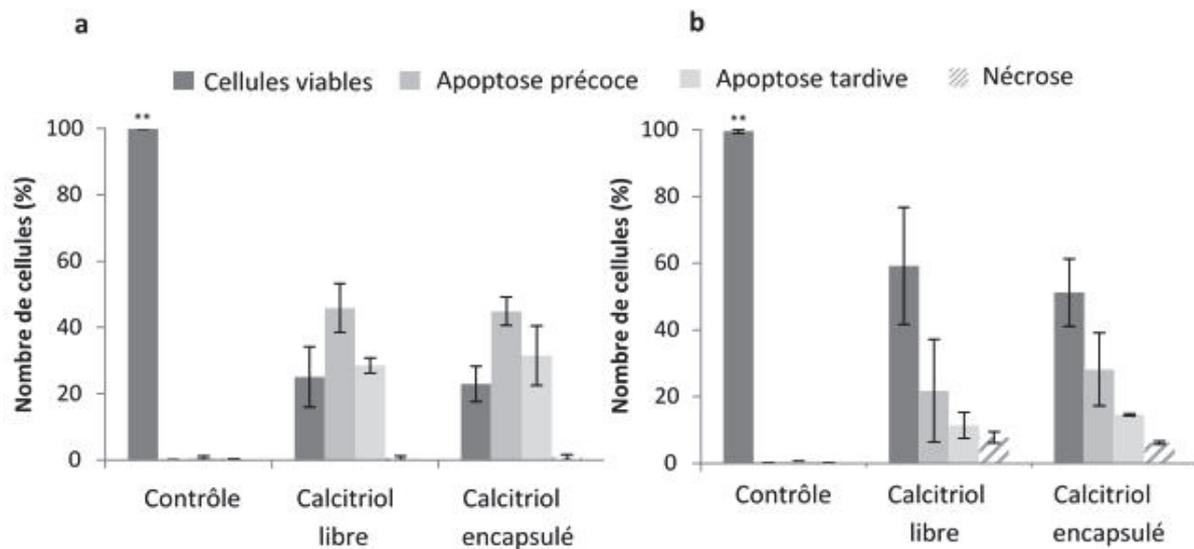


Figure 39. Activité cytotoxique du calcitriol. A J0, les cellules MCF-7 ont été incubées 24 heures avec 1000 nM de calcitriol libre ou encapsulé (Nicolas *et al.*, 2018). L'état apoptotique des cellules a été évalué après (a) 7 jours et (b) 10 jours. Les cellules non exposées au calcitriol ont été définies comme contrôles. Les données représentent la moyenne \pm écart-type (n=3). Les différences sont significatives avec $p < 0,01$ (**).

IV.3.4. Etudes préliminaires de la toxicité des nanocapsules chargées en calcitriol *in vivo*

L'encapsulation du calcitriol dans des nanocapsules a donc démontré des résultats prometteurs *in vitro* vis à vis de son activité sur les cellules MCF-7. Dans le but de poursuivre avec l'évaluation de l'intérêt thérapeutique de l'encapsulation du calcitriol, tant d'un point de vue efficacité que d'un point de vue toxicité, nous avons réalisé une étude préliminaire *in vivo* pour vérifier la faisabilité de l'injection intratumorale du calcitriol (libre et encapsulé). Ainsi, les NCs ayant également pour but de réduire les effets secondaires du calcitriol, principalement l'hypercalcémie, une étude *in vivo* de la calcémie post-administration du calcitriol a été réalisée en deux temps chez des souris SCID CB17 porteuses de lymphome (Raji) ou de cancer du sein (MDA MB231). Le protocole a été établi sur la base des données présentées dans la littérature (Swami *et al.*, 2011; Trump *et al.*, 2004).

Etude 1

La première étude a été réalisée sur un modèle murin de lymphome de Burkitt (Raji). Les animaux ont été répartis en 3 groupes de 2 souris :

- Groupe "contrôle positif de la calcémie"
- Groupe "calcitriol libre"
- Groupe "calcitriol encapsulé".

À J0, les souris ont chacune reçu par injection intraveineuse pour le groupe « contrôle positif » et par injection intratumorale pour les 2 autres groupes une dose de 0,5 µg de calcitriol dilué dans du tampon phosphate, soit 25 µg/Kg, avec un volume injecté de 100 µL. Le contrôle positif correspond à l'injection intraveineuse de calcitriol aux animaux car elle permet de considérer l'impact d'une concentration maximale en calcitriol dans la circulation sanguine sur la calcémie post-traitement.

Des prélèvements sanguins au niveau du sinus rétro-orbital (20 µL) ont été réalisés 2 jours avant traitement pour définir la calcémie initiale de chaque souris puis 1 jour et 7 jours après traitement. Le sérum a ensuite été récupéré après centrifugation (2000 g, 10 min) pour la quantification du calcium (Figure 40).

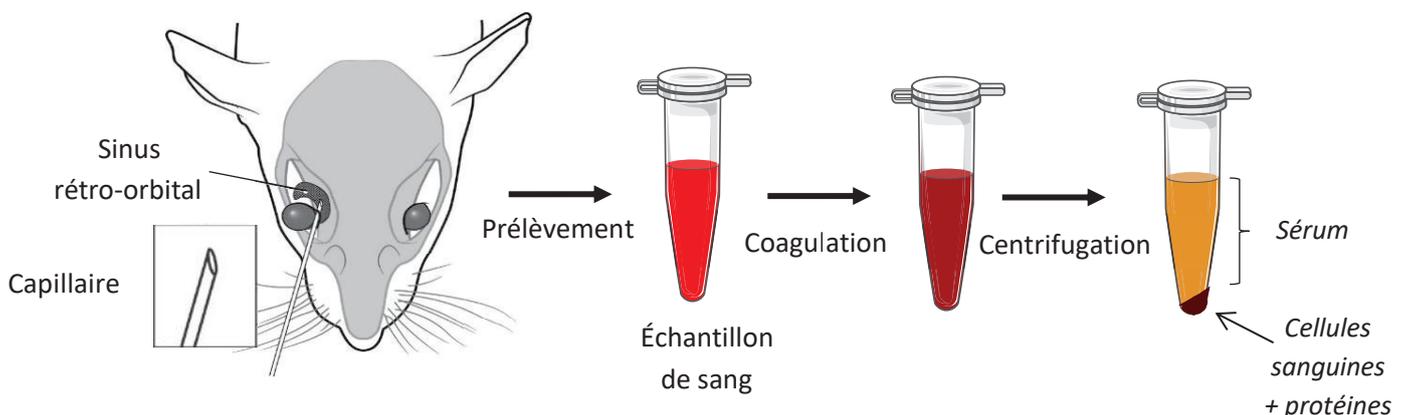


Figure 40. Schéma du protocole permettant l'obtention de sérum

La calcémie a été évaluée à l'aide d'un kit de quantification du calcium (Abnova, USA). Le protocole a été établi selon les recommandations du fournisseur. Cet essai reposant sur une réaction colorimétrique dépendant de la formation d'un complexe chromogène ($\lambda = 575 \text{ nm}$) entre les ions calcium et la 0-crésolphthaléine, les valeurs des densités optiques des mélanges d'échantillons sériques et du réactif ont été mesurées à 575 nm avec un spectrophotomètre lecteur de plaques (Multiskan Ascent, Labsystems SA, Cergy-pontoise, France). Après administration du calcitriol libre aux souris par voie intraveineuse, la calcémie a augmenté pour l'une des 2 souris dans les 24 heures suivant l'injection, passant de 10 à 15 mg/dL, mais de manière surprenante n'a pas évolué pour l'autre souris dans les conditions similaires (Figure 41). L'injection intratumorale de calcitriol a également été responsable d'une augmentation de la calcémie des 2 souris concernées (+25% en moyenne). Par

ailleurs, à l'inverse des souris ayant reçu le calcitriol libre, par voie intraveineuse ou intratumorale, aucune hypercalcémie (taux de calcium > 12 mg/dL) n'a été observée chez les souris ayant reçu les nanocapsules encapsulant le calcitriol dans les 24 heures suivant le traitement et aucune évolution de la calcémie n'a été observée après traitement chez ces souris. En revanche, ces dernières sont décédées dans la semaine suivant l'administration du traitement, ne permettant pas d'évaluer leur calcémie à J7.

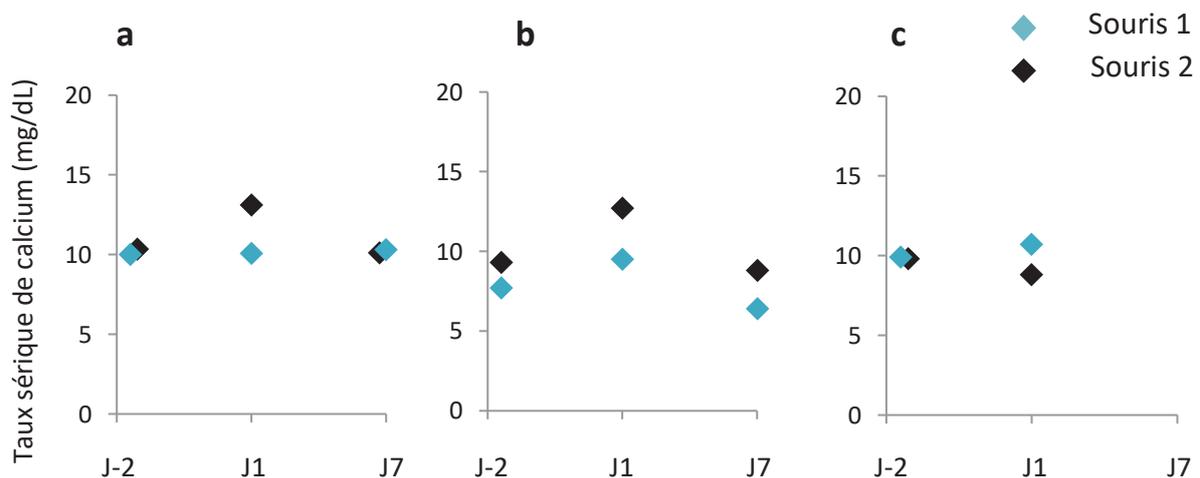


Figure 41. Evaluation de l'impact de l'injection de calcitriol (0,5 µg/souris) sur la calcémie d'un modèle murin de lymphome de Burkitt (Raji). A J0, 2 souris ont reçu le calcitriol libre par voie intraveineuse (témoins positifs) (a), le calcitriol libre par voie intratumorale (b) ou les nanocapsules encapsulant le calcitriol par voie intratumorale (c). La calcémie des souris a été évaluée 2 jours avant traitement (J-2), 1 jour (J1) et 7 jours après (J7) excepté dans le groupe ayant reçu le calcitriol encapsulé dans lequel les 2 souris sont décédées au cours de l'étude.

Nos résultats s'accordent avec ceux obtenus dans d'autres études. Par exemple, Fonseca-Filho *et al.* ont observé une augmentation de la calcémie chez un modèle murin de cancer du sein 24 heures après administration intratumorale de 0,075 µg de calcitriol par souris (Fonseca-Filho *et al.*, 2017). Un retour à la calcémie initiale a été observé 7 jours après l'injection de calcitriol libre pour ces 2 groupes expérimentaux. Le fait que les souris traitées avec les NCs encapsulant le calcitriol n'aient pas présenté d'hypercalcémies suite au traitement, à l'inverse des autres souris, peut s'expliquer par la libération lente du calcitriol, retardant et prolongeant son action hypercalcémique. L'association de cet effet prolongé et de la dose importante de calcitriol administrée peut être à l'origine du décès des 2 souris de ce groupe. Pour cette raison, une deuxième étude du suivi de la calcémie des souris à la suite de l'administration de calcitriol libre ou encapsulé a été conduite, avec une dose en actif réduite.

Etude 2

La seconde étude visant à évaluer l'impact d'une administration de calcitriol à des souris sur leur calcémie a été réalisée sur un modèle de xénogreffe de carcinome mammaire humain (MDA-MB-231). Les animaux ont été répartis en 2 groupes de 3 souris :

- Groupe « calcitriol libre »
- Groupe « calcitriol encapsulé »

Le protocole est identique à celui de l'étude 1 hormis la dose administrée, ici réduite de 4 fois. Dans la présente étude, les animaux ont donc reçu 0,125 µg de calcitriol par voie intratumorale, soit 6,25 µg/Kg, avec un volume injecté de 100 µL.

De la même manière que lors de la première étude mais dans une moindre mesure, une augmentation de la calcémie (+11% en moyenne) a été observée dans les 24 heures suivant l'administration de calcitriol libre (Figure 42). Ces observations peuvent s'expliquer par la diminution de la dose de calcitriol administrée.

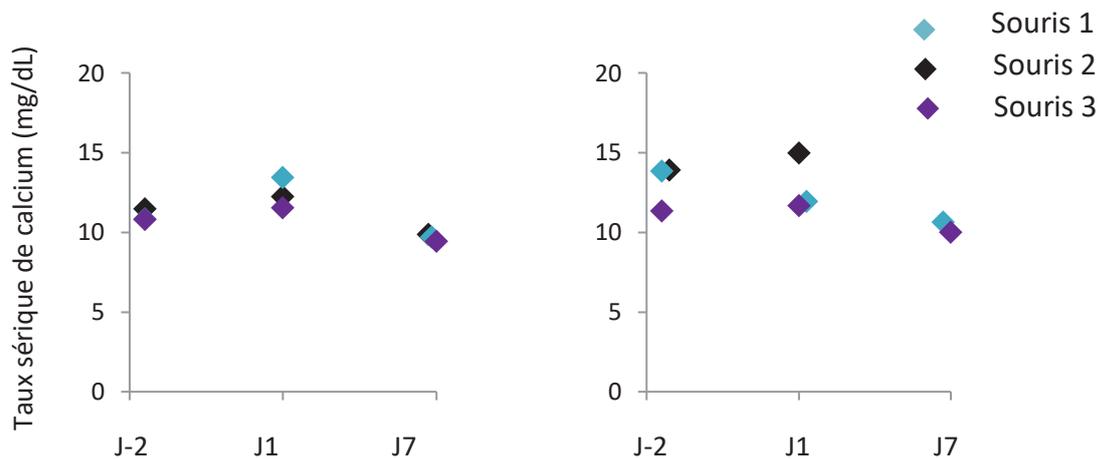


Figure 42. Evaluation de l'impact de l'injection de calcitriol (0,125 µg/souris) sur la calcémie d'un modèle murin de carcinome mammaire humain (MDA-MB-231). A J0, les souris ont reçu par voie intratumorale soit (a) du calcitriol libre soit (b) des nanocapsules encapsulant le calcitriol. La calcémie des souris a été évaluée 2 jours avant traitement (J-2), 1 jour (J1) et 7 jours après (J7) excepté pour une des souris du groupe « calcitriol encapsulé » décédée au cours de l'étude.

En revanche, une variabilité de l'évolution de la calcémie chez les souris ayant été traitées avec les nanocapsules encapsulant le calcitriol a été mise en évidence puisqu'une faible augmentation de cette dernière a été observée chez 2 souris et une diminution chez le 3^{ème} animal du groupe. Ces résultats divergent donc avec ceux de la précédente étude mais il est difficile d'apporter une conclusion compte tenu du faible nombre d'animaux considérés. Une des souris de ce groupe est par ailleurs décédée au cours de l'étude, ceci pouvant s'expliquer par son taux de calcium initial qui

témoigne d'une hypercalcémie (taux de calcium > 12 mg/dL) et/ou par une libération prolongée du calcitriol et donc une hypercalcémie prolongée. Quel que soit le traitement reçu, la calcémie initiale est retrouvée 7 jours après traitement.

En conclusion, la dose de 0,125 µg de calcitriol par souris semble être acceptable dans le cas d'une calcémie initiale non pathologique puisque dans ce cas, la calcémie initiale est retrouvée 7 jours après traitement. Nous avons établi les doses en calcitriol de 0,125 et 0,5 µg/souris sur la base des études réalisées chez l'Homme et de l'étude de Muindi *et al.* (2003). En effet, selon Muindi *et al.*, ces doses sont respectivement équivalentes à des doses de 0,5 et 2,1 µg/kg chez l'Homme, et correspondent aux doses administrées par voie orale lors de l'étude clinique de phase I (Beer *et al.*, 2001). La présente étude indique que l'évaluation de l'activité anti-cancéreuse du calcitriol *in vivo* est envisageable dans ces conditions moyennant la confirmation de ces résultats par des études supplémentaires chez un modèle murin d'intérêt, et avec plus d'animaux (> 5 souris par condition). Dans l'esprit de trouver un modèle plus performant que le modèle murin de xénogreffe MCF-7, qui se caractérise par une croissance tumorale extrêmement lente, nous avons évalué la sensibilité de différentes lignées cellulaires au calcitriol *in vitro* (Annexe). Ces lignées ont préalablement fait l'objet d'une sélection sur la base de leur croissance tumorale rapide et de leur sensibilité à l'activité du calcitriol supposée dans la littérature.

IV.4. Références

- Almouazen, E., Bourgeois, S., Jordheim, L.P., Fessi, H., Briançon, S., 2013. Nano-encapsulation of vitamin D3 active metabolites for application in chemotherapy: formulation study and *in vitro* evaluation. *Pharm. Res.* 30, 1137–1146.
- Barichello, J.M., Morishita, M., Takayama, K., Nagai, T., 1999. Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 25, 471–476.
- Beer, T.M., Munar, M., Henner, W.D., 2001. A Phase I trial of pulse calcitriol in patients with refractory malignancies: pulse dosing permits substantial dose escalation. *Cancer* 91, 2431–2439.
- Ben-Eltriki, M., Deb, S., Guns, E.S.T., 2016. Calcitriol in combination therapy for prostate cancer: pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions. *J. Cancer* 7, 391–407.
- Brigger, I., Dubernet, C., Couvreur, P., 2012. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64, 24–36.
- Calvo, P., Vila-Jato, J.L., Alonso, M.J., 1996. Comparative *in vitro* evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers. *J. Pharm. Sci.* 85, 530–536.
- Chouvet, C., Vicard, E., Devonec, M., Saez, S., 1986. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibitory effect on the growth of two human breast cancer cell lines (MCF-7, BT-20). *J. Steroid Biochem.* 24, 373–376.

- Cruz, L., Soares, L.U., Costa, T.D., Mezzalira, G., da Silveira, N.P., Guterres, S.S., Pohlmann, A.R., 2006. Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. *Int. J. Pharm.* 313, 198–205.
- Deeb, K.K., Trump, D.L., Johnson, C.S., 2007. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat. Rev. Cancer* 7, 684–700.
- Di Rosa, M., Malaguarnera, M., Nicoletti, F., Malaguarnera, L., 2011. Vitamin D3: a helpful immunomodulator. *Immunology* 134, 123–139.
- Dong, Y., Feng, S.-S., 2006. Nanoparticles of poly(D,L-lactide)/methoxy poly(ethylene glycol)-poly(D,L-lactide) blends for controlled release of paclitaxel. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 78A, 12–19.
- Drozdek, S., Bazylińska, U., Bazylińska, U., 2016. Biocompatible oil core nanocapsules as potential co-carriers of paclitaxel and fluorescent markers: preparation, characterization, and bioimaging. *Colloid Polym. Sci.* 294, 225–237.
- Duffy, M.J., Murray, A., Synnott, N.C., O'Donovan, N., Crown, J., 2017. Vitamin D analogues: Potential use in cancer treatment. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 112, 190–197.
- Feldman, D., Krishnan, A.V., Swami, S., Giovannucci, E., Feldman, B.J., 2014. The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. *Nat. Rev. Cancer* 14, 342–357.
- Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J.P., Ammoury, N., Benita, S., 1989. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.* 55, R1–R4.
- Fonseca-Filho, V.C.N., Katayama, M.L.H., Lyra, E.C., Maria, D.A., Basso, R.A., Nonogaki, S., Guerra, J.M., Maistro, S., Góes, J.C.G.S., Fogueira, M.A.A.K., 2017. Orthotopic tumorgrafts in nude mice as a model to evaluate calcitriol effects in breast cancer. *Braz. J. Biol.* 77, 856–867.
- Hansen, C.M., 2007. *Hansen Solubility Parameters: A User's Handbook*, Second Edition. CRC Press Book.
- Krishnan, A.V., Swami, S., Feldman, D., 2012. The potential therapeutic benefits of vitamin D in the treatment of estrogen receptor positive breast cancer. *Steroids* 77, 1107–1112.
- Laredj-Bourezg, F., Bolzinger, M.-A., Pelletier, J., Chevalier, Y., 2017. Pickering emulsions stabilized by biodegradable block copolymer micelles for controlled topical drug delivery. *Int. J. Pharm.* 531, 134–142.
- Larsen, D.B., Parshad, H., Fredholt, K., Larsen, C., 2002. Characteristics of drug substances in oily solutions. Drug release rate, partitioning and solubility. *Int. J. Pharm.* 232, 107–117.
- Ly, L.H., Zhao, X.-Y., Holloway, L., Feldman, D., 1999. Liarozole acts synergistically with 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 to inhibit growth of DU 145 human prostate cancer cells by blocking 24-hydroxylase activity. *Endocrinology* 140, 2071–2076.
- Maj, E., Filip-Psurska, B., Świtalska, M., Kutner, A., Wietrzyk, J., 2015. Vitamin D analogs potentiate the antitumor effect of imatinib mesylate in a human A549 lung tumor model. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 27191–27207.
- Mora-Huertas, C.E., Fessi, H., Elaissari, A., 2010. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int. J. Pharm.* 385, 113–142.
- Mouzouvi, C.R.A., Umerska, A., Bigot, A.K., Saulnier, P., 2017. Surface active properties of lipid nanocapsules. *PLOS ONE* 12, e0179211–e0179228.
- Muindi, J.R., Modzelewski, R.A., Peng, Y., Trump, D.L., Johnson, C.S., 2004. Pharmacokinetics of 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3 in Normal Mice after Systemic Exposure to Effective and Safe Antitumor Doses. *Oncology* 66, 62–66.

- Nicolas, S., Bolzinger, M.-A., Jordheim, L.P., Chevalier, Y., Fessi, H., Almouazen, E., 2018. Polymeric nanocapsules as drug carriers for sustained anticancer activity of calcitriol in breast cancer cells. *Int. J. Pharm.* 550, 170–179.
- Poletto, F.S., Jäger, E., Cruz, L., Pohlmann, A.R., Guterres, S.S., 2008. The effect of polymeric wall on the permeability of drug-loaded nanocapsules. *Mater. Sci. Eng.* 28, 472–478.
- Rajh, M., Dolinar, K., Miš, K., Pavlin, M., Pirkmajer, S., 2016. Medium renewal blocks anti-proliferative effects of metformin in cultured MDA-MB-231 breast cancer cells. *PLOS ONE* 11, e0154747-e0154764.
- Ramalho, M.J., Loureiro, J.A., Gomes, B., Frasco, M.F., Coelho, M.A.N., Pereira, M.C., 2015. PLGA nanoparticles as a platform for vitamin D-based cancer therapy. *Beilstein J. Nanotechnol.* 6, 1306–1318.
- Sabzichi, M., Mohammadian, J., Mohammadi, M., Jahanfar, F., Movassagh Pour, A.A., Hamishehkar, H., Ostad-Rahimi, A., 2017. Vitamin D-loaded nanostructured lipid carrier (NLC): a new strategy for enhancing efficacy of doxorubicin in breast cancer treatment. *Nutr. Cancer* 69, 840–848.
- Sahoo, S.K., Ma, W., Labhasetwar, V., 2004. Efficacy of transferrin-conjugated paclitaxel-loaded nanoparticles in a murine model of prostate cancer. *Int. J. Cancer* 112, 335–340.
- Scher, H.I., Jia, X., Chi, K., de Wit, R., Berry, W.R., Albers, P., Henick, B., Waterhouse, D., Ruether, D.J., Rosen, P.J., Meluch, A.A., Nordquist, L.T., Venner, P.M., Heidenreich, A., Chu, L., Heller, G., 2011. Randomized, open-label phase III trial of docetaxel plus high-dose calcitriol versus docetaxel plus prednisone for patients with castration-resistant prostate cancer. *J. Clin. Oncol.* 29, 2191–2198.
- Sethi, M., Sukumar, R., Karve, S., Werner, M.E., Wang, E.C., Moore, D.T., Kowalczyk, S.R., Zhang, L., Wang, A.Z., 2014. Effect of drug release kinetics on nanoparticle therapeutic efficacy and toxicity. *Nanoscale* 6, 2321–2327.
- Simboli-Campbell, M., Narvaez, C.J., Tenniswood, M., Welsh, J., 1996. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ induces morphological and biochemical markers of apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 58, 367–376.
- Swami, S., Krishnan, A.V., Wang, J.Y., Jensen, K., Peng, L., Albertelli, M.A., Feldman, D., 2011. Inhibitory Effects of Calcitriol on the Growth of MCF-7 Breast Cancer Xenografts in Nude Mice: Selective Modulation of Aromatase Expression *in vivo*. *Horm. Cancer* 2, 190–202.
- Teixeira, M., Alonso, M.J., Pinto, M.M.M., Barbosa, C.M., 2005. Development and characterization of PLGA nanospheres and nanocapsules containing xanthone and 3-methoxyxanthone. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 59, 491–500.
- Trump, D.L., Hershberger, P.A., Bernardi, R.J., Ahmed, S., Muindi, J., Fakhri, M., Yu, W.-D., Johnson, C.S., 2004. Anti-tumor activity of calcitriol: pre-clinical and clinical studies. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 89–90, 519–526.
- Van Krevelen, D.W., Te Nijenhuis, K., 2009. *Properties of Polymers (Fourth Edition)*. Elsevier, Amsterdam.
- Wagner, D., Trudel, D., Van der Kwast, T., Nonn, L., Giangreco, A.A., Li, D., Dias, A., Cardoza, M., Laszlo, S., Hersey, K., Klotz, L., Finelli, A., Fleshner, N., Vieth, R., 2013. Randomized clinical trial of vitamin D₃ doses on prostatic vitamin D metabolite levels and ki67 labeling in prostate cancer patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98, 1498–1507.
- Welsh, J., 2011. Vitamin D metabolism in mammary gland and breast cancer. *Mol. Cell. Endocrinol.* 347, 55–60.
- Woloszynska-Read, A., Johnson, C.S., Trump, D.L., 2011. Vitamin D and cancer: clinical aspects. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 25, 605–615.

Chapitre V : Implication des macrophages dans l'activité pro-apoptotique de nanocapsules encapsulant le calcitriol

V.1. Introduction

Ce chapitre sera consacré à l'évaluation de l'implication des macrophages dans l'activité cytotoxique du calcitriol vis-à-vis de la lignée d'adénocarcinome mammaire humain MCF-7.

Les macrophages représentent la population immunitaire la plus présente au sein des tumeurs où ils sécrètent, sous l'influence du microenvironnement tumoral, des facteurs pro-tumoraux, faisant d'eux des acteurs majeurs de la progression tumorale (Sica *et al.*, 2000). La polarisation des macrophages, vers un phénotype anti- ou pro-tumoral, est initiée par des stimulus locaux. Compte tenu de leur plasticité phénotypique, ils peuvent aisément être reprogrammés vers l'un ou l'autre des phénotypes (Luo, 2006). Du fait de leur activité phagocytaire et de leur mobilité tumorale, leur ciblage par les nanoparticules a émergé comme une approche thérapeutique de choix dans le cadre du traitement contre le cancer (Binnemars-Postma *et al.*, 2017).

En ce sens, de multiples études ont démontré l'efficacité de telles approches *in vitro* et *in vivo* (Soma *et al.*, 2000 ; Zeisberger *et al.*, 2006 ; Miller *et al.*, 2015 ; Zanganeh *et al.*, 2016). Cependant, aucune de ces études ne démontre l'intérêt d'exploiter les TAMs à la fois pour leur plasticité phénotypique et pour leur capacité de réservoir de nanoparticules. Les nanocapsules développées à l'issue de nos travaux sont particulièrement intéressantes pour vérifier l'efficacité de cette association thérapeutique puisqu'elles possèdent des propriétés physicochimiques adéquates pour la phagocytose. De plus, au-delà de ses activités anti-cancéreuses, le calcitriol est décrit pour son rôle immunomodulateur, notamment envers les macrophages. Une étude a par ailleurs démontré qu'il stimulait l'action cytotoxique de macrophages sur une lignée cellulaire de lymphome de par l'induction de la production de cathélicidine par ces derniers (Bruns *et al.*, 2015). Enfin, les nanocapsules présentent une libération prolongée du calcitriol et sont constituées d'une coque polymère s'opposant à la libération de l'actif une fois les nanocapsules phagocytées, jusqu'à érosion de cette dernière.

Afin de vérifier le potentiel des macrophages à stocker les nanocapsules, nous avons au préalable évalué leur internalisation et leur rétention au sein des macrophages dérivés de la lignée de monocytes humains THP-1, ainsi que des cellules d'adénocarcinome mammaire humain MCF-7 en co-

culture pendant 10 jours. Nous avons ensuite évalué la viabilité des cellules MCF-7 en mono-cultures ou co-cultivées avec les macrophages après exposition au calcitriol (libre et encapsulé) ou aux nanocapsules vides. De plus, afin de confirmer la capacité des macrophages à retenir les nanocapsules et à redistribuer le calcitriol encapsulé aux cellules cancéreuses, nous avons établi des co-cultures sans exposer directement les cellules MCF-7 à l'actif. Pour ce faire, nous avons pré-incubés les macrophages avec les nanocapsules avant d'établir les co-cultures.

Faits marquants de l'étude

- ✓ Les nanocapsules sont efficacement internalisées par les cellules de cancer du sein MCF-7 et les macrophages *in vitro*, en mono- et co-cultures
 - ✓ Les macrophages sont capables de jouer un rôle de réservoir des nanocapsules pendant au moins 10 jours
 - ✓ Les macrophages sont capables de redistribuer le calcitriol aux cellules cancéreuses environnantes *in vitro*
 - ✓ Les macrophages potentialisent l'activité cytotoxique du calcitriol *in vitro* pendant 10 jours
 - ✓ L'exposition des macrophages aux nanocapsules blanches est à l'origine d'une réduction de la viabilité des cellules cancéreuses, suggérant une activation des macrophages par ces dernières
-

V.2. Publication

Macrophages enhance the *in vitro* cytotoxic activity of calcitriol-loaded nanocapsules on breast cancer cells

Article soumis

Sabrina Nicolas¹ – Marie-Alexandrine Bolzinger¹ – Lars Petter Jordheim² – Hatem Fessi¹ – Eyad Almouazen^{1*}

¹ Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, LAGEP UMR 5007, 43 boulevard du 11 novembre 1918, F-69622, Villeurbanne, France.

² Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, 69008, Lyon, France.

*Corresponding author: Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, LAGEP UMR 5007, 43 boulevard du 11 novembre 1918, F-69622, Villeurbanne, France. Tel : +33478777136. E-mail: eyad.al-mouazen@univ-lyon1.fr

V.2.1. Abstract

Calcitriol-loaded polymeric nanocapsules have shown a long lasting antiproliferative activity against breast cancer cells with a promising potential to avoid calcitriol systemic side effects that currently compromise its clinical use. Tumor associated macrophages (TAMs) may support the anticancer activity of calcitriol nanodelivery systems due to their own sensitivity to calcitriol and ability to internalize together with cancer cells drug-loaded nanoparticles. They circulate into the tumor site and may deliver calcitriol to surrounding cancer cells. In this study, we investigated the potential implication of TAMs in calcitriol-loaded nanocapsule cytotoxic activity using an *in vitro* co-culture model of human breast adenocarcinoma cells (MCF-7) and macrophages derived from a human monocytic cell line (THP-1).

Nanocapsules of approximately 200 nm were highly internalized and stored inside macrophages in this model. The cytotoxicity of calcitriol-loaded nanocapsule against MCF-7 cells was enhanced up to 4-fold and maintained over 10 days in the presence of macrophages. In addition, when THP-1 macrophages were preincubated with calcitriol-loaded nanocapsules and co-cultured with MCF-7 cells, they induced cell death in MCF-7 cells, showing that macrophages were efficient reservoirs of calcitriol.

In conclusion, calcitriol-loaded nanocapsules present a sustained cytotoxic activity in the presence of macrophages which act as slow-releasing reservoirs of encapsulated calcitriol.

V.2.2. Introduction

Tumor associated macrophages (TAMs) are key players in the tumor microenvironment of most solid tumors including breast cancer (Mantovani *et al.*, 2002). TAMs are predominantly immunosuppressive, thereby contributing to all stages of tumor progression including cancer cell proliferation and invasiveness (Ward *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2015). Considering the detrimental role of most TAMs in tumor growth, their plasticity, their mobility, and their ability to internalize nanoparticles, they are interesting targets for cancer therapy, notably through the use of nanomedicines (Ngambenjawong *et al.*, 2017a; Vinogradov *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2017). Their involvement in the activity of encapsulated drugs has to be considered in the design of anticancer nanomedicines. Recent studies suggested that macrophages could potentiate the activity of encapsulated drugs. Tanei *et al.* evaluated the redirection of nanoparticle albumin-bound paclitaxel (nAb-PTX) to hepatic macrophages in order to enhance PTX activity in liver metastasis of breast and lung. They loaded nAB-PTX into a nanoporous solid multistage nanovector (MSV) and proved that macrophages exposed to these nanoparticles were viable and able to internalize and release PTX (Tanei *et al.*, 2016). Indeed, their supernatant presented cytotoxic effects against the 4T1 breast cancer cell line (Tanei *et al.*, 2016). Similarly, a higher inhibition of tumor growth was obtained *in vivo* when PTX was loaded in YI peptide-functionalized polymeric nanoparticles to target TAMs in a colorectal cancer mouse model (Cao *et al.*, 2018). The functionalized formulation presented also a higher tumor accumulation and was colocalized with TAMs (Cao *et al.*, 2018). Sousa *et al.* studied the *in vitro* polarization of J774 murine macrophages upon culture in breast cancer cell-conditioned medium and exposure to liposomes encapsulating the bisphosphonate zoledronate (Sousa *et al.*, 2015). The authors showed that encapsulated zoledronate enhanced the expression of several markers of immunostimulating macrophages. However, these activities were not observed in direct co-culture models (Sousa *et al.*, 2015). In another study, Soma *et al.* demonstrated that doxorubicin encapsulation into poly-alkylcyanoacrylate (PACA) nanoparticles maintained its cytotoxic activity *in vitro* on a

reticulum cell sarcoma cell line in both mono- and co-cultures with macrophages (Soma *et al.*, 2000). They found that macrophages were able to store and redistribute doxorubicin to cancer cells but did not potentiate its cytotoxicity. Finally, Miller *et al.* demonstrated *in vivo* on a fibrosarcoma xenograft mouse model that macrophages are important to store PEGylated nanoparticles in tumor microenvironment, and that they were able to redistribute the encapsulated drug in a sustained manner (Miller *et al.*, 2015a). These studies pointed out the advantages of macrophages in nano-based cancer therapy, both directly through their polarization to an immunostimulating phenotype and indirectly by potentiating the activity of any anticancer drug through their use as reservoirs of nanoparticles.

In a previous study, we have reported the development of calcitriol (1,25-dihydroxyvitamin D₃)-loaded polymeric nanocapsules (calcitriol-NCs) that are able to sustain its antiproliferative activity on breast cancer cells and could enhance its clinical use (Nicolas *et al.*, 2018). The anticancer activities of calcitriol are attributed to anti-proliferative, pro-differentiative and cytotoxic actions toward cancer cells (Deeb *et al.*, 2007; Krishnan *et al.*, 2012). Calcitriol can also act as a modulator of the immune system through actions on various immune cells including macrophages and its role was well elucidated in autoimmune diseases (Baeke *et al.*, 2010; Szymczak and Pawliczak, 2016). Macrophages are known to express vitamin D receptor (VDR) so to be responsive to calcitriol exposure (Townsend *et al.*, 2005). Moreover, it was documented that macrophages are able to participate in the extra-renal production and secretion of calcitriol due to the expression of the 1 α -hydroxylase and the absence of its catabolic enzyme (24-hydroxylase) (Townsend *et al.*, 2005). Therefore, macrophages could be implicated in the anti-cancer activities of calcitriol-NCs. The mechanisms implicated in the activity of calcitriol on macrophages in tumor models have been poorly investigated. Zhang *et al.* have shown the involvement of the vitamin D receptor (VDR) in the pro-metastatic activity of TAMs. Treatment with calcitriol reduced cancer cell migration activity, as identified in co-cultures of breast cancer cells and macrophages *in vitro* and confirmed in an *in vivo* mouse model of breast cancer (Zhang *et al.*, 2014). Calcitriol can also induce the production of cathelicidin by macrophages independently of their phenotype, through a toll-like receptor activation of its gene expression (Gombart, 2009). Cathelicidin is an interesting antimicrobial peptide for cancer therapy found to be cytotoxic against high-grade B cell lymphoma (Bruns *et al.*, 2015). Taken together, these results indicate that besides its activities on cancer cells, calcitriol may influence macrophage-activity toward anti-tumor effects.

Considering NP interactions with macrophages and calcitriol activity on macrophages, the main objective of this work was to evaluate the impact of these immune cells on the efficacy of calcitriol-based nanoparticles against cancer cells. In this work, we first assessed the ability of macrophages to internalize and store calcitriol-NCs using fluorescent-labeled NCs (Nile red-NCs) in an

in vitro co-culture model. Secondly, we evaluated the *in vitro* cytotoxic activity of these NCs on MCF-7 cells in absence or in presence of THP-1-derived macrophages.

V.2.3. Materials and methods

V.2.3.1. Chemicals

Calcitriol was purchased from Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA) (purity $\geq 97\%$). Poly(D,L)lactic acid (PLA, Mw 20000 g·mol⁻¹) was supplied by Evonik Laboratories (Germany). Caprylic/capric triglyceride PEG-4 esters (Labrafac Hydro[®] WL1219) was generously provided by Gattefossé (Saint-Priest, France). Caprylic/capric/succinic triglyceride (Miglyol[®] 829) was supplied from Cremer (USA). Nile red was purchased from Sigma-Aldrich (France). Polysorbate 80 (Montanox[®] 80 VG Premium) and sodium lauryl sulfate (SDS) were respectively obtained from Seppic (France) and Sigma-Aldrich. Acetone (Acros Organics, USA), acetonitrile (Fisher Scientific, UK) and ultrapure water (resistivity > 18 mΩ·cm at 25 °C) used throughout the experiments were of analytical grades.

V.2.3.2. Preparation of the calcitriol-loaded polymeric nanocapsules

Calcitriol-NCs were prepared using the previously described nanoprecipitation technique (Nicolas *et al.*, 2018). Briefly, the organic phase consisted of PLA (0.15%, w/w of the organic phase), a mix of Labrafac Hydro[®] WL1219 and Miglyol[®] 829 in equal proportions (0.3% w/w of the organic phase) to form the shell and the core of NCs respectively. These components were dissolved in 7 mL of acetone and calcitriol (0.01%, w/w of the organic phase) was added to the organic phase. After stirring, this phase was poured dropwise into 14 mL of an aqueous phase containing 0.05% (w/w of the aqueous phase) of Montanox[®] VG 80. NC suspensions were stirred for 20 min at room temperature, prior to evaporation of acetone and a part of the water. Evaporation was performed under vacuum (200 mbar) using a rotary evaporator (Rotavapor[®] R-205, Büchi, Switzerland). Similar calcitriol-free formulas were prepared as controls (blank-NCs). Fluorescent labeled NCs were similarly prepared by adding Nile red (0.01%, w/w of the organic phase) to the organic phase of the formulation instead of calcitriol. The suspensions were stored in the dark at 4 °C away from humidity.

V.2.3.3. NC physicochemical characterizations

The physicochemical properties of NCs were evaluated as previously described (Nicolas *et al.*, 2018). The mean size, the size distribution (characterized by the polydispersity index (PDI)) and the zeta potential of NCs were measured using dynamic light scattering (NanoZS instrument, Malvern, UK).

The total amount of calcitriol recovered in NCs was quantified by liquid chromatography using a Waters 717 injector, a Waters 600 pump and a Waters 2996 photodiode array UV detector ($\lambda = 266$ nm). A Xselect HSS C18 column (3.5 μm , 4.6 \times 150 mm, Waters, Ireland) was used. Nile red quantification was performed using UV-spectrophotometry (UV -1800 Pharma Spec SHIMADZU, $\lambda = 530$ nm) analysis. Finally, the encapsulation efficiencies of either calcitriol or Nile red into NCs were calculated by quantifying the fraction of the non-encapsulated compound using a centrifugation method (62000 g, 30 min).

V.2.3.4. *In vitro* calcitriol-NCs release studies

Calcitriol release from NCs was determined as previously described (Almouazen *et al.*, 2013) by dispersing calcitriol-NCs in a phosphate buffer solution (PBS, pH=7.4) containing 0.01% of SDS to obtain a final concentration of calcitriol of 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (sink conditions). Suspensions were maintained at 37 °C under moderate magnetic stirring (300 rpm) over 7 days. During the release process, aliquots were collected at predetermined time points and centrifuged at 62000 g for 10 min. The supernatant was then collected, and analyzed by HPLC as described above. The percentage of drug released from NCs, defined as the ratio of the free drug concentration (in the supernatant) to the total drug concentration, was calculated. Similarly, the cumulative release of calcitriol was investigated by collecting the supernatant every 24 h and subsequently replacing the release medium by a fresh one.

V.2.3.5. *In vitro* biological evaluations of calcitriol activity

V.2.3.5.1. Cell lines

Human breast adenocarcinoma cells (MCF-7) obtained from American Type Culture Collection (USA) were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco[®], Thermo Fisher Scientific, Inc) supplemented with fetal bovine serum (10%), penicillin (100 units/mL) and streptomycin (100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). The human monocytic cell line (THP-1) was maintained as a suspension culture in Roswell Park Memorial Institute medium supplemented with 2-mercaptoethanol (Final concentration of 0.05 mM), fetal bovine serum (10%), penicillin (100 units/mL) and streptomycin (100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Cells were maintained in a humidified incubator at 37 °C in the presence of 5% CO₂.

V.2.3.5.2. Generation of THP-1 derived macrophages

Briefly, one million of THP-1 monocytes cells were exposed to 0.5 μM phorbol myristate acetate (PMA, Promega) for 7 h to achieve differentiation to macrophages. Conversely to THP-1 monocytes, THP-1 macrophages are adherent, allowing a rapid evaluation of the efficacy of the

differentiation process. Then, THP-1 cells were rinsed twice with PBS and plated in flasks for 24 h for adhesion prior to experiments.

V.2.3.5.3. In vitro co-culture model

To establish the co-culture model, MCF-7 cells were harvested with trypsin-EDTA prior to addition to THP-1 macrophages previously adhered in T25 flasks in a 1:1 ratio. Cell numbers were adapted according to the duration of the experiment, *i.e.* 4 (10^6 cells/flask), 7 or 10 days (both 10^5 cells/flask) to maintain cells in viable conditions. Co-cultures were maintained for 24 h prior to experiments.

V.2.3.5.4. Cellular uptake of nanocapsules

The intracellular uptake of NCs was analyzed by fluorescence using flow cytometry. THP-1 macrophages and MCF-7 cells were seeded individually or in co-cultures in T25 flasks to obtain adherent cultures as described above. Mono-cultivated THP-1 macrophages and MCF-7 cells were incubated for 1, 3 or 6 h with Nile-red-NCs, and washed with PBS to remove non-internalized NCs prior to medium addition. Similarly, co-cultures were incubated 3 h with fluorescent-labeled NCs. At predetermined times, cells were harvested using trypsin-EDTA, and pelleted twice by centrifugation at 320 g for 3 min before washing with PBS. Unexposed cells were used as control. Fluorescence was analyzed using a LSRII[®] FACS as described below.

V.2.3.5.5. Calcitriol toxicity against THP-1 macrophages

THP-1 macrophages were seeded at a density of 10^6 cells per well in 6-well plate. After 24 h delay for cell adhesion, THP-1 macrophages were incubated with free or encapsulated calcitriol ($1 \mu\text{M}$) for 3 h and the cell viability was evaluated over 240 h using FACS analysis as described below.

V.2.3.5.6. Cytotoxic activity of calcitriol on MCF-7 cells

V.2.3.5.6.1. Calcitriol activity on MCF-7 cells in mono-culture

MCF-7 cells were seeded at similar densities to co-culture conditions described above. After 24 h, MCF-7 cells were exposed to $1 \mu\text{M}$ of free calcitriol or encapsulated calcitriol, or to blank-NCs in similar dilution conditions than encapsulated calcitriol for 3, 24 or 96 h (Figure S2). After this period, cells were washed with PBS and fresh medium was added. Cell viability was evaluated as described below.

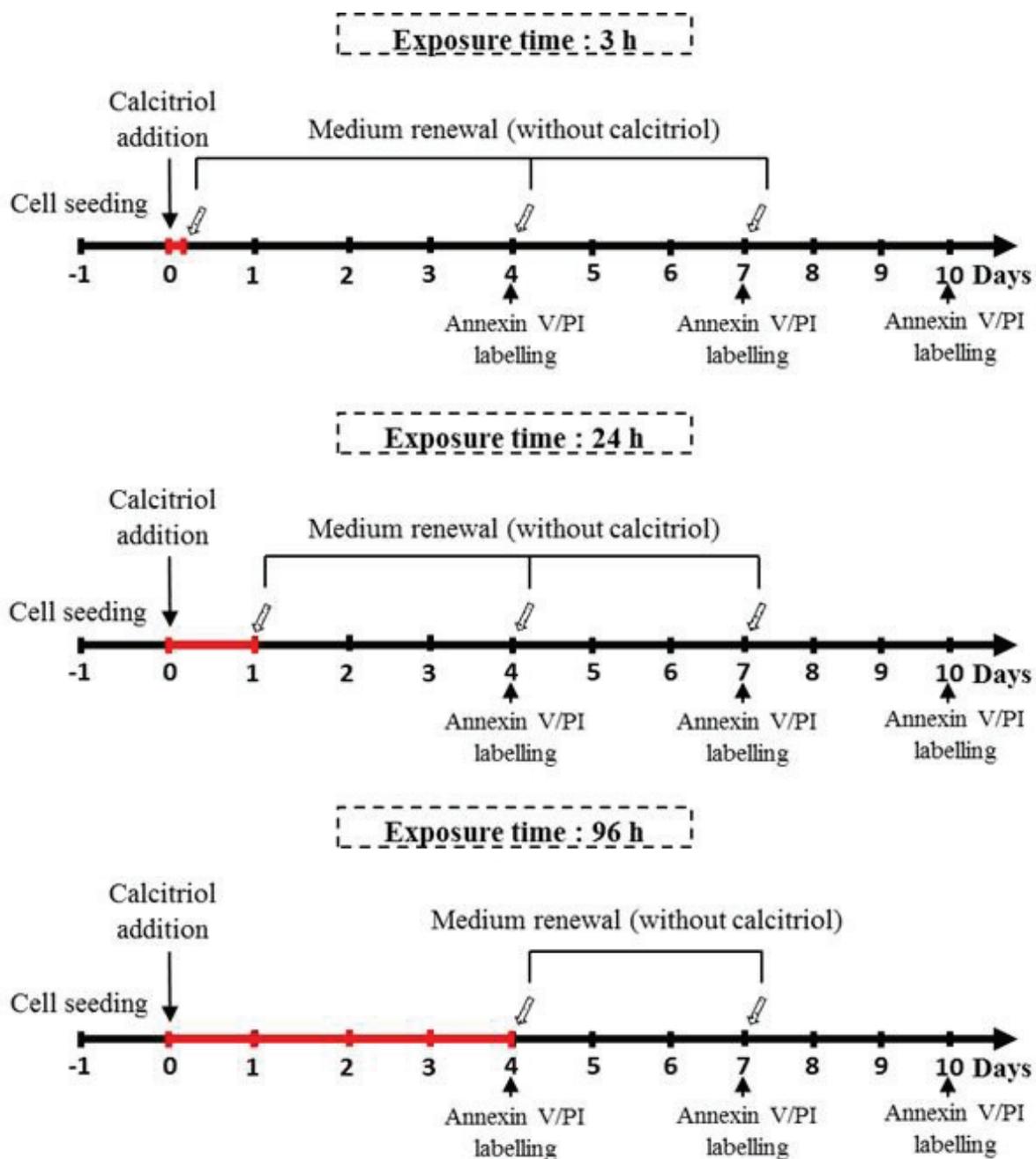


Figure S2. Method for the evaluation of calcitriol cytotoxic activity on MCF-7 cells *in vitro* using different times of incubation. MCF-7 cells were seeded at a density of 10^6 cells/flask in T25 flasks for a culture period of 4 days or at a density of 10^5 cells/flask for 7 and 10 days. After 24 h delay for cell adhesion (Day 0), MCF-7 cells were exposed to $1 \mu\text{M}$ of encapsulated calcitriol for 3, 24, or 96 h (red lines). Then, cells were washed with PBS to remove calcitriol and fresh complete medium was added. The viability of MCF-7 cells was analyzed at days 4, 7 and 10 using AnnexinV/propidium iodide staining.

V.2.3.5.6.2. Calcitriol activity on MCF-7 cells in co-culture with THP-1 macrophages

For co-cultures with THP-1 macrophages (cellular ratio of 1:1), MCF-7 cells were directly added in the T25 flasks containing adherent THP-1 macrophages at the same density (Weigert *et al.*, 2007). After 24 h, co-incubated cells were exposed to 1 μ M of free calcitriol or encapsulated calcitriol, or to blank-NCs in similar dilution conditions than encapsulated calcitriol for 3 h (Figure S3). Cells were then washed with PBS and fresh medium was added. Cell viability was evaluated as described below.

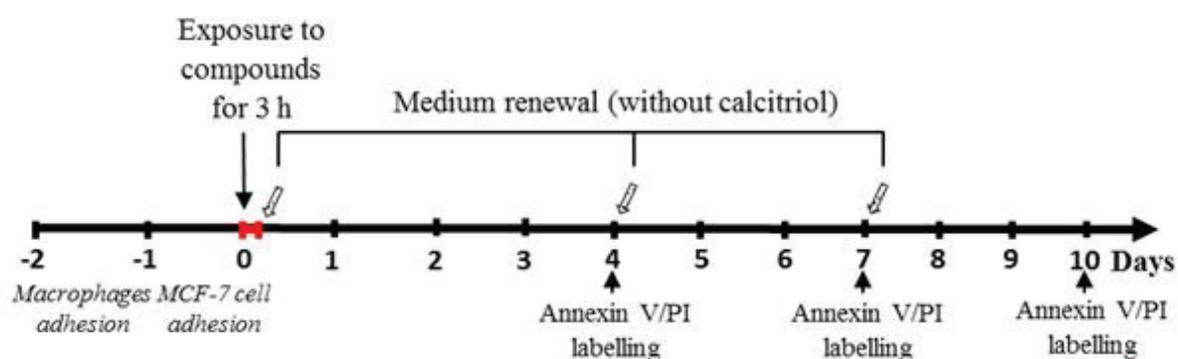


Figure S3. Method for the evaluation of calcitriol cytotoxic activity on MCF-7 cells *in vitro*. MCF-7 cells were seeded in presence of adherent macrophages (co-cultures with a cellular ratio of 1:1) at a density of 10^6 cells/flask in T25 flasks for a culture period of 4 days or at a density of 10^5 cells/flasks for 7 and 10 days. After 24 h delay for cell adhesion (Day 0), cells were exposed to 1 μ M of encapsulated calcitriol for 3 h (red line). Then, cells were washed with PBS to remove calcitriol and fresh complete medium was added. The viability of MCF-7 cells was analyzed at days 4, 7 and 10 using AnnexinV/propidium iodide staining.

V.2.3.5.6.3. Calcitriol activity on MCF-7 cells in delayed co-cultures with THP-1 macrophages

THP-1 cells were seeded as indicated and, after 24 h delay, exposed to 1 μ M of free or encapsulated calcitriol for 3 h (Figure S4). After this period, cells were washed with PBS and fresh complete medium was added. MCF-7 cells were added to the culture at a similar density than THP-1 macrophages to establish co-cultures with a cellular ratio of 1:1. Cell viability was evaluated as described below.

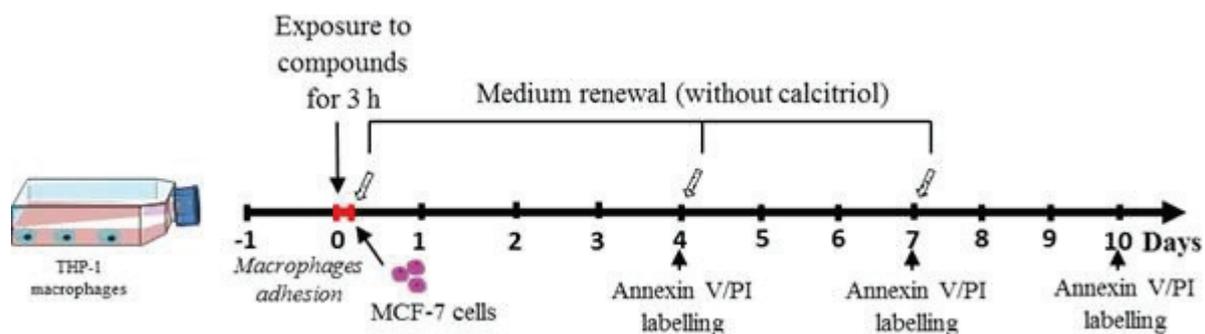


Figure S4. Method for the evaluation of calcitriol cytotoxic activity on MCF-7 cells co-cultured with THP-1 macrophages without direct exposure to calcitriol *in vitro*. THP-1 macrophages were seeded at a density of 10^6 cells/flask in T25 flasks for a culture period of 4 days or at a density of 10^5 cells/flask for 7 and 10 days. After 24 h delay for cell adhesion (Day 0), cells were exposed to $1 \mu\text{M}$ of encapsulated calcitriol for 3 h (red line). Then, cells were washed with PBS to remove calcitriol, following by the addition of MCF-7 cells to the cultured macrophages at a similar density to establish a co-culture with a ratio of 1:1. Fresh complete medium was added. The viability of MCF-7 cells was analyzed at days 4, 7 and 10 using AnnexinV/propidium iodide staining.

V.2.3.5.6.4. FACS analysis of cellular uptake and cell viability

Prior to the quantification of the cellular uptake by MCF-7 cells and macrophages, a selective labeling of the THP-1 cell line (CD45^+) was performed using an APC-conjugated human anti-CD45 antibody (BD Biosciences, USA) which allowed differentiating them from MCF-7 cells (CD45^-). The ratio of the mean fluorescence intensity (MFI) after exposure to NCs to the MFI of to the control (unexposed cells) was calculated for data analysis. A total of 50,000 cells was counted per sample.

For the evaluation of the cytotoxic activity of calcitriol against MCF-7 cells either in mono- or co-cultures at days 4, 7 and 10, THP-1 macrophages were selectively labeled with an APC-conjugated human anti-CD45 antibody. Then, cells were stained with AnnexinV/propidium iodide (PI) (Roche) according to the manufacturer's instructions and analyzed by flow activated cell sorting (FACS) on a Becton Dickinson FACS LSRII[®] (San Jose, CA, USA). Cells were counted as viable ($\text{AnnexinV}^-/\text{PI}^-$), early apoptotic ($\text{AnnexinV}^+/\text{PI}^-$), late apoptotic ($\text{AnnexinV}^+/\text{PI}^+$) or necrotic ($\text{AnnexinV}^-/\text{PI}^+$), expressed as percentage of the total cells. Unexposed cells were used as control. A total of 50,000 cells was counted per sample.

V.2.3.6. Statistical analysis

Results were evaluated using analysis of variance with subsequent comparisons by Student's test for paired or non-paired data, as appropriate. Statistical significance was defined as $p < 0.05$ (*) and

p<0.01 (**). Values are reported as means \pm standard error of the mean (SEM).

V.2.4. Results

V.2.4.1. NC physicochemical characterizations

In accordance with our previous study, NCs were successfully formulated and high encapsulation rates were obtained, with $88 \pm 1\%$ of encapsulation for calcitriol-NCs and up to 98% for Nile red-NCs (Table 9) (Nicolas *et al.*, 2018). *In vitro* biological evaluation conditions (37 °C) did not affect the NCs stability of calcitriol-NCs as $\sim 96\%$ of the drug was recovered after 10 days (data not shown). Blank-NCs and Nile red-NCs had similar physicochemical properties to calcitriol-NCs (Table 9). The narrow particle size distribution (mean size of approximately 200 nm) resulted in small values of the polydispersity index given by the cumulants analysis ($PdI < 0.1$). The ζ -potential values of the formulations were weakly negative, reflecting the negative charge of the particles (Table 9).

Table 9. Physicochemical properties of NCs. Data are represented as means of 3 independent experiments \pm SEM.

Sample	Particle mean size (nm)	Polydispersity Index	Zeta potential (mV)	Encapsulation efficiency (%)
Blank NCs	196 ± 3	0.078 ± 0.013	-18.9 ± 2.0	-
Calcitriol-NCs	198 ± 5	0.072 ± 0.004	-19.2 ± 2.2	88 ± 1
Nile red-NCs	201 ± 3	0.071 ± 0.006	-22.7 ± 1.5	98 ± 1

Calcitriol release from NCs under sink conditions exhibited a classical biphasic release pattern, with an initial burst release during the first 3 hours with $44 \pm 3\%$ of drug release, followed by a plateau over 24 h due to an equilibrium between released and entrapped calcitriol (Figure 43a). A second experiment was performed by renewing the release medium every 24 h. This experiment allowed us to observe continuous release of calcitriol over 3 days reaching approximately 100% of release (Figure 43b).

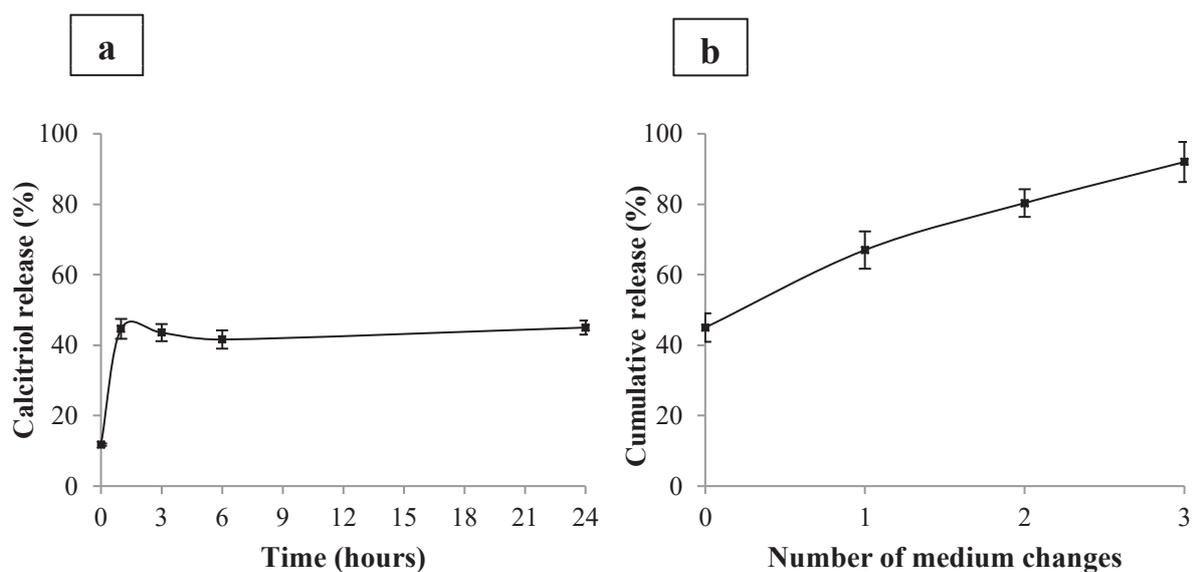


Figure 43. Release profiles of calcitriol-NCs. The percentage of released drug in PBS supplemented with 0.01% of SDS to ensure sink conditions at 37 °C was measured after 3, 6, 24 (a). The cumulative release of calcitriol was also evaluated over 96 h by changing release medium every 24 h and presented as function of the number of medium changes (b). The data is represented as means of 3 independent experiments \pm SEM.

V.2.4.2. Cellular uptake of NCs

Nile red-NCs were rapidly internalized *in vitro* by both MCF-7 cells (Figure 45a) and THP-1 macrophages in monocultures (Figure 45b): 100% of cells were found labelled after 1 h exposure time. The cellular uptake of NCs is quantitatively expressed as the ratio of the mean fluorescence intensity after exposure to NCs (F) to the mean fluorescence intensity of the control (F₀, unexposed cells). The increase in mean fluorescence intensity of MCF-7 cells after exposure to NCs was slightly different over time with F/F₀=8 and 13 after 1 and 6 h, respectively (Figure 45a). The mean fluorescence intensity of THP-1 macrophages increased 16 times after 1 h and the highest value (F/F₀=24) was observed after 3 h, indicating a higher internalization of NCs compared to MCF-7 cells (Figure 45a). This cell exposure time to NCs was selected to evaluate their uptake by both cell types in co-cultures (Figure 45c). Similarly to mono-cultures, all co-cultured cells (MCF-7 cells and THP-1 macrophages) internalized Nile red-NCs after 3 h exposure time with a higher uptake by macrophages. Actually, the mean fluorescence intensity (MFI) increased 9 times for MCF-7 cells against 25 times for THP-1 macrophages (Figure 45c). Beyond this incubation period, MCF-7 cells lost their fluorescence, with only a limited number of positive cells after 96 h (<20%) and a complete loss of the fluorescence at 168 h and 240 h. Conversely,

NC internalization by THP-1 macrophages decreased in a time-dependent manner but was both slower and less important. More than 40% (43.2%) of fluorescent cells were still found at T= 240 h with a 6-fold increase of MFI compared to unexposed cells, indicating a storage of NCs over 10 days (Figure 45c).

V.2.4.3. Cytotoxic activity of calcitriol-NCs on MCF-7 cells in mono-culture

Calcitriol cytotoxic activity was evaluated as the percentage of viable MCF-7 cells measured over 10 days. In the same period and conditions, unexposed MCF-7 cells presented 100% of viable cells (data not shown). When cells were exposed to free calcitriol for 3, 24 or 96 h, the number of viable cells were found to be $56 \pm 9\%$, $34 \pm 7\%$, and $15 \pm 2\%$, respectively at Day 4. No statistically significant differences were observed at Day 7 between the three incubation periods with approximately 20% of MCF-7 viability (Figure 44a). The cytotoxic activity of free calcitriol was lower on Day 10 with up to 59% of viable MCF-7 cells. Considering calcitriol-NCs, for the lowest period of incubation (3 h), their cytotoxic activity was limited over 10 days with $57 \pm 3\%$ of viability at day 4 and around 65% at days 7 and 10 (Figure 44b). When the period of incubation with calcitriol-NCs increased from 3 h to 24 or 96 h, a higher cytotoxic activity of the formulation was noticed with $27 \pm 4\%$ of viable cells at Day 4 and less than 23% at Day 7. Similarly to free calcitriol, the cytotoxic activity of encapsulated calcitriol was reduced at day 10 with 45-51% of cell viability

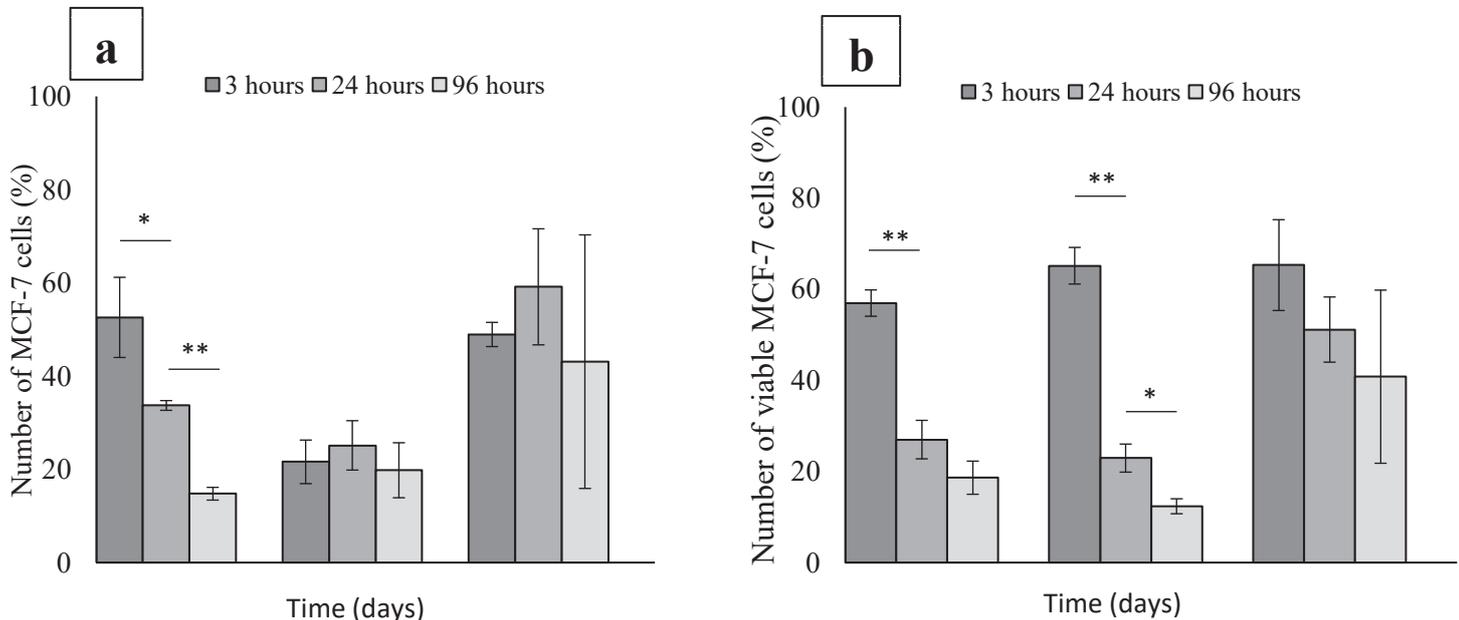
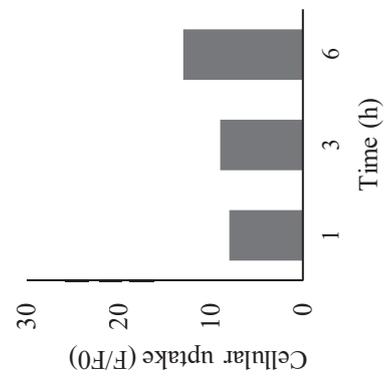
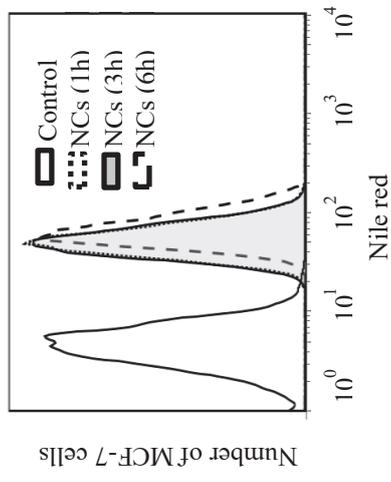
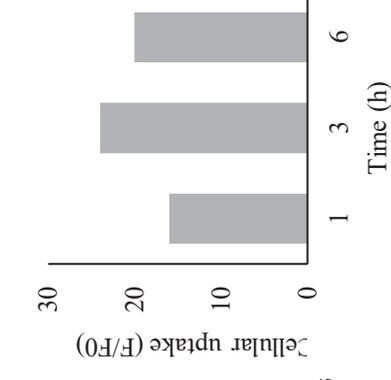
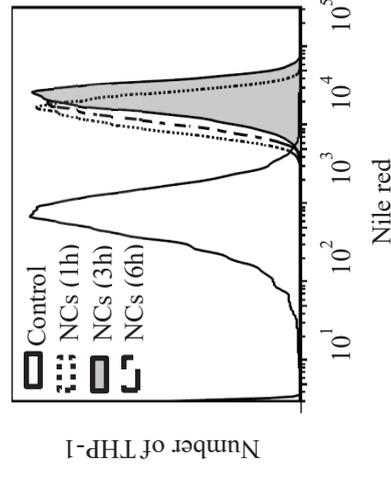


Figure 44. Influence of the incubation period of MCF-7 cells with calcitriol on its cytotoxic activity. MCF-7 cells were incubated 3, 24, or 96 h with (a) free or (b) encapsulated calcitriol (1 μ M). Cell viability of MCF-7 was assessed at days 4, 7 and 10. The data are means of 3 independent experiments \pm SEM. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$ using Student's *t*-test.

a**b****c**

Control
 3 h
 24 h
 96 h
 168 h
 240 h

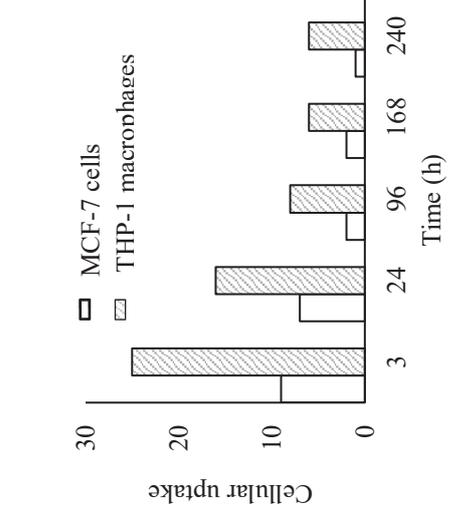
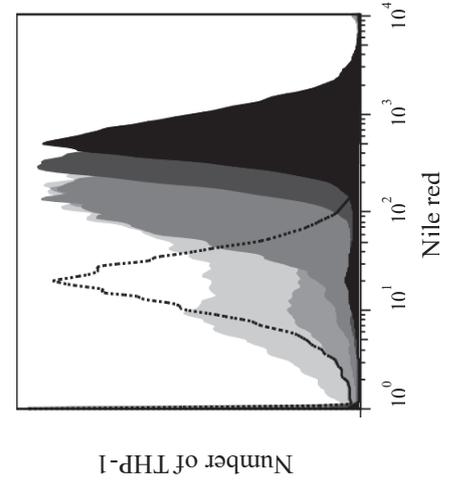
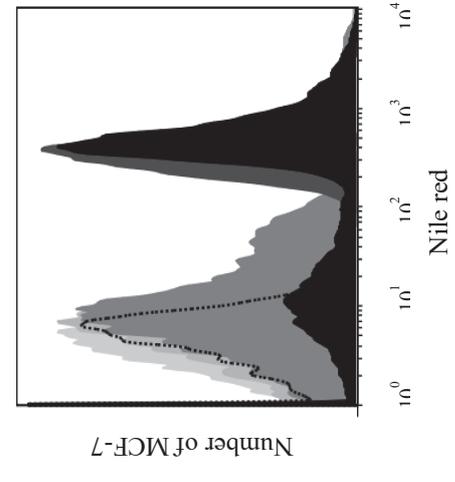


Figure 45. Cellular uptake of NCs. Based on the fluorescence of Nile red-NCs, the cellular uptake of NCs by (a) MCF-7 or (b) THP-1

macrophages in mono-cultures and (c) co-cultures was evaluated. Mono-cultured cells were incubated for 1, 3 or 6 h with NCs (T=0) and analyzed after 24 h (T=24) by flow cytometry (a, b). Cellular uptake of NCs was also evaluated in co-cultures (ratio of 1:1) after 3 h of incubation with Nile red-NCs, and analyzed immediately (T=3) or after 24, 96, 168 or 240 h (c). Data is expressed as the ratio of the mean fluorescence intensity after exposure to NCs (F) to the mean fluorescence intensity of the control (F0, unexposed cells). The data illustrate one experiment.

V.2.4.4. Cytotoxic activity calcitriol-NCs on MCF-7 cells in co-culture with THP-1 macrophages

Unexposed MCF-7 cells in co-cultures with THP-1 macrophages presented a viability of 100% over 10 days, indicating that THP-1 macrophages did not affect the viability of MCF-7 cells (data not shown).

MCF-7 cell co-cultured with THP-1 macrophages (ratio 1:1) showed higher sensitivity to both forms of calcitriol compared to mono-cultures, indicating macrophages implication in MCF-7 cell death (Figure 46). When MCF-7 cells were exposed to free calcitriol, similar MCF-7 viabilities were found in mono- and co-cultures except for Day 10 where the percentage of viable cells largely decreased in the presence of THP-1 macrophages ($52 \pm 2\%$ vs $23 \pm 2\%$, $p < 0.01$). In the case of cell exposure to calcitriol-NCs, the presence of macrophages strongly reduced MCF-7 cell viability at each time point of the experiment, with significant differences compared to MCF-7 cell mono-cultures ($p < 0.01$) notably at days 7 ($21 \pm 7\%$ vs $64 \pm 6\%$) and 10 ($24 \pm 2\%$ vs $69 \pm 11\%$). At days 7 and 10, the viabilities of co-cultured MCF-7 cells exposed to blank NCs were found to be $41 \pm 8\%$ and $74 \pm 10\%$, respectively, which is significantly higher than for calcitriol-NCs in similar conditions ($p < 0.01$).

V.2.4.5. Cytotoxic activity of calcitriol-NCs, and blank-NCs on MCF-7 cells in delayed co-cultures with THP-1 macrophages

Macrophages were exposed for 3 h to blank-NCs or calcitriol-NCs prior to co-culture establishment with MCF-7 cells in order to evaluate their implication in calcitriol activity through i) their use as reservoir to sustain the cytotoxic activity of calcitriol on MCF-7 cells and ii) their calcitriol-induced activation to kill cancer cells (Figure S4). At Day 4, similar limited effects were observed for blank-NCs and calcitriol-NCs with $53 \pm 3\%$ and $46 \pm 1\%$ of cell viability, respectively (Figure 47). For longer co-cultures, calcitriol-NCs were significantly more cytotoxic against MCF-7 cells than blank-NCs. The peak of MCF-7 cell mortality was reached at Day 7, with $12 \pm 4\%$ of cell viability after exposure to calcitriol-NCs ($p < 0.01$). At Day 10, blank-NCs lost their cytotoxic activity with 72% of cell viability due to the proliferation of MCF-7 cells during the experiment. Conversely, MCF-7 cells co-cultured with THP-1 macrophages and exposed to calcitriol-NCs presented a similar viability at Day 10 as compared to Day 7. This result suggests that the internalization of calcitriol-NCs by macrophages maintained the cytotoxicity against MCF-7 cells over at least 10 days. Interestingly, MCF-7 cells incubated with calcitriol-NCs-loaded macrophages were mainly in an early apoptosis state ($56 \pm 1\%$) rather than in late apoptosis ($23 \pm 3\%$), confirming the maintenance of the cytotoxic activity induced by encapsulated calcitriol and/or macrophages (Figure 47).

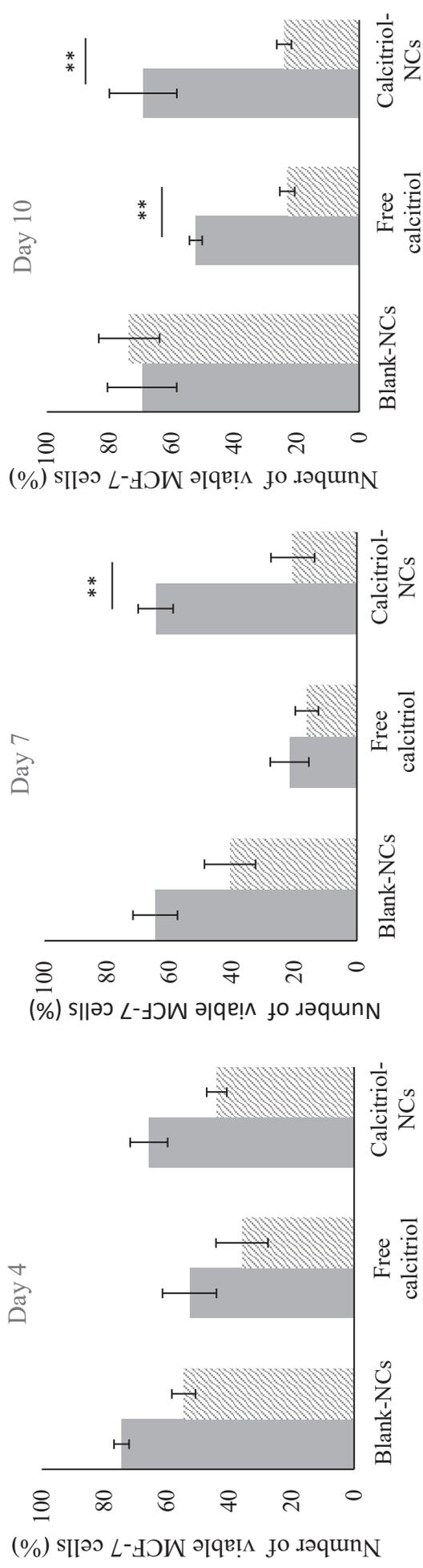


Figure 46. Influence of calcitriol on MCF-7 cell viability. MCF-7 were cultured alone (mono-cultures, filled bars) or in presence of THP-1 macrophages (co-cultures, hatched bars) and incubated 3 h with either free calcitriol (1 μ M), encapsulated calcitriol (1 μ M), or blank-NCs in similar dilution conditions than encapsulated calcitriol. Cell viability of MCF-7 was assessed at days 4, 7 and 10. The data are means of 3 independent experiments \pm SEM. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$ using Student's *t*-test.

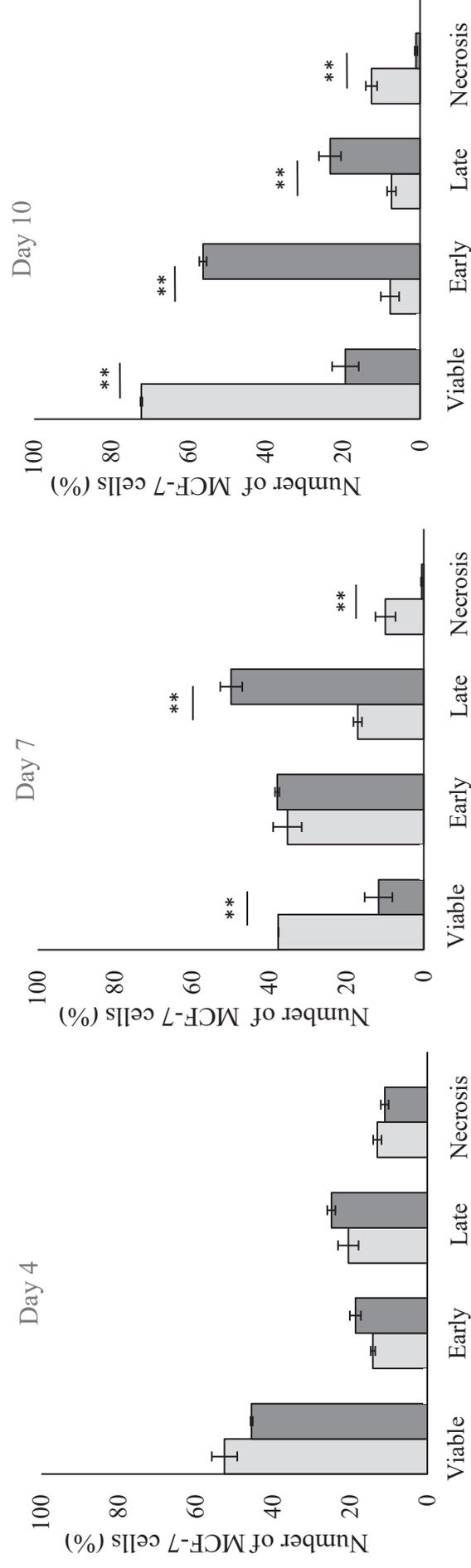


Figure 47. Cytotoxic activity of calcitriol on MCF-7 cells co-cultured with THP-1 macrophages. THP-1 macrophages were preincubated with either blank-NCs (light grey bars) or calcitriol-NCs (dark grey bars, 1 μ M) for 3 h. Blank-NCs were added in similar dilution conditions than encapsulated calcitriol. Cells were washed, and MCF-7 cells were added to the culture of THP-1 macrophages to establish co-cultures (cellular ratio of 1:1). MCF-7 cell viability was assessed at days 4, 7 and 10. The data are means of 3 independent experiments \pm SEM. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$ using Student's *t*-test.

V.2.5. Discussion

Tumor associated macrophages get more attention in the development of new antitumor therapeutic strategies due to their continual recruitment and implication in tumor progression and metastasis (Mantovani and Locati, 2013). Several therapeutic strategies were initiated on targeting TAMs through the use of nanomedicines regarding their depletion (Penn *et al.*, 2018; Sharma *et al.*, 2013), their repolarization (Cullis *et al.*, 2017; Sousa *et al.*, 2015) or their use as biological carriers (Pang *et al.*, 2016). There are emerging evidences showing that tumor infiltrated macrophages influence the delivery and the activity of nanomedicines, as shown for PEGylated liposomes (Lucas *et al.*, 2017) and PEGylated nanoparticles (Miller *et al.*, 2015a). Once at the tumor site, nanoparticles can be internalized by both cancer cells and TAMs, which are highly present and mobile in the tumor mass (Ngambenjawong *et al.*, 2017b; Vinogradov *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2017). These latter ones have also the ability to redistribute drugs to surrounding cancer cells (Miller *et al.*, 2015a). Therefore, several nanomedicine systems such as doxorubicin-loaded nanoparticles (Soma *et al.*, 2000), functionalized paclitaxel-loaded nanoparticles (Cao *et al.*, 2018), zoledronate-loaded liposomes (Sousa *et al.*, 2015) and PEGylated nanoparticles encapsulating a platinum (Pt) derivative (Miller *et al.*, 2015a) were evaluated *in vitro* and *in vivo* in the presence of macrophages. However, all mentioned studies focused on encapsulated anticancer agents that do not have a direct activity on macrophages and could induce macrophage mortality, limiting nanoparticle storage. Moreover, comparison between free versus encapsulated drug or mono versus co-culture models are not completely elucidated.

To this aim, we hereby evaluated the advantages of macrophages targeting using calcitriol loaded nanocapsules. Indeed, beside its antiproliferative and cytotoxic activities on cancer cells, calcitriol can influence and modulate TAMs functions towards an anti-tumor phenotype through various mechanisms (Bruns *et al.*, 2015; Cohen-Lahav *et al.*, 2006). Calcitriol exerts pro-differentiation activities on monocytes, and may activate TAMs leading to tumor cell phagocytosis, as demonstrated on the U937 monocytic cell line (Rigby *et al.*, 1984). In addition, Bruns *et al.* have shown that exposure of macrophages to calcitriol induced lymphoma cell mortality through the induction of the production of cathelicidin by macrophages (Bruns *et al.*, 2015).

In this work, we used a nanocapsule formulation that has been found to increase the antiproliferative activity of calcitriol on MCF-7 cells over 10 days through its sustained release (Nicolas *et al.*, 2018). The labelling of NCs with Nile red showed a rapid uptake of NCs by both MCF-7 cells and THP-1 macrophages after 3 h of incubation in monocultures (Figures 45a and b). This is in accordance with previous studies which report the uptake of polymeric nanoparticles by MCF-7 cells (Chawla and Amiji, 2003) and macrophages (Nicolette *et al.*, 2011). In addition, a higher increase in the mean fluorescence intensity was observed in THP-1 macrophages compared to MCF-7 cells indicating higher

NCs uptake (Figure 45). Moreover, NCs persisted inside macrophages in the co-culture model as the majority of the macrophages conserved a higher fluorescence intensity over 10 days. These results are in accordance with the ones obtained by Edagwa *et al.* who observed a retention of isoniazid-PLGA NPs in monocytes-derived macrophages over more than 10 days after a 24 h exposure period (Edagwa *et al.*, 2014). Conversely, MCF-7 cells were not able to retain NCs that long as the mean fluorescence intensity rapidly decreased for these cells (Figure 45), which could be explained by the proliferation of MCF-7 cells. In addition, THP-1 macrophages viability after exposure to 1 μ M of calcitriol was evaluated over 10 days and did not show any difference between the free and encapsulated forms of calcitriol regarding their cytotoxicity (>70% of viable cells, data not shown). These results demonstrate that viable macrophages are able to internalize and preserve calcitriol loaded-nanocapsules inside their cytoplasm over 10 days ensuring a sustained calcitriol activity in the tumor microenvironment. This statement is strongly encouraged in the case of calcitriol as macrophages do not express calcitriol degradation enzyme (24-hydroxylase) unlike MCF-7 cells that is known to express 24-hydroxylase after calcitriol exposure (García-Quiroz *et al.*, 2016; Townsend *et al.*, 2005).

Then, we established co-cultures of macrophages (generated from the THP-1 monocytic cell line) and cancer cells (MCF-7 cell line) to evaluate the cytotoxic activity of calcitriol-NCs on MCF-7 cells in comparison with MCF-7 mono-cultures. The implication of macrophages in the cytotoxic activity of calcitriol-NCs on MCF-7 was clearly observed at days 7 and 10 as MCF-7 cell viability decreased more than 40% in co-cultures compared to mono-cultures. This effect was limited at day 4, which can be explained by the time needed to release calcitriol inside macrophage and then to alter their activation or to be redistributed outside the cells (Figure 46). By combining these results with the fact that unexposed co-cultured MCF-7 cells presented a viability of 100% during the entire experiment, it was clear that macrophages contributed actively to MCF-7 cell mortality. Macrophages implication in free calcitriol activity was only observed after 10 days in co-culture where free calcitriol lost its activity in monoculture.

The cytotoxic activity of encapsulated calcitriol against MCF-7 cells did not decrease when macrophages were incubated with NCs prior to be co-cultured with MCF-7 cells, confirming the contribution of macrophages in MCF-7 cells-induced mortality. Indeed, $21 \pm 7\%$ of viable MCF-7 cells were counted at Day 7 after direct co-cultures, *i.e.* direct exposure of MCF-7 cells to calcitriol, and $12 \pm 4\%$ for the delayed co-cultures, *i.e.* when MCF-7 cells were not directly exposed to calcitriol. THP-1 macrophages exposure to blank-NCs also decreased the viability of MCF-7 cells, especially after 7 days, where it decreased from 60%, which is superior to the cytotoxicity observed in mono-cultivated MCF-7 cells. This could be explained by an activation of macrophages toward a proinflammatory state to phagocyte cancer cells, as shown by Nicolette *et al.* on J774 murine macrophages with polymeric microparticles (Nicolette *et al.*, 2011). These results are consistent with the fact that macrophages-

mediated cytotoxicity against cancer cells in tumors can be mainly attributed to phagocytosis (Bener *et al.*, 2016).

Considering the persistence of the THP-1 macrophages over the whole co-culture experiments, macrophage contribution in calcitriol loaded-NCs could be explained by two potential actions, *i.e.* their use as reservoirs and their activation against cancer cells (Vinogradov *et al.*, 2014).

Our results are consistent with previous studies which explained TAMs contribution by the simple storage of these NPs. Soma *et al.* demonstrated that macrophages were able to release doxorubicin from nanoparticles after their phagocytosis in co-cultures with ovarian sarcoma cells (Soma *et al.*, 2000). They observed a 5-fold increase in the IC₅₀ for both free doxorubicin and doxorubicin-loaded nanoparticles compared to cancer cells monocultures (Soma *et al.*, 2000). Similar investigations were performed by Miller *et al.* using a PEGylated nanoparticles loading a platinum-based pro-drug (Miller *et al.*, 2015b). The authors found that the depletion of TAMs *in vivo* in a fibrosarcoma xenograft mouse model decreased the therapeutic efficacy of the encapsulated drug. They hypothesized that macrophages were essential to store and redistribute slowly NPs to the surrounding cancer cells (Miller *et al.*, 2015b). Another approach is their activation or their reprogramming towards an antitumor phenotype due to their plasticity, which could be beneficial regarding tumor regression (Sousa *et al.*, 2015; Zanganeh *et al.*, 2016). This was notably investigated by Zanganeh *et al.* who showed that ferumoxytol nanoparticles caused macrophage polarization towards an anti-tumor phenotype, leading to tumor cell apoptosis and delaying mammary tumor growth *in vivo* (Zanganeh *et al.*, 2016). The contribution of TAMs in the activity of drug-loaded nanoparticles was also revealed on a pancreatic cancer mouse model treated with nAb-PTX (Cullis *et al.*, 2017). The nAb-PTX, induced macrophage immunostimulatory (M1) cytokine expression *in vitro* and increased the MHCII⁺/CD80⁺/CD86⁺ M1 macrophage population *in vivo* (Cullis *et al.*, 2017). In addition, nanocapsules were found to be internalized by undifferentiated THP-1 monocytes (data not shown). This could be interesting as circulating monocytes are permanently recruited to the tumor site to differentiate into TAMs and could thus contribute to calcitriol delivery to tumor cells (Lewis and Pollard, 2006).

Taken together, these results indicate that macrophages are essential to internalize NCs and release calcitriol from these NCs, thus improving the direct cytotoxic activity of calcitriol against cancer cells and initiating indirect action *via* macrophages. These findings demonstrate the advantages of calcitriol encapsulation with respect to its cytotoxic activity against breast cancer cells. Nanocapsules are internalized by MCF-7 cells and macrophages ensuring a direct effect by sustaining the anti-proliferative activity of calcitriol on MCF-7 cells and an indirect longer cytotoxic activity *via* the macrophages. Macrophages can be both activated to phagocyte cancer cells and used as reservoir of NCs for several days and slowly redistribute calcitriol to surrounding cancer cells.

V.2.6. Conclusion

The cytotoxic activity of calcitriol on breast cancer cells either in mono- or in co-culture with THP-1 macrophages was investigated. The ability of breast cancer cells and macrophages to internalize calcitriol-loaded nanocapsules was shown, resulting in a sustained activity of the drug. Finally, we highlighted that macrophages strongly reduced the viability of MCF-7 cells after exposure to calcitriol-NCs. We hypothesized that this could be attributed to their ability to store and redistribute slowly encapsulated calcitriol to surrounding cancer cells and/or their activation to phagocyte cancer cells by calcitriol. Accordingly, further *in vitro* studies should be performed to characterize the phenotype of the macrophages after exposure to calcitriol, and to evaluate the impact of the macrophage phenotype, *i.e.* immunosuppressive or immunostimulant, on encapsulated calcitriol activity. *In vivo* experiments in models with or without macrophages will allow to confirm our hypotheses and allow us to further translate this approach into the clinic.

Acknowledgments

This work received financial support of the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche for the PhD scholarship (France).

V.2.7. References

- Almouazen, E., Bourgeois, S., Jordheim, L.P., Fessi, H., Briançon, S., 2013. Nano-encapsulation of Vitamin D3 Active Metabolites for Application in Chemotherapy: Formulation Study and *in vitro* Evaluation. *Pharm. Res.* 30, 1137–1146.
- Baeke, F., Takiishi, T., Korf, H., Gysemans, C., Mathieu, C., 2010. Vitamin D: modulator of the immune system. *Curr. Opin. Pharmacol.* 10, 482–496.
- Bener, G., J. Félix, A., Sánchez de Diego, C., Pascual Fabregat, I., Ciudad, C.J., Noé, V., 2016. Silencing of CD47 and SIRP α by Polypurine reverse Hoogsteen hairpins to promote MCF-7 breast cancer cells death by PMA-differentiated THP-1 cells. *BMC Immunol.* 17, 32–43.
- Binnemars-Postma, K., Storm, G., Prakash, J., 2017. Nanomedicine Strategies to Target Tumor-Associated Macrophages. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 979-1005.
- Bruns, H., Buttner, M., Fabri, M., Mougiakakos, D., Bittenbring, J.T., Hoffmann, M.H., Beier, F., Pasemann, S., Jitschin, R., Hofmann, A.D., Neumann, F., Daniel, C., Maurberger, A., Kempkes, B., Amann, K., Mackensen, A., Gerbitz, A., 2015. Vitamin D-dependent induction of cathelicidin in human macrophages results in cytotoxicity against high-grade B cell lymphoma. *Sci. Transl. Med.* 7, 282ra47-282ra47.

- Cao, D., Liang, L., Xu, Y., Sun, J., Lei, M., Wang, M., Wei, Y., Sun, Z., 2018. Tumor associated macrophages and angiogenesis dual-recognizable nanoparticles for enhanced cancer chemotherapy. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 14, 651-659.
- Chawla, J.S., Amiji, M.M., 2003. Cellular uptake and concentrations of tamoxifen upon administration in poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles. *AAPS PharmSci* 5, 28–34.
- Cohen-Lahav, M., Shany, S., Tobvin, D., Chaimovitz, C., Douvdevani, A., 2006. Vitamin D decreases NF κ B activity by increasing I κ B α levels. *Nephrol. Dial. Transplant.* 21, 889–897.
- Cullis, J., Siolas, D., Avanzi, A., Barui, S., Maitra, A., Bar-Sagi, D., 2017. Macropinocytosis of Nab-paclitaxel Drives Macrophage Activation in Pancreatic Cancer. *Cancer Immunol. Res.* 5, 182–190.
- Deeb, K.K., Trump, D.L., Johnson, C.S., 2007. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat. Rev. Cancer* 7, 684–700.
- Edagwa, B.J., Guo, D., Puligujja, P., Chen, H., McMillan, J., Liu, X., Gendelman, H.E., Narayanasamy, P., 2014. Long-acting antituberculous therapeutic nanoparticles target macrophage endosomes. *FASEB J.* 28, 5071–5082.
- García-Quiroz, J., García-Becerra, R., Santos-Martínez, N., Avila, E., Larrea, F., Díaz, L., 2016. Calcitriol stimulates gene expression of cathelicidin antimicrobial peptide in breast cancer cells with different phenotype. *J. Biomed. Sci.* 23, 78–84.
- Gombart, A.F., 2009. The vitamin D–antimicrobial peptide pathway and its role in protection against infection. *Future Microbiol.* 4, 1151–1165.
- Krishnan, A.V., Swami, S., Feldman, D., 2012. The potential therapeutic benefits of vitamin D in the treatment of estrogen receptor positive breast cancer. *Steroids* 77, 1107–1112.
- Lewis, C.E., Pollard, J.W., 2006. Distinct Role of Macrophages in Different Tumor Microenvironments. *Cancer Res.* 66, 605–612.
- Lucas, A.T., White, T.F., Deal, A.M., Herity, L.B., Song, G., Santos, C.M., Zamboni, W.C., 2017. Profiling the relationship between tumor-associated macrophages and pharmacokinetics of liposomal agents in preclinical murine models. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 13, 471–482.
- Mantovani, A., Locati, M., 2013. Tumor-Associated Macrophages as a Paradigm of Macrophage Plasticity, Diversity, and Polarization: Lessons and Open Questions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33, 1478–1483.
- Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., Sica, A., 2002. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 23, 549–555.
- Miller, M.A., Zheng, Y.-R., Gadde, S., Pfirschke, C., Zope, H., Engblom, C., Kohler, R.H., Iwamoto, Y., Yang, K.S., Askevold, B., Kolishetti, N., Pittet, M., Lippard, S.J., Farokhzad, O.C., Weissleder, R., 2015a. Tumour-associated macrophages act as a slow-release reservoir of nano-therapeutic Pt(IV) pro-drug. *Nat. Commun.* 6, 8692-9004.
- Ngambenjawong, C., Gustafson, H.H., Pun, S.H., 2017. Progress in tumor-associated macrophage (TAM)-targeted therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev., Immuno-engineering: The Next Frontier in Therapeutics Delivery* 114, 206–221.

- Nicolas, S., Bolzinger, M.-A., Jordheim, L.P., Chevalier, Y., Fessi, H., Almouazen, E., 2018. Polymeric nanocapsules as drug carriers for sustained anticancer activity of calcitriol in breast cancer cells. *Int. J. Pharm.* 550, 170–179.
- Nicolete, R., Santos, D.F. dos, Faccioli, L.H., 2011. The uptake of PLGA micro or nanoparticles by macrophages provokes distinct *in vitro* inflammatory response. *Int. Immunopharmacol.* 11, 1557–1563.
- Pang, L., Qin, J., Han, L., Zhao, W., Liang, J., Xie, Z., Yang, P., Wang, J., 2016. Exploiting macrophages as targeted carrier to guide nanoparticles into glioma. *Oncotarget* 7, 37081–37091.
- Penn, C.A., Yang, K., Zong, H., Lim, J.-Y., Cole, A., Yang, D., Baker, J., Goonewardena, S.N., Buckanovich, R.J., 2018. Therapeutic Impact of Nanoparticle Therapy Targeting Tumor-Associated Macrophages. *Mol. Cancer Ther.* 17, 96–106.
- Rigby, W.F., Shen, L., Ball, E.D., Guyre, P.M., Fanger, M.W., 1984. Differentiation of a human monocytic cell line by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (calcitriol): a morphologic, phenotypic, and functional analysis. *Blood* 64, 1110–1115.
- Sharma, G., Karmali, P.P., Sugahara, K.N., Xie, H., Kotamraju, V.R., Ruoslahti, E., Smith, J.W., 2013. Depletion of tumor-associated macrophages with clodronate-loaded PLGA nanoparticles. *Nano LIFE* 3, 1343005-1343015.
- Soma, C.E., Dubernet, C., Barratt, G., Benita, S., Couvreur, P., 2000. Investigation of the role of macrophages on the cytotoxicity of doxorubicin and doxorubicin-loaded nanoparticles on M5076 cells *in vitro*. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 68, 283–289.
- Sousa, S., Auriola, S., Mönkkönen, J., Määttä, J., 2015. Liposome encapsulated zoledronate favours M1-like behaviour in murine macrophages cultured with soluble factors from breast cancer cells. *BMC Cancer* 15, 4–14.
- Szymczak, I., Pawliczak, R., 2016. The Active Metabolite of Vitamin D₃ as a Potential Immunomodulator. *Scand. J. Immunol.* 83, 83–91.
- Tanei, T., Leonard, F., Liu, X., Alexander, J.F., Saito, Y., Ferrari, M., Godin, B., Yokoi, K., 2016. Redirecting Transport of Nanoparticle Albumin-Bound Paclitaxel to Macrophages Enhances Therapeutic Efficacy against Liver Metastases. *Cancer Res.* 76, 429–439.
- Townsend, K., Evans, K.N., Campbell, M.J., Colston, K.W., Adams, J.S., Hewison, M., 2005. Biological actions of extra-renal 25-hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase and implications for chemoprevention and treatment. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 97, 103–109.
- Vinogradov, S., Warren, G., Wei, X., 2014. Macrophages associated with tumors as potential targets and therapeutic intermediates. *Nanomed.* 9, 695–707.
- Wang, Y., Lin, Y.-X., Qiao, S.-L., An, H.-W., Ma, Y., Qiao, Z.-Y., Rajapaksha, R.P.Y.J., Wang, H., 2017. Polymeric nanoparticles promote macrophage reversal from M2 to M1 phenotypes in the tumor microenvironment. *Biomaterials* 112, 153–163.
- Ward, R., Sims, A.H., Lee, A., Lo, C., Wynne, L., Yusuf, H., Gregson, H., Lisanti, M.P., Sotgia, F., Landberg, G., Lamb, R., 2015. Monocytes and macrophages, implications for breast cancer migration and stem cell-like activity and treatment. *Oncotarget* 6, 14687–14699.

Weigert, A., Tzieply, N., von Knethen, A., Johann, A.M., Schmidt, H., Geisslinger, G., Brune, B., 2007. Tumor Cell Apoptosis Polarizes Macrophages Role of Sphingosine-1-Phosphate. *Mol. Biol. Cell* 18, 3810–3819.

Zanganeh, S., Hutter, G., Spitler, R., Lenkov, O., Mahmoudi, M., Shaw, A., Pajarinen, J.S., Nejadnik, H., Goodman, S., Moseley, M., Coussens, L.M., Daldrup-Link, H.E., 2016. Iron oxide nanoparticles inhibit tumour growth by inducing pro-inflammatory macrophage polarization in tumour tissues. *Nat. Nanotechnol.* 11, 986–994.

Zhang, Y., Guo, Q., Zhang, Z., Bai, N., Liu, Z., Xiong, M., Wei, Y., Xiang, R., Tan, X., 2014. VDRStatus Arbitrates the Prometastatic Effects of Tumor-Associated Macrophages. *Mol. Cancer Res.* 12, 1181–1191.

Zhou, N., Zhang, Y., Zhang, X., Lei, Z., Hu, R., Li, H., Mao, Y., Wang, X., Irwin, D., Niu, G., Tan, H., 2015. Exposure of Tumor-Associated Macrophages to Apoptotic MCF-7 Cells Promotes Breast Cancer Growth and Metastasis. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 11966–11982.

Chapitre VI : Efficacité anti-cancéreuse de nanocapsules encapsulant le calcitriol sur des cellules de leucémie myéloïde aigüe *in vitro*

VI.1. Introduction

Outre leur activité anti-cancéreuse vis-à-vis des tumeurs solides, le calcitriol et ses analogues sont également décrits pour leur efficacité dans le traitement de la leucémie. Cette activité est modulée par de multiples mécanismes d'action vis-à-vis des cellules leucémiques, induits par la liaison du calcitriol à son récepteur nucléaire (Gocek *et al.*, 2012). Ils ont été élucidés *in vitro* et confirmés *in vivo* au cours d'études pré-cliniques et incluent des activités pro-différenciative (Abe *et al.*, 1981; Mangelsdorf *et al.*, 1984; Koeffler *et al.*, 1985; Gocek *et al.*, 2012), antiproliférative (McCarthy *et al.*, 1983; Zhou *et al.*, 1990; Trynda *et al.*, 2015), et cytotoxique (Pepper, 2003). Deux études cliniques basées sur le traitement de patients atteints de leucémie avec le calcitriol en combinaison avec la cytarabine, ont par ailleurs été réalisées et ont démontré des résultats prometteurs quant à la durée de rémission observée chez les patients traités (Petrini *et al.*, 1991; Slapak *et al.*, 1992). Néanmoins, elles n'ont pas permis de définir clairement l'intérêt thérapeutique du calcitriol et ont mis en évidence des hypercalcémies.

Les macrophages sont profondément impliqués dans le développement de la leucémie et sont alors connus sous le terme de « macrophages associés aux leucémies » (LAMs). Une corrélation positive a d'ailleurs été établie entre la densité en LAMs immunosuppresseurs et un mauvais pronostic vital (Yang *et al.*, 2018). En effet, les LAMs, de la même manière que les TAMs, tendent à promouvoir le développement de la leucémie, en particulier au niveau de la rate, faisant d'eux des cibles thérapeutiques d'intérêt (Yang *et al.*, 2018). Chen *et al.* ont démontré sur un modèle murin de leucémie lymphoblastique aigüe que la déplétion des LAMs par le biais de liposomes encapsulant le clodronate n'avait qu'un faible impact sur la survie des souris (Chen *et al.*, 2015). Ces résultats renforcent l'intérêt thérapeutique du calcitriol pour activer les LAMs à phagocyter les cellules leucémiques et/ou les repolariser vers un phénotype immunostimulant. Yang *et al.* ont d'ailleurs démontré que l'administration intrapéritonéale de poly(I:C) (10 mg/Kg), connue pour ses actions immunomodulatrices (chapitre III paragraphe III.3.4.2.), à un modèle murin de leucémie myéloïde aigüe permettait d'induire l'expression de gènes caractéristiques des macrophages anti-tumoraux (CXCL11, IL-6, IL-12 β , iNOS et TNF- α) et de diminuer celle des macrophages pro-tumoraux (Yang *et al.*,

2018). Les mêmes auteurs ont démontré que le traitement des souris avec la poly(I:P) permettait de prolonger leur survie par rapport aux souris non traitées, suggérant l'intérêt de la reprogrammation des macrophages dans le traitement des leucémies (Yang *et al.*, 2018).

Le traitement actuel des leucémies repose sur la chimiothérapie et la radiothérapie, qui ne sont pas sélectifs, sont à l'origine d'effets secondaires et d'une résistance des patients à l'efficacité du traitement (Vinhas *et al.*, 2017). Les nanomédecines représentent donc une alternative intéressante à ces thérapies. L'utilisation de nanoparticules pour le traitement des cancers hématologiques, notamment les leucémies, repose sur une approche différente de celle envisagée pour le ciblage des tumeurs solides puisque les cellules néoplasiques sont dans ce cas disséminées dans la circulation sanguine (Vinhas *et al.*, 2017). Cependant, les nanoparticules, toutes générations confondues, sont d'autant plus intéressantes dans ce cas puisque leur administration intraveineuse permet une internalisation à la fois par les cellules leucémiques et par les monocytes et macrophages circulants (Vinhas *et al.*, 2017).

Nous avons donc souhaité évaluer les activités antiproliférative et cytotoxique des nanocapsules développées au cours de nos travaux antérieurs vis-à-vis d'un modèle de leucémie en utilisant des protocoles *in vitro* similaires (Nicolas *et al.*, 2018). Pour ce faire, la lignée cellulaire de leucémie myéloïde aigüe MV4-11 a été sélectionnée pour sa sensibilité au calcitriol. Le choix de cette lignée cellulaire est également judicieux pour les études *in vivo* puisque le modèle de xéno greffe tumorale MV4-11 est hautement infiltré par les macrophages de phénotype pro-tumoral qui présentent un rôle participatif vis-à-vis de la croissance tumorale (Al-Matary *et al.*, 2016).

Dans un second temps, l'implication des macrophages dans l'activité cytotoxique du calcitriol vis-à-vis des cellules MV4-11 a été évaluée par le biais de co-cultures des deux types cellulaires.

Enfin, dans le but d'évaluer l'intérêt d'une combinaison thérapeutique du calcitriol avec un agent utilisé en chimiothérapie, l'interaction du calcitriol avec la cytarabine vis-à-vis des cellules MV4-11 a été évaluée. Pour ce faire, l'indice de combinaison entre la cytarabine et le calcitriol, définissant le mécanisme régissant leur interaction, à savoir un effet antagoniste, additif, ou synergique, a donc été calculé à la suite d'essais MTT visant à définir l'IC₅₀ des deux actifs seuls ou en combinaison. La cytarabine a été sélectionnée pour cette étude pour diverses raisons. D'une part, c'est une molécule de choix pour le traitement des leucémies qui est commercialisée pour cette utilisation (Cytosar®), mais elle présente quelques limites. En effet, il existe des résistances à cet actif responsables d'un échec du traitement des leucémie myéloïdes aigües notamment (Xie *et al.*, 2015, 2010). De plus, la cytarabine requiert un transporteur (hENT1, human equilibrative nucleoside transporter 1), qui est saturable, et elle est rapidement inactivée par la cytidine désaminase à la suite de son internalisation cellulaire (Rein *et* Rizzieri, 2014). Par ailleurs, l'activité anti-cancéreuse de la cytarabine a été

démontrée *in vitro* et *in vivo* sur le modèle tumoral MV4-11 (Mertz *et al.*, 2011; Xie *et al.*, 2015). Ainsi, le traitement de souris nude immunodéprimées porteuses de xénogreffe MV4-11 avec 100 mg/kg/j (J0 à J8) puis 75 mg/kg/j 5 jours/7 a permis une réduction de la croissance tumorale de 33% après 30 jours par rapport aux souris non traitées (Mertz *et al.*, 2011). Enfin, l'interaction de cette dernière avec le calcitriol a été évaluée dans plusieurs études, *in vitro* comme *in vivo*, dans lesquelles une synergie entre les deux molécules a été reportée (Makishima *et al.*, 1998; Slapak *et al.*, 1992; Studzinski *et al.*, 1986; Yamada *et al.*, 2006).

VI.2. Matériel et méthodes

VI.2.1. Préparation et caractérisation des nanocapsules encapsulant le calcitriol

Les nanocapsules sont obtenues par la méthode de nanopréciipitation et caractérisées comme décrit dans le chapitre IV, paragraphe IV.2.3.3. La formule a été sélectionnée à l'issue de nos précédents travaux et est composée d'acide poly(D,L)lactique, formant la coque polymère, et d'un mélange de triglycérides à chaînes moyennes PEGylés (caprylic/capric triglycerides PEG-4 esters, Labrafac Hydro® WL219) ou non (caprylic/capric/succinic triglycerides, Miglyol 829®) en quantités équivalentes, formant le cœur huileux des NCs (ratio polymère:huile 1:2) (Nicolas *et al.*, 2018).

VI.2.2. Culture cellulaire

Les cellules MV4-11 sont cultivées en suspension à 37 °C en présence de 5% de CO₂ dans du milieu Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI 1640) supplémenté avec du serum de veau foetal (SVF, 10%), de la pénicilline (100 U·mL⁻¹) et de la streptomycine (100 µg·mL⁻¹) (RPMI complet).

VI.2.3. Différenciation des monocytes THP-1 en macrophages

Afin de différencier les monocytes THP-1 en macrophages, une concentration de 0,5 µM de 12-myristate 13-acétate de phorbol (PMA, Promega) est ajoutée à une suspension cellulaire contenant 1 million de monocytes THP-1 pendant 7 heures à 37 °C en présence de 5% de CO₂. Après ce délai, les cellules THP-1 sont culottées par centrifugation (320 g, 3 minutes) et rincées deux fois avec 5 mL de PBS. Ensuite, les macrophages THP-1, qui sont adhérents, sont ensemencés dans des flasques durant 24 heures pour permettre leur adhésion avant toute expérimentation. Ils sont maintenus en suspension à 37 °C en présence de 5% de CO₂ dans du milieu Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI 1640) supplémenté avec du serum de veau foetal (SVF, 10%), de la pénicilline (100 U·mL⁻¹) et de la streptomycine (100 µg·mL⁻¹) ainsi qu'avec du 2-mercaptoéthanol (Sigma-Aldrich, France) à une concentration finale de 0,05 mM.

VI.2.4. Evaluation de l'activité antiproliférative du calcitriol sur les cellules MV4-11

Afin d'évaluer l'activité antiproliférative du calcitriol, les cellules MV4-11 sontensemencées dans des plaques 96 puits à fond rond à une densité de 5000 cellules par puits. A J0, les cellules sont exposées à différentes concentrations en calcitriol libre ou encapsulé à des concentrations variables (1 – 1000 nM). Après 4 jours d'incubation avec le calcitriol (J4), les cellules sont rincées avec du PBS et du milieu de culture cellulaire complet est ajouté dans les puits. Les cellules non exposées font office de contrôle. Le nombre de cellules métaboliquement actives, et donc considérées comme vivantes, est estimé par un essai MTT après 4, 7 ou 10 jours avec une durée minimale d'exposition au calcitriol de 4 jours. Le milieu de culture cellulaire (sans calcitriol) est renouvelé après 4 et 7 jours de culture de manière à maintenir un milieu nutritif complet au cours de l'expérimentation. L'essai MTT repose sur l'utilisation du bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium (couleur jaune) C'est un essai colorimétrique reposant sur la réduction de l'anneau de tétrazolium du réactif par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives en formazan, de couleur violette. Pour ce faire, un volume de 20 µL de solution MTT (5 mg·mL⁻¹) est ajoutée à chaque puits, et les plaques 96 puits sont incubées à l'obscurité pendant 2 heures à 37 °C. Une fois le temps écoulé, le milieu de chaque puits est éliminé et un volume de 100 µL d'une solution composée d'acide chlorhydrique (HCl)/isopropanol/eau (1/90/9, v/v/v) est ajoutée dans les puits pour extraire le formazan. Après un temps d'incubation de 15 minutes, les densités optiques (DO) sont mesurées à 540 nm pour l'évaluation de l'intensité de la couleur violette, et à 690 nm pour soustraire le blanc avec un spectrophotomètre multipuits (Multiskan Ascent, Labsystems SA, Cergy-pontoise, France). Les résultats sont exprimés en pourcentages du contrôle (cellules non exposées).

VI.2.5. Evaluation de l'activité cytotoxique du calcitriol sur les cellules MV4-11

Les protocoles ont été adaptés à partir de ceux décrits dans le chapitre V, paragraphe V.2.3.5.

VI.2.5.1. Activité du calcitriol sur des mono-cultures de cellules MV4-11

Les cellules MV4-11 sontensemencées dans des flasques T25 à des concentrations variables en fonction de la durée de l'expérimentation pour maintenir les cellules dans des conditions viables. Ainsi, les concentrations sont de 10⁶ cellules par flasque pour une durée d'expérimentation de 4 jours, et de 10⁵ cellules par flasque pour une durée d'expérimentation de 7 ou 10 jours. Les cellules MV4-11 sont ensuite exposées à 1 µM de calcitriol libre ou encapsulé pendant 3 heures. Analogiquement, les cellules sont aussi exposées aux nanocapsules blanches dans des conditions de dilution similaires. Après ce temps, le milieu cellulaire des flasques contenant les MV4-11 est transféré dans des flacons et rincé 2 fois avec 5 mL de PBS par le biais de centrifugations (320 g, 3 minutes). Les cellules sont

ensuite remises en suspension dans du RPMI complet frais dépourvu de calcitriol dans les flasques initiales. Après 4, 7, ou 10 jours de culture, la viabilité cellulaire est évaluée commé décrit dans la section 6.2.5.4.

VI.2.5.2. Activité du calcitriol sur des cellules MV4-11 cultivées avec des macrophages THP-1 après exposition directe à l'actif

Afin d'établir les co-cultures, les cellules MV4-11 sont ajoutées aux flasques T25 contenant les macrophages THP-1 adhérents en quantités équivalentes afin d'obtenir un ratio cellulaire initial de 1 :1. Les concentrations cellulaires sont adaptées de la même manière que pour les mono-cultures de cellules MV4-11 (section 6.2.5.1). Une concentration de 1 μ M de calcitriol libre ou encapsulé est alors ajoutée dans les flasques contenant les co-cultures pendant 3 heures. Analogiquement, les cellules sont aussi exposées aux nanocapsules blanches dans des conditions de dilution similaires. Après ce temps, le milieu cellulaire des flasques (contenant les cellules en suspension, donc les MV4-11) est transféré dans des flacons, et rincé 2 fois avec 5 mL de PBS par le biais de centrifugations (320 g, 3 minutes). La flasque, contenant les cellules adhérentes (macrophages THP-1) est également rincée à deux reprises avec du PBS. Les cellules sont ensuite remises en culture dans les flasques initiales dans du RPMI complet frais dépourvu de calcitriol. Après 4, 7, ou 10 jours de culture, la viabilité cellulaire est évaluée commé décrit dans la section 6.2.5.4.

VI.2.5.3. Activité du calcitriol sur des cellules MV4-11 cultivées avec des macrophages THP-1 pré-incubés avec l'actif

Afin d'évaluer la capacité de stockage des NCs par les macrophages et/ou l'impact de leur activation sur la viabilité cellulaire des MV4-11, les macrophages THP-1 sont pré-incubés avec 1 μ M de calcitriol libre ou encapsulé pendant 3 heures. Les cellules sont aussi exposées aux nanocapsules blanches dans des conditions de dilution similaires. Les flasques sont ensuite rincées deux fois avec du PBS puis les macrophages THP-1 sont remis en culture dans les flasques initiales dans du RPMI complet frais dépourvu de calcitriol. Les cellules MV4-11 sont ensuite ajoutées aux cultures de macrophages THP-1 de manière à obtenir un ratio cellulaire de 1 :1. Après 4, 7, ou 10 jours de culture, la viabilité cellulaire est évaluée commé décrit dans la section 6.2.5.4.

VI.2.5.4. Evaluation de la viabilité cellulaire des cellules MV4-11

Après 4, 7 ou 10 jours de culture cellulaire, les cellules MV4-11 sont prélevées, rincées avec du PBS puis marquées avec de l'annexine V et de l'iodure de propidium (IP) (Roche) selon les recommandations du fournisseur. Les cellules sont ensuite analysées par cytométrie en flux (Becton Dickinson FACS LSRII, San José, USA). Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules viables (annexineV⁻/IP⁻), en apoptose précoce (annexine V⁺/IP⁻), en apoptose tardive (annexine⁺/IP⁺), ou nécrotiques (annexine⁻/IP⁺) par rapport à la population totale. Un total de 10 000 cellules est compté pour chaque échantillon.

VI.2.6. Evaluation de l'interaction entre le calcitriol et la cytarabine *in vitro*

Afin de déterminer les concentrations inhibant la prolifération de 50% des cellules (IC₅₀) de chaque molécule, le nombre de cellules viables a été évalué par un essai MTT comme décrit dans la section 6.2.4.1. Ainsi, les cellules MV4-11 ont étéensemencées dans des plaques 96 puits à fond rond à une densité de 10 000 cellules par puits pour une durée d'expérimentation de 3 jours et de 3000 cellules par puits pour une durée d'expérimentation de 7 jours. Immédiatement après ensemencement, les cellules ont été incubées pendant 3 ou 7 jours avec des concentrations variables en calcitriol (3·10⁻⁸-10⁻¹ μM) et/ou en cytarabine (3·10⁻⁶-10¹ μM). Après ces périodes, le nombre de cellules vivantes a été évalué. Les IC₅₀ du calcitriol et de la cytarabine ont par la suite été estimées à l'aide du logiciel Compusyn (ComboSyn, Inc., USA) permettant notamment d'évaluer leur activité antiproliférative, seules ou combinées (mélange défini par le logiciel à partir des IC₅₀ définies à l'issue des essais isolés), dans une gamme de concentrations incluant leur concentration IC₅₀. La saisie des DO obtenues à l'issue du test MTT dans le logiciel permet de calculer l'indice de combinaison de mortalité des cellules (IC), qui permet de déterminer s'il existe un effet antagoniste, additif ou synergique entre les composés :

- IC ≤ 0,9 = Synergie
- 0,9 < IC < 1,1 = Additivité
- IC ≥ 1,1 = Antagonisme

L'IC est calculé comme suit :

$$IC = [(D)_1/(Dx)_1] + [(D)_2/(Dx)_2]$$

avec (Dx)₁ et (Dx)₂ les IC₅₀ respectives de la cytarabine et du calcitriol lorsqu'ils sont ajoutés individuellement aux cultures cellulaires, et (D)₁ et (D)₂ leurs IC₅₀ quand il sont combinés.

VI.2.7. Analyses statistiques

Les résultats ont été comparés par le biais du test de Student, avec une analyse préalable de la variance pour déterminer la parité des données. Une différence significative entre des données est admise pour $p < 0,05$. Les résultats sont présentés en tant que moyenne \pm écart-type à la moyenne (SEM).

VI.3. Résultats et discussion

VI.3.1. Activité antiproliférative du calcitriol sur les cellules MV4-11

La viabilité des cellules MV4-11 suite à l'exposition au calcitriol pendant 4 jours a été immédiatement évaluée (J4), et évaluée à J7 et J10 (Figure 48). Des viabilités cellulaires de $47 \pm 2\%$ à J4 (Figure 48a) et d'environ 10% à J7 et J10 (Figure 48b-c) ont été observées pour la concentration maximale en calcitriol libre testée. De plus, l'augmentation de la concentration en calcitriol est corrélée avec une activité antiproliférative plus importante de ce dernier. Ainsi, à J7, l'exposition des cellules MV4-11 à 10^{-3} μM de calcitriol est à l'origine d'une réduction de la prolifération cellulaire d'environ 25% contre 90% lors d'une exposition à 1 μM de calcitriol (Figure 48b). D'autre part, l'encapsulation du calcitriol dans les nanocapsules maintient son activité antiproliférative sur 10 jours (Figure 48).

En accord avec la littérature, ces travaux ont permis de mettre en évidence l'activité antiproliférative du calcitriol sur les cellules de leucémie myéloïde aigüe (MV4-11) (McCarthy *et al.*, 1983; Zhou *et al.*, 1990; Trynda *et al.*, 2015). La corrélation positive entre la concentration en calcitriol et le temps d'incubation sur l'activité de ce dernier sont similaires à ceux observés lors de précédents travaux sur les cellules d'adénocarcinome mammaire humain (MCF-7) (Nicolas *et al.*, 2018). En revanche, l'impact de la concentration intracellulaire du calcitriol sur son activité, et donc l'intérêt de son encapsulation et du profil de libération prolongé de l'actif n'a pas été mis en évidence ici. Cela peut s'expliquer par la durée d'exposition longue (> 96 heures) des cellules au calcitriol. En effet, nous avons également démontré un simple maintien de l'activité du calcitriol après encapsulation sur les cellules MCF-7 pour un temps d'exposition de 96 heures (Nicolas *et al.*, 2018). Cela peut s'expliquer par la concentration intracellulaire en calcitriol, qui est identique entre les deux formes puisque le protocole établi dans cette étude repose sur une exposition longue au calcitriol. Un temps d'exposition réduit à 24 heures a en revanche permis d'observer une perte de l'activité du calcitriol libre sur 10 jours alors qu'elle n'avait que peu d'impact sur l'activité antiproliférative de sa forme encapsulée. Bien qu'aucune étude ne rapporte ce fait sur les cellules MV4-11, il semblerait que cela soit commun à diverses lignées cellulaires et divers actifs (Chouvet *et al.*, 1986; Rajh *et al.*, 2016). La réduction du temps d'exposition des cellules MV4-11 au calcitriol, plus représentatif de la réalité, serait donc nécessaire pour considérer l'activité de l'actif internalisé par les cellules.

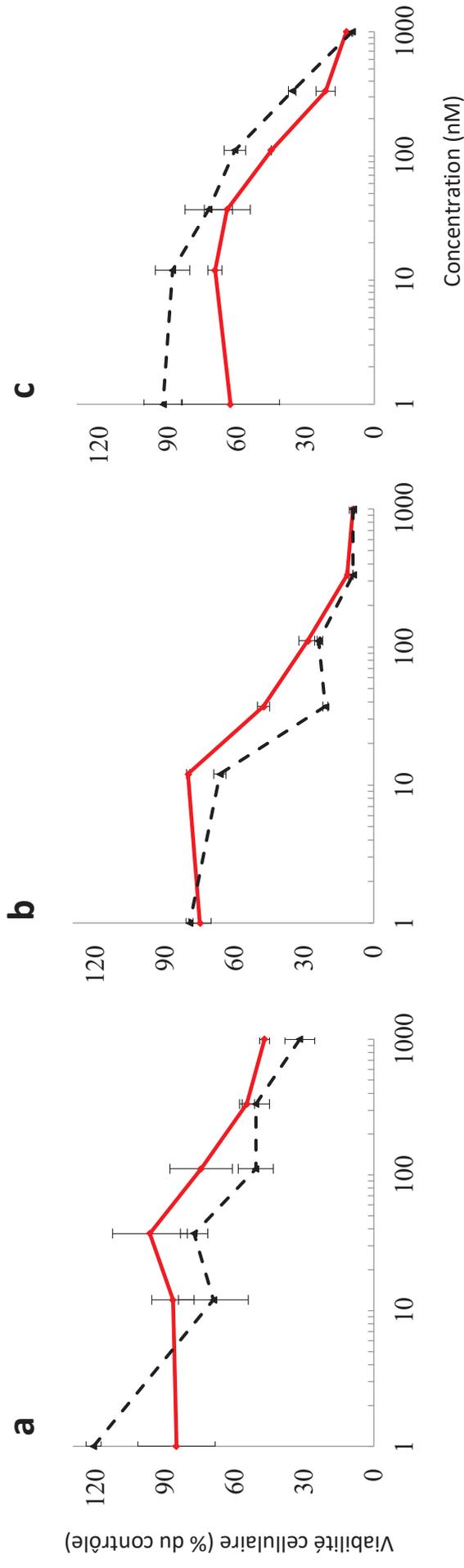


Figure 48. Activité antiproliférative du calcitriol libre (rouge) ou encapsulé (noir). Après (a) 4 jours, (b) 7 jours ou (c) 10 jours d'exposition des cellules MV4-11 au calcitriol, la viabilité cellulaire a été évaluée par un essai MTT. Les données sont représentées en tant que pourcentage de cellules par rapport aux cellules non exposées dont la viabilité est considérée à 100% (moyenne \pm SEM, n=2).

VI.3.2. Activité cytotoxique du calcitriol sur les cellules MV4-11 en mono- et en co-cultures avec des macrophages THP-1

L'activité cytotoxique du calcitriol sur les cellules MV4-11 a été évaluée en mono- et co-cultures avec des macrophages THP-1 après une exposition de 3 heures (Figure 49). Les cellules non exposées présentent environ 100% de viabilité cellulaire sur toute la période d'expérimentation (non montré). En mono-cultures, le calcitriol exerce une activité cytotoxique envers les cellules MV4-11 puisque des viabilités de $21 \pm 8\%$, $15 \pm 1\%$ et $22 \pm 5\%$ ont été respectivement observées à J4, J7, et J10 après exposition au calcitriol libre et $27 \pm 5\%$, $24 \pm 5\%$, $18 \pm 3\%$ pour le calcitriol encapsulé. Ces résultats indiquent que l'encapsulation du calcitriol maintient son activité cytotoxique pendant 10 jours au même titre que son activité antiproliférative. Par ailleurs, dans ces conditions, les NCs blanches ont démontré une faible toxicité puisque plus de 80% de viabilité cellulaire est observée pendant les 10 jours d'expérimentation. L'activité cytotoxique du calcitriol envers les cellules MV4-11 est donc en accord avec les observations de Pepper (2003).

Lorsque les cellules MV4-11 sont co-cultivées avec les macrophages THP-1 et que ces deux types cellulaires sont exposés au calcitriol, la viabilité cellulaire des MV4-11 est similaire à celle observée en mono-cultures (Figure 49). En revanche, à l'inverse des mono-cultures de cellules MV4-11, l'exposition des cellules aux NCs blanches est à l'origine d'une réduction importante de la viabilité des cellules MV4-11 en co-cultures avec par exemple moins de 20% de viabilité observée à J7 (Figure 49). En co-cultures, les NCs blanches sont donc à l'origine d'une mortalité cellulaire similaire à celle observée à la suite de l'exposition des cellules au calcitriol dans les mêmes conditions.

Lorsque les macrophages THP-1 sont pré-incubés avec les NCs chargées avec du calcitriol avant d'être co-cultivés avec les cellules MV4-11, des effets cytotoxiques similaires à ceux obtenus en co-cultures directes, lors desquelles les 2 types cellulaires ont été en contact avec les composés, sont démontrés pendant 10 jours (Figure 49 et Figure 50). Ainsi, à J4, des viabilités identiques sont observées (14%), à J7 $21 \pm 5\%$ (co-cultures directes) et $18 \pm 1\%$ (pré-incubation des macrophages) et à J10 $26 \pm 7\%$ (co-cultures directes) et $23 \pm 1\%$ (pré-incubation des macrophages) de viabilité cellulaire.

En revanche, ce maintien de l'activité entre les co-cultures directes et les co-cultures établies après exposition des macrophages uniquement aux NCs n'est visible que pendant 4 jours pour les NCs blanches, avec des viabilités de $12 \pm 1\%$ (co-culture directe, Figure 49a) et $16 \pm 7\%$ (pré-incubation des macrophages THP-1, puis co-culture, Figure 50a). Au-delà de 4 jours, la viabilité des cellules MV4-11 augmente de manière croissante en fonction du temps après exposition aux NCs blanches jusqu'à atteindre $54 \pm 15\%$ de viabilité à J10 (Figure 50c).

L'augmentation de la proportion de cellules en apoptose précoce à J7 et J10 indique une activité maintenue du calcitriol encapsulé pendant au moins 10 jours (Figure 50). Couplées avec les résultats précédents, ces observations laissent à supposer que les NCs agissent de manière intrinsèque sur les macrophages et que cette action s'additionne à l'action cytotoxique du calcitriol. En particulier, les NCs blanches pourraient activer les macrophages phagocytant alors les cellules MV4-1 et/ou polariser ces derniers vers un phénotype anti-tumoral contribuant à la mort cellulaire (Nicolette *et al.*, 2011). Cela va dans le sens des observations de Nicolette *et al.* qui ont démontré une production de protéines pro-inflammatoires par des macrophages murins J774 suite à leur exposition à des microparticules polymères de PLGA blanches (5-7 μm), bien qu'ils n'aient pas démontré cet impact avec des particules de taille nanométrique (Nicolette *et al.*, 2011). Par ailleurs, la perte d'activité des NCs blanches lorsque seuls les macrophages y sont exposés peut s'expliquer par une co-internalisation cellulaire de ces dernières en présence des cellules MV4-11, potentialisant alors leur action.

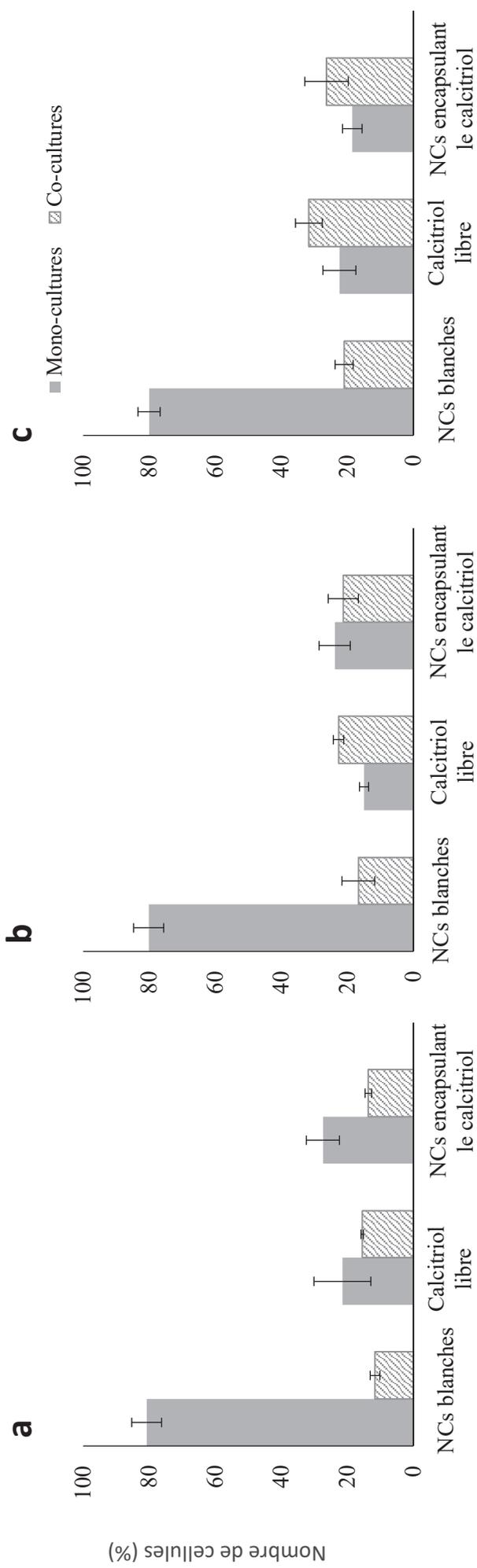


Figure 49. Activité cytotoxique du calcitriol sur les cellules MV4-11. Les cellules MV4-11 ont été cultivées seules (mono-cultures) ou en présence de macrophages (co-cultures) et incubées 3 heures avec du calcitriol libre ou encapsulé (1000 nM), ou avec des nanocapsules blanches dans des conditions de dilutions similaires à celles des nanocapsules encapsulant le calcitriol. La viabilité cellulaire des MC4-11 a été évaluée **(a)** 4 jours, **(b)** 7 jours ou **(c)** 10 jours après incubation avec l'actif. Les données sont représentées en tant que pourcentage de cellules par rapport à la population totale (moyenne \pm SEM, n=3).

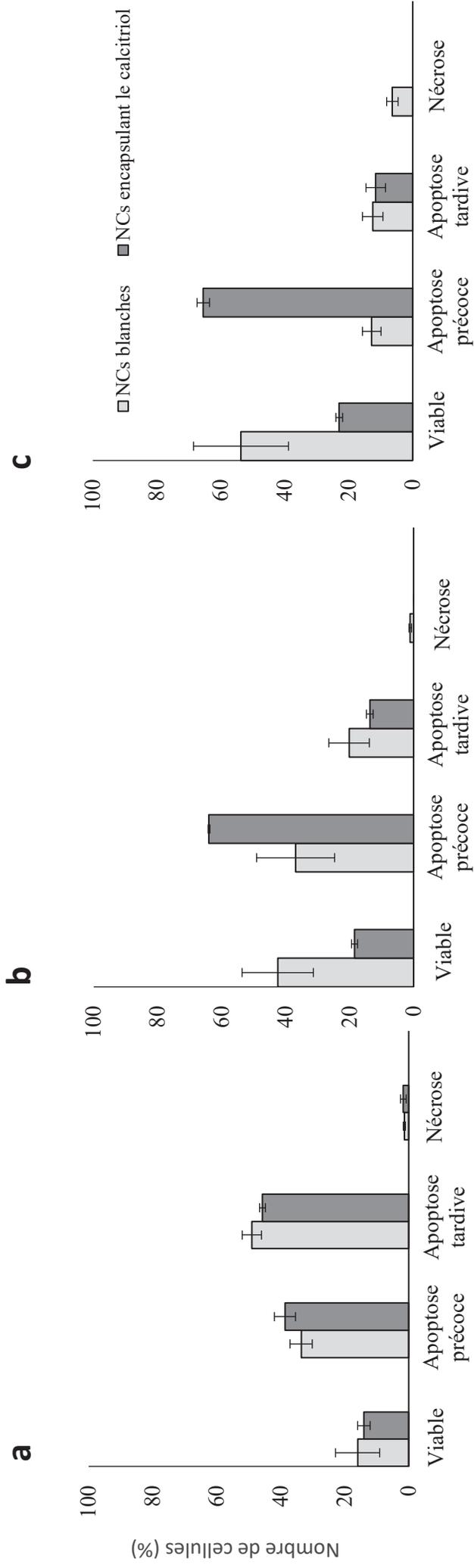


Figure 50. Activité cytotoxique du calcitriol sur les cellules MV4-11. Les macrophages THP-1 ont été pré-incubés 3 heures avec du calcitriol encapsulé (1000 nM) ou avec des nanocapsules blanches dans des conditions de dilutions similaires. Après ce temps d'incubation, les cellules ont été rincées et les cellules MV4-11 ont été ajoutées aux flasques de manière à obtenir un ratio cellulaire de 1 : 1. La viabilité cellulaire des MC4-11 a été évaluée (a) 4 jours, (b) 7 jours ou (c) 10 jours après incubation avec l'actif. Les données sont représentées en tant que pourcentage de cellules par rapport à la population totale (moyenne \pm SEM, n=3).

VI.3.3. Evaluation de l'intérêt de la combinaison thérapeutique du calcitriol et de la cytarabine *in vitro*

Afin d'évaluer l'intérêt d'une association thérapeutique du calcitriol avec la cytarabine, l'action antiproliférative propre à ces derniers a dans un premier temps été évaluée (Figure 51). Pour ce faire, les cellules MV4-11 ont été exposées durant 7 jours au calcitriol ($3 \cdot 10^{-8}$ - 10^{-1} μ M) ou à la cytarabine ($3 \cdot 10^{-6}$ - 10^1 μ M). La cytarabine possède une activité antiproliférative concentration dépendante sur les cellules MV4-11 à partir d'une concentration de 100 nM. Dans les mêmes conditions, les cellules MV4-11 sont d'autant plus sensibles à l'activité antiproliférative du calcitriol puisqu'il est actif à partir de 10^{-6} μ M (Figure 51).

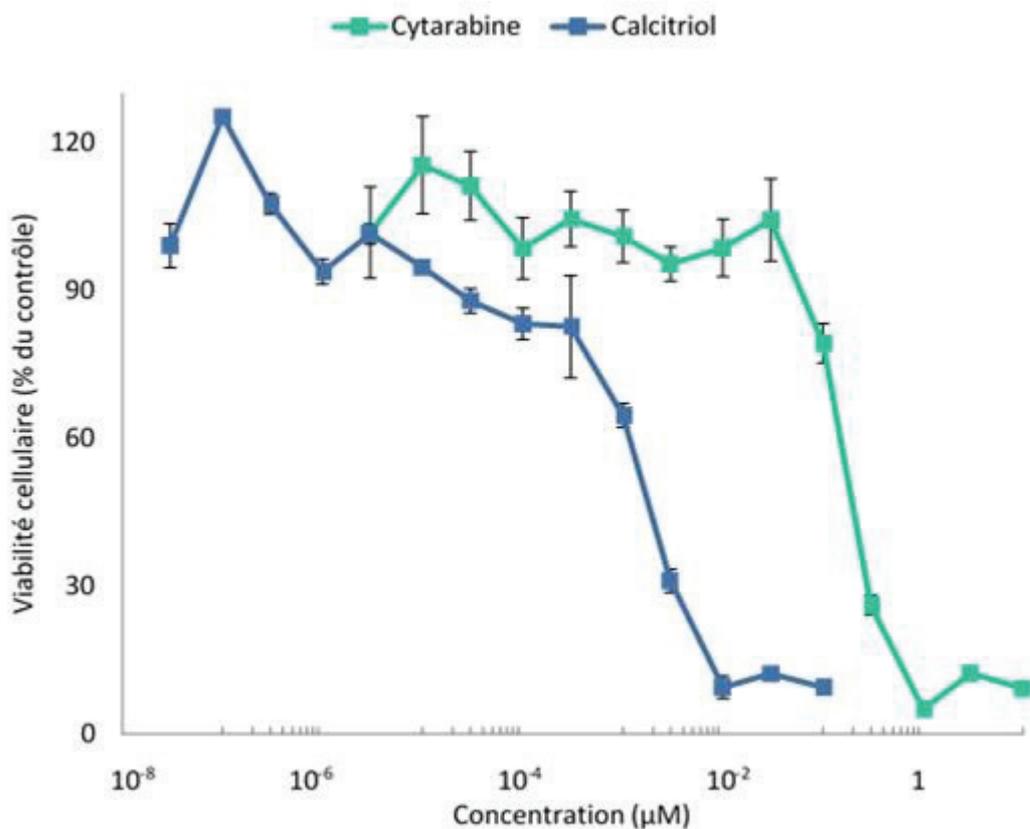


Figure 51. Activité antiproliférative du calcitriol et de la cytarabine sur les cellules MV4-11. La viabilité cellulaire a été évaluée par un essai MTT après 7 jours d'exposition des cellules aux composés. Les données sont représentées en tant que pourcentage de cellules par rapport aux cellules non exposées dont la viabilité est considérée à 100% (moyenne \pm SEM, n=3).

Des essais MTT ont été réalisés à J3 et J7 en exposant les cellules MV4-11 aux actifs seuls ou en mélange. Leurs concentrations inhibitrices de 50% de la prolifération cellulaires (IC_{50}) ont été estimées par le logiciel Compusyn (Tableau 10). Les IC_{50} du calcitriol sont de respectivement $1,9 \cdot 10^{-4}$ et

1,2·10⁻³ µM après 3 et 7 jours d'incubation avec les cellules MV4-11 (Tableau 10). L'indice de combinaison calculé à J3 indique une additivité (0,9-1,1) voire une synergie (<0,9) entre les 2 actifs. Cependant, à J7, l'indice de combinaison n'indique aucune synergie entre la cytarabine et le calcitriol puisqu'il est de 1,17 ± 0,11.

Tableau 10. Estimation des IC₅₀ et calcul de l'indice de combinaison (IC) du calcitriol et de la cytarabine après 3 ou 10 jours d'exposition des cellules MV4-11 par le logiciel Compusyn (moyenne ± SEM, n=3)

	IC ₅₀ (nM)		IC
	Calcitriol	Cytarabine	
J3	19 ± 2	767 ± 44	0,85 ± 0,09
J7	1,2 ± 0,2	138 ± 35	1,17 ± 0,11

L'indice de combinaison entre le calcitriol et la cytarabine calculé à J3, indiquant une synergie (<0,9) entre les 2 actifs, est en accord avec la littérature (Studzinski *et al.*, 1986; Slapak *et al.*, 1992; Makishima *et al.*, 1998). De plus, l'IC₅₀ du calcitriol est cohérente avec celle obtenue par Trynda *et al.* qui ont défini une concentration IC₅₀ du calcitriol vis-à-vis des cellules MV4-11 de 1,56·10⁻² nM après 5 jours d'exposition (Trynda *et al.*, 2015). L'IC₅₀ estimée de la cytarabine dans la présente étude (767 ± 44 nM à J3) est quant à elle éloignée de celles définies par Xie *et al.* au cours de deux études qui sont pour la même période de seulement 106 ± 63 nM dans une des deux études (Xie *et al.*, 2010) et de 220 nM dans l'autre (Xie *et al.*, 2015), soit plus de 3 à 6 fois inférieure à celle estimée dans notre étude. Par ailleurs, un essai mené avec une densité cellulaire moindre (3000 cellules par puits au lieu de 10 000) lors de l'étape d'optimisation du protocole (non montré) a permis d'obtenir un indice de combinaison entre la cytarabine et le calcitriol de seulement 0,45 à J3 indiquant clairement un effet synergique entre les actifs (n=1). Studzinski *et al.* ont expliqué sur des cellules de leucémie humaine promyélocytaire (HL-60) que cet effet synergique entre la cytarabine et le calcitriol était dû à une inhibition de la maturation de l'ADN répliqué suite à la potentialisation de la réduction de l'élongation de l'ADN provoquée par la cytarabine par le calcitriol lors de l'initiation de ses effets pro-différenciatifs (Studzinski *et al.*, 1991). Ce phénomène résulte en une accumulation cytotoxique de petits fragments d'ADN (Studzinski *et al.*, 1991).

Par ailleurs, l'essai réalisé à J7 ne démontre aucune synergie entre le calcitriol et la cytarabine. Cette perte de synergie au cours du temps n'a à ce jour jamais été reportée pour ces actifs puisque la durée des études n'est pas aussi importante, mais elle a été observée pour d'autres actifs (Elliott *et*

al., 1989). Elle peut s'expliquer par une dégradation de l'une ou l'autre des molécules ou par une rétention cellulaire diminuant au cours du temps.

VI.4. Conclusion

En conclusion, nous avons démontré que le calcitriol présentait des activités antiproliférative et cytotoxique vis-à-vis des cellules MV4-11 durant 10 jours. L'encapsulation de l'actif dans des nanocapsules permet de maintenir cette activité sans toutefois la potentialiser. Cette étude n'a pas permis de mettre en évidence une quelconque participation des macrophages à l'activité cytotoxique du calcitriol, probablement en raison du protocole établi. Des études complémentaires visant à évaluer l'internalisation cellulaire des nanocapsules sont donc à envisager pour optimiser le protocole *in vitro*. Par ailleurs, l'effet pro-différentiatif du calcitriol et l'intérêt des macrophages vis-à-vis de cette activité ainsi que des activités antiproliférative et cytotoxique du calcitriol avec un protocole optimal (temps d'exposition et concentrations en calcitriol) sont envisageables. Nous avons également mis en évidence une possible synergie entre le calcitriol et la cytarabine qu'il est nécessaire d'approfondir. Enfin, des études *in vivo* seraient nécessaires pour confirmer le potentiel thérapeutique du calcitriol ainsi que les avantages des nanocapsules en termes d'activité et de toxicité.

VI.5. Références

- Abe, E., Miyaura, C., Sakagami, H., Takeda, M., Konno, K., Yamazaki, T., Yoshiki, S., Suda, T., 1981. Differentiation of mouse myeloid leukemia cells induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 4990–4994.
- Al-Matary, Y.S., Botezatu, L., Opalka, B., Hones, J.M., Lams, R.F., Thivakaran, A., Schutte, J., Koster, R., Lennartz, K., Schroeder, T., Haas, R., Duhrensen, U., Khandanpour, C., 2016. Acute myeloid leukemia cells polarize macrophages towards a leukemia supporting state in a Growth factor independence 1 dependent manner. *Haematologica* 101, 1216–1227.
- Chen, S.-Y., Yang, X., Feng, W.-L., Liao, J.-F., Wang, L.-N., Feng, L., Lin, Y.-M., Ren, Q., Zheng, G.-G., 2015. Organ-Specific Microenvironment Modifies Diverse Functional and Phenotypic Characteristics of Leukemia-Associated Macrophages in Mouse T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *J. Immunol.* 194, 2919–2929.
- Chouvet, C., Vicard, E., Devonec, M., Saez, S., 1986. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibitory effect on the growth of two human breast cancer cell lines (MCF-7, BT-20). *J. Steroid Biochem.* 24, 373–376.
- Elliott, W.L., Howard, C.T., Dykes, D.J., Leopold, W.R., 1989. Sequence and schedule-dependent synergy of trimetrexate in combination with 5-fluorouracil *in vitro* and in mice. *Cancer Res.* 49, 5586–5590.
- Gocek, E., Burska, H., Marchwicka, A., Marcinkowska, E., 2012. Regulation of Leukemic Cell Differentiation through the Vitamin D Receptor at the Levels of Intracellular Signal Transduction, Gene Transcription, and Protein Trafficking and Stability. *Leuk. Res. Treat.* 2012, 1–11.

- Koeffler, H.P., Hirji, K., Itri, L., 1985. 1,25-Dihydroxyvitamin D3: *in vivo* and *in vitro* effects on human preleukemic and leukemic cells. *Cancer Treat. Rep.* 69, 1399–1407.
- Makishima, M., Okabe-Kado, J., Honma, Y., 1998. Growth inhibition and differentiation induction in human monoblastic leukaemia cells by 1 α -hydroxyvitamin D derivatives and their enhancement by combination with hydroxyurea. *Br. J. Cancer* 77, 33–39.
- Mangelsdorf, D.J., Koeffler, H.P., Donaldson, C.A., Pike, J.W., Haussler, M.R., 1984. 1,25-Dihydroxyvitamin D3-induced differentiation in a human promyelocytic leukemia cell line (HL-60): receptor-mediated maturation to macrophage-like cells. *J. Cell Biol.* 98, 391–398.
- McCarthy, D.M., San Miguel, J.F., Freake, H.C., Green, P.M., Zola, H., Catovsky, D., Goldman, J.M., 1983. 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits proliferation of human promyelocytic leukaemia (HL60) cells and induces monocyte-macrophage differentiation in HL60 and normal human bone marrow cells. *Leuk. Res.* 7, 51–55.
- Mertz, J.A., Conery, A.R., Bryant, B.M., Sandy, P., Balasubramanian, S., Mele, D.A., Bergeron, L., Sims, R.J., 2011. Targeting MYC dependence in cancer by inhibiting BET bromodomains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 16669–16674.
- Nicolas, S., Bolzinger, M.-A., Jordheim, L.P., Chevalier, Y., Fessi, H., Almouazen, E., 2018. Polymeric nanocapsules as drug carriers for sustained anticancer activity of calcitriol in breast cancer cells. *Int. J. Pharm.* 550, 170–179.
- Nicolette, R., Santos, D.F. dos, Faccioli, L.H., 2011. The uptake of PLGA micro or nanoparticles by macrophages provokes distinct *in vitro* inflammatory response. *Int. Immunopharmacol.* 11, 1557–1563.
- Pepper, C., 2003. The vitamin D3 analog EB1089 induces apoptosis via a p53-independent mechanism involving p38 MAP kinase activation and suppression of ERK activity in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells *in vitro*. *Blood* 101, 2454–2459.
- Petrini, M., Caracciolo, F., Corini, M., Valentini, P., Sabbatini, A.R., Grassi, B., 1991. Low-dose ARA-C and 1(OH) D3 administration in acute non lymphoid leukemia: pilot study. *Haematologica* 76, 200–203.
- Rajh, M., Dolinar, K., Miš, K., Pavlin, M., Pirkmajer, S., 2016. Medium Renewal Blocks Anti-Proliferative Effects of Metformin in Cultured MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *PLOS ONE* 11, e0154747–e0154764.
- Rein, L.A.M., Rizzieri, D.A., 2014. Clinical potential of elacytarabine in patients with acute myeloid leukemia. *Ther. Adv. Hematol.* 5, 211–220.
- Slapak, C.A., Desforges, J.F., Fogaren, T., Miller, K.B., 1992. Treatment of acute myeloid leukemia in the elderly with low-dose cytarabine, hydroxyurea, and calcitriol. *Am. J. Hematol.* 41, 178–183.
- Studzinski, G.P., Bhandal, A.K., Breivi, Z.S., 1986. Potentiation by 1- α ,25-Oihydroxyvitamin D3 of Cytotoxicity to HL-60 Cells Produced by Cytarabine and Hydroxyurea. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 76, 641–648.
- Studzinski, G.P., Reddy, K.B., Hill, H.Z., Bhandal, A.K., 1991. Potentiation of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine cytotoxicity to HL-60 cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3 correlates with reduced rate of maturation of DNA replication intermediates. *Cancer Res.* 51, 3451–3455.
- Trynda, J., Turlej, E., Milczarek, M., Pietraszek, A., Chodyński, M., Kutner, A., Wietrzyk, J., 2015. Antiproliferative Activity and *in vivo* Toxicity of Double-Point Modified Analogs of 1,25-Dihydroxyergocalciferol. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 24873–24894.
- Vinhas, R., Mendes, R., Fernandes, A.R., Baptista, P.V., 2017. Nanoparticles—Emerging Potential for Managing Leukemia and Lymphoma. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 5, 1–10.

- Xie, C., Edwards, H., Caldwell, J.T., Wang, G., Taub, J.W., Ge, Y., 2015. Obatoclox potentiates the cytotoxic effect of cytarabine on acute myeloid leukemia cells by enhancing DNA damage. *Mol. Oncol.* 9, 409–421.
- Xie, C., Edwards, H., Xu, X., Zhou, H., Buck, S.A., Stout, M.L., Yu, Q., Rubnitz, J.E., Matherly, L.H., Taub, J.W., Ge, Y., 2010. Mechanisms of Synergistic Antileukemic Interactions between Valproic Acid and Cytarabine in Pediatric Acute Myeloid Leukemia. *Clin. Cancer Res.* 16, 5499–5510.
- Yamada, K., Mizusawa, M., Harima, A., Kajiwara, K., Hamaki, T., Hoshi, K., Kozai, Y., Kodo, H., 2006. Induction of remission of relapsed acute myeloid leukemia after unrelated donor cord blood transplantation by concomitant low-dose cytarabine and calcitriol in adults. *Eur. J. Haematol.* 77, 345–348.
- Yang, X., Feng, W., Wang, R., Yang, F., Wang, L., Chen, S., Ru, Y., Cheng, T., Zheng, G., 2018. Repolarizing heterogeneous leukemia-associated macrophages with more M1 characteristics eliminates their pro-leukemic effects. *OncolImmunology* 7, e1412910-e1412923.
- Zhou, J.Y., Norman, A.W., Chen, D.L., Sun, G.W., Uskokovic, M., Koeffler, H.P., 1990. 1,25-Dihydroxy-16-ene-23-yne-vitamin D3 prolongs survival time of leukemic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 3929–3932.

Discussion générale

Le but de ce travail de thèse était d'investiguer le potentiel thérapeutique de vecteurs ciblant les cellules cancéreuses et les macrophages infiltrés dans les tumeurs, et prolongeant l'activité du principe actif encapsulé. L'objectif était double puisqu'il s'agissait de développer des nanovecteurs de calcitriol capables de le libérer de manière prolongée au sein même des cellules tumorales et/ou des macrophages infiltrés dans les tumeurs, et d'évaluer l'intérêt de ce système vis-à-vis de l'amélioration et la prolongation de son activité anti-cancéreuse tant directement qu'indirectement *via* un ciblage des macrophages.

Les macrophages sont des cellules immunitaires impliquées dans le développement de diverses pathologies, ce qui en fait une cible thérapeutique d'intérêt, notamment dans le cas du cancer. Dans ce cas, les monocytes circulants sont recrutés de manière continue au sein de la tumeur, où ils sont, sous l'influence de ce microenvironnement qui se caractérise par une sécrétion permanente de cytokines, chimiokines, et de facteurs de croissance, différenciés et maintenus en macrophages pro-tumoraux (Cui *et al.*, 2016; Mantovani et Locati, 2013). Ils sont alors appelés « macrophages associés aux tumeurs » (TAMs). Les TAMs jouent un rôle majoritairement délétère pour l'organisme, comme démontré par la corrélation positive entre leur présence, et plus précisément le degré d'infiltration de la tumeur par ces derniers, et un mauvais pronostic vital, notamment dans le cas du cancer du sein (Yang *et al.*, 2015). En effet, les TAMs participent, voire même orchestrent les différentes étapes du développement tumoral, de la prolifération des cellules néoplasiques à leur dissémination au sein de l'organisme, et donc à la formation de métastases.

Plusieurs stratégies thérapeutiques ciblant les TAMs sont décrites dans la littérature, à savoir leur déplétion, leur reprogrammation vers un phénotype anti-tumoral, ou encore leur utilisation en tant que vecteurs ou réservoirs de nanoparticules (Luo, 2006; Binnemars-Postma *et al.*, 2017). De par leur rôle de phagocytose et leur mobilité intra-tumorale, les macrophages sont en effet capables d'internaliser des nanoparticules chargées de principe actif, puis de le libérer aux cellules cancéreuses environnantes permettant aussi d'atteindre les zones tumorales non-vascularisées (Gustafson *et al.*, 2015; Binnemars-Postma *et al.*, 2017). Les TAMs internalisent ainsi la majorité des NPs dirigées vers les cellules cancéreuses après leur rétention au niveau tumoral. Plusieurs approches galéniques reposant sur l'utilisation des nanomédecines pour le ciblage des TAMs ont été développées en utilisant des NPs PEGylées et fonctionnalisées avec des ligands spécifiques. Néanmoins, l'administration locale, en l'occurrence intra-tumorale, de nanoparticules dont la surface n'est pas modifiée (vecteurs de 1^{ère}

génération) (Chellat *et al.*, 2005) permet leur rétention au niveau tumoral exclusivement, le ciblage des TAMs et l'élucidation des mécanismes mis en jeu dans leur participation à l'activité de tels nanovecteurs. C'est la raison pour laquelle nous avons retenu cette stratégie pour nos travaux.

Nous avons choisi de développer des nanoparticules polymères biodégradables mesurant environ 200 nm pour assurer une internalisation aussi bien par les cellules cancéreuses que les macrophages (Sharma *et al.*, 2010). Comme décrit dans le chapitre II, il existe différents mécanismes d'internalisation des nanoparticules par les macrophages, mais il semblerait que la phagocytose soit la voie privilégiée (Gustafson *et al.*, 2015). La phagocytose des nanoparticules consiste en leur englobement dans des phagolysosomes et est suivie de leur digestion par le contenu enzymatique de ces derniers. Cet évènement est donc un point crucial qui va fortement impacter la libération du principe actif *in situ* ainsi que sa dégradation et sa disponibilité au niveau du microenvironnement tumoral. Par conséquent, la biodégradabilité des constituants des nanoparticules est nécessaire pour pouvoir assurer une libération de l'actif encapsulé tout en évitant les effets indésirables émanant de l'accumulation de nanoparticules ou de résidus toxiques au sein des organes riches en macrophages (foie et rate par exemple) (Kamaly *et al.*, 2016). D'autre part, la cinétique de dégradation des nanoparticules est profondément influencée par leur structure. Par exemple, l'épaisseur de la coque polymère des nanoparticules a une influence sur la vitesse d'érosion de cette dernière et donc sur la vitesse de libération de l'actif encapsulé. Plusieurs polymères biodégradables sont donc communément employés pour la formulation de nanoparticules, notamment l'acide poly-lactique (PLA).

Le calcitriol, métabolite actif de la vitamine D, est à ce jour commercialisé sous différentes formes galéniques pour son activité sur le métabolisme phospho-calcique. De plus, il possède des activités anti-cancéreuses qui ont été mises en évidence pour la première fois il y a plusieurs dizaines d'années par le biais d'études épidémiologiques ayant démontré une corrélation entre la carence en vitamine D et la fréquence d'apparition du cancer (Garland and Garland, 1980). A ce jour, l'intérêt thérapeutique du calcitriol pour le traitement du cancer a été largement décrit sur différents modèles tumoraux exprimant son récepteur, le VDR, incluant certains cancers du sein hormono-dépendants (Krishnan *et al.*, 2010). En effet, il a été démontré que dans le cas de ces cancers, les œstrogènes stimulaient la prolifération cellulaire, or le calcitriol inhibe leur production ainsi que l'expression de leurs récepteurs, participant fatalement à son action antiproliférative vis-à-vis des cellules cancéreuses (Doisneau-Sixou *et al.*, 2003; Krishnan et Feldman, 2011). Ses mécanismes d'action sont donc bien décrits puisqu'il agirait à la fois directement sur les cellules cancéreuses par des effets antiprolifératifs, pro-différenciatifs et cytotoxiques, mais également sur le microenvironnement tumoral par un effet

anti-inflammatoire et une limitation de l'angiogenèse (Blutt *et al.*, 2000; Pálmer *et al.*, 2001; Krishnan et Feldman, 2011).

Par ailleurs, le rôle du calcitriol sur les macrophages a été proposé suite à l'identification de l'expression du VDR et de la 1 α -hydroxylase, qui est l'enzyme permettant la synthèse de calcitriol à partir de son précurseur (calcidiol), par ces cellules (Monkawa *et al.*, 2000; Baeke *et al.*, 2010). De plus, les macrophages, contrairement aux cellules cancéreuses, n'expriment pas l'enzyme catabolique du calcitriol (24-hydroxylase). Tout cela suggère que les macrophages peuvent jouer le rôle de réservoir de calcitriol en assurant sa protection et sa sécrétion extracellulaire. Aussi, le calcitriol possède un rôle activateur des macrophages puisqu'il peut d'une part potentialiser leur activité phagocytaire et d'autre part stimuler la production de certains facteurs anti-tumoraux par ces derniers. Par exemple, une étude menée sur un modèle de lymphome à larges cellules B a démontré que l'exposition des TAMs au calcitriol induisait la sécrétion de cathélicidine par ces derniers, et que ce peptide antimicrobien était cytotoxique envers les cellules de lymphome (Bruns *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 1993). Ces activités font du calcitriol un principe actif d'intérêt dans ce projet, permettant d'étudier à la fois son action directe sur les cellules cancéreuses et son action indirecte résultant de son activité sur les macrophages.

Bien qu'il possède un large spectre d'activités anti-cancéreuses et qu'il soit efficace sur de nombreux modèles tumoraux, l'utilisation clinique du calcitriol dans le cadre de la chimiothérapie anti-tumorale est limitée par le taux sérique requis pour qu'il soit efficace en tant que tel (>1 nM), entraînant des hypercalcémies. Plusieurs alternatives ont de ce fait été envisagées, principalement en terme de posologie. La dernière stratégie en date repose sur l'administration intermittente d'une dose élevée (45 μ g/kg/semaine) en calcitriol par voie orale, dont la forme galénique (DN-101) a été développée pour le traitement du cancer pour permettre l'administration de telles doses en calcitriol (Beer *et al.*, 2007; Scher *et al.*, 2011). Bien qu'aucune hypercalcémie ne soit associée à son administration, les résultats cliniques obtenus avec cette formule restent faibles. C'est la raison pour laquelle la dernière étude clinique large, *i.e.* l'étude de phase III ASCENT 2 menée chez des patients atteints de cancer de la prostate métastatique, a été interrompue précocement (Scher *et al.*, 2011). Ceci peut s'expliquer par la faible demi-vie du calcitriol dans la circulation sanguine (16,2 heures pour la formule DN-101) rendant difficile le maintien de son efficacité thérapeutique au cours du temps (Figure 9) (Beer, 2005).

La vectorisation du calcitriol dans des nanoparticules est donc une stratégie judicieuse pour potentialiser son efficacité tout en réduisant ses effets secondaires de par un ciblage tumoral permettant une augmentation de la concentration intracellulaire en calcitriol, d'autant plus que c'est

une molécule lipophile ($\log P = 5,5$). Pour ce faire, nous avons développé des nanoparticules polymères de composition adaptée, notamment par le biais de l'ajout d'huile. En effet, de manière générale, les nanocapsules, de par la présence d'huile, permettent une encapsulation plus importante des molécules lipophiles par rapport aux nanosphères. L'huile permet une solubilisation et une rétention des actifs lipophiles améliorant le rendement d'encapsulation et susceptible de ralentir leur libération (Barichello *et al.*, 1999). Par ailleurs, la coque polymère constituant les nanocapsules, en fonction de son épaisseur, tend à renforcer le potentiel de rétention de l'actif exercé par l'huile contenue en leur cœur (Poletto *et al.*, 2008). Le développement de nanocapsules biodégradables chargées en calcitriol est une stratégie d'intérêt permettant à la fois le ciblage tumoral et la prolongation de sa disponibilité au niveau tumoral, donc son activité.

Plusieurs études ont évoqué l'intérêt des macrophages en thérapie anti-cancéreuse après exposition à des nanoparticules, soit par une action directe par une activation ou une polarisation de ces derniers (Sousa *et al.*, 2015; Zanganeh *et al.*, 2016), soit indirectement par le biais d'un stockage des nanoparticules encapsulant des actifs anti-cancéreux (Soma *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2015a). Cependant, ces activités n'ont pour la majorité pas été observées dans le cadre de co-cultures de cellules cancéreuses et de macrophages. De plus, les études ont tout au plus démontré un maintien de l'activité anti-cancéreuse des principes actifs encapsulés en comparaison à leur activité en monocultures. La participation des macrophages à l'activité anti-cancéreuse du calcitriol *via* leur rôle de réservoir de nanoparticules ou la modulation de leur phénotype par le calcitriol, permettant une action anti-tumorale sur le long terme, sera donc ici abordée.

En ce sens, nous avons mené une étude de formulation dans le but de développer des nanoparticules adéquates en prenant en considération tous les pré-requis préalablement abordés. Les nanoparticules doivent donc, en plus d'être biodégradables, présenter les propriétés physicochimiques optimales pour une encapsulation maximale et une libération prolongée du calcitriol. Par ailleurs, les nanoparticules ont été formulées de manière à respecter une taille comprise entre 150 et 200 nm, permettant leur diffusion au sein de la tumeur et leur internalisation par les cellules cancéreuses et les TAMs. Les paramètres de formulation ont été optimisés pour que les nanoparticules internalisées par les cellules cancéreuses exercent une activité prolongée envers ces dernières. La persistance des nanoparticules au sein des TAMs est souhaitée afin de libérer de manière prolongée le calcitriol aux cellules tumorales, donc de maintenir son activité anti-cancéreuse sur une longue période. Ces points seront abordés dans cette partie.

Développement de nanoparticules encapsulant le calcitriol

Bien que de nombreux travaux visant à encapsuler les autres métabolites de la vitamine D dans des nanoparticules aient été conduits, principalement afin d'enrichir des produits alimentaires en vitamine D, peu abordent l'encapsulation du calcitriol. Des travaux ont été menés dans le but de l'encapsuler pour une application en thérapie anti-cancéreuse dans des microsphères à base de polyvinylnéodécanoate (Nguyen *et al.*, 2007), des nanosphères et nanocapsules d'acide poly(D,L)lactique (PLA) (Almouazen *et al.*, 2013) et des nanosphères d'acide poly(dl-lactique-polyglycolique) (Ramalho *et al.*, 2015). Almouazen *et al.* ont ainsi observé une efficacité d'encapsulation du cholécalciférol, plus hydrophobe que le calcitriol, plus importante dans des nanocapsules que dans des nanosphères avec respectivement 97% et 70% d'encapsulation, ainsi qu'un ralentissement de sa libération à partir des nanocapsules (Almouazen *et al.*, 2013). Les auteurs ont ensuite encapsulé le calcitriol dans les nanocapsules sélectionnées à l'issue de l'étude de formulation, démontrant 88% d'encapsulation (Almouazen *et al.*, 2013), contre seulement 57% dans le cas des nanosphères de composition similaire étudiées par Ramalho *et al.* (Ramalho *et al.*, 2015). Notre stratégie, d'un point de vue galénique, a donc été d'investiguer l'impact de la formulation des nanoparticules sur leurs propriétés en vue du développement d'un système de libération prolongée du calcitriol.

La revue de littérature de Mora-Huertas témoigne de l'intérêt des nanocapsules pour l'encapsulation de principes actifs liposolubles et leur libération prolongée ainsi que de l'impact du ratio polymère:huile sur la libération des principes actifs liposolubles (Mora-Huertas *et al.*, 2010). Deux approches sont envisageables pour moduler ce ratio, à savoir la variation de la concentration en polymère ou en huile. L'importance de la présence du polymère a cependant été démontrée au cours d'une étude portant sur la vectorisation de la xanthone et de son dérivé, tous deux liposolubles (Teixeira *et al.*, 2005). En effet, Teixeira *et al.* ont observé une libération plus importante des principes actifs encapsulés dans des nanoémulsions par rapport aux nanocapsules, attestant de l'importance du polymère pour prolonger la libération des molécules encapsulées (Teixeira *et al.*, 2005). Plusieurs études ont aussi démontré que l'augmentation de la concentration en polymère constituant les nanocapsules permettait d'augmenter l'épaisseur de leur coque polymère, alors responsable d'une libération prolongée de l'actif liposoluble (Poletto *et al.*, 2008; Romero-Cano et Vincent, 2002, 2002). Par ailleurs, des travaux menés sur l'encapsulation du diclofénac, actif liposoluble (LogP = 4,4), dans des nanocapsules de PLA ont montré que l'augmentation de la concentration en huile pouvait être responsable de la formation de gouttelettes d'huile isolées (Guterres *et al.*, 1995). Nous avons donc choisi d'étudier l'impact du ratio polymère:huile sur la libération du calcitriol en maintenant la concentration en huile constante et en variant la concentration en polymère. Dans cette étude de

formulation, le PLA (masse moléculaire = 20 000 g·mol⁻¹) et des triglycérides à chaînes moyennes (Miglyol® 829, 0,3% m/m de la phase organique) ont été employés. Des nanoémulsions (ratio polymère:huile de 0:1), des nanocapsules (ratios polymère:huile de 1:8, 1:4 et 1:2) et des nanosphères (ratio polymère:huile de 1:0) ont ainsi été formulées. La variation de la concentration en polymère n'a pas eu d'impact majeur sur les propriétés physicochimiques des nanoparticules développées puisqu'elles présentent toutes une taille monodisperse moyenne comprise entre 173 ± 3 nm et 195 ± 15 nm et une faible charge de surface d'environ -22 mV (Table 4). Par ailleurs, les nanocapsules ont démontré une efficacité d'encapsulation supérieure à celle des nanosphères et des nanoémulsions (Table 4). Ceci s'explique par la solubilité importante du calcitriol dans l'huile et sa faible solubilité dans le polymère, tendant vers une rétention du principe actif au cœur des nanocapsules (Table 6). Nos résultats sont en accord avec Barichello *et al.* et Teixeira *et al.* dans le sens où la faible solubilité de l'actif dans le polymère favorise sa diffusion dans la phase aqueuse durant la préparation des nanosphères (Barichello *et al.*, 1999; Teixeira *et al.*, 2005). Cela explique également la libération du calcitriol à partir des différentes formules. En effet, bien que le profil de libération biphasique soit commun aux nanoémulsions, nanocapsules et nanosphères (Figure 34), la quantité en calcitriol libérée lors de la première phase conditionne sa libération globale. En effet, la libération du calcitriol se caractérise par un « burst release » suivi d'un plateau durant lequel sa libération est constante. L'existence de ce plateau, bien que les conditions sink soient respectées, s'explique par un équilibre entre la fraction en calcitriol retenue par les nanoparticules et sa fraction libérée dans le milieu, aussi observée au cours d'autres études avec divers principes actifs (Calvo *et al.*, 1996; Teixeira *et al.*, 2005). Le renouvellement régulier du milieu de libération permet de rompre cet équilibre, comme démontré dans la Figure 43 qui montre que la totalité du calcitriol est libéré après 3 changements de milieu. Par ailleurs, le « burst release » du calcitriol est limité d'une part par la combinaison de polymère et d'huile, et d'autre part par une concentration suffisante en polymère. En effet, l'augmentation croissante de la concentration en PLA est à l'origine d'une diminution croissante de cette libération initiale, avec respectivement 59 ± 1%, 50 ± 7% et 41 ± 5% pour les nanocapsules contenant 0,04%, 0,07%, et 0,15% de PLA (m/m de la phase organique) (Figure 34). Ces résultats sont donc en accord avec les travaux présentés dans la littérature et suggèrent une augmentation de l'épaisseur de la coque polymère, d'autant plus que le calcitriol n'y est pas soluble, ralentissant alors sa libération (Romero-Cano and Vincent, 2002; Poletto *et al.*, 2008). Nos travaux contredisent cependant l'hypothèse émise par Teixeira *et al.* selon laquelle l'actif interagirait avec la coque polymère (Teixeira *et al.*, 2005) puisque nous avons observé un effet de « dilution » du calcitriol dans la coque polymère des nanocapsules. En effet, pour des quantités en principe actif et en huile fixes, l'augmentation de la concentration en polymère ne modifie pas la répartition du calcitriol entre le polymère et l'huile mais tend à diminuer la concentration en principe actif dans la coque polymère (Table 7). Dans le cadre de l'application

souhaitée, les nanocapsules contenant 0,15% de PLA, correspondant à un ratio polymère:huile de 1:2 ont donc été définies comme étant la formule optimale.

La revue de littérature de Mora-Huertas discute par ailleurs de l'importance de la polarité de l'huile pour l'encapsulation et la rétention des principes actifs liposolubles dans les nanocapsules (Mora-Huertas *et al.*, 2010). Teixeira *et al.* ont quant à eux complété ces observations en démontrant une influence de la solubilité du principe actif dans l'huile, et non pas l'inverse, vis-à-vis de leur efficacité d'encapsulation (Teixeira *et al.*, 2005). De plus, compte tenu du fait que le calcul théorique de la compatibilité de deux composés ($\overline{\Delta\delta}$) prenne en compte leurs interactions polaires (Hansen, 2007), la solubilité du calcitriol dans l'huile formant le cœur des nanocapsules semble être un paramètre essentiel dans la modulation de son efficacité d'encapsulation ainsi que de sa libération.

Afin d'évaluer son importance dans le cadre du développement de nanocapsules adéquates pour l'utilisation thérapeutique du calcitriol en tant qu'actif anti-cancéreux, nous avons sélectionné des triglycérides à chaînes moyennes non modifiés (Labrafac lipophile® WL1349 et Miglyol® 829) ou modifiés avec la présence de PEG-4 (Labrafac Hydro® WL1219), PEG-6 (Labrafil® M1944 CS) et PEG-8 (Labrasol®), augmentant de manière croissante leur polarité. Après 6 heures, des libérations du calcitriol variant de 40% pour le Labrafac Hydro® WL1219 et le Miglyol® 829 à $79 \pm 2\%$ pour le Labrasol® ont ainsi été observées (Figure 35). La présence de PEG dans les huiles peut favoriser la rétention du calcitriol dans les nanocapsules par le biais d'une interaction entre la fonction éther des PEG et la fonction hydroxyle du calcitriol. Paradoxalement, l'augmentation de la polarité d'une huile, corrélée au poids moléculaire des PEG dans le cas de triglycérides à chaînes moyennes modifiées, réduit la compatibilité du calcitriol avec ces huiles se traduisant par une augmentation de la distance $\overline{\Delta\delta}$ entre ces deux composés (Table 6). De plus, la présence de PEG dans la composition des huiles favorise la formation de micelles participant à la réduction de l'efficacité d'encapsulation du calcitriol dans les nanocapsules ainsi qu'à sa libération importante. Le mélange d'huiles modérément polaires ne contenant pas de PEG (Miglyol® 829) ou des PEG de poids moléculaires très faible (Labrafac Hydro® WL1219) en quantités équivalentes a ainsi été identifié comme étant le plus adéquat dans le cadre de ce projet. En effet ces nanocapsules présentent, en plus des propriétés physicochimiques souhaitées, la réduction la plus importante de la libération initiale du calcitriol et la plus grande stabilité par rapport aux autres formulations.

Internalisation des nanocapsules développées par les cellules cancéreuses et les macrophages

La majorité des études visant à évaluer le potentiel thérapeutique de principes actifs anti-cancéreux vectorisés dans des nanoparticules sont menées sur des mono-cultures de cellules cancéreuses, suggérant la nécessité d'une internalisation des nanoparticules par ces dernières pour assurer l'activité de l'actif encapsulé. Chawla *et al.* ont ainsi démontré *in vitro* que les cellules MCF-7 internalisaient des nanoparticules polymères en quelques minutes seulement (Chawla et Amiji, 2003). De plus, la capacité d'internalisation de nanocapsules similaires à celles développées dans ce projet par les cellules MCF-7 a été confirmée *in vitro* de manière qualitative au cours d'une étude précédente par microscopie à fluorescence après des temps d'incubation longs de 4, 7 ou 10 jours (Almouazen *et al.*, 2013). La persistance des nanocapsules au sein des cellules MCF-7 avait également été évoquée puisqu'une fluorescence était toujours observable 10 jours après incubation avec les nanocapsules chargées en rouge nile ainsi qu'avec le rouge nile libre, mais dans une moindre mesure. Ces résultats diffèrent des présentes observations mais peuvent s'expliquer par le temps d'incubation ainsi que par l'autofluorescence du milieu cellulaire, non prise en compte dans les observations microscopiques (Almouazen *et al.*, 2013).

Par ailleurs, au vu de leur activité de phagocytose, les macrophages associés aux tumeurs peuvent être ciblés en tant qu'intermédiaires pour l'internalisation de NPs. Afin d'évaluer l'interaction entre les macrophages et les nanocapsules développées au cours de ce travail et de définir le temps d'incubation adapté à l'évaluation de leur implication dans l'activité du calcitriol *in vitro*, des études d'internalisation cellulaire ont été menées. L'internalisation des nanocapsules par les macrophages et par les cellules cancéreuses a été évaluée en mono- et co-cultures après incubation des deux types cellulaires avec la formule optimale de nanocapsules marquée par le rouge nile. En accord avec la littérature, les résultats obtenus par cytométrie en flux ont révélé que la totalité des cellules MCF-7 en mono-cultures internalisait les nanocapsules en seulement 1 heure (Figure 45) (Chawla et Amiji, 2003). Des résultats similaires ont été obtenus avec les macrophages THP-1, avec une internalisation maximale au bout de 3 heures. L'évaluation quantitative de la fluorescence a suggéré une internalisation des nanocapsules plus importante par les macrophages que par les cellules cancéreuses, avec des augmentations de la fluorescence par rapport à l'autofluorescence de chaque type cellulaire de respectivement 16 et 8 après 3 heures d'incubation (Figure 45). Ces observations sont en adéquation avec les résultats obtenus en mono-cultures puisque les nanocapsules ont été internalisées efficacement par les deux types cellulaires, avec 100% des cellules positives en terme de fluorescence après 3 heures (Figure 45).

Par ailleurs, les nanocapsules ont été stockées efficacement par les macrophages pendant 10 jours alors que les cellules MCF-7 ont fait preuve d'une rétention moindre de ces dernières avec une réduction conséquente du nombre de cellules fluorescentes (<20%) après seulement 96 heures et une disparition du signal fluorescent au-delà. Ces observations démontrent d'une part, que l'utilisation des macrophages en tant que réservoir de nanocapsules chargées en calcitriol est envisageable, et d'autre part que cette dernière ne s'oppose pas à l'internalisation des nanocapsules par les cellules cancéreuses, permettant une activité anti-cancéreuse rapide du calcitriol encapsulé.

Activités anti-cancéreuses directes du calcitriol *in vitro*

Les activités antiproliférative et cytotoxique du calcitriol (10-1000 nM) ont donc été évaluées sur la lignée cellulaire d'adénocarcinome mammaire humain MCF-7, exprimant le VDR et décrite pour sa sensibilité vis-à-vis du principe actif (Chouvet *et al.*, 1986; Simboli-Campbell *et al.*, 1997; Saracligil *et al.*, 2017). Bien que Simboli-Campbell *et al.* aient observé une activité antiproliférative du calcitriol vis-à-vis des cellules MCF-7 après seulement 48 heures *in vitro* (Simboli-Campbell *et al.*, 1997), Chouvet *et al.* ont démontré que 4 jours étaient nécessaires pour détecter une quelconque activité de ce principe actif, et 7 jours pour qu'elle soit significative (Chouvet *et al.*, 1986). De manière similaire, nous avons donc conduit nos travaux *in vitro* pendant 10 jours avec des évaluations régulières de l'activité du calcitriol, à savoir après 4, 7 et 10 jours de culture cellulaire.

Bien que l'intérêt de l'encapsulation du calcitriol dans des nanoparticules au regard de son activité antiproliférative ait été démontré au cours de plusieurs études, l'impact de la cinétique de libération du calcitriol encapsulé sur son activité anti-cancéreuse n'a à notre connaissance jamais été évalué (Almouazen *et al.*, 2013; Ramalho *et al.*, 2015; Sabzichi *et al.*, 2017). En effet, bien que les auteurs ayant encapsulé le calcitriol revendiquent l'avantage d'une libération prolongée de l'actif vis-à-vis de son activité biologique, cette corrélation n'a jamais clairement été établie, aussi bien pour le calcitriol que de manière générale. Ceci peut se justifier par les protocoles mis en place, en particulier le temps d'exposition long des cellules au principe actif (> 24 heures) qui ne permet pas d'évaluer l'activité de la fraction de calcitriol intracellulaire exclusivement comme discuté pour d'autres molécules (Rajh *et al.*, 2016). En particulier, Rajh *et al.* ont démontré une corrélation entre le temps d'exposition des cellules de cancer du sein MDA-MB-231 à la metformine et l'activité antiproliférative de cette dernière (Rajh *et al.*, 2016). Les auteurs ont en effet démontré qu'une réduction du temps d'exposition des cellules au principe actif était responsable d'une perte de son activité (Rajh *et al.*, 2016). De plus, Chouvet *et al.* ont démontré que le remplacement du milieu de culture contenant le calcitriol par un milieu de culture cellulaire frais était à l'origine d'une perte rapide de son activité

antiproliférative vis-à-vis des cellules MCF-7 (Chouvet *et al.*, 1986). Compte tenu de ces observations, nous avons souhaité, dans un premier temps, optimiser le protocole d'évaluation de l'efficacité biologique du calcitriol *in vitro* en testant deux temps d'exposition à l'actif (24 et 96 heures). En accord avec les observations faites par Chouvet *et al.* et Simboli-Campbell *et al.*, une activité antiproliférative temps et concentration-dépendante du calcitriol a été mise en évidence, indépendamment de la durée d'exposition au principe actif (Chouvet *et al.*, 1986; Simboli-Campbell *et al.*, 1996). Le temps d'exposition « long » testé (96 heures) n'a pas permis d'observer d'action prolongée du calcitriol après encapsulation (Figure 36). En revanche, le temps d'exposition réduit (24 heures), plus représentatif de la réalité, en raison du flux sanguin, a permis d'observer une potentialisation de l'activité antiproliférative du calcitriol envers les cellules MCF-7 durant 10 jours avec une inhibition de la croissance cellulaire de plus de 65% pour la forme encapsulée du calcitriol (> 100 nM) (Figure 36). En revanche, une perte totale de l'activité de sa forme libre était observée en réponse à une élimination précoce du milieu de culture contenant le calcitriol, ce qui est en accord avec les résultats décrits dans la littérature (Chouvet *et al.*, 1986; Rajh *et al.*, 2016).

Le temps d'exposition court testé a donc été sélectionné afin de comparer les différentes formules développées, à savoir les nanoémulsions, les 3 types de nanocapsules et les nanosphères, au regard de l'activité antiproliférative du calcitriol. Cela a permis de mettre en évidence une corrélation entre le profil de libération des nanovecteurs et l'activité biologique de l'actif encapsulé. Ainsi, une libération lente du calcitriol encapsulé, assurée par des paramètres de formulation adéquats permettant la rétention du principe actif au cœur des nanocapsules (Nicolas *et al.*, 2018), est corrélée à une activité prolongée de l'actif *in vitro* (Figure 38). Au vu de ces observations, bien que la persistance importante des nanocapsules au sein des cellules cancéreuses puisse expliquer l'avantage des nanocapsules par rapport à la forme libre du calcitriol (Almouazen *et al.*, 2013), il peut aussi s'expliquer par le profil de libération prolongé du principe actif. Cela se confirme par l'absence de potentialisation de l'activité antiproliférative du calcitriol pour les formules présentant une libération initiale importante de ce dernier.

Au cours de ce projet, nous avons également démontré l'activité cytotoxique du calcitriol envers les cellules MCF-7 *in vitro*. L'impact du temps d'incubation des cellules avec le calcitriol (1000 nM) sur cette dernière a également été étudié en testant 3 durées d'exposition : 3 heures, correspondant au temps d'internalisation cellulaire optimal défini et 24 et 96 heures, correspondant aux études de l'activité antiproliférative du calcitriol. Bien que cette durée n'influence pas l'activité du calcitriol libre au-delà de 4 jours d'incubation, c'est un facteur limitant de son activité lorsque ce dernier est encapsulé durant 7 jours. En effet, la réduction du temps d'exposition des cellules au calcitriol est associée à une réduction de son activité cytotoxique. Par exemple, pour des durées

d'exposition au calcitriol encapsulé de 3, 24 ou 96 heures, le nombre de cellules viables diminue de manière croissante avec respectivement 65%, 23% et 12% de cellules viables (Figure 44). La libération lente du calcitriol est avantageuse en terme de durée, comme en témoigne la potentialisation de son activité antiproliférative vis-à-vis des cellules MCF-7 pendant 10 jours, mais limitante en terme de puissance de l'activité cytotoxique du calcitriol. Il est cependant important de prendre en considération que ces deux types d'activités se combinent et donc que le calcitriol est cytotoxique envers des cellules qu'il maintient dans un état de quiescence.

Participation des macrophages à l'activité cytotoxique du calcitriol *in vitro*

Dans le but d'évaluer la participation des macrophages à l'activité des nanoparticules chargées en calcitriol, nous avons choisi d'établir des co-cultures de cellules cancéreuses MCF-7 avec des macrophages différenciés à partir d'une lignée cellulaire de monocytes THP-1. De manière similaire aux études visant à évaluer l'activité antiproliférative du calcitriol, nous avons réalisé ces études durant 10 jours. Par ailleurs, sur la base des études d'internalisation cellulaire et de l'étude de l'impact du temps d'incubation des cellules avec le calcitriol ayant démontré une activité cytotoxique faible donc améliorable de ce dernier, une durée d'exposition de 3 heures a été sélectionnée. Nous avons mis en évidence une participation active des macrophages à l'activité cytotoxique des nanocapsules encapsulant le calcitriol sur les cellules MCF-7 durant 10 jours. Cette dernière est peu visible après 4 jours de culture cellulaire du fait du temps nécessaire pour la libération du calcitriol, l'activation des macrophages et/ou la redistribution du calcitriol aux cellules cancéreuses. En revanche, 10 jours après initiation de l'exposition au calcitriol encapsulé (3 heures, 1000 nM), la présence des macrophages a permis une chute de la viabilité des cellules MCF-7, notamment à J7 avec $21 \pm 7\%$ de cellules viables contre $64 \pm 6\%$ pour les mono-cultures de cellules MCF-7, et à J10 avec respectivement $24 \pm 2\%$ et $69 \pm 11\%$ de cellules MCF-7 viables ($p < 0,01$, Figure 46).

Des résultats similaires ont été obtenus sans exposition directe des cellules cancéreuses au calcitriol en pré-incubant les macrophages avec les nanocapsules chargées avec l'actif, confirmant l'implication des macrophages dans son activité (Figure 47). Ces résultats pourraient s'expliquer par un stockage et une redistribution du calcitriol aux cellules cancéreuses comme suggéré au cours de deux études (Miller *et al.*, 2015b; Soma *et al.*, 2000). En effet, Soma *et al.* ont démontré *in vitro* que l'activité de la doxorubicine encapsulée dans des nanoparticules de poly-alkylcyanoacrylate était conservée en présence des macrophage mais que son IC_{50} était multipliée par 5 sur un modèle de co-culture de cellules de sarcome et de macrophages (Soma *et al.*, 2000). Par ailleurs, Miller *et al.* ont

démontré *in vivo* que la déplétion des TAMs dans un modèle murin de fibrosarcome diminuait l'accumulation intra-tumorale de NPs polymères encapsulant un dérivé de platine résultant en une efficacité thérapeutique moindre (Miller *et al.*, 2015). Cependant, une étude de co-culture mériterait d'être menée afin d'élucider les mécanismes mis en jeu. Ces résultats pourraient aussi s'expliquer par une activation des macrophages, comme proposé par Nicolette *et al.* qui ont observé l'induction de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α et IL-1 β) par des macrophages murins après exposition à des microparticules de PLGA vides (Nicolette *et al.*, 2011). Une telle activation pourrait favoriser la phagocytose des cellules MCF-7 et l'inhibition de leur prolifération. Cette hypothèse est renforcée par l'observation d'une réduction de la viabilité cellulaire des MCF-7 après pré-incubation des macrophages avec les nanocapsules ne contenant pas de calcitriol de près de 60% après 7 jours de culture cellulaire (Figure 47). Par ailleurs, la viabilité moindre des cellules MCF-7 après pré-incubation des macrophages aux nanocapsules chargées en calcitriol par rapport aux nanocapsules blanches dans ces mêmes conditions laisse suggérer la mise en place simultanée de ces différents mécanismes.

Ces études ont été répétées sur un autre modèle cancéreux sensible aux activités antiproliférative et cytotoxique du calcitriol, à savoir la lignée cellulaire de leucémie myéloïde aigüe (MV4-11) (Trynda *et al.*, 2015). Cette lignée cellulaire est d'autant plus intéressante que le calcitriol possède des activités pro-différenciatives bénéfiques vis-à-vis de cette dernière et des cellules leucémiques de manière générale (Gocek *et al.*, 2012). Enfin, cette lignée cellulaire a été sélectionnée en raison de l'aisance avec laquelle des modèles murins de xéno greffe de leucémie myéloïde aigüe peuvent être établis, permettant de plus une croissance rapide de la tumeur. Cette dernière est avantageuse puisqu'elle permet une exactitude des données issues de l'évaluation de l'activité anti-cancéreuse du traitement administré, en terme de volume tumoral principalement.

L'approche thérapeutique abordée avec ce modèle cancéreux est différente de celle envisagée pour le modèle de cancer du sein qui est un modèle de tumeur solide. En effet, dans le cas de la leucémie, les cellules leucémiques sont circulantes dans le sang justifiant l'intérêt d'une administration intraveineuse des nanocapsules développées dans ce projet. Ce mode d'administration pourrait ainsi assurer un ciblage des cellules leucémiques permettant les actions antiproliférative, cytotoxique et pro-différenciative du calcitriol encapsulé. Par ailleurs, l'interaction des monocytes et macrophages circulants avec les nanocapsules doit être considéré, d'où l'intérêt d'évaluer l'implication des macrophages sur ce modèle. Le ciblage des cellules leucémiques par des nanosystèmes, y compris polymères, a été démontré à l'issue de plusieurs travaux (Anand *et al.*, 2010; Vinhas *et al.*, 2017). Par exemple, Anand *et al.* ont développé des nanoparticules polymères à base de copolymères di-blocs PLGA-PEG pour l'encapsulation du curcumin et une administration par voie intraveineuse. Les auteurs

ont observé une internalisation cellulaire des nanoparticules (81 nm) par des cellules de leucémie myéloïde chronique KBM-5 en seulement 5 minutes *in vitro* (Anand *et al.*, 2010).

Dans notre étude, bien que les activités antiproliférative et cytotoxique du calcitriol envers les cellules MV4-11 aient été observées *in vitro*, aucune participation quelconque, qu'elle soit négative ou positive, des macrophages à l'activité cytotoxique du calcitriol n'a pu être observée. Ces résultats peuvent cependant s'expliquer par la sensibilité importante de la lignée cellulaire au calcitriol. En effet, une étude de l'évaluation de l'activité cytotoxique du calcitriol vis-à-vis des cellules MV4-11 a permis de définir une concentrations en calcitriol inhibant 50% de la prolifération cellulaire (IC₅₀) de seulement 15,6 ± 8,7 nM après 5 jours d'exposition au calcitriol, ce qui correspond approximativement à la concentration minimale testée dans notre étude (Figure 51 et Tableau 9) (Trynda *et al.*, 2015). Ainsi, la concentration en calcitriol testée pour l'évaluation de l'implication des macrophages à son activité (1 µM) s'est révélée extrêmement cytotoxique dans le cadre des mono-cultures, aboutissant à une mortalité des cellules MV4-11 constante sur 10 jours avec plus de 70% de mortalité cellulaire, contre seulement 35% pour les cellules MCF-7 exposées au calcitriol encapsulé dans les mêmes conditions (Figure 46). En effet, les cellules MV4-11 sont plus sensibles à l'activité antiproliférative du calcitriol que les cellules MCF-7 avec par exemple 63% d'inhibition de la croissance cellulaire après exposition des cellules MV4-11 à 0,1 µM de calcitriol (Figure 36) contre seulement 48% pour les cellules MCF-7 dans les mêmes conditions (Figure 48). De plus, la durée d'exposition de 3 heures pour évaluer l'activité cytotoxique du calcitriol a été sélectionnée au cours de notre étude précédente sur la base des études d'internalisation du calcitriol par les cellules MCF-7 et par les macrophages THP-1 en mono- et co-cultures (chapitre V paragraphe V.2.3.5.4.). Dans le cas présent, la lignée cellulaire étant différente (nature et taille des cellules notamment), il aurait été judicieux de réaliser au préalable une étude d'internalisation cellulaire des NCs ainsi qu'une étude cinétique de la viabilité des cellules MV4-11 afin d'optimiser les conditions expérimentales. Le fait qu'aucune participation des macrophages à l'activité du calcitriol envers les cellules MV4-11 ne soit observable *in vitro* pourrait en effet s'expliquer par une internalisation au moins aussi importante par les cellules MV4-11 que les macrophages.

Références

- Almouazen, E., Bourgeois, S., Jordheim, L.P., Fessi, H., Briançon, S., 2013. Nano-encapsulation of Vitamin D3 Active Metabolites for Application in Chemotherapy: Formulation Study and *in vitro* Evaluation. *Pharm. Res.* 30, 1137–1146.
- Anand, P., Nair, H.B., Sung, B., Kunnumakkara, A.B., Yadav, V.R., Tekmal, R.R., Aggarwal, B.B., 2010. RETRACTED: Design of curcumin-loaded PLGA nanoparticles formulation with enhanced cellular uptake, and increased bioactivity *in vitro* and superior bioavailability *in vivo*. *Biochem. Pharmacol.* 79, 330–338.

- Baeke, F., Takiishi, T., Korf, H., Gysemans, C., Mathieu, C., 2010. Vitamin D: modulator of the immune system. *Curr. Opin. Pharmacol.* 10, 482–496.
- Barichello, J.M., Morishita, M., Takayama, K., Nagai, T., 1999. Encapsulation of Hydrophilic and Lipophilic Drugs in PLGA Nanoparticles by the Nanoprecipitation Method. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 25, 471–476.
- Beer, T.M., 2005. Pharmacokinetics and Tolerability of a Single Dose of DN-101, a New Formulation of Calcitriol, in Patients with Cancer. *Clin. Cancer Res.* 11, 7794–7799.
- Beer, T.M., Ryan, C.W., Venner, P.M., Petrylak, D.P., Chatta, G.S., Ruether, J.D., Redfern, C.H., Fehrenbacher, L., Saleh, M.N., Waterhouse, D.M., Carducci, M.A., Vicario, D., Dreicer, R., Higano, C.S., Ahmann, F.R., Chi, K.N., Henner, W.D., Arroyo, A., Clow, F.W., 2007. Double-Blinded Randomized Study of High-Dose Calcitriol Plus Docetaxel Compared With Placebo Plus Docetaxel in Androgen-Independent Prostate Cancer: A Report From the ASCENT Investigators. *J. Clin. Oncol.* 25, 669–674.
- Bener, G., J. Félix, A., Sánchez de Diego, C., Pascual Fabregat, I., Ciudad, C.J., Noé, V., 2016. Silencing of CD47 and SIRP α by Polypurine reverse Hoogsteen hairpins to promote MCF-7 breast cancer cells death by PMA-differentiated THP-1 cells. *BMC Immunol.* 17, 32-43.
- Binnemars-Postma, K., Storm, G., Prakash, J., 2017. Nanomedicine Strategies to Target Tumor-Associated Macrophages. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 979-1006.
- Blutt, S.E., McDonnell, T.J., Polek, T.C., Weigel, N.L., 2000. Calcitriol-Induced Apoptosis in LNCaP Cells Is Blocked By Overexpression of Bcl-2¹. *Endocrinology* 141, 10–17.
- Bruns, H., Buttner, M., Fabri, M., Mougiakakos, D., Bittenbring, J.T., Hoffmann, M.H., Beier, F., Pasemann, S., Jitschin, R., Hofmann, A.D., Neumann, F., Daniel, C., Maurberger, A., Kempkes, B., Amann, K., Mackensen, A., Gerbitz, A., 2015. Vitamin D-dependent induction of cathelicidin in human macrophages results in cytotoxicity against high-grade B cell lymphoma. *Sci. Transl. Med.* 7, 282ra47-282ra47.
- Calvo, P., Vila-Jato, J.L., Alonso, M.J., 1996. Comparative *in vitro* evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers. *J. Pharm. Sci.* 85, 530–536.
- Champion, J.A., Walker, A., Mitragotri, S., 2008. Role of Particle Size in Phagocytosis of Polymeric Microspheres. *Pharm. Res.* 25, 1815–1821.
- Chawla, J.S., Amiji, M.M., 2003. Cellular uptake and concentrations of tamoxifen upon administration in poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles. *AAPS PharmSci* 5, 28-34.
- Chellat, F., Merhi, Y., Moreau, A., Yahia, L., 2005. Therapeutic potential of nanoparticulate systems for macrophage targeting. *Biomaterials* 26, 7260–7275.
- Chouvet, C., Vicard, E., Devonec, M., Saez, S., 1986. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibitory effect on the growth of two human breast cancer cell lines (MCF-7, BT-20). *J. Steroid Biochem.* 24, 373–376.
- Cui, R., Yue, W., Lattime, E.C., Stein, M.N., Xu, Q., Tan, X.-L., 2016. Targeting tumor-associated macrophages to combat pancreatic cancer. *Oncotarget* 7, 50735-50754.
- Doisneau-Sixou, S.F., Sergio, C.M., Carroll, J.S., Hui, R., Musgrove, E.A., Sutherland, R.L., 2003. Estrogen and antiestrogen regulation of cell cycle progression in breast cancer cells. *Endocr. Relat. Cancer* 10, 179–186.
- Fogal, V., Zhang, L., Krajewski, S., Ruoslahti, E., 2008. Mitochondrial/Cell-Surface Protein p32/gC1qR as a Molecular Target in Tumor Cells and Tumor Stroma. *Cancer Res.* 68, 7210–7218.
- Garland, C.F., Garland, F.C., 1980. Do sunlight and vitamin D reduce the likelihood of colon cancer? *Int. J. Epidemiol.* 9, 227–231.

- Gocek, E., Bauraska, H., Marchwicka, A., Marcinkowska, E., 2012. Regulation of Leukemic Cell Differentiation through the Vitamin D Receptor at the Levels of Intracellular Signal Transduction, Gene Transcription, and Protein Trafficking and Stability. *Leuk. Res. Treat.* 2012, 1–11.
- Greish, K., 2010. Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect for Anticancer Nanomedicine Drug Targeting, in: Grobmyer, S.R., Moudgil, B.M. (Eds.), *Cancer Nanotechnology*. Humana Press 624, 25–37.
- Gustafson, H.H., Holt-Casper, D., Grainger, D.W., Ghandehari, H., 2015. Nanoparticle uptake: The phagocyte problem. *Nano Today* 10, 487–510.
- Guterres, S.S., Fessi, H., Barratt, G., Devissaguet, J.-P., Puisieux, F., 1995. Poly (DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study. *Int. J. Pharm.* 113, 57–63.
- Hansen, C.M., 2007. Hansen solubility parameters a user's handbook. CRC Press, Boca Raton.
- He, C., Hu, Y., Yin, L., Tang, C., Yin, C., 2010. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials* 31, 3657–3666.
- Kamaly, N., Yameen, B., Wu, J., Farokhzad, O.C., 2016. Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release. *Chem. Rev.* 116, 2602–2663.
- Krishnan, A.V., Feldman, D., 2011. Mechanisms of the Anti-Cancer and Anti-Inflammatory Actions of Vitamin D. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 51, 311–336.
- Krishnan, A.V., Swami, S., Feldman, D., 2010. Vitamin D and breast cancer: Inhibition of estrogen synthesis and signaling. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 121, 343–348.
- Luo, Y., 2006. Targeting tumor-associated macrophages as a novel strategy against breast cancer. *J. Clin. Invest.* 116, 2132–2141.
- Mantovani, A., Locati, M., 2013. Tumor-Associated Macrophages as a Paradigm of Macrophage Plasticity, Diversity, and Polarization: Lessons and Open Questions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33, 1478–1483.
- Miller, M.A., Zheng, Y.-R., Gadde, S., Pfirschke, C., Zope, H., Engblom, C., Kohler, R.H., Iwamoto, Y., Yang, K.S., Askevold, B., Kolishetti, N., Pittet, M., Lippard, S.J., Farokhzad, O.C., Weissleder, R., 2015a. Tumour-associated macrophages act as a slow-release reservoir of nano-therapeutic Pt(IV) pro-drug. *Nat. Commun.* 6, 8692–9004.
- Mishra, P., Nayak, B., Dey, R.K., 2016. PEGylation in anti-cancer therapy: An overview. *Asian J. Pharm. Sci.* 11, 337–348.
- Moghimi, S.M., Parhamifar, L., Ahmadvand, D., Wibroe, P.P., Andresen, T.L., Farhangrazi, Z.S., Hunter, A.C., 2012. Particulate Systems for Targeting of Macrophages: Basic and Therapeutic Concepts. *J. Innate Immun.* 4, 509–528.
- Monkawa, T., Yoshida, T., Hayashi, M., Saruta, T., 2000. Identification of 25-hydroxyvitamin D3 1 α -hydroxylase gene expression in macrophages. *Kidney Int.* 58, 559–568.
- Mora-Huertas, C.E., Fessi, H., Elaissari, A., 2010. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int. J. Pharm.* 385, 113–142.
- Nguyen, T.L.U., Tey, S.Y., Pourgholami, M.H., Morris, D.L., Davis, T.P., Barner-Kowollik, C., Stenzel, M.H., 2007. Synthesis of semi-biodegradable crosslinked microspheres for the delivery of 1,25 dihydroxyvitamin D3 for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Eur. Polym. J.* 43, 1754–1767.
- Nicolas, S., Bolzinger, M.-A., Jordheim, L.P., Chevalier, Y., Fessi, H., Almouazen, E., 2018. Polymeric nanocapsules as drug carriers for sustained anticancer activity of calcitriol in breast cancer cells. *Int. J. Pharm.* 550, 170–179.

- Nicolete, R., Santos, D.F. dos, Faccioli, L.H., 2011. The uptake of PLGA micro or nanoparticles by macrophages provokes distinct *in vitro* inflammatory response. *Int. Immunopharmacol.* 11, 1557–1563.
- Owensiii, D., Peppas, N., 2006. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 307, 93–102.
- Pálmer, H.G., González-Sancho, J.M., Espada, J., Berciano, M.T., Puig, I., Baulida, J., Quintanilla, M., Cano, A., de Herreros, A.G., Lafarga, M., Muñoz, A., 2001. Vitamin D₃ promotes the differentiation of colon carcinoma cells by the induction of E-cadherin and the inhibition of β -catenin signaling. *J. Cell Biol.* 154, 369–388.
- Poletto, F.S., Jäger, E., Cruz, L., Pohlmann, A.R., Guterres, S.S., 2008. The effect of polymeric wall on the permeability of drug-loaded nanocapsules. *Mater. Sci. Eng. C* 28, 472–478.
- Rajh, M., Dolinar, K., Miš, K., Pavlin, M., Pirkmajer, S., 2016. Medium Renewal Blocks Anti-Proliferative Effects of Metformin in Cultured MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *PLOS ONE* 11, e0154747.
- Ramalho, M.J., Loureiro, J.A., Gomes, B., Frasco, M.F., Coelho, M.A.N., Pereira, M.C., 2015. PLGA nanoparticles as a platform for vitamin D-based cancer therapy. *Beilstein J. Nanotechnol.* 6, 1306–1318.
- Romero-Cano, M., Vincent, B., 2002. Controlled release of 4-nitroanisole from poly(lactic acid) nanoparticles. *J. Controlled Release* 82, 127–135.
- Sabzichi, M., Mohammadian, J., Mohammadi, M., Jahanfar, F., Movassagh Pour, A.A., Hamishehkar, H., Ostad-Rahimi, A., 2017. Vitamin D-Loaded Nanostructured Lipid Carrier (NLC): A New Strategy for Enhancing Efficacy of Doxorubicin in Breast Cancer Treatment. *Nutr. Cancer* 69, 840–848.
- Saracligil, B., Ozturk, B., Unlu, A., Abusoglu, S., Tekin, G., 2017. The effect of vitamin D on MCF-7 breast cancer cell metabolism. *Bratisl. Med. J.* 118, 101–106.
- Scher, H.I., Jia, X., Chi, K., de Wit, R., Berry, W.R., Albers, P., Henick, B., Waterhouse, D., Ruether, D.J., Rosen, P.J., Meluch, A.A., Nordquist, L.T., Venner, P.M., Heidenreich, A., Chu, L., Heller, G., 2011. Randomized, Open-Label Phase III Trial of Docetaxel Plus High-Dose Calcitriol Versus Docetaxel Plus Prednisone for Patients With Castration-Resistant Prostate Cancer. *J. Clin. Oncol.* 29, 2191–2198.
- Sharma, G., Valenta, D.T., Altman, Y., Harvey, S., Xie, H., Mitragotri, S., Smith, J.W., 2010. Polymer particle shape independently influences binding and internalization by macrophages. *J. Controlled Release* 147, 408–412.
- Simboli-Campbell, M., Narvaez, C.J., Tenniswood, M., Welsh, J., 1996. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ induces morphological and biochemical markers of apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 58, 367–376.
- Simboli-Campbell, M., Narvaez, C.J., VanWeelden, K., Tenniswood, M., Welsh, J., 1997. Comparative effects of 1,25(OH)₂D₃ and EB1089 on cell cycle kinetics and apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* 42, 31–41.
- Soma, C.E., Dubernet, C., Barratt, G., Benita, S., Couvreur, P., 2000. Investigation of the role of macrophages on the cytotoxicity of doxorubicin and doxorubicin-loaded nanoparticles on M5076 cells *in vitro*. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 68, 283–289.
- Sousa, S., Auriola, S., Mönkkönen, J., Määttä, J., 2015a. Liposome encapsulated zoledronate favours M1-like behaviour in murine macrophages cultured with soluble factors from breast cancer cells. *BMC Cancer* 15, 4-14.
- Stewart, D.A., Yang, Y., Makowski, L., Troester, M.A., 2012. Basal-like Breast Cancer Cells Induce Phenotypic and Genomic Changes in Macrophages. *Mol. Cancer Res.* 10, 727–738.

- Teixeira, M., Alonso, M.J., Pinto, M.M.M., Barbosa, C.M., 2005. Development and characterization of PLGA nanospheres and nanocapsules containing xanthone and 3-methoxyxanthone. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 59, 491–500.
- Ting, H.-J., Hsu, J., Bao, B.-Y., Lee, Y.-F., 2007. Docetaxel-induced growth inhibition and apoptosis in androgen independent prostate cancer cells are enhanced by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3. *Cancer Lett.* 247, 122–129.
- Trynda, J., Turlej, E., Milczarek, M., Pietraszek, A., Chodyński, M., Kutner, A., Wietrzyk, J., 2015. Antiproliferative Activity and *in vivo* Toxicity of Double-Point Modified Analogs of 1,25-Dihydroxyergocalciferol. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 24873–24894.
- Vinhas, R., Mendes, R., Fernandes, A.R., Baptista, P.V., 2017. Nanoparticles—Emerging Potential for Managing Leukemia and Lymphoma. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 5, 1-10.
- Ward, R., Sims, A.H., Lee, A., Lo, C., Wynne, L., Yusuf, H., Gregson, H., Lisanti, M.P., Sotgia, F., Landberg, G., Lamb, R., 2015. Monocytes and macrophages, implications for breast cancer migration and stem cell-like activity and treatment. *Oncotarget* 6, 14687–14699.
- Xu, H., Soruri, A., Gieseler, R.K., Peters, J.H., 1993. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 exerts opposing effects to IL-4 on MHC class-II antigen expression, accessory activity, and phagocytosis of human monocytes. *Scand. J. Immunol.* 38, 535–540.
- Yang, J., Li, X., Liu, X., Liu, Y., 2015. The role of tumor-associated macrophages in breast carcinoma invasion and metastasis. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8, 6656–6664.
- Zanganeh, S., Hutter, G., Spitler, R., Lenkov, O., Mahmoudi, M., Shaw, A., Pajarinen, J.S., Nejadnik, H., Goodman, S., Moseley, M., Coussens, L.M., Daldrup-Link, H.E., 2016. Iron oxide nanoparticles inhibit tumour growth by inducing pro-inflammatory macrophage polarization in tumour tissues. *Nat. Nanotechnol.* 11, 986–994.

Conclusion et perspectives

Dans ce projet, nous avons développé des nanocapsules de calcitriol à base d'acide poly(D,L)lactique et de triglycérides (ratio 1:2) d'une taille de 200 nm et présentant une libération prolongée du principe actif. Ces nanoparticules permettent de potentialiser ses activités antiproliférative et cytotoxique vis-à-vis d'une lignée cellulaire d'adénocarcinome mammaire humain. Cependant, qu'en est-il pour son activité pro-différentiative ? Afin de répondre à cette question, les études *in vitro* sur les cellules de leucémie myéloïde aigue pourraient être poursuivies en quantifiant les marqueurs de différenciation de surface des cellules, en particulier CD14, CD11b, et CD11c (Gocek *et al.*, 2012).

Par ailleurs, de multiples études pourraient être mises en place afin d'élucider la participation des macrophages à l'activité cytotoxique du calcitriol. Pour commencer, l'évaluation d'une telle implication des macrophages pourrait être élargie à l'activité antiproliférative du calcitriol dans le cas des co-cultures mettant en jeu des cellules de cancer du sein.

Diverses études visant à élucider les mécanismes mis en jeu dans l'implication des macrophages sont également envisageables. Par exemple, des co-cultures des macrophages THP-1 avec une lignée cellulaire cancéreuse résistante au calcitriol pourraient être mises en place. L'évaluation de l'activité cytotoxique du calcitriol dans ces conditions permettrait d'évaluer le mécanisme impliqué dans l'activité des macrophages, et notamment de confirmer leur activation pour phagocyter les cellules cancéreuses dans le cas où la viabilité des cellules cancéreuses chuterait. Par ailleurs, le phénotype des macrophages pourrait être déterminé avant et après exposition au calcitriol encapsulé ou libre, ainsi qu'avant d'être co-cultivés avec les cellules cancéreuses et après différentes durées de co-cultures. Les macrophages définis comme pro-tumoraux et anti-tumoraux expriment en effet des récepteurs de surface différents et présentent un profil de sécrétion qui leur est propre. Les stratégies d'évaluation du phénotype des macrophages sont bien décrites dans la littérature, notamment (Weigert *et al.*, 2007; Sousa *et al.*, 2015b):

- La quantification des cytokines produites par ces derniers, TNF- α (caractéristique d'un phénotype anti-tumoral), TGF- β , IL-10, IL-8, ou VEGF (caractéristiques d'un phénotype pro-tumoral)
- La quantification des récepteurs de surface avec par exemple le récepteur CD163, caractéristique des macrophages pro-tumoraux.

Cela pourrait être complété avec une étude à visée mécanistique dans le but d'évaluer l'influence du phénotype des macrophages vis-à-vis de leur implication dans l'activité anti-cancéreuse du calcitriol sur les cellules MCF-7 ou tout autre modèle tumoral. Pour ce faire, des co-cultures des cellules

cancéreuses avec non pas des macrophages classiques mais avec des macrophages préalablement polarisés vers un phénotype considéré comme pro- ou anti-tumoral pourraient être établies (Genin *et al.*, 2015). D'autres macrophages, par exemple issus de la différenciation des monocytes issus de prélèvements sanguins chez l'homme, doivent aussi être considérés pour extrapoler les résultats obtenus à l'issue de ces travaux.

D'autre part, les études *in vitro* ayant démontré l'intérêt de l'encapsulation du calcitriol doivent être poursuivies par des études *in vivo*. Ces dernières permettront d'évaluer l'importance de l'encapsulation tant vis-à-vis de la réduction des effets secondaires imputés à l'utilisation du calcitriol que vis-à-vis de la potentialisation de son efficacité thérapeutique en tant qu'agent anti-cancéreux. En ce sens, les études préliminaires de la calcémie post-administration intra-tumorale du calcitriol chez des modèles murins de lymphome de Burkitt (Raji) et de carcinome mammaire (MDA-MB-231) ont permis de démontrer qu'un traitement hebdomadaire avec 0,125 µg de calcitriol (voie intratumorale) était envisageable. En effet, bien qu'une augmentation de la calcémie ait été observée 24 heures après traitement, un retour à la calcémie initiale 7 jours après traitement a été démontré.

Par ailleurs, diverses combinaisons thérapeutiques impliquant l'utilisation du calcitriol ont démontré leur intérêt en clinique (Woloszynska-Read *et al.*, 2011). Ainsi, les effets synergiques entre le calcitriol et divers agents cytotoxiques utilisés en chimiothérapie anti-cancéreuse sont reportés dans la littérature (Ahmed *et al.*, 2002; Hershberger *et al.*, 2001; Moffatt *et al.*, 1999; Ting *et al.*, 2007). En ce sens et à la suite des études ayant démontré l'activité du calcitriol sur la lignée de leucémie myéloïde aigüe MV4-11, nous avons réalisé une étude préliminaire *in vitro* visant à définir l'intérêt potentiel de la combinaison du calcitriol avec la cytarabine, utilisée en clinique pour le traitement des leucémies mais dont l'efficacité s'avère parfois limitée. Notre choix s'est porté sur la cytarabine car l'évaluation d'une telle combinaison thérapeutique a déjà fait l'objet de quelques études *in vitro*, *in vivo*, et même cliniques qui ont démontré des résultats prometteurs (Slapak *et al.*, 1992; Studzinski *et al.*, 1986; Makishima *et al.*, 1998; Yamada *et al.*, 2006). Bien que les résultats obtenus au cours de notre étude aillent dans le sens des études déjà réalisées, à savoir vers une synergie entre les deux actifs, des résultats complémentaires sont nécessaires *in vitro* avant de pouvoir faire l'objet d'études *in vivo*.

Enfin, dans la continuité de ce projet, les nanoparticules pourront être PEGylées pour permettre un ciblage tumoral après administration intraveineuse des formules. En effet, en clinique, l'injection intra-tumorale est à ce jour majoritairement proscrite du fait du risque important de dissémination des cellules néoplasiques dans la circulation sanguine pouvant aboutir à la formation de métastases. Par ailleurs, l'encapsulation d'autres actifs anti-cancéreux ou immunomodulateurs dans les nanocapsules développées ainsi que leur intérêt thérapeutique pourra aussi être étudiée.

Références

- Ahmed, S., Johnson, C.S., Rueger, R.M., Trump, D.L., 2002. Calcitriol (1,25-Dihydroxycholecalciferol) Potentiates Activity of Mitoxantrone/Dexamethasone in an Androgen Independent Prostate Cancer Model. *J. Urol.* 168, 756–761.
- Genin, M., Clement, F., Fattaccioli, A., Raes, M., Michiels, C., 2015. M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. *BMC Cancer* 15, 577-590.
- Gocek, E., Bauraska, H., Marchwicka, A., Marcinkowska, E., 2012. Regulation of Leukemic Cell Differentiation through the Vitamin D Receptor at the Levels of Intracellular Signal Transduction, Gene Transcription, and Protein Trafficking and Stability. *Leuk. Res. Treat.* 2012, 1–11.
- Hershberger, P.A., Yu, W.D., Modzelewski, R.A., Rueger, R.M., Johnson, C.S., Trump, D.L., 2001. Calcitriol (1,25-dihydroxycholecalciferol) enhances paclitaxel antitumor activity *in vitro* and *in vivo* and accelerates paclitaxel-induced apoptosis. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 7, 1043–1051.
- Makishima, M., Okabe-Kado, J., Honma, Y., 1998. Growth inhibition and differentiation induction in human monoblastic leukaemia cells by 1 α -hydroxyvitamin D derivatives and their enhancement by combination with hydroxyurea. *Br. J. Cancer* 77, 33–39.
- Moffatt, K.A., Johannes, W.U., Miller, G.J., 1999. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ and platinum drugs act synergistically to inhibit the growth of prostate cancer cell lines. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 5, 695–703.
- Slapak, C.A., Desforges, J.F., Fogaren, T., Miller, K.B., 1992. Treatment of acute myeloid leukemia in the elderly with low-dose cytarabine, hydroxyurea, and calcitriol. *Am. J. Hematol.* 41, 178–183.
- Sousa, S., Brion, R., Lintunen, M., Kronqvist, P., Sandholm, J., Mönkkönen, J., Kellokumpu-Lehtinen, P.-L., Lauttia, S., Tynninen, O., Joensuu, H., Heymann, D., Määttä, J.A., 2015b. Human breast cancer cells educate macrophages toward the M2 activation status. *Breast Cancer Res.* 17, 101-114.
- Studzinski, G.P., Bhandal, A.K., Breivi, Z.S., 1986. Potentiation by 1- α ,25-Oihydroxyvitamin D₃ of Cytotoxicity to HL-60 Cells Produced by Cytarabine and Hydroxyurea. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 76, 641–648.
- Weigert, A., Tzieply, N., von Knethen, A., Johann, A.M., Schmidt, H., Geisslinger, G., Brüne, B., 2007. Tumor Cell Apoptosis Polarizes Macrophages—Role of Sphingosine-1-Phosphate. *Mol. Biol. Cell* 18, 3810–3819.
- Woloszynska-Read, A., Johnson, C.S., Trump, D.L., 2011. Vitamin D and cancer: Clinical aspects. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 25, 605–615.
- Yamada, K., Mizusawa, M., Harima, A., Kajiwara, K., Hamaki, T., Hoshi, K., Kozai, Y., Kodo, H., 2006. Induction of remission of relapsed acute myeloid leukemia after unrelated donor cord blood transplantation by concomitant low-dose cytarabine and calcitriol in adults. *Eur. J. Haematol.* 77, 345–348.

Annexe : Sélection d'une lignée cellulaire sensible au calcitriol

Dans l'esprit de trouver un modèle sensible à l'activité du calcitriol plus performant que le modèle murin de xéno greffe MCF-7 en terme de croissance tumorale, l'activité antiproliférative du calcitriol a été évaluée *in vitro* sur différentes lignées cellulaires cancéreuses pour lesquelles la présence du récepteur à la vitamine D (VDR) et/ou la sensibilité au calcitriol sont décrites dans la littérature. Quatre lignées cellulaires ont ainsi été sélectionnées : des lignées humaines de leucémie (MV4-11 et HL-60), une lignée murine de cancer du sein (4T1) et une lignée de lymphome (SUDHL4).

Ainsi, Trynda *et al.* ont démontré la sensibilité des lignées de leucémie myéloïde aigüe MV4-11 et de leucémie promyélocytaire aigüe HL-60 au calcitriol et ses analogues *in vitro*, avec des concentrations en calcitriol inhibant 50% de la prolifération cellulaire (IC₅₀) de respectivement 15,6 ± 8,7 nM et 44,2 ± 16,9 nM après 5 jours d'exposition au calcitriol (Trynda *et al.*, 2015). Une autre étude a permis de mettre en évidence l'activité pro-différentiative du calcitriol sur les cellules MV4-11 (Gocek *et al.*, 2012). La lignée cellulaire de cancer du sein 4T1 exprime le VDR, comme démontré dans plusieurs études, ce qui laisse envisager sa sensibilité au calcitriol. Pourtant, bien qu'étudiée au cours de quelques études, cette dernière n'a à ce jour pas été mise en évidence. Anisiewicz *et al.* n'ont pas observé d'activité antiproliférative du calcitriol *in vitro* sur cette dernière (Anisiewicz *et al.*, 2017), pouvant s'expliquer par un niveau d'expression du VDR relativement faible (Williams *et al.*, 2016) ainsi que par l'agressivité de ce modèle tumoral, aboutissant à une formation rapide de métastases (Williams *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2014). Par ailleurs, de manière surprenante, Anisiewicz *et al.* et Pawlik *et al.* ont démontré que le calcitriol favorisait même le potentiel métastatique de ce modèle tumoral (Anisiewicz *et al.*, 2017; Pawlik *et al.*, 2018). L'activité antiproliférative du calcitriol a par ailleurs été démontré sur la lignée cellulaire de lymphome diffus à grandes cellules B SUDHL4 (Hickish *et al.*, 1993). Bien que l'expression du VDR par la lignée soit initialement faible et que l'exposition des cellules SUDHL4 au calcitriol tende à diminuer cette expression, Hickish *et al.* ont observé un effet antiprolifératif du calcitriol après exposition des cellules SUDHL4 à une concentration de 10⁻⁷ M durant au moins 4 jours, mais pas d'effet aux concentrations inférieures testées (10⁻⁸ et 10⁻⁹ M). Dans les mêmes conditions, les auteurs ont observé l'effet pro-différentiatif du calcitriol (Hickish *et al.*, 1993).

Les lignées cellulaires humaines de leucémie myéloïde aigüe (MV4-11), de leucémie promyélocytaire aigüe (HL-60) et de lymphome diffus à grandes cellules B (SUDHL4) (American Type Culture Collection, USA) sont cultivées en suspension à 37 °C en présence de 5% de CO₂ dans du milieu

RPMI 1640 complet. Afin d'évaluer l'activité antiproliférative du calcitriol, elles ont étéensemencées dans des plaques 96 puits à fond rond à des densités respectives de 5000, 10 000 et 20 000 cellules par puits. La lignée cellulaire murine de cancer du sein 4T1 (American Type Culture Collection, USA) est quant à elle adhérente, et cultivée dans les mêmes conditions excepté le milieu qui est du DMEM complet. Afin d'évaluer l'activité antiproliférative du calcitriol sur ces cellules, elles ont étéensemencées dans des plaques 96 puits à fond plat à une densité de 5000 cellules par puits, et requièrent 24 heures pour adhérer aux plaques avant l'exposition au calcitriol. A J0, les cellules sont exposées à différentes concentrations en calcitriol libre (10 – 1000 nM). Après 4 jours d'incubation avec le calcitriol (J4), les cellules sont rincées avec du PBS et du milieu de culture cellulaire complet est ajouté dans les puits. Les cellules non exposées font office de contrôle. Après 7 jours (J7), le nombre de cellules vivantes est estimé par un essai MTT.

L'évaluation de l'activité antiproliférative du calcitriol sur ces 4 lignées cellulaire a permis de mettre en évidence la sensibilité de la lignée cellulaire de leucémie myéloïde aigüe MV4-11 au calcitriol mais une faible sensibilité voire une résistance des autres lignées cellulaires à l'activité antiproliférative exercée par ce dernier (Figure S5). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Anisiewicz *et al.* pour la lignée cellulaire 4T1 pour laquelle les mécanismes à l'origine de la résistance à l'activité du calcitriol malgré la présence du récepteur restent à ce jour inconnus (Anisiewicz *et al.*, 2017). Cependant, ces observations diffèrent des résultats obtenus au cours d'autres études réalisées avec les lignées cellulaires HL-60 et SUDHL4 et nécessitent des études complémentaires, notamment pour la lignée cellulaire HL-60 pour laquelle des résultats surprenants sont obtenus (Hickish *et al.*, 1993; Trynda *et al.*, 2015). En effet, une viabilité de ces dernières de $65 \pm 6\%$ est observée après exposition à 100 nM de calcitriol alors que $97 \pm 8\%$ des cellules sont viables après exposition à une concentration en calcitriol 10 fois plus élevée ($p < 0,05$, Figure S5).

Le modèle de leucémie myéloïde aigüe ressort donc comme un modèle de choix pour l'établissement d'un modèle murin de xénogreffe sur lequel l'intérêt de la vectorisation du calcitriol pourra être évalué, tant d'un point de vue efficacité que toxicité.

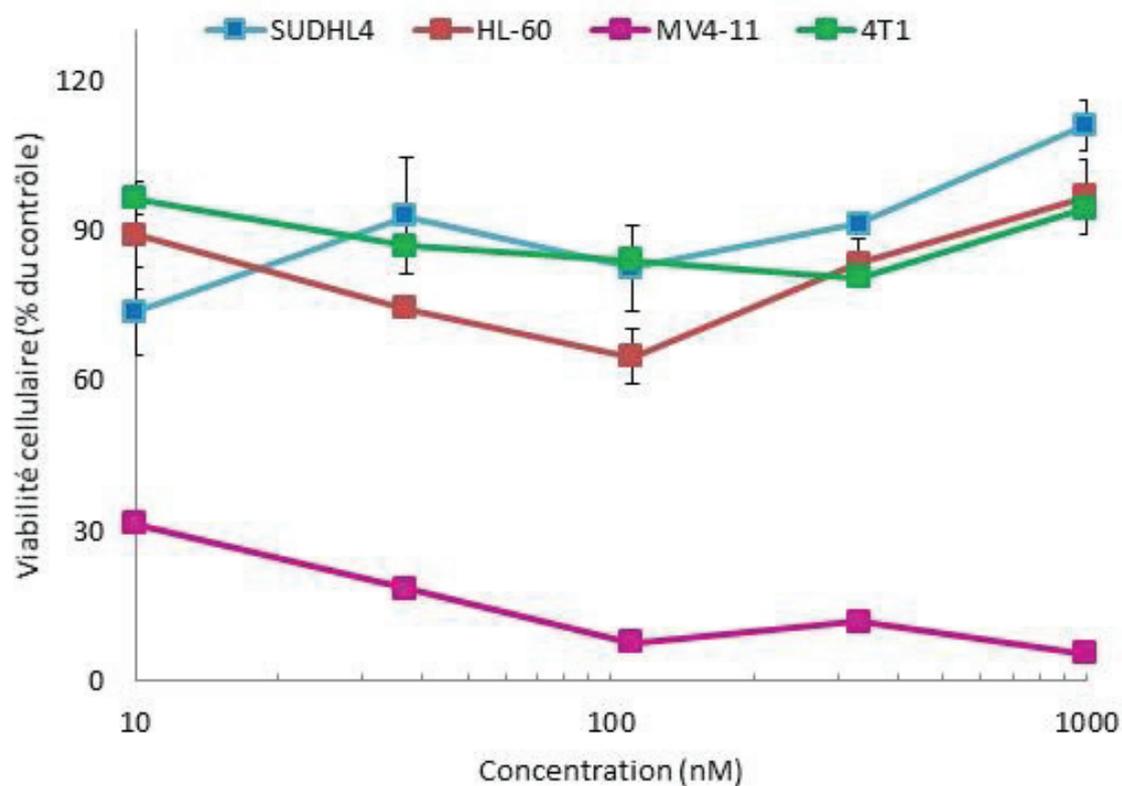


Figure S5. Activité antiproliférative du calcitriol libre sur différentes lignées cellulaires. Après 7 jours d'exposition des cellules au calcitriol libre (10 – 1000 nM), la viabilité cellulaire a été évaluée par un essai MTT. Les données sont représentées en tant que pourcentage de cellules par rapport aux cellules non exposées dont la viabilité est considérée à 100% (moyenne \pm SEM, n=3).

Résumé

Les macrophages (M ϕ) infiltrés dans les tumeurs orchestrent les différentes étapes du développement tumoral. De par leur capacité à internaliser les nanoparticules (NPs) et leur plasticité phénotypique, ils sont impliqués dans l'efficacité thérapeutique des actifs vectorisés par un rôle de réservoir de NPs ou une modulation de leur réponse envers les cellules néoplasiques. Le calcitriol, métabolite actif de la vitamine D, possède des activités à la fois anti-cancéreuse et immunomodulatrice. Sa vectorisation *via* des NPs est une approche thérapeutique intéressante pour potentialiser ses activités tout en limitant les effets secondaires s'opposant à son utilisation clinique dans le cadre de la chimiothérapie. Une étude de formulation a permis de développer des NPs à base d'acide poly(D,L)lactique et de triglycérides (ratio 1:2) d'une taille de 200 nm et présentant une libération prolongée du calcitriol. Des études *in vitro* menées sur les cellules de cancer du sein MCF-7 ont permis de mettre en évidence l'avantage d'une libération prolongée du calcitriol vis-à-vis de son activité antiproliférative aboutissant à une réduction de 65% de la viabilité cellulaire après 10 jours par rapport au contrôle, non observable avec le calcitriol libre. La participation active des M ϕ à l'activité cytotoxique du calcitriol sur les lignées cellulaires de cancer du sein MCF-7 et de leucémie MV4-11 a aussi été mise en évidence par un modèle de co-culture *in vitro*. En effet, les NPs de calcitriol, après internalisation par les M ϕ , provoquent une action cytotoxique prolongée contre les cellules MCF-7 en co-culture au bout de 10 jours avec seulement 20% de cellules viables vs 70% en l'absence de M ϕ .

Mots-clés : calcitriol, nanoparticules polymères, macrophages, cancer du sein, leucémie

Abstract

Tumor associated macrophages (M ϕ) orchestrate the different stages of tumor development. They are able to internalize nanoparticles (NPs) and are known for their phenotypic plasticity, which make them interesting targets for cancer treatment through the storage of NPs or a modulation of their activity towards the neoplastic cells. Calcitriol, the active metabolite of vitamin D, exerts both anticancer and immunomodulatory activities. Its vectorization *via* NPs is an interesting therapeutic approach to potentiate its activities while limiting its side effects, which hamper its current clinical use in chemotherapy. We developed poly (D, L) lactic acid and triglyceride-based NPs (1:2 ratio) measuring 200 nm and exhibiting a sustained release of calcitriol. *In vitro* studies, performed on breast cancer cells (MCF-7), showed the advantages of a sustained release of calcitriol regarding its antiproliferative activity with a 65%-decrease in cell viability after 10 days compared to unexposed cells, while it was unobservable for free calcitriol. The implication of M ϕ in the cytotoxic activity of calcitriol towards MCF-7 cells and MV4-11 cells (leukemia) cells has been demonstrated using an *in vitro* co-culture model. Calcitriol-NPs showed a sustained cytotoxic activity towards MCF-7 cells in co-cultures after 10 days, through their uptake by M ϕ , with a decrease in cell viability of 80% vs 30% in mono-cultures.

Keywords: calcitriol, polymeric nanoparticles, macrophages, breast cancer, leukemia