

2022-2023

**Thèse**

pour le

**Diplôme d'État de Docteur en  
Pharmacie**

**Stratégie thérapeutique de  
l'hépatocarcinome : pertinence de la  
vectorisation ?**

**Delaporte Flavien**

Né le 26/06/1992 à Le Mans (72)

Sous la direction de Mme. Savary Camille

Membres du jury

Catherine Passirani-Malleret	Présidente
Camille Savary	Directrice
Jérôme Boursier	Membre
Gaël Le Roux	Membre
Matthew Burbank	Membre

Soutenue publiquement le :  
25/10/2023



**FACULTÉ  
DE SANTÉ**

UNIVERSITÉ D'ANGERS

# ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné DELAPORTE Flavien  
déclare être pleinement conscient que le plagiat de documents ou d'une  
partie d'un document publiée sur toutes formes de support, y compris l'internet,  
constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.  
En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées  
pour écrire ce rapport ou mémoire.

Flavien Delaporte le **14/09/2023**



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



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

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

# LISTE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTÉ DE SANTÉ D'ANGERS

---

**Doyen de la Faculté** : Pr Nicolas Lerolle

**Vice-Doyen de la Faculté et directeur du département de pharmacie** : Pr Sébastien Faure

**Directeur du département de médecine** : Pr Cédric Annweiler

## PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS

ABRAHAM Pierre	PHYSIOLOGIE	Médecine
ANGOULVANT Cécile	MEDECINE GENERALE	Médecine
ANNWEILER Cédric	GERIATRIE ET BIOLOGIE DU VIEILLISSEMENT	Médecine
ASFAR Pierre	REANIMATION	Médecine
AUBE Christophe	RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE	Médecine
AUGUSTO Jean-François	NEPHROLOGIE	Médecine
BAUFRETON Christophe	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIOVASCULAIRE	Médecine
BELLANGER William	MEDECINE GENERALE	Médecine
BENOIT Jean-Pierre	PHARMACOTECHNIE	Pharmacie
BIERE Loïc	CARDIOLOGIE	Médecine
BIGOT Pierre	UROLOGIE	Médecine
BONNEAU Dominique	GENETIQUE	Médecine
BOUCHARA Jean-Philippe	PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE	Médecine
BOUET Pierre-Emmanuel	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE	Médecine
BOUVARD Béatrice	RHUMATOLOGIE	Médecine
BOURSIER Jérôme	GASTROENTEROLOGIE ; HEPATOLOGIE	Médecine
BRIET Marie	PHARMACOLOGIE	Médecine
CALES Paul	GASTROENTEROLOGIE ; HEPATOLOGIE	Médecine
CAMPONE Mario	CANCEROLOGIE ; RADIOTHERAPIE	Médecine
CAROLI-BOSC François-Xavier	GASTROENTEROLOGIE ; HEPATOLOGIE	Médecine
CASSEREAU Julien	NEUROLOGIE	Médecine
CONNAN Laurent	MEDECINE GENERALE	Médecine
COPIN Marie-Christine	ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES	Médecine
COUTANT Régis	PEDIATRIE	Médecine
CUSTAUD Marc-Antoine	PHYSIOLOGIE	Médecine
CRAUSTE-MANCIET Sylvie	PHARMACOTECHNIE HOSPITALIERE	Pharmacie
DE CASABIANCA Catherine	MEDECINE GENERALE	Médecine
DESCAMPS Philippe	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE	Médecine
D'ESCATHA Alexis	MEDECINE ET SANTE AU TRAVAIL	Médecine
DINOMAS Mickaël	MEDECINE PHYSIQUE ET DE READAPTATION	Médecine
DUBEE Vincent	MALADIES INFECTIEUSES ET TROPICALES	Médecine
DUCANCELLE Alexandra	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE ; HYGIENE HOSPITALIERE	Médecine
DUVAL Olivier	CHIMIE THERAPEUTIQUE	Pharmacie
DUVERGER Philippe	PEDOPSYCHIATRIE	Médecine
EVEILLARD Mathieu	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE	Pharmacie
FAURE Sébastien	PHARMACOLOGIE PHYSIOLOGIE	Pharmacie
FOURNIER Henri-Dominique	ANATOMIE	Médecine
FOUQUET Olivier	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIOVASCULAIRE	Médecine
FURBER Alain	CARDIOLOGIE	Médecine
GAGNADOUX Frédéric	PNEUMOLOGIE	Médecine
GOHIER Bénédicte	PSYCHIATRIE D'ADULTES	Médecine
GUARDIOLA Philippe	HEMATOLOGIE ; TRANSFUSION	Médecine
GUILLET David	CHIMIE ANALYTIQUE	Pharmacie
HAMY Antoine	CHIRURGIE GENERALE	Médecine
HENNI Samir	MEDECINE VASCULAIRE	Médecine
HUNAUT-BERGER Mathilde	HEMATOLOGIE ; TRANSFUSION	Médecine

IFRAH Norbert	HEMATOLOGIE ; TRANSFUSION	Médecine
JEANNIN Pascale	IMMUNOLOGIE	Médecine
KEMPF Marie	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE ; HYGIENE HOSPITALIERE	Médecine
KUN-DARBOIS Daniel	CHIRURGIE MAXILLO-FACIALE ET STOMATOLOGIE	Médecine
LACOEUILLE FRANCK	RADIOPHARMACIE	Pharmacie
LACCOURREYE Laurent	OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE	Médecine
LAGARCE Frédéric	BIOPHARMACIE	Pharmacie
LARCHER Gérald	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRES	Pharmacie
LASOCKI Sigismond	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION	Médecine
LEBDAI Souhil	UROLOGIE	Médecine
LEGENDRE Guillaume	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE	Médecine
LEGRAND Erick	RHUMATOLOGIE	Médecine
LERMITE Emilie	CHIRURGIE GENERALE	Médecine
LEROLLE Nicolas	REANIMATION	Médecine
LUNEL-FABIANI Françoise	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE ; HYGIENE HOSPITALIERE	Médecine
MARCHAIS Véronique	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE	Pharmacie
MARTIN Ludovic	DERMATO-VERERELOGIE	Médecine
MAY-PANLOUP Pascale	BIOLOGIE ET MEDECINE DU DEVELOPPEMENT ET DE LA REPRODUCTION	Médecine
MENEI Philippe	NEUROCHIRURGIE	Médecine
MERCAT Alain	REANIMATION	Médecine
PAPON Nicolas	PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE	Pharmacie
PASSIRANI Catherine	CHIMIE GENERALE	Pharmacie
PELLIER Isabelle	PEDIATRIE	Médecine
PETIT Audrey	MEDECINE ET SANTE AU TRAVAIL	Médecine
PICQUET Jean	CHIRURGIE VASCULAIRE ; MEDECINE VASCULAIRE	Médecine
PODEVIN Guillaume	CHIRURGIE INFANTILE	Médecine
PROCACCIO Vincent	GENETIQUE	Médecine
PRUNIER Delphine	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE	Médecine
PRUNIER Fabrice	CARDIOLOGIE	Médecine
RAMOND-ROQUIN Aline	MEDECINE GENERALE	Médecine
REYNIER Pascal	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE	Médecine
RICHARD Isabelle	MEDECINE PHYSIQUE ET DE READAPTATION	Médecine
RICHOMME Pascal	PHARMACOGNOSIE	Pharmacie
RIOU Jérémie	BIostatistiques	Pharmacie
RODIEN Patrice	ENDOCRINOLOGIE, DIABETE ET MALADIES METABOLIQUES	Médecine
ROQUELAURE Yves	MEDECINE ET SANTE AU TRAVAIL	Médecine
ROUGE-MAILLART Clotilde	MEDECINE LEGALE ET DROIT DE LA SANTE	Médecine
ROUSSEAU Audrey	ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES	Médecine
ROUSSEAU Pascal	CHIRURGIE PLASTIQUE, RECONSTRUCTRICE ET ESTHETIQUE	Médecine
ROUSSELET Marie-Christine	ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES	Médecine
ROY Pierre-Marie	MEDECINE D'URGENCE	Médecine
SAULNIER Patrick	BIOPHYSIQUE ET BIostatistiques	Pharmacie
SERAPHIN Denis	CHIMIE ORGANIQUE	Pharmacie
SCHMIDT Aline	HEMATOLOGIE ; TRANSFUSION	Médecine
TESSIER-CAZENEUVE Christine	MEDECINE GENERALE	Médecine
TRZEPIZUR Wojciech	PNEUMOLOGIE	Médecine
UGO Valérie	HEMATOLOGIE ; TRANSFUSION	Médecine
URBAN Thierry	PNEUMOLOGIE	Médecine
VAN BOGAERT Patrick	PEDIATRIE	Médecine
VENARA Aurélien	CHIRURGIE VISCERALE ET DIGESTIVE	Médecine
VENIER-JULIENNE Marie-Claire	PHARMACOTECHNIE	Pharmacie
VERNY Christophe	NEUROLOGIE	Médecine
WILLOTEAUX Serge	RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE	Médecine



## MAÎTRES DE CONFÉRENCES

BAGLIN Isabelle	CHIMIE THERAPEUTIQUE	Pharmacie
BASTIAT Guillaume	BIOPHYSIQUE ET BIOSTATISTIQUES	Pharmacie
BEAUVILLAIN Céline	IMMUNOLOGIE	Médecine
BEGUE Cyril	MEDECINE GENERALE	Médecine
BELIZNA Cristina	MEDECINE INTERNE	Médecine
BELONCLE François	REANIMATION	Médecine
BENOIT Jacqueline	PHARMACOLOGIE	Pharmacie
BESSAGUET Flavien	PHYSIOLOGIE PHARMACOLOGIE	Pharmacie
BLANCHET Odile	HEMATOLOGIE ; TRANSFUSION	Médecine
BOISARD Séverine	CHIMIE ANALYTIQUE	Pharmacie
BRIET Claire	ENDOCRINOLOGIE, DIABETE ET MALADIES METABOLIQUES	Médecine
BRIS Céline	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE	Pharmacie
CAPITAIN Olivier	CANCEROLOGIE ; RADIOTHERAPIE	Médecine
CHAO DE LA BARCA Juan-Manuel	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE	Médecine
CHEVALIER Sylvie	BIOLOGIE CELLULAIRE	Médecine
CLERE Nicolas	PHARMACOLOGIE / PHYSIOLOGIE	Pharmacie
COLIN Estelle	GENETIQUE	Médecine
DERBRE Séverine	PHARMACOGNOSIE	Pharmacie
DESHAYES Caroline	BACTERIOLOGIE VIROLOGIE	Pharmacie
DOUILLET Delphine	MEDECINE D'URGENCE	Médecine
FERRE Marc	BIOLOGIE MOLECULAIRE	Médecine
FORTRAT Jacques-Olivier	PHYSIOLOGIE	Médecine
GUELFF Jessica	MEDECINE GENERALE	Médecine
HAMEL Jean-François	BIOSTATISTIQUES, INFORMATIQUE MEDICALE	Médicale
HELESBEUX Jean-Jacques	CHIMIE ORGANIQUE	Pharmacie
HERIVAUX Anaïs	BIOTECHNOLOGIE	Pharmacie
HINDRE François	BIOPHYSIQUE	Médecine
JOUSSET-THULLIER Nathalie	MEDECINE LEGALE ET DROIT DE LA SANTE	Médecine
JUDALET-ILLAND Ghislaine	MEDECINE GENERALE	Médecine
KHIATI Salim	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE	Médecine
LANDREAU Anne	BOTANIQUE/ MYCOLOGIE	Pharmacie
LEGEAY Samuel	PHARMACOCINETIQUE	Pharmacie
LEMEE Jean-Michel	NEUROCHIRURGIE	Médecine
LE RAY-RICHOMME Anne-Marie	PHARMACOGNOSIE	Pharmacie
LEPELTIER Elise	CHIMIE GENERALE	Pharmacie
LETOURNEL Franck	BIOLOGIE CELLULAIRE	Médecine
LIBOUBAN Hélène	HISTOLOGIE	Médecine
LUQUE PAZ Damien	HEMATOLOGIE BIOLOGIQUE	Médecine
MABILLEAU Guillaume	HISTOLOGIE, EMBRYOLOGIE ET CYTOGENETIQUE	Médecine
MALLET Sabine	CHIMIE ANALYTIQUE	Pharmacie
MAROT Agnès	PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE	Pharmacie
MESLIER Nicole	PHYSIOLOGIE	Médecine
MIOT Charline	IMMUNOLOGIE	Médecine
MOUILLIE Jean-Marc	PHILOSOPHIE	Médecine
NAIL BILLAUD Sandrine	IMMUNOLOGIE	Pharmacie
PAILHORIES Hélène	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE	Médecine
PAPON Xavier	ANATOMIE	Médecine
PASCO-PAPON Anne	RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE	Médecine
PECH Brigitte	PHARMACOTECHNIE	Pharmacie
PENCHAUD Anne-Laurence	SOCIOLOGIE	Médecine
PIHET Marc	PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE	Médecine
POIROUX Laurent	SCIENCES INFIRMIERES	Médecine
PY Thibaut	MEDECINE GENERALE	Médecine
RINEAU Emmanuel	ANESTHESIOLOGIE REANIMATION	Médecine
RIQUIN Elise	PEDOPSYCHIATRIE ; ADDICTOLOGIE	Médecine
RONY Louis	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE	Médecine

ROGER Emilie  
 SAVARY Camille  
 SCHMITT Françoise  
 SCHINKOWITZ Andréas  
 SPIESSER-ROBELET Laurence  
 TEXIER-LEGENDRE Gaëlle  
 VIAULT Guillaume

PHARMACOTECHNIE  
 PHARMACOLOGIE-TOXICOLOGIE  
 CHIRURGIE INFANTILE  
 PHARMACOGNOSIE  
 PHARMACIE CLINIQUE ET EDUCATION  
 THERAPEUTIQUE  
 MEDECINE GENERALE  
 CHIMIE ORGANIQUE

Pharmacie  
 Pharmacie  
 Médecine  
 Pharmacie  
 Pharmacie  
 Médecine  
 Pharmacie

## AUTRES ENSEIGNANTS

### ATER

ELHAJ MAHMOUD Dorra

IMMUNOLOGIE

Pharmacie

### PRCE

AUTRET Erwan  
 BARBEROUSSE Michel  
 FISBACH Martine  
 O'SULLIVAN Kayleigh  
 RIVEAU Hélène

ANGLAIS  
 INFORMATIQUE  
 ANGLAIS  
 ANGLAIS  
 ANGLAIS

Santé  
 Santé  
 Santé  
 Santé

### PAST

CAVAILLON Pascal  
 DILÉ Nathalie  
 GUILLET Anne-Françoise  
 MOAL Frédéric  
 PAPIN-PUREN Claire  
 KAASSIS Mehdi  
 GUITTON Christophe  
 SAVARY Dominique  
 POMMIER Pascal  
 PICCOLI Giorgia

PHARMACIE INDUSTRIELLE  
 OFFICINE  
 PHARMACIE DEUST PREPARATEUR  
 PHARMACIE CLINIQUE  
 OFFICINE  
 GASTRO-ENTEROLOGIE  
 MEDECINE INTENSIVE-REANIMATION  
 MEDECINE D'URGENCE  
 CANCEROLOGIE-RADIOTHERAPIE  
 NEPHROLOGIE

Pharmacie  
 Pharmacie  
 Pharmacie  
 Pharmacie  
 Pharmacie  
 Médecine  
 Médecine  
 Médecine  
 Médecine  
 Médecine

### PLP

CHIKH Yamina

ECONOMIE-GESTION

Médecine

# REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres du jury. Votre présence, expertise et évaluation me permettent aujourd'hui de conclure ces longues études de pharmacie. Catherine, merci beaucoup de t'être libérée pour présider cette thèse.

J'aimerais également exprimer ma sincère gratitude envers mon encadrante, Camille Savary, sans qui rien de tout cela n'aurait été possible. Merci de m'avoir pris sous ton aile, merci pour tes corrections, merci pour tes conseils et surtout merci pour ton humanité.

Viennent ensuite mes amis, qu'ils aient été rencontrés à la faculté de pharmacie d'Angers, en médecine, puis pendant mes années d'internat et également au laboratoire MINT pendant ma thèse scientifique. Vous êtes trop nombreux pour tous vous citer mais je tiens à remercier chaleureusement Antoine, Charlie, Milad, Charles, Corentin et Marie-Anne pour leur amitié sans faille. Buddy, I did this one without your help but you know that I wouldn't have been able to advance without you. Shukran sharmouta.

Mon Didou, j'espère pouvoir te compter dans cette assemblée, et que ce soit le cas ou non, tu étais dans les parages presque depuis le début et je ne serais jamais devenu l'homme que je suis aujourd'hui sans toi. Tout simplement merci frangin.

Un immense merci à ma compagne Majda, qui a su me supporter, me remotiver et rester à mes côtés malgré la distance qui nous a séparés pendant quelques années. Cette épreuve est maintenant derrière nous et j'espère sincèrement que la route sera encore longue, tsanbrik hayatou.

Pour finir, je ne saurais comment remercier ma famille proche, mon père Marc, ma mère Nelly, ainsi que ma sœur Valentine pour leur présence aujourd'hui, et surtout pour le soutien inconditionnel ainsi que l'amour qu'ils m'ont toujours offert.

# Table des matières

TABLE DES FIGURES.....	11
TABLE DES TABLEAUX.....	13
LISTE DES ABREVIATIONS .....	14
INTRODUCTION.....	16
1. CHAPITRE 1 : LE FOIE .....	17
1.1. Anatomie .....	17
1.2. Histologie.....	18
1.2.1. Les différentes cellules hépatiques.....	18
1.2.2. Les lobules hépatiques.....	19
1.2.3. Les fonctions hépatiques .....	20
a) Fonctions de synthèse .....	20
b) Fonctions de détoxification.....	20
c) Fonctions de stockage.....	21
2. CHAPITRE 2 : LE CARCINOME HEPATOCELLULAIRE .....	21
2.1. Épidémiologie, incidence et mortalité .....	21
2.2. Facteurs de risque.....	23
2.2.1. Les hépatites virales.....	23
2.2.2. L'aflatoxine B1 (AFB <sub>1</sub> ).....	25
2.2.3. L'alcool .....	26
2.2.4. Le syndrome métabolique .....	26
2.2.5. Autres facteurs de risque.....	26
2.3. Facteurs protecteurs.....	26
2.4. Stades d'évolution vers le carcinome hépatocellulaire.....	27
2.5. Dépistage et diagnostic du cancer hépatocellulaire .....	30
2.5.1. Dépistage .....	30
2.5.2. Diagnostic .....	30
2.6. Classification pronostique : le système BCLC (Barcelona Clinic Liver Cancer).....	31
2.7. Les thérapeutiques actuelles .....	35
2.7.1. Les traitements curatifs .....	35
a) La transplantation.....	35
b) La résection.....	35
c) La destruction percutanée .....	36
d) La radiothérapie stéréotaxique.....	36
e) Traitements adjuvants .....	36
2.7.2. Les traitements palliatifs.....	36
a) La chimioembolisation artérielle .....	36
b) La radioembolisation .....	37
c) Les traitements médicamenteux .....	37
1 <sup>ère</sup> ligne de Traitement .....	37

2 <sup>ème</sup> ligne de traitement.....	40
3 <sup>ème</sup> ligne de traitement.....	41
2.7.3. Principaux effets indésirables des traitements médicamenteux.....	41
3. CHAPITRE 3 : UNE STRATEGIE INNOVANTE POUR AUGMENTER LA BIODISPONIBILITE D'ACTIFS LIPOSOLUBLES : LES VECTEURS NANOPARTICULAIRES.....	43
3.1. Introduction sur les nanoparticules .....	43
3.2. Nanoparticules inorganiques et hépatocarcinome.....	50
3.2.1. Les nanoparticules d'or .....	50
3.2.2. Les nanoparticules d'argent.....	50
3.2.3. Les nanoparticules de silice .....	52
3.2.4. Les nanoparticules de magnétite .....	52
3.3. Nanoparticules organiques et hépatocarcinome.....	52
3.3.1. Les nanoparticules polymériques .....	52
a) Les dérivés des polyesters .....	53
b) Les dérivés du chitosan .....	54
c) Les dérivés du pullulane.....	54
d) Les dérivés de la pectine .....	55
3.3.2. Les nanotubes de carbone .....	55
3.3.3. Les nanoparticules dérivées de l'albumine .....	56
3.3.4. Les systèmes nanoparticulaires lipidiques.....	57
a) Les liposomes .....	57
b) Les nanoparticules lipidiques solides .....	58
c) Les NCLs .....	58
4. TRANSCUTOL <sup>®</sup> LIPID NANOCAPSULES AND THE PROOF OF CONCEPT OF THEIR INTEREST FOR THE VECTORIZATION OF HCC TREATMENT .....	60
4.1. Abstract .....	60
4.2. Introduction .....	60
4.3. Material and methods .....	62
4.3.1. Materials .....	62
4.3.2. Formulation and characterization of lipid nanocapsules.....	62
a) Preparation of DiD-TPB.....	62
b) Formulation of LNCs .....	62
c) Physico-chemical characterization of LNCs.....	63
4.3.3. Cells and cell culture conditions .....	64
a) HepG2 cell line .....	64
b) HepaRG cell line .....	64
4.3.4. Treatment conditions .....	65
4.3.5. Toxicity assessment .....	65
4.3.6. LNCs uptake by liver cells.....	65
a) Kinetics of internalization .....	65
b) Pathways of internalization .....	66
4.3.7. Data analysis .....	66
4.4. Results and discussion .....	66
4.4.1. Characterization of LNCs.....	66
4.4.2. Toxicity assessment after acute exposure .....	67

4.4.3.	Toxicity assessment after chronic exposure .....	69
4.4.4.	LNCs uptake by liver cells.....	70
4.5.	<i>Conclusion</i> .....	74
<b>DISCUSSION .....</b>		<b>75</b>
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>		<b>78</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>		<b>79</b>

# Table des figures

FIGURE 1. LOCALISATION ANATOMIQUE DU FOIE ( <a href="https://www.centre-hepato-biliaire.org">HTTPS://WWW.CENTRE-HEPATO-BILIAIRE.ORG</a> ) .....	17
FIGURE 2. ANATOMIE ET SEGMENTATION DU FOIE. (A) REPRESENTATION SCHEMATIQUE EN VUE ANTERIEURE DU FOIE ET DE SA VASCULARISATION ( <a href="http://www.amfe.fr">WWW.AMFE.FR</a> ). .....	18
FIGURE 3. STRUCTURE DU TISSU HEPATIQUE ( <a href="https://www.centre-hepato-biliaire.org">HTTPS://WWW.CENTRE-HEPATO-BILIAIRE.ORG</a> ) .....	19
FIGURE 4. TAUX (A) D'INCIDENCE ET (B) DE MORTALITE STANDARDISEES SUR L'AGE POUR L'HEPATOCARCINOME EN 2018, D'APRES LES DONNEES DU CENTRE INTERNATIONAL DE RECHERCHE SUR LE CANCER (GLOBOCAN 2018). ASR : AGE-STANDARDISED RATE .....	22
FIGURE 5. PREVALENCE DU VIRUS DE L'HEPATITE B CHEZ LES ADULTES (15-49 ANS) EN 2005. EXTRAIT DE OTT ET AL., 2012. ....	24
FIGURE 6. PREVALENCE DU VIRUS DE L'HEPATITE B (A) ET C (B) PARMI LES PATIENTS ATTEINTS DE CIRRHOSE. EXTRAIT DE ALBERT ET AL., 2022. ....	25
FIGURE 7. ESTIMATION DE LA PREVALENCE MONDIALE DES NAFLD. EXTRAIT DE TENG ET AL., 2023 .....	28
FIGURE 8. COUPE TISSULAIRE D'UN FOIE (A) SAIN ( <a href="https://histologie.univ-nantes.fr">HTTPS://HISTOLOGIE.UNIV-NANTES.FR</a> ) ET D'UN FOIE (B) AU STADE DE CIRRHOSE ( <a href="https://www.centre-hepato-biliaire.org">HTTPS://WWW.CENTRE-HEPATO-BILIAIRE.ORG</a> ) .....	29
FIGURE 9. REPRESENTATION DU SCHEMA DIAGNOSTIC DE CHC CHEZ UN PATIENT CIRRHOTIQUE. D'APRES L'EASL-EORTC 2012 (EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY FOR THE LIVER - EUROPEAN ORGANIZATION FOR RESEARCH AND TREATMENT OF CANCER). US : ULTRASOUND ; MRI : MAGNETIC RESONANCE IMAGING.....	32
FIGURE 10. CLASSIFICATION BCLC EN 2022. EXTRAIT DE REIG ET AL., 2022. AFP : ALPHA-FETOPROTEIN ; ALBI : ALBUMIN-BILIRUBIN ; BSC : BEST SUPPORTIVE CARE ; ECOG PS : EASTERN COOPERATIVE ONCOLOGY GROUP-PERFORMANCE STATUS ; LT : LIVER TRANSPLANTATION ; MELD : MODEL OF END-STAGE LIVER DISEASE ; TACE : TRANARTERIAL CHEMOEMBOLISATION .....	34
FIGURE 11. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES MECANISMES D'ACTION DU SORAFENIB. EXTRAIT DE WALKO ET AL., 2014. TGF : TUMOR GROWTH FACTOR ; RAF : RAPIDLY ACCELERATED FIBROSARCOMA ; MEK : MITOGEN-EXTRACELLULAR SIGNAL-REGULATED KINASE ; ERK : EXTRACELLULAR SIGNAL-REGULATED KINASE ; VHL : VON HIPPEL-LINDAU TUMOR SUPPRESSOR ; HIF : HYPOXIA-INDUCIBLE FACTOR ; PDGF : PLATELET DERIVED GROWTH FACTOR ; VEGF : VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR .....	39
FIGURE 12. REPRESENTATION DES METHODES, DESCENDANTE OU ASCENDANTE, DE FABRICATION DES COMPOSES NANOMETRIQUES. EXTRAIT DE BAYDA ET AL., 2020 .....	44
FIGURE 13. REPRESENTATION DE DIFFERENTS TYPES DE NPS A BASE DE CARBONE AVEC (A) UN FULLERENE C60, (B) DES NPS DE NOIR DE CARBONE ET (C) DES POINTS QUANTIQUES DE CARBONE. EXTRAIT DE JOUDEH ET AL., 2022.....	45
FIGURE 14. REPRESENTATION DE TROIS DIFFERENTS TYPES DE NPLS. EXTRAIT DE MADKHALI ET AL., 2022 .....	48
FIGURE 15. SCHEMA DU PROCEDE DE FORMULATION PAR INVERSION DE PHASE DES NANOCAPSULES LIPIDIQUES. EXTRAIT DE IDLAS ET AL., 2021 .....	48
FIGURE 16. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTES VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUEES DANS LES EFFETS ANTI-ANGIOGENIQUES ET ANTI-INFLAMMATOIRES LIES AUX AU-NPS. EXTRAIT DE DARWEESH ET AL., 2019.....	51
FIGURE 17. SCHEMA DE SYNTHESE DES POLYSOMES DE DOXORUBICINE DECORES DU PEPTIDE SP94. EXTRAIT DE ZHANG ET AL., 2021 .....	54

FIGURE 18. REPRESENTATION DE NANOTUBES DE CARBONE (A) MONO PAROI ET (B) MULTI PAROIS. EXTRAIT DE ELSAYED ET AL., 2019 .....	56
FIGURE 19. SCHEMA DE TROIS DIFFERENTS TYPES DE SYSTEMES NANOPARTICULAIRES LIPIDIQUES, (A) LES LIPOSOMES, (B) LES NANOPARTICULES LIPIDIQUES SOLIDES ET (C) LES NANOCAPSULES LIPIDIQUES. EXTRAIT DE SHEORAN ET AL., 2022 .....	57
FIGURE 20. CELL VIABILITY ASSESSED BY (A) MTT AND (B) NRU ASSAYS ON HEPG2 AND HEPARG CELLS AFTER ACUTE (24H) EXPOSURE, AND ON HEPARG CELLS AFTER 2 AND 4 WEEKS OF CHRONIC EXPOSURE TO LNCs. DATA ARE REPRESENTED AS % OF VIABILITY IN VEHICLE CONTROL CELLS (N = 3-4) $\pm$ SEM. ....	67
FIGURE 21. UPTAKE OF LNCs IN HEPG2 (A AND D) AND HEPARG (B AND E) CELLS AFTER ACUTE EXPOSURE, AND IN HEPARG CELLS AFTER 4 WEEKS OF CHRONIC EXPOSURE (C AND F). DATA REPRESENT THE % OF POSITIVE CELLS TO DiD SIGNAL (A, B AND C) AND THE MFI IN ARBITRARY UNIT (D, E AND F) (N = 3-4) $\pm$ SEM. * AND + (P < 0.05) REPRESENT A SIGNIFICATIVE DIFFERENCE BETWEEN SAMPLES CONCENTRATIONS AND TIME OF EXPOSURE, RESPECTIVELY. ....	72
FIGURE 22. ASSESSMENT OF ENDOCYTOSIS-MEDIATED PATHWAYS OF INTERNALIZATION AFTER ACUTE EXPOSURE ON HEPG2 CELLS (A), AND AFTER ACUTE AND CHRONIC EXPOSURE ON HEPARG CELLS (B). DATA ARE EXPRESSED IN % OF POSITIVE CELLS TO DiD SIGNAL (N = 3) $\pm$ SEM. * (P < 0.05) AND ** (P < 0.001) REPRESENT A SIGNIFICATIVE DIFFERENCE COMPARED TO THE CONTROL. ....	73



## Table des tableaux

TABEAU 1. CALCUL DU SCORE DE CHILD-PUGH. EXTRAIT DE ERLINGER ET AL., 2002.....	31
TABEAU 2. EFFETS INDESIRABLES FREQUENTS RETROUVES CHEZ LES PATIENTS TRAITES PAR LES MOLECULES DE 1ERE, 2EME ET 3EME LIGNE DE TRAITEMENT DANS LE CHC .....	42
TABEAU 3. CLASSIFICATION DES NANOMATERIAUX EN FONCTION DE LEUR DIMENSIONNALITE.....	45
TABEAU 4. COMPOSITION OF TWO BATCHES OF LNCs.....	64
TABEAU 5. CHARACTERIZATION OF LNCs: MEAN DIAMETER IN INTENSITY (ZETASIZER®) AND IN NUMBER (NANOSIGHT), PDI AND Z-POTENTIAL. DATA ARE SHOWN AS MEAN (N = 4-6) ± SEM .....	67
TABEAU 6. LC <sub>50</sub> OF LNCs AFTER 24 H OF EXPOSURE ON HEPG2 AND HEPARG CELL LINES, AND AFTER 2 AND 4 WEEKS OF EXPOSURE ON HEPARG CELL LINE. DATA ARE SHOWN AS LC <sub>50</sub> (MG/ML) (N = 3-4) ± SEM. *, + AND # REPRESENT A SIGNIFICATIVE DIFFERENCE BETWEEN CELL LINES, TIME OF EXPOSURE AND TYPE OF ASSAY, RESPECTIVELY (P < 0.05) .....	69

## Liste des abréviations

AFP	Alpha Fœto-Protéine
ANSM	Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
<i>BRAF</i>	<i>v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>
<i>BSA</i>	<i>Bovin Serum Albumin</i>
CHC	Carcinome HépatoCellulaire
DCP	Des-gamma-CarboxyProthrombine
EASL-EORTC	<i>European Association for the Study for the Liver - European Organization for Research and Treatment of Cancer</i>
<i>EGF</i>	<i>Epithelial Growth Factor</i>
<i>EMA</i>	<i>European Medicines Agency</i>
<i>ERK</i>	<i>Extracellular Signal-regulated Kinase</i>
<i>FACS</i>	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
<i>FDA</i>	<i>U.S Food and Drug Administration</i>
<i>FGF</i>	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
GRAS	Generally Recognized As Safe
<i>HIF</i>	<i>Hypoxia-Inducible Factor</i>
<i>ICH</i>	<i>International Council for Harmonisation of technical requirements for pharmaceuticals for human use</i>
IV	IntraVeineuse
<i>LNCs</i>	<i>Lipid NanoCapsules</i>
MEC	Matrice ExtraCellulaire
<i>MEK</i>	<i>Mitogen-Extracellular signal-regulated Kinase</i>
<i>MET</i>	<i>Mesenchymal Epithelial Transition</i>
<i>MFI</i>	<i>Median Fluorescence Intensity</i>
<i>MRI</i>	<i>Magnetic Resonance Imaging</i>
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-biopyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
<i>NAFL</i>	<i>Non-Alcoholic Fatty Liver</i>
<i>NAFLD</i>	<i>Non-Alcoholic Fatty Liver Diseases</i>
<i>NASH</i>	<i>Non-Alcoholic SteatoHepatitis</i>
NCLs	NanoCapsules Lipidiques

NPLS	NanoParticules Lipidiques Solides
NPs	NanoParticules
NRU	<i>Neutral Red Uptake</i>
PCL	PolyCaproLactone
<i>PD-L1</i>	<i>Progammed Death-Ligand 1</i>
<i>PDGF</i>	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PDTC	PyrroliDinediThioCarbamate
<i>PLA</i>	<i>PolyLactic Acid</i>
<i>PLGA</i>	<i>Poly (Lactic-co-Glycolic Acid)</i>
<i>RAF</i>	<i>Rapidly Accelerated Fibrosarcoma</i>
RET	<i>REarranged during Transfection</i>
SOR	Sorafénib
<i>TACE</i>	<i>TransArterial ChemoEmbolisation</i>
<i>TARE</i>	<i>TransArterial RadioEmbolisation</i>
<i>TAT</i>	<i>Trans-Activator of Transcription</i>
<i>TGF</i>	<i>Transforming Growth Factor</i>
<i>VEGF</i>	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VHB	Virus de l'Hépatite B
VHC	Virus de l'Hépatite C
<i>VHL</i>	<i>Von Hippel-Lindau tumor suppresor</i>

## Introduction

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) compte près d'un million de nouveaux cas par an et se classe, au niveau mondial, en 3<sup>ème</sup> position des cancers les plus létaux. Cette place peut s'expliquer par le fait que cette pathologie reste souvent asymptomatique, empêchant ainsi un diagnostic à un stade précoce et par extension l'accès aux traitements curatifs (transplantation, résection et ablation), représentant les meilleures chances de survie pour les patients. Il existe toutefois des thérapies palliatives pour le traitement du CHC à un stade avancé. Parmi ces dernières, le sorafénib (SOR), inhibiteur de tyrosine kinase, permet d'augmenter la survie globale d'environ un an. Malgré cette amélioration notable, le SOR entraîne des effets indésirables importants, intestinaux et cutanés notamment, pouvant mettre en jeu le pronostic vital (grade 4). Une solution pour pallier ces inconvénients pourrait être trouvée dans la vectorisation. En effet, les nanoparticules (NPs), notamment les nanocapsules lipidiques (NCLs), peuvent diminuer les effets indésirables d'un principe actif anticancéreux sur les cellules/tissus sains environnants non ciblés et aussi augmenter le ciblage de cellules cancéreuses.

Les deux premiers chapitres de ce mémoire de thèse s'intéresseront au foie et au CHC. Après un rappel anatomique, physiologique et fonctionnel du foie, le CHC (épidémiologie, étiologies et facteurs de risque) sera développé. La prise en charge thérapeutique suivant les nouvelles recommandations de 2023 sera détaillée. Le troisième chapitre correspondra à un état de l'art des nanoparticules en développement dans la prise en charge du CHC où les différentes stratégies thérapeutiques seront décrites et discutées en fonction du type de NPs utilisé. Le dernier chapitre sera dédié à une partie expérimentale *in vitro*. Cette dernière représente une étude préliminaire analysant les interactions de NCLs blanches (non chargées en principe actif) avec des cellules hépatiques cancéreuses et non cancéreuses. L'analyse des profils de toxicité et des cinétiques d'internalisation donnera des éléments de réponse quant à l'intérêt potentiel des NCLs en tant que vecteurs de médicaments dirigés contre le CHC. Pour finir, une discussion étayera la place des NPs, et plus spécifiquement des NCLs, dans la stratégie thérapeutique du CHC.

# 1. Chapitre 1 : le foie

## 1.1. Anatomie

Le foie représente l'organe interne le plus volumineux du corps humain avec un poids pouvant atteindre jusqu'à 1,6 kg. Il se situe dans l'hypocondre droit de la cavité abdominale et est protégé par les côtes basses (Figure 1). Il fait partie, avec les autres viscères, de l'appareil digestif.

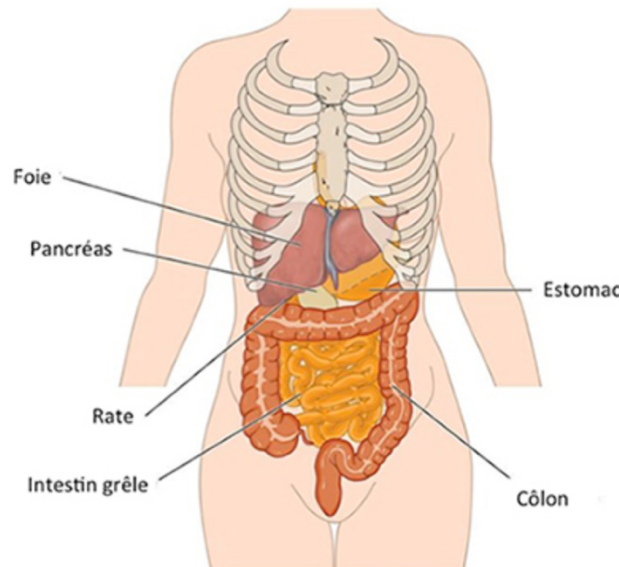
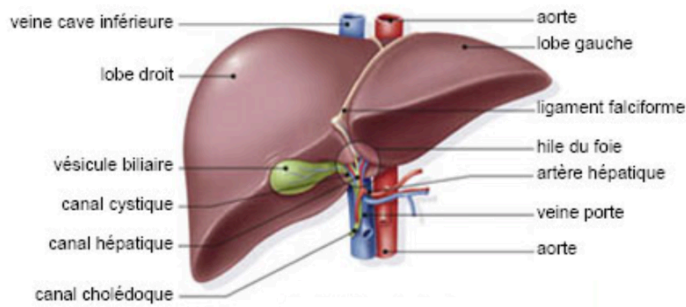


Figure 1. Localisation anatomique du foie

(<https://www.centre-hepato-biliaire.org>)

Le foie se décompose en quatre parties inégales, appelées lobes. Les deux lobes majeurs sont le lobe hépatique droit (2/3 du volume du foie) et le lobe hépatique gauche (1/3 du volume du foie) séparés verticalement par le ligament falciforme. Entre les lobes majeurs sont localisés deux lobes mineurs, le lobe caudé et le lobe carré. Entre ce dernier et le lobe hépatique droit se trouve la vésicule biliaire. Tout comme pour les lobes majeurs, il existe une séparation anatomique entre les deux lobes mineurs, le hile du foie (Figure 2. A). Enfin, chaque lobe se divise en huit segments fonctionnels indépendants (Figure 2. B).

A



B

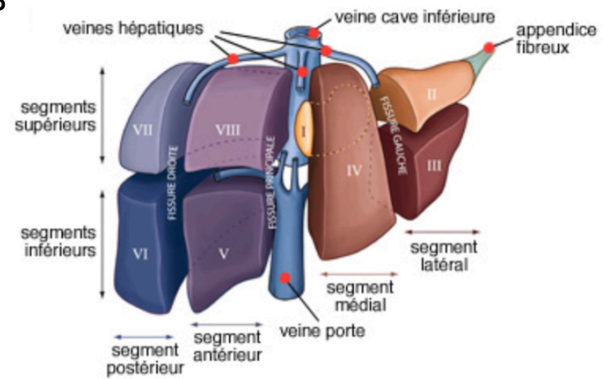


Figure 2. Anatomie et segmentation du foie. (A) Représentation schématique en vue antérieure du foie et de sa vascularisation ([www.amfe.fr](http://www.amfe.fr)).  
(B) Segmentation lobulaire hépatique (<https://www.arcagy.org/infocancer>)

La vascularisation hépatique est assurée par deux vaisseaux sanguins pénétrants dans le foie au niveau du hile : l'artère hépatique et la veine porte (Figure 2. A). L'artère hépatique se charge d'apporter au foie un sang riche en oxygène. La veine porte quant à elle apporte un sang pauvre en oxygène et riche en nutriments provenant de l'estomac, des intestins, du pancréas ainsi que de la rate. Chaque segment de lobe est vascularisé par une branche de l'artère hépatique ainsi qu'une branche de la veine porte. Pour finir, les veines hépatiques se jettent dans la veine cave inférieure qui elle-même rejoindra le cœur.

## 1.2. Histologie

### 1.2.1. Les différentes cellules hépatiques

Le foie regroupe différents types cellulaires.

Les **hépatocytes** sont les principales cellules hépatiques fonctionnelles. Ils représentent environ 70% du volume total du foie. Ces cellules sont polarisées avec un pôle vasculaire en regard des sinusoides ainsi qu'un pôle biliaire. Les hépatocytes, riches en organites cytoplasmiques, sont les garants de l'activité métabolique hépatique.

Les **cellules endothéliales sinusoidales** bordent les sinusoides. Ces dernières forment un endothélium fenestré dépourvu de membrane basale permettant les échanges (gazeux et nutritifs) entre le sang et les hépatocytes.

Les **cholangiocytes** sont des cellules de type épithélial formant les canaux biliaires.

Les **cellules de Küpffer** sont les macrophages hépatiques tissulaires. Elles jouent un rôle majeur dans la réponse immunitaire locale.

Les **cellules étoilées** (ou cellules de Ito) sont localisées entre les hépatocytes et les cellules endothéliales, dans l'espace de Disse. Ces dernières sont les principales actrices de la synthèse des composés de la matrice extracellulaire (MEC). En situation pathologique, elles augmenteraient la sécrétion de collagène et de protéoglycans dans la MEC, renforçant ainsi la fibrose hépatique.

Les « **pit cells** » ou **lymphocytes résidents** possèdent une activité antitumorale de type *natural killer*. Elles se trouvent dans la lumière des sinusoides et peuvent également avoir des prolongements à travers la barrière endothéliale.

### 1.2.2. Les lobules hépatiques

Le foie est organisé en unités fonctionnelles par les lobules hépatiques. Chaque lobule est constitué de milliers de cellules hépatiques. Au centre de chaque lobule se situe une veine centro-lobulaire qui se déverse dans les veines sus-hépatiques puis dans la veine cave inférieure. Les lobules sont délimités en périphérie par des espaces conjonctivo-vasculaires appelés les espaces portes (Figure 3). Ces derniers se composent d'une branche de la veine porte et de l'artère hépatique, de capillaires lymphatiques ainsi que d'un canal biliaire. A l'intérieur d'un lobule, les hépatocytes s'agencent en travées monocouches délimitées par les sinusoides. Le sang entre via les espaces portes pour ensuite se déverser dans les sinusoides et finalement être drainé vers la veine centro-lobulaire. Les canalicules biliaires, situés entre deux hépatocytes adjacents, permettent l'évacuation de la bile jusqu'au canal biliaire situé dans l'espace porte.

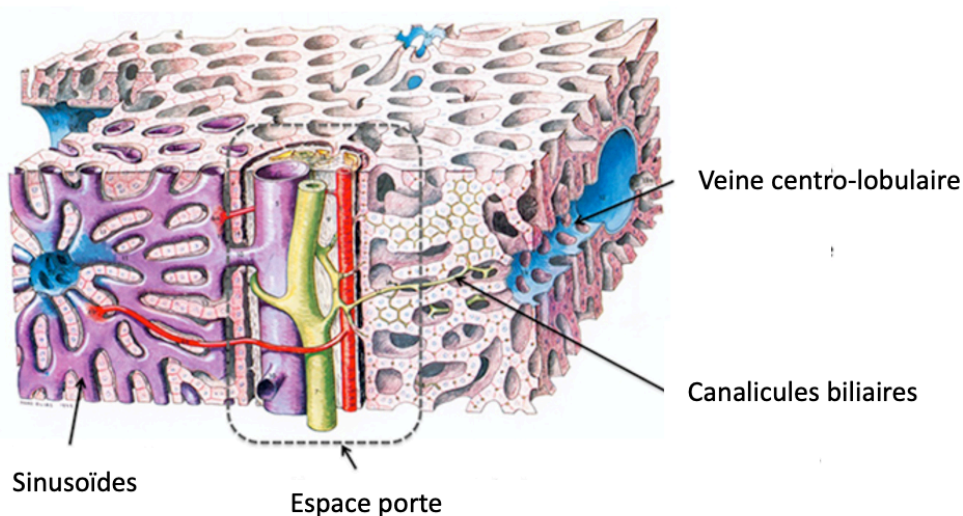


Figure 3. Structure du tissu hépatique (<https://www.centre-hepatobiliaire.org>)

### 1.2.3. Les fonctions hépatiques

Le foie est un organe majeur indispensable du fait de ces nombreuses fonctions de **synthèse**, de **détoxification** et de **stockage**. En effet, il participe au métabolisme glucidique, lipidique, protéique et permet également la biodégradation de composés toxiques pour l'organisme, qu'ils soient endogènes ou exogènes.

#### a) Fonctions de synthèse

- Métabolisme des **glucides** : le foie est impliqué dans la régulation du taux de glycémie. Les glucides (e.g. glucose, fructose) apportés par l'alimentation sont transformés (glycogénogénèse) et stockés dans le foie sous forme de glycogène. Celui-ci peut également être libéré par glycogénolyse lorsque l'organisme a besoin d'énergie. Le foie peut aussi fabriquer du glucose à partir d'acides aminés (néoglucogénèse).
- Métabolisme des **lipides** : le foie synthétise les lipoprotéines permettant le transport des graisses dans l'organisme. Il transforme également les lipides de l'alimentation, tel que le cholestérol, sous forme de triglycérides afin de les stocker. Un excès de triglycérides entraîne la formation de gouttelettes lipidiques au sein des hépatocytes, mécanisme impliqué dans la stéatose.
- Métabolisme des **protéines** : le foie synthétise la majorité des protéines plasmatiques dont l'albumine, responsable du transport d'une grande variété de molécules et de médicaments. La synthèse de facteurs de coagulation (facteurs II, VII, IX et X) est aussi assurée par le foie.
- Sécrétion de la **bile** : les acides biliaires sont synthétisés par le foie. Ils sont sécrétés par les hépatocytes et les cholangiocytes. La bile permet de transporter jusqu'à l'intestin grêle les produits liposolubles excrétés par le foie. Les acides biliaires contenus dans la bile servent ensuite à digérer les graisses situées dans l'intestin.

#### b) Fonctions de détoxification

- **Métabolisme des xénobiotiques** : le foie est l'organe principal de la détoxification des médicaments et autres toxiques. Le métabolisme hépatique (réactions enzymatiques de phase I et II) permet la biotransformation des xénobiotiques en métabolites secondaires afin de pouvoir les éliminer (majoritairement par voie biliaire ou urinaire) de l'organisme. Certains médicaments nécessitent d'être métabolisés au niveau hépatique afin d'acquérir leur effet thérapeutique (prodrogues) tandis que sur d'autres, le métabolisme hépatique engendre la formation de métabolites réactifs toxiques.



- La **bilirubine libre** : elle est produite lors de la formation d'hémoglobine. Elle sera glucurono-conjugée au niveau des hépatocytes pour être ensuite éliminée par voie biliaire.

- **L'urée** : synthétisée par les hépatocytes, elle permet la détoxification de l'ammoniac en générant des protons H<sup>+</sup>. Elle joue donc aussi un rôle dans l'équilibre acido-basique.

### c) Fonctions de stockage

Le foie a pour fonction de stocker le glycogène, les triglycérides, le fer ainsi que les vitamines A, D et B12.

## 2. Chapitre 2 : Le carcinome hépatocellulaire

Aussi désigné sous le terme d'hépatocarcinome, le CHC est la tumeur primitive du foie la plus fréquente (environ 80% des cas totaux) et touche principalement les hommes (environ 80% des cas) (1). Dans la majorité des cas, le CHC se développe sur une hépatopathie chronique préexistante (hépatites virales, alcoolisme chronique). Ces atteintes chroniques entraînent localement une inflammation, de la fibrose et une régénération aberrante des hépatocytes. L'épidémiologie, les facteurs de risque, l'évolution et pour finir la prise en charge (du dépistage aux traitements) du CHC seront développés.

### 2.1. Épidémiologie, incidence et mortalité

Le cancer primitif du foie est le sixième cancer le plus fréquemment diagnostiqué et la **troisième cause de décès par cancer** dans le monde en 2020, avec environ 906 000 nouveaux cas et 830 000 décès (1). Les taux d'incidence et de mortalité sont 2 à 3 fois plus élevés chez les hommes que chez les femmes au niveau mondial et le cancer du foie se classe au 5<sup>ème</sup> rang en termes d'incidence et 2<sup>ème</sup> en termes de mortalité chez les hommes. Les taux d'incidence chez les hommes sont 2,4 fois plus élevés dans les pays en voie de développement et les taux (incidence et mortalité) les plus élevés sont observés dans les pays d'Asie de l'Est (Mongolie) et du Sud-Est (Thaïlande, Cambodge et Vietnam) ainsi qu'en Afrique du Nord (Égypte) et de L'Ouest (Nigéria). De plus, le cancer du foie est la 1<sup>ère</sup> cause de mortalité parmi les cancers pour la Mongolie, la Thaïlande, le Cambodge, l'Égypte ainsi que le Guatemala, indépendamment du sexe (1)

(Figure 4). Ces disparités peuvent s'expliquer quant à la répartition inégale des différents facteurs étiologiques de l'hépatocarcinome. Une méta-analyse, réalisée par Bosetti *et al.*, regroupe les tendances de la mortalité liée au CHC en Europe entre les années 1980 et le début des années 2000. La mortalité globale chez les hommes a augmenté en Autriche, en Allemagne ainsi qu'en Suisse tandis qu'elle a diminué en France et en Italie. Concernant les femmes, les taux de mortalité les plus importants sont retrouvés en Espagne et en Suisse (2). Il existe donc des différences de mortalité et d'incidence importantes selon un axe Nord-Sud régies principalement par l'accès aux traitements. Toutefois, une augmentation des cas de CHC est observée ces dernières années dans les pays économiquement développés : cette tendance serait en lien avec l'augmentation importante de nouveaux cas de diabète ainsi que d'obésité dans ces pays, facteurs de risque connus et développés dans les parties suivantes (3).

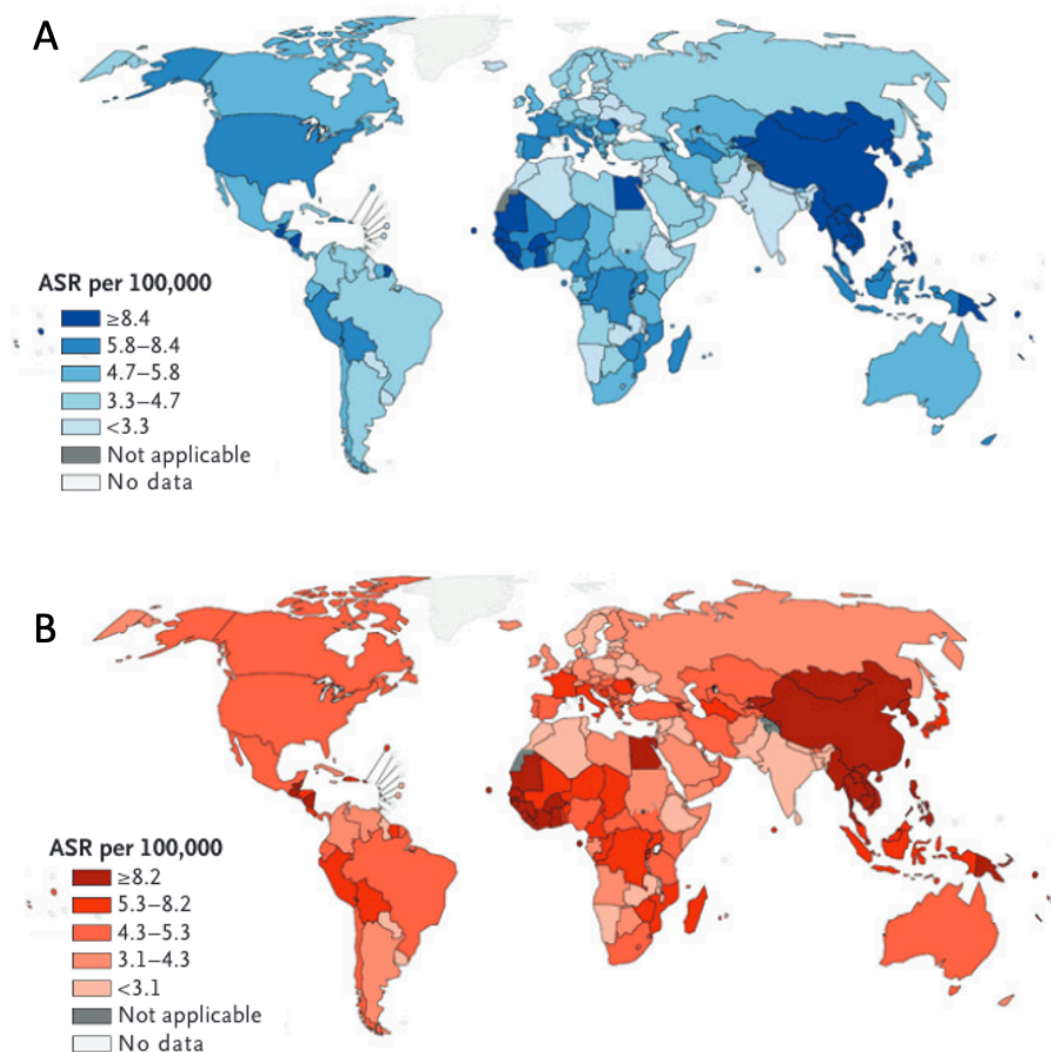


Figure 4. Taux (A) d'incidence et (B) de mortalité standardisé sur l'âge pour l'hépatocarcinome en 2018, d'après les données du Centre International de Recherche sur le Cancer (GLOBOCAN 2018). ASR : Age-Standardised Rate

## 2.2. Facteurs de risque

Les principaux facteurs de risque du CHC sont les infections chroniques telles que les **hépatites virales** B (VHB) et C (VHC), l'exposition à l'**aflatoxine B<sub>1</sub>** (AFB<sub>1</sub>) ainsi que la consommation excessive et chronique **d'alcool**. L'**obésité** ainsi que le **diabète** de type 2 représentent également des facteurs environnementaux de risque connus. La conséquence commune majeure aux facteurs de risques mentionnés se traduit par le passage du foie dans un état cirrhotique. En effet, le CHC se développe dans 80% des cas sur un foie cirrhotique (4).

### 2.2.1. Les hépatites virales

Les infections chroniques par le VHB et le VHC représentent, au niveau mondial, le facteur de risque principal de développement du CHC avec environ 80% des cas d'hépatocarcinome coinfectés par le VHB ou le VHC. Le VHB peut se transmettre par exposition à du sang contaminé, par voie sexuelle et aussi par une transmission mère-enfant à la naissance. Il est important de souligner que le développement au stade chronique de cette infection dépend surtout de l'âge : plus l'infection est précoce, plus le risque est élevé (3). L'influence démographique joue également un rôle primordial dans l'apparition de l'hépatocarcinome : responsable d'environ **50% de l'ensemble des cas de CHC**, les zones endémiques du **VHB** au niveau mondial (Asie et Afrique Sub-Saharienne) (Figure 5) se superposent assez facilement avec les zones d'incidence du CHC. Dans ces pays en transition économique, le VHB se transmet majoritairement à la naissance, du fait d'un contexte économique plus pauvre et par extension des conditions sanitaires plus limitées qu'en Europe ou aux Etats-Unis.

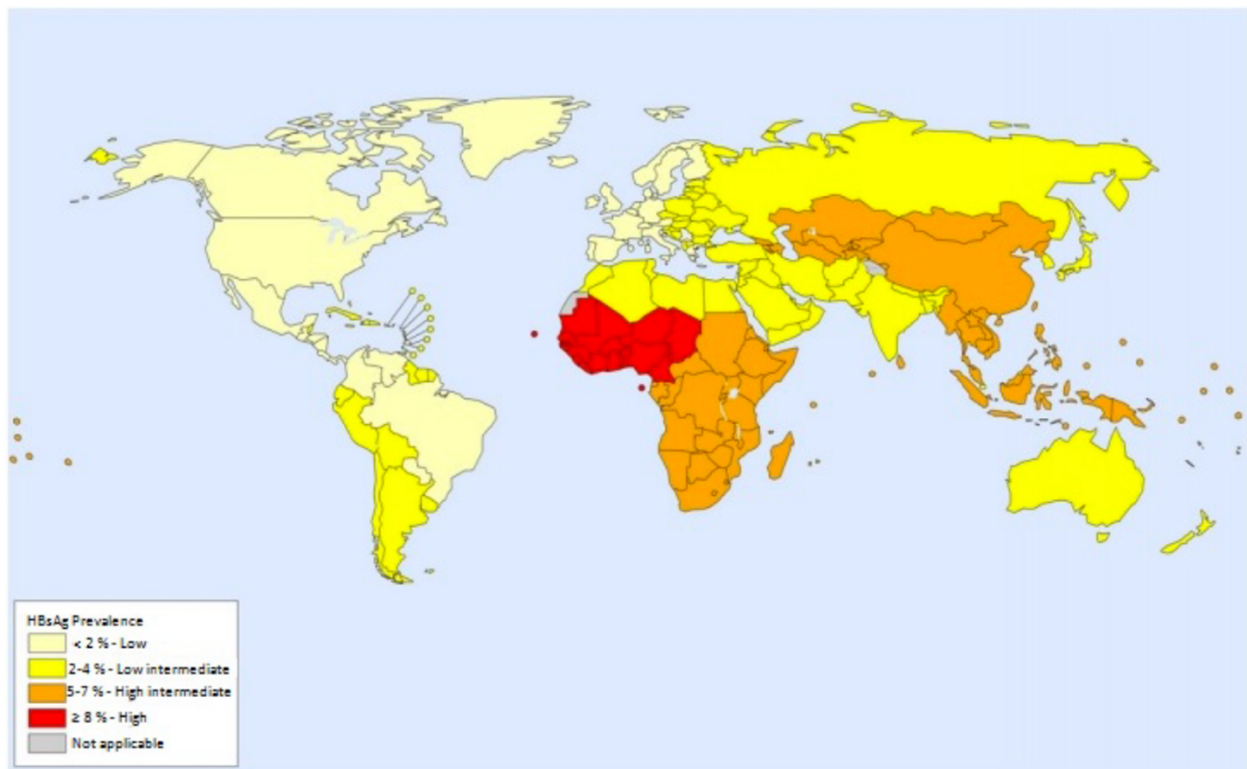


Figure 5. Prévalence du virus de l'hépatite B chez les adultes (15-49 ans) en 2005.

Extrait de Ott et al., 2012

Le VHC se transmet majoritairement par voie sanguine, que ce soit par transfusion sanguine non vérifiée par dépistage préalable, exposition au sang lors d'une altercation ou bien lors de l'utilisation de matériel souillé lors de la prise de drogues par voie intraveineuse (toxicomanes). Une diminution importante de sa prévalence au niveau mondial a pu être observée entre la fin du 20<sup>ème</sup> siècle et l'année 2017, en passant respectivement de 170 millions de personnes porteuses du VHC chronique vs. 71 millions (5). Cette amélioration est la conséquence d'un meilleur accès aux traitements ainsi qu'une réduction des risques nosocomiaux. Toutefois, il n'existe à l'heure actuelle aucun vaccin contre le VHC ce qui peut expliquer que la prévalence du VHC reste importante dans certains pays tels que la Roumanie, en Ouzbékistan, au Pakistan, en Égypte ainsi qu'au Mali pour lesquels l'accès aux traitements reste difficile (6). Le passage à la chronicité pour les adultes est d'environ 70% ce qui est bien plus élevé comparativement au VHB (environ 5%) (4). Ainsi, les données de prévalences du VHB et du VHC dans la population de patients cirrhotiques diffèrent au niveau global (Figure 6) avec une mise en cause du **VHC dans 31% des cas de CHC** (7).

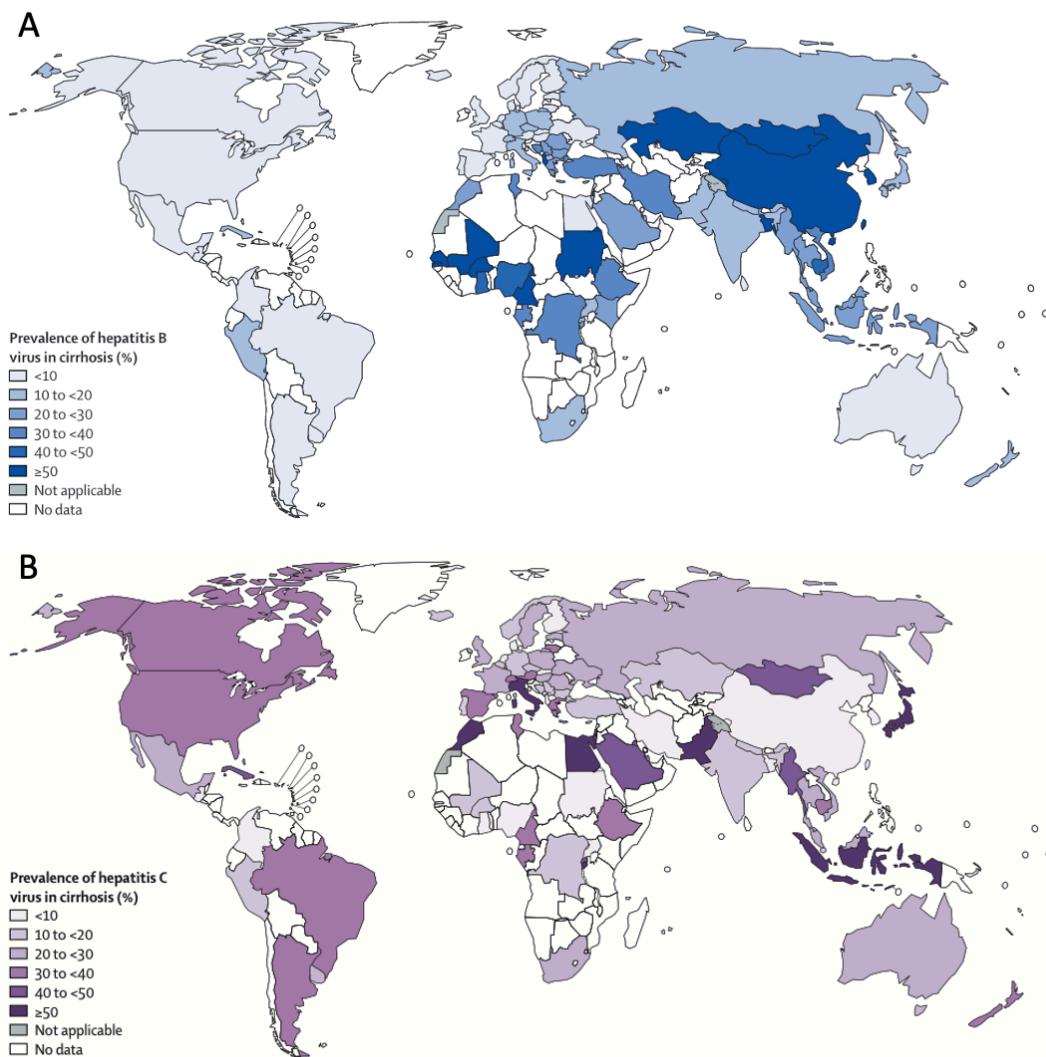


Figure 6. Prévalence du virus de l'hépatite B (A) et C (B) parmi les patients atteints de cirrhose. Extrait de Albert et al., 2022

### 2.2.2. L'aflatoxine B1 (AFB<sub>1</sub>)

AFB<sub>1</sub> est la mycotoxine la plus fréquente retrouvée dans les aliments contaminés. Elle est produite par des champignons appartenant majoritairement à 2 espèces du genre *Aspergillus* (*Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus*). Elle est reconnue pour avoir des propriétés tératogènes, cancérogènes et génotoxique. Sa toxicité est médiée par la formation de dérivés hydroxylés ou bien époxydes après métabolisme hépatique. Ces métabolites réactifs forment des adduits sur le codon 247 du gène codant pour la protéine P53. De plus, l'AFB<sub>1</sub> a été reconnue comme facteur de risque du CHC seule et de manière encore plus importante si la personne est coinfectede par le VHB (8).

### 2.2.3. L'alcool

La consommation excessive et/ou chronique d'alcool est depuis longtemps reconnue comme facteur de risque du CHC entraînant une stéatose alcoolique, précurseuse de la stéatohépatite puis du CHC (9). Les lésions hépatiques entraînées par la consommation d'alcool sont majoritairement dues au **stress oxydatif** et à **l'inflammation** (10). L'alcool est métabolisé (CYP2E1) grâce à l'action de l'alcool déshydrogénase en métabolite réactif, l'aldéhyde, composé extrêmement toxique et induisant des effets génotoxiques. Par ailleurs, il a été mis en évidence une action synergique néfaste de l'alcool avec le VHC, doublant ainsi le risque de développer un hépatocarcinome (11,12).

### 2.2.4. Le syndrome métabolique

L'obésité, le diabète de type 2 et plus généralement le **syndrome métabolique** sont également reconnus comme facteurs de risque de l'hépatocarcinome. Ces pathologies, en pleine explosion depuis le début des années 2000 en Europe, en Australie et encore plus sur le continent Nord-Américain, sont devenues un réel enjeu de santé publique avec une prévalence mondiale de 20 à 25%. Elles peuvent entraîner au long court une stéatose hépatique pouvant elle-même évoluer vers une stéatohépatite non alcoolique (NASH) puis vers une cirrhose (13,14). Cela explique, en partie, l'expansion du CHC dans les pays économiquement développés (Figure 6. B).

### 2.2.5. Autres facteurs de risque

D'autres pathologies, acquises ou héréditaires, connues pour favoriser le développement d'une cirrhose, sont aussi considérées comme facteurs de risque du CHC. Nous pouvons citer les hépatites auto-immunes, l'hémochromatose, les cholangites sclérosantes primitives et la maladie de Wilson.

## 2.3. Facteurs protecteurs

Une méta-analyse récemment publiée s'est penchée sur l'impact de l'alimentation dans le cadre de l'hépatocarcinome (15). Une **alimentation riche en acides gras polyinsaturés n-3** permettrait de protéger contre le CHC parmi une population de patients atteints du VHB et/ou VHC (16). Les aliments contenant des polyphénols, tels que les fruits frais et le **café** permettraient de cibler l'angiogenèse via l'action de multiples signaux intracellulaires diminuant ainsi le risque de développer un hépatocarcinome (17). Le café, en particulier caféiné, aurait donc également un effet protecteur contre le CHC.

En effet, la café serait associé à une diminution du risque relatif de survenue du CHC d'environ 30%, avec ou sans pathologie hépatique préexistante (18,19).

La prise de certains médicaments peut également avoir un impact bénéfique sur le développement de l'hépatocarcinome. Une méta-analyse publiée en 2021 a permis de mettre en évidence un effet protecteur de l'utilisation de la **metformine** sur plusieurs types de cancer, notamment contre le CHC associé à la NASH (20). L'impact de la metformine sur l'hépatocarcinome a été étudié dans une étude de cohorte publiée en 2011. Cette étude, réalisée sur 100 patients diabétiques de type 2 coinfectés par le VHC avec cirrhose, a conclu que la metformine diminuait significativement le risque de survenue d'hépatocarcinome chez ces patients (21).

Wang *et al.* ont publié en 2022 une revue s'intéressant à l'étude de la prise d'inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase, les **statines**, dans le cadre du CHC. Leur analyse a permis de conclure que l'utilisation des statines diminuait le risque de développer un CHC (odd ratio (OR) ajusté = 0,58 ; IC 95% : 0,51-0,67). Il a également été démontré que les statines avaient un effet protecteur contre le CHC après infection au VHB et VHC (OR = 0,44 et 0,53, respectivement avec IC 95% : 0,22-0,85 et 0,49-0,57, respectivement). Il est toutefois précisé que seules les statines lipophiliques possèdent ces effets bénéfiques (22).

## 2.4. Stades d'évolution vers le carcinome hépatocellulaire

Les **stéatopathies non alcooliques (NAFLD)** regroupent la **stéatose hépatique non alcoolique (NAFL)** et la **NASH**. La NAFL se caractérise par une accumulation anormale de graisses intrahépatiques en l'absence de consommation chronique/excessive d'alcool. La NAFL est l'une des causes majeures de développement de pathologies hépatiques affectant à la fois les adultes et les enfants (23,24). De plus, elle est considérée comme la manifestation hépatique du syndrome métabolique et sa prévalence suit généralement les courbes d'obésité. Une grande partie des cas de NAFL est donc retrouvée aux Etats-Unis, en Amérique du Sud, en Australie ainsi qu'en Asie et dans certains pays du Moyen-Orient (Figure 7).



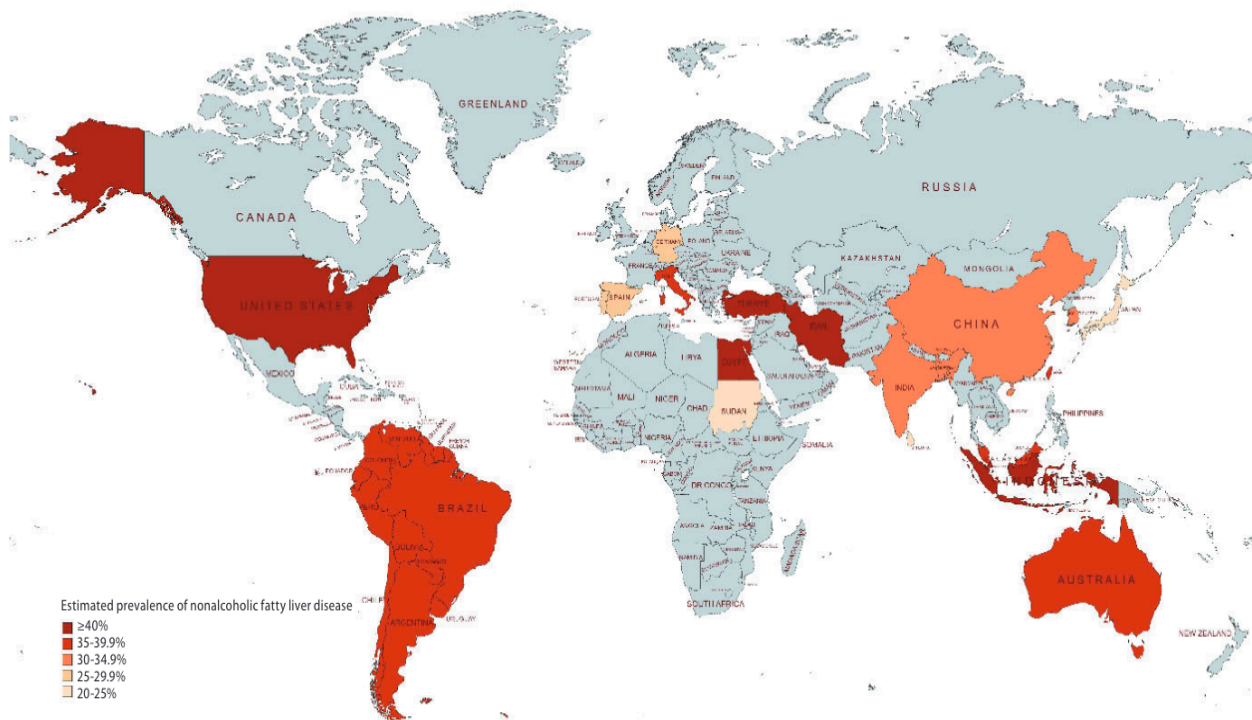


Figure 7. Estimation de la prévalence mondiale des NAFLD. Extrait de Teng et al., 2023

La NASH se définit par une stéatose associée à une inflammation du foie ainsi que divers degrés de fibrose également en l'absence de consommation importante d'alcool. La NAFL et la NASH peuvent évoluer vers un état cirrhotique puis vers d'autres pathologies hépatiques jusqu'au CHC. Les différents stades d'évolution des NAFLD sont représentés dans la Figure 8.

Chez un patient atteint d'une maladie hépatique, aiguë et surtout chronique, les cellules hépatiques lésées sont remplacées par un tissu cicatriciel fibreux : il s'agit de la **fibrose hépatique**. Cette dernière restructure progressivement l'architecture hépatique jusqu'à atteindre le stade de **cirrhose** (Figure 9). A ce stade, l'organisation tissulaire sous forme de lobules a complètement disparue et des **nodules de régénération** (retrouvés au stade de CHC) apparaissent, entourés par des zones de fibrose. Puis le foie évolue vers la cirrhose et viennent ensuite des modifications moléculaires conférant aux cellules dysplasiques des avantages prolifératifs, invasifs et de survie qui achèvent la transition vers le CHC.



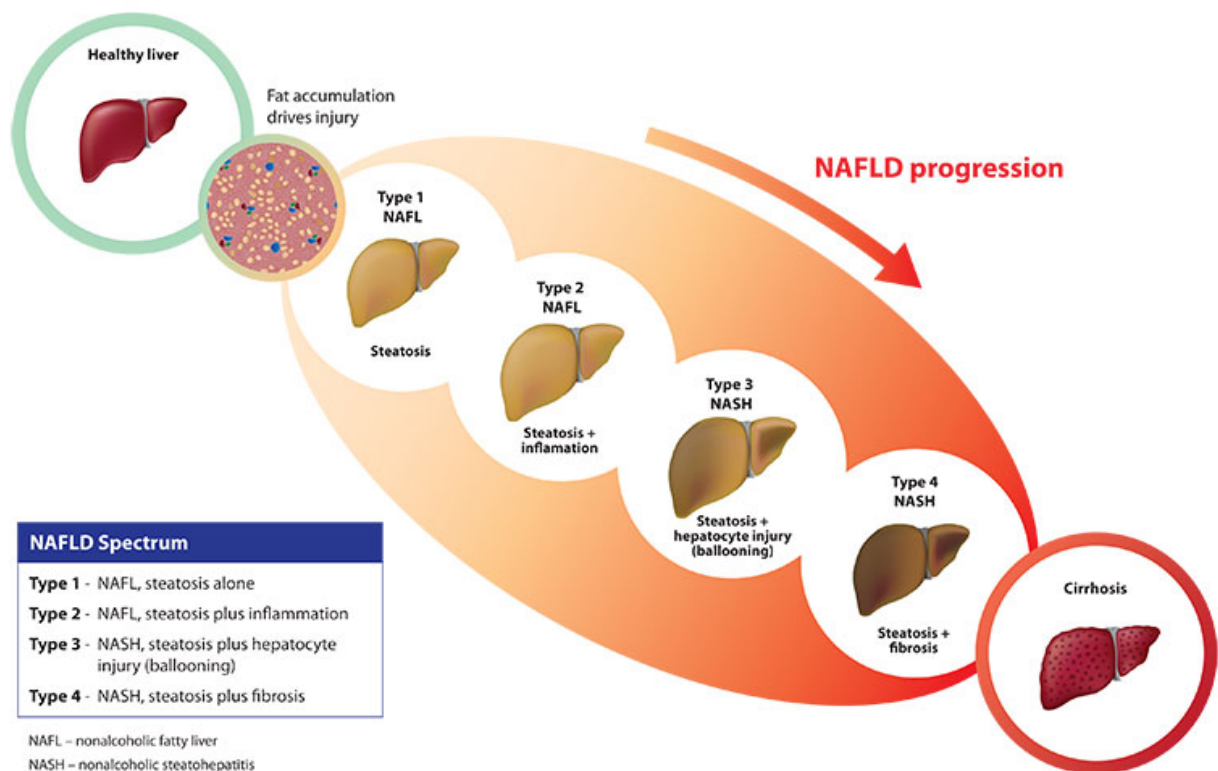


Figure 8. Représentation des stades d'évolution des NAFLD  
([www.fattyLiverfoundation.org](http://www.fattyLiverfoundation.org))

D'autres tumeurs primitives du foie existent mais se développent généralement sur un foie non cirrhotique, à l'inverse du CHC. Parmi ces dernières sont retrouvés le cholangiocarcinome intra-hépatique, l'angiosarcome et l'hépatoblastome.

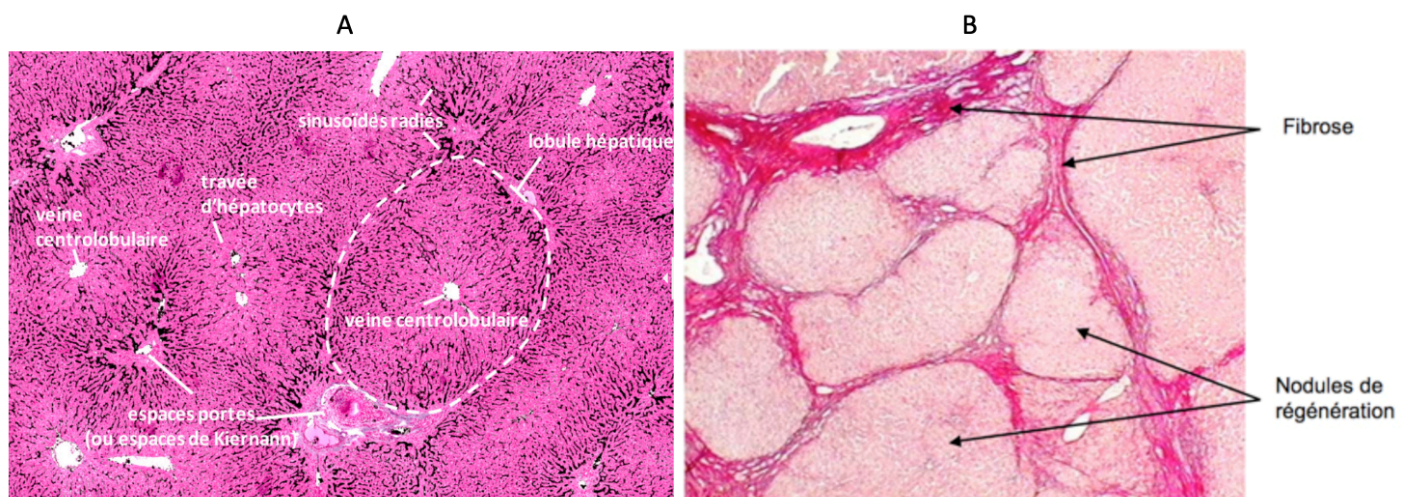


Figure 9. Coupe tissulaire d'un foie (A) sain (<https://histologie.univ-nantes.fr>) et d'un foie (B) au stade de cirrhose (<https://www.centre-hepato-biliaire.org>)

## **2.5. Dépistage et diagnostic du cancer hépatocellulaire**

### **2.5.1. Dépistage**

Le but primaire du dépistage est tout simplement de pouvoir identifier les patients à un stade le plus précoce possible afin de leur faire bénéficier d'une prise en charge curative. Le dépistage précoce est d'autant plus important pour le CHC car celui-ci peut rester asymptomatique jusqu'à un stade avancé de la maladie. La population à haut risque (patients cirrhotiques, patients porteurs du VHB et/ou VHC ainsi que les patients avec antécédents familiaux de CHC) doit, en théorie, bénéficier d'un suivi biannuel avec échographie et dosage de l'alpha fœtoprotéine (AFP). L'AFP est une glycoprotéine chargée négativement, naturellement fabriquée par le fœtus, puis diminuant après la naissance jusqu'à des concentrations de l'ordre du nanogramme par millilitre. Son augmentation à l'âge adulte est souvent un signe de développement d'un cancer, notamment hépatique (25). De plus, une étude thaïlandaise a mis en évidence une amélioration de la détection du CHC de 15% lorsque l'AFP est associée à l'échographie (26). L'analyse de l'AFP par immunochromatographie a permis d'identifier 3 glycoformes (AFP-L1, -L2 et -L3) pouvant être utilisées pour la détection de l'HCC, sans toutefois être assez efficacement prédictives seules. Depuis 2002, le Japon a inclus, en plus de l'AFP totale et de l'AFP-L3, un troisième biomarqueur dans son programme de surveillance : le des-gamma-carboxyprothrombine (DCP). La combinaison de ces 3 biomarqueurs a augmenté significativement les taux de détection du CHC à un stade précoce (27). Les instances européennes et américaines (EASL-EORTC et AASLD) ne recommandent actuellement pas le dosage de l'AFP à cause de problèmes de coûts importants et de bénéfices trop faibles.

### **2.5.2. Diagnostic**

Dans la majorité des cas, la suspicion de CHC est posée en regard des symptômes observés ou bien à la découverte de nodules lors d'une échographie (Figure 9). La démarche diagnostique du CHC est conditionnée par la présence, ou non, d'une cirrhose sous-jacente. Dans un premier temps, l'évaluation de la cirrhose se fait donc sur des critères cliniques biologiques (taux de prothrombine, transaminases, plaquettes et gamma-glutamyltranspeptidase si suspicion d'alcoolisme), endoscopiques (varices œsophagiennes) et morphologiques (dysmorphie hépatique). En l'absence de positivité des critères précédemment cités, une biopsie hépatique devra être réalisée. Cette

dernière, suivie d'une analyse histologique, reste l'examen de référence pour poser le diagnostic de CHC (chez tout type de patient, avec un foie sain tout autant qu'avec une hépatopathie préexistante) (28). Des tests exploratoires non invasifs (Fibrotest®, Fibromètre® et Fibroscan®) peuvent être utilisés sur les patients cirrhotiques selon l'*European Association for the Study of the Liver* (EASL). Toutefois, ces tests ne sont pas recommandés pour les patients non cirrhotiques car pouvant mener à une erreur de diagnostic (29).

## 2.6. Classification pronostique : le système **BCLC (Barcelona Clinic Liver Cancer)**

L'objectif des classifications est de pouvoir établir à la fois un pronostic du CHC à l'instant t et de choisir le traitement le plus adapté à la situation clinique du patient. La classification BCLC est actuellement celle recommandée par l'EASL. Ce système prend en compte les facteurs cliniques et biologiques suivants :

- le nombre et la taille des nodules, la présence d'une invasion vasculaire et la présence d'une dissémination extra-hépatique ;
- l'évaluation de la fonction hépatique avec le calcul du score de Child-Pugh (Tableau 1). Une cirrhose de classe A correspond à un score entre 5 et 6, la classe B entre 7 et 9 et la classe C entre 10 et 15 ;
- l'état de santé général : calcul de l'indice de performance (PST) de l'organisation mondiale de la santé (OMS), et identification des facteurs de comorbidité.

Tableau 1. Calcul du score de Child-Pugh. Extrait de Erlinger et al., 2002

	1 point	2 points	3 points
Encéphalopathie (grade)	Absente	Grade I et II	Grade III et IV
Ascite	Absente	Minime	Modérée
Bilirubine totale (μmol/l)	< 35	35 à 50	> 50
Albumine (g/l)	> 35	28 à 35	< 28
Taux de prothrombine (%)	> 50	40 à 50	< 40

De nombreuses améliorations relatives au diagnostic ainsi qu'au traitement du CHC ont vu le jour au cours des dernières années, ce qui a abouti à une mise à jour de la classification BCLC de 2018 (30) en 2022 (Figure 10) (31).

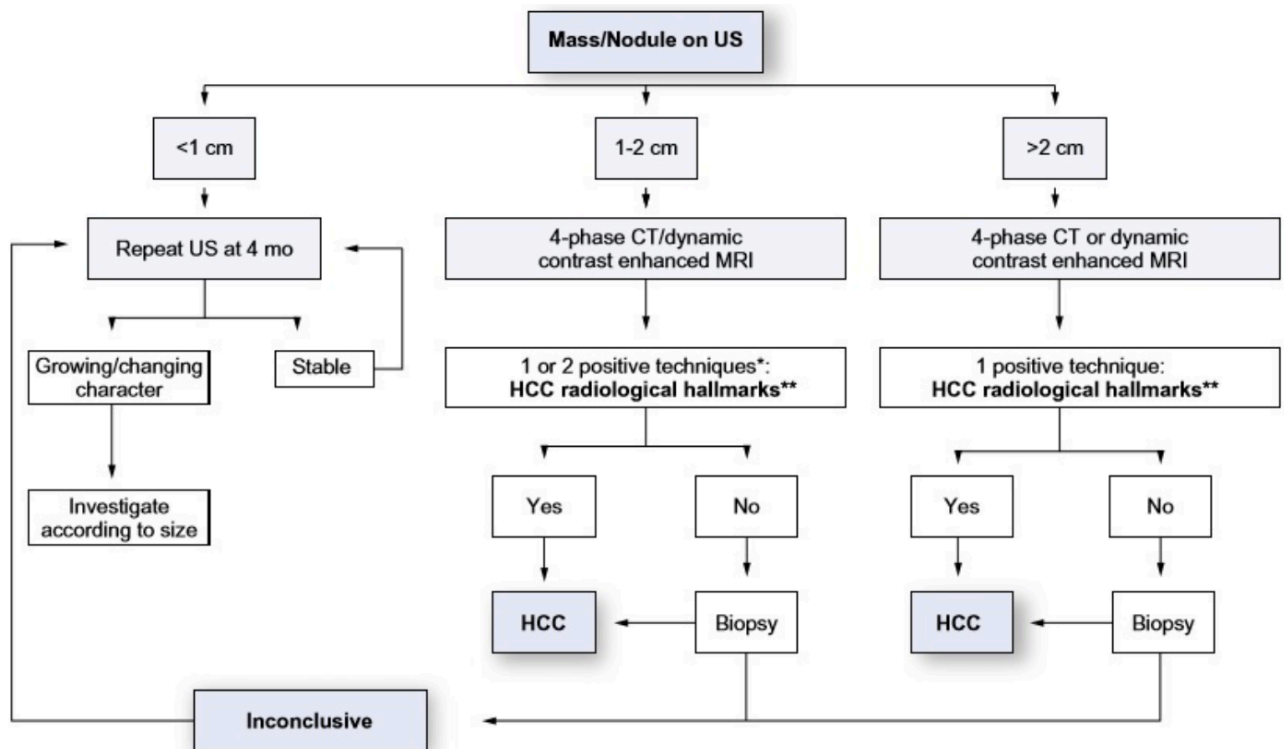


Figure 10. Représentation du schéma diagnostique de CHC chez un patient cirrhotique. D'après l'EASL-EORTC 2012 (European Association for the Study of the Liver - European Organization for Research and Treatment of Cancer). US : UltraSound ; MRI : Magnetic Resonance Imaging

Le **stade 0** d'un CHC (**très précoce**) est attribué aux patients n'ayant qu'une seule tumeur de diamètre inférieur à 2 cm, en bon état général et avec une fonction hépatique préservée (Child-Pugh A). Ces tumeurs sont éligibles aux traitements curatifs, et la survie globale des patients est d'environ 85% à cinq ans post-résection/ablation hépatique.

Un CHC de **stade A (précoce)** est défini pour les patients ayant un à trois nodules de moins de 3 cm de diamètre, en bon état général avec une fonction hépatique préservée ou peu altérée (Child-Pugh A ou B). Ces tumeurs sont également éligibles aux traitements curatifs, avec une survie globale des patients à cinq ans légèrement inférieure à celle des stades très précoces.

Le **stade B** correspond aux patients présentant de multiples nodules mais sans dissémination extra-hépatique et avec une fonction hépatique préservée ou peu altérée. La survie moyenne de ces patients varie de 16 à 36 mois après prise en charge thérapeutique et dépend de l'atteinte hépatique lors du diagnostic.

Les patients atteints d'un CHC de **stade C (avancé)** présentent de multiples nodules avec invasion intra- et/ou extra-hépatique. Ces patients, dans la majorité des cas, sont symptomatiques avec une fonction hépatique altérée (Child-Pugh B ou C). Leur survie moyenne, après traitement, dépend de l'atteinte hépatique et peut varier de 6 à 24 mois.

Le **stade terminal (D)** correspond à une atteinte multinodulaire le plus souvent accompagnée d'une invasion extra-hépatique. Ces patients possèdent une fonction hépatique largement altérée (Child-Pugh C le plus souvent) associée à une altération sévère de l'état général. La survie moyenne est estimée à environ 3 mois.

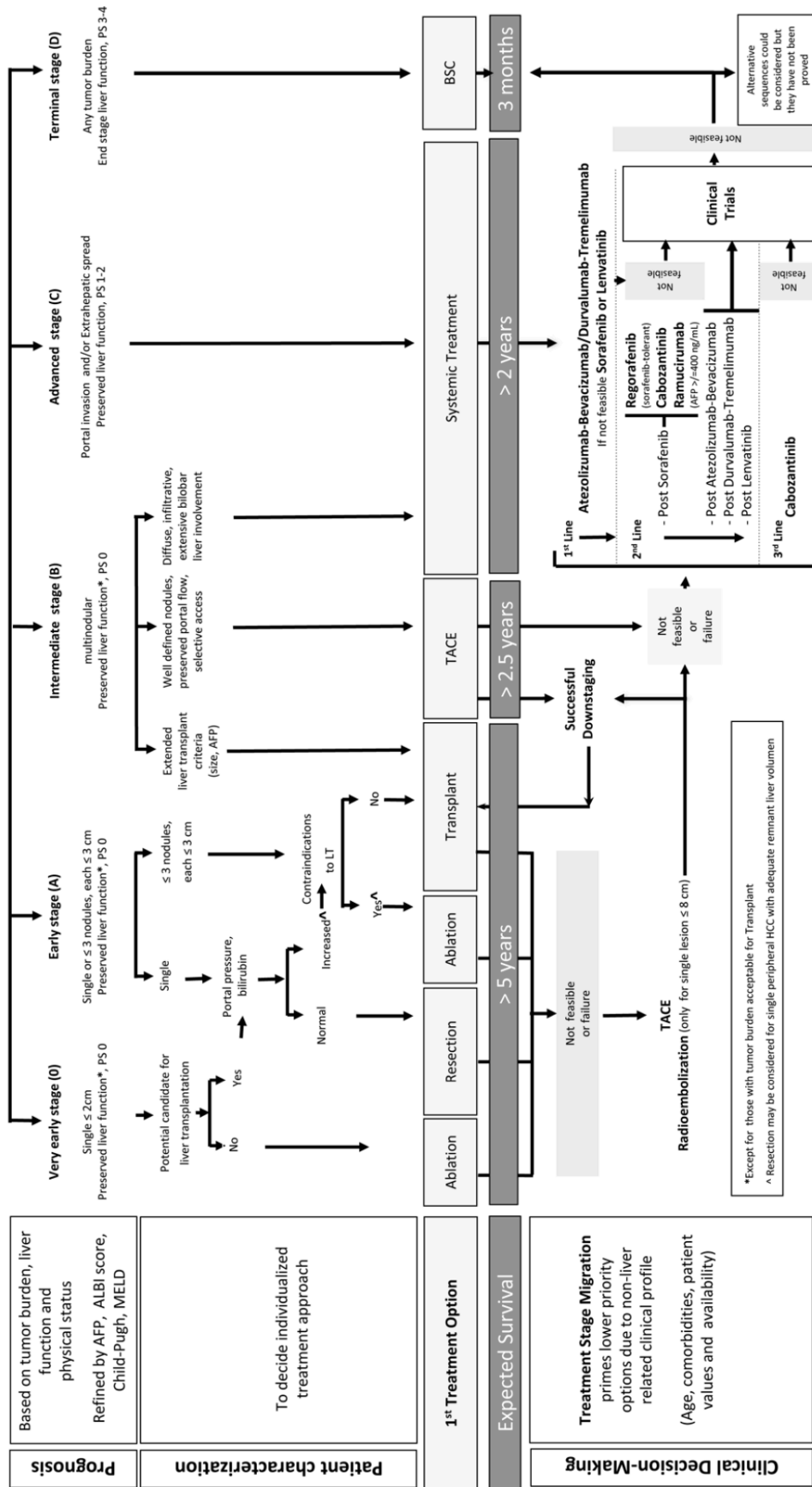


Figure 11. Classification BCLC en 2022. Extrait de Reig et al., 2022. AFP : alpha-fetoprotéine ; ALBI : albumin-bilirubin ; BSC : best supportive care ; ECOG PS : Eastern Cooperative Oncology Group-Performance Status ; LT : liver transplantation ; MELD : Model of End-stage Liver Disease ; TACE : TransArterial ChemoEmbolisation

## 2.7. Les thérapeutiques actuelles

La classification BCLC fournit un arbre décisionnel thérapeutique permettant d'adapter les traitements en fonction de l'état clinique du patient après diagnostic. Les dossiers patients sont revus en réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP) afin de valider le diagnostic et d'orienter le traitement vers une visée plutôt curative ou palliative.

### 2.7.1. Les traitements curatifs

#### a) La transplantation

Elle est indiquée dans le cas d'un CHC strictement localisé au niveau hépatique avec nodule unique ou multiples mesurant moins de 3 cm de diamètre en l'absence de thrombose portale ou hépatique. Ce traitement est considéré comme « idéal » car traitant l'étiologie, la tumeur, ainsi que les conséquences somatiques potentielles. Le taux de survie globale à 5 ans est d'environ 70% avec un taux de récurrence de 4 à 20%. Les greffons étant malheureusement très rares, une réelle pénurie sévit mondialement et donc peu de patients peuvent profiter de cette solution thérapeutique. S'ajoute à cette pénurie les contre-indications telles que l'âge, la présence de comorbidités et l'alcoolisme chronique. Afin de pallier la pénurie de greffons, la résection et la destruction percutanée sont privilégiées dans un premier temps. La deuxième solution, envisagée par un collège d'expert (*ILTS Transplant Oncology Consensus Conference*) en 2020, propose d'étendre les critères d'acceptation en vue d'une transplantation (32).

#### b) La résection

En l'absence de fibrose sur un foie non tumoral, la résection est le traitement de référence. Pour les patients cirrhotiques, la résection est discutée lorsque la fonction hépatique est préservée (Child-Pugh A). En cas d'absence ou de présence de cirrhose, les taux de survie globale à 5 ans sont d'environ 50 et 30%, respectivement (33). En 2012 une méta-analyse a regroupé l'ensemble des publications PubMed relatives à une résection hépatique dans le contexte du CHC de 2000 à 2010. Cette étude a permis de mettre en évidence des taux de survie sans récurrence à 5 ans de l'ordre de 65%, sans tenir compte de l'état cirrhotique (34).



### c) La destruction percutanée

Généralement bien tolérée, cette méthode simple représente une alternative à la chirurgie. La radiofréquence monopolaire est d'abord envisagée pour une tumeur < 3 cm de diamètre. En cas de contre-indication à la radiofréquence, l'alcoolisation percutanée peut être réalisée pour un diamètre tumoral inférieur à 2 cm.

Plus récemment, de nouvelles méthodes sont étudiées afin de pouvoir traiter des tumeurs plus volumineuses (3 à 5 cm), notamment la radiofréquence multibipolaire (35).

### d) La radiothérapie stéréotaxique

Cette technique est indiquée pour les patients ayant un CHC mononodulaire, non éligibles à la résection, à la transplantation et à la radiofréquence. Elle nécessite une expertise spécialisée des cliniciens, ainsi que des accélérateurs de particules dernière génération avec système d'imagerie intégré. La tolérance est excellente avec possibilité de l'utiliser sur des patients fragiles sur le plan cardio-respiratoire. Des essais de phase I et II ont montré des taux de survie globale à 1 et 2 ans de 85 et 70% respectivement, et ce avec de rares complications (35). Plus récemment, un essai randomisé de phase III a prouvé la non-infériorité de cette thérapeutique vs radiofréquence dans le cadre des récidives de CHC (36).

### e) Traitements adjuvants

Il existe un risque de récurrence locale élevé, post résection ou destruction percutanée, qui peut questionner sur l'intérêt d'un traitement adjuvant post traitement curatif afin d'éviter au mieux les rechutes. Une méta-analyse, incluant 6 essais cliniques randomisés avec 844 patients totaux, a évalué l'influence de thérapies par cytokines autologues sur la survie globale et la survie sans progression. Cette étude a montré l'amélioration de ces deux paramètres jusqu'à 3 ans en post résection de l'HCC (37).

## 2.7.2. Les traitements palliatifs

### a) La chimioembolisation artérielle

Pour réaliser une chimioembolisation artérielle (**TACE**, ou *TransArterial ChemoEmbolisation*), il convient de réaliser au préalable une artériographie afin d'identifier l'artère alimentant la tumeur. Une chimiothérapie est alors injectée dans cette artère (localement) avec des agents d'embolisation afin de stopper la vascularisation de



la tumeur. La *TACE* est indiquée en 1<sup>ère</sup> ligne de traitement palliatif pour les patients atteints d'un CHC évolué, multinodulaire, sans migration extra-hépatique, en bon état général avec un score de Child-Pugh A ou B (38,39). Une méta-analyse de 2003 a pu mettre en évidence une prolongation de la survie de plus 20% à deux ans (40).

## **b) La radioembolisation**

De même que pour la *TACE*, la radio embolisation artérielle (**TARE**, ou *TransArterial RadioEmbolisation*) nécessite une artériographie préalable. Des microsphère d'Yttrium-90 sont ensuite injectées dans l'artère hépatique puis une embolisation est pratiquée. Auparavant il n'existait pas de « réelles » indications pour la *TARE* dans la stratégie thérapeutique du CHC, d'autant plus que plusieurs études (essai français SARAH, essai SIRveNIB et SORAMIC) n'ont pu démontrer la supériorité de la radioembolisation vs. SOR (41-43). Toutefois, des études plus récentes ont prouvé l'importance d'une dosimétrie personnalisée (44), menant ainsi à l'établissement de nouvelles recommandations au niveau international (45).

## **c) Les traitements médicamenteux**

### **1<sup>ère</sup> ligne de Traitement**

L'association **atézolizumab – bévacicumab** (Tecentriq® - Avastin®) est indiquée comme la référence dans le traitement du CHC avancé. Cette dernière a obtenu son autorisation de mise sur le marché (AMM) en 2021 pour les patients adultes atteints d'un CHC avancé ou non résécable, n'ayant pas reçu de traitement systémique antérieur, uniquement Child-Pugh A et non éligibles/ou échec des autres traitements locorégionaux. Cette association fait appel à une immunothérapie anti-PD-L1 (ou *Programmed Death-Ligand 1*), l'atézolizumab, et à un anticorps monoclonal ciblant le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF ou *Vascular Endothelial Growth Factor*). Les résultats de l'étude de phase III IMbrave ont montré une supériorité de cette combinaison face au traitement par SOR. En effet, la survie globale (19.2 vs. 13.4 mois,  $p < 0.0009$ ) ainsi que la survie sans progression (6.9 vs. 4.3 mois,  $p = 0.0001$ ) ont été nettement améliorées, sans toutefois diminuer les effets indésirables de grade  $\geq 3$  (Finn R, Qin S et al., 2020).

L'association **trémélimumab – durvalumab** (Imjudo® - Imfinzi®) a reçu de manière très récente (février 2023), à la suite de l'étude HIMALAYA, son AMM pour la même indication et dans les mêmes règles de restriction de traitement que la combinaison atézolizumab – bévacizumab. En effet, cette association médicamenteuse augmente la survie globale *versus* SOR seul (46). Cette thérapie associe un anticorps monoclonal anti-antigène 4 (dirigé contre les lymphocytes T cytotoxiques), le trémélimumab, et un anticorps monoclonal anti-PD-L1. Il n'existe à ce jour aucune donnée de comparaison entre ces deux thérapies de 1<sup>ère</sup> ligne, le choix de traitement doit donc se faire en fonction des données d'efficacité et de tolérance, et bien sûr en fonction du profil de chaque patient.

### Les inhibiteurs de tyrosine kinase

Le **SOR** (Nexavar®) est un inhibiteur multikinase ciblant des protéines à activité sérine/thréonine kinase et des récepteurs à activité tyrosine kinase, s'ensuit une cascade cellulaire, illustrée dans la Figure 12, entraînant un blocage de voies de signalisation. Le SOR possède des propriétés antiprolifératives et antiangiogéniques sur les cellules tumorales (hépatiques et endothéliales) via l'inhibition des voies de signalisation RAF (*Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*), MEK (*Mitogen-Extracellular signal-regulated Kinase*) et ERK (*Extracellular Signal-regulated Kinase*). Son effet antiangiogénique se traduit par son ciblage des récepteurs à activité tyrosine-kinase tels que le VEGFR 2 et 3 (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*) et le PDGFR-  $\beta$  (*Platelet Derived Growth Factors Receptor  $\beta$* ) sur les cellules endothéliales. Le SOR a également démontré des effets apoptotiques (47,48). Le SOR a obtenu son AMM en France en 2008 et est resté pendant 10 ans la seule molécule de référence en 1<sup>ère</sup> ligne de traitement palliatif du CHC. Son indication est le traitement palliatif du CHC avancé non éligible à un traitement spécifique curatif (transplantation, résection, *TACE*) ou palliatif médicamenteux (immunothérapies) ou en récurrence après traitement spécifique chez des patients ayant un bon état général avec une fonction hépatique préservée (Child-Pugh A). Le SOR reste une 1<sup>ère</sup> ligne de traitement en cas de contre-indication aux associations atézolizumab – bévacizumab et trémélimumab – durvalumab. Les études SHARP et ASIA-PACIFIC (études randomisées en double aveugle) ont toutes deux pu démontrer une amélioration en termes de survie globale et de survie sans progression du SOR *versus* placebo (7,49).

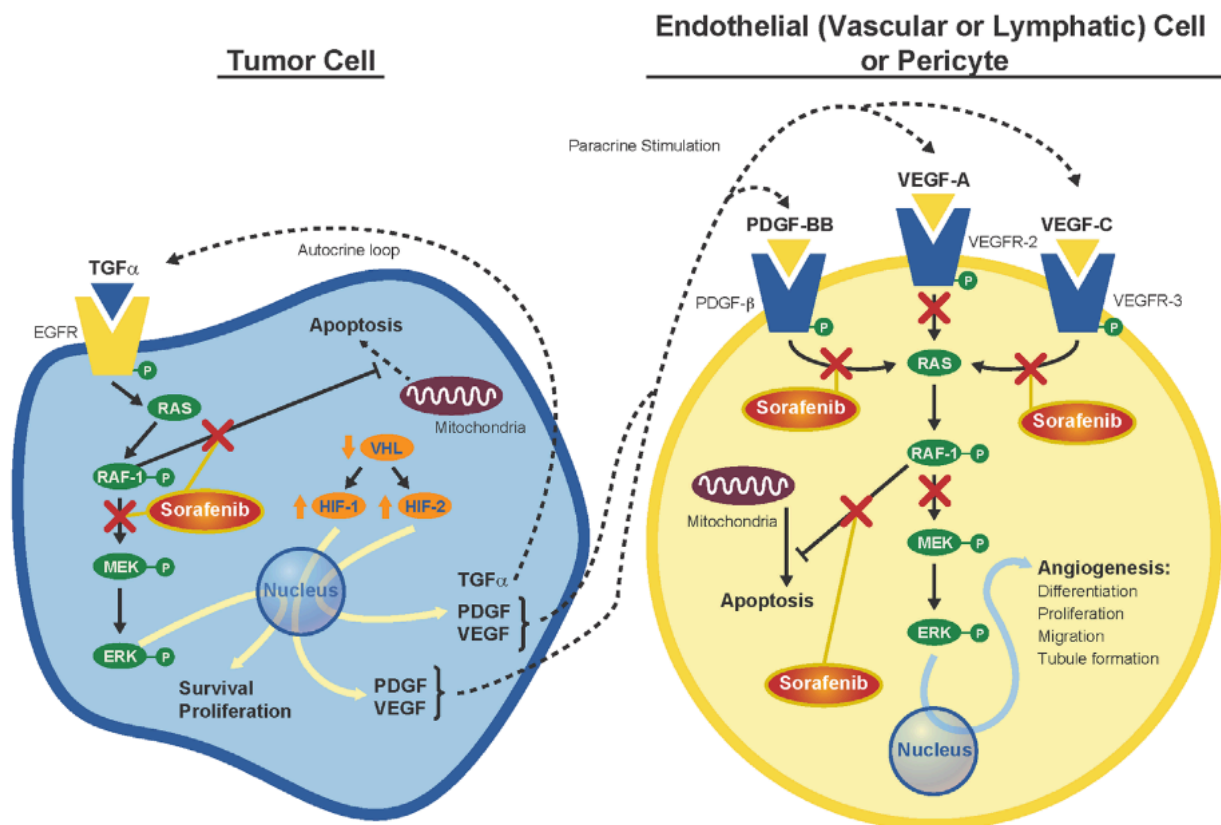


Figure 12. Représentation schématique des mécanismes d'action du sorafénib. Extrait de Walko et al., 2014. EGF : Epithelial Growth Factor ; TGF : Tumor Growth Factor ; RAF : Rapidly accelerated Fibrosarcoma ; MEK : Mitogen-Extracellular signal-regulated Kinase ; ERK : Extracellular Signal-regulated Kinase ; VHL : Von Hippel-Lindau tumor suppressor ; HIF : Hypoxia-Inducible Factor ; PDGF : Platelet Derived Growth Factor ; VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

Le **lenvatinib** (Lenvima®) est un inhibiteur multikinase à activité anti-angiogénique majoritairement en inhibant les VEGFR1, 2 et 3, le PDGFR –  $\alpha$  ainsi que le récepteur au facteur de croissance des fibroblastes, le FGFR (*Fibroblast Growth Factor Receptor*). Il possède également des activités antiprolifératives en inhibant le récepteur RET (*REarranged during Transfection* : gènes proto-oncogènes). Cette molécule a démontré sa non-infériorité vs. SOR dans une étude de phase III de 2018, notamment avec une amélioration de la survie sans progression (7.4 vs. 3.7 mois) (50). Le lenvatinib a obtenu une extension d'AMM Européenne en 2018 mais aucun remboursement dans l'indication du CHC en France. Ce traitement représente donc une alternative au SOR en cas de contre-indication avec quelques limites économiques.

## **2<sup>ème</sup> ligne de traitement**

Le **régorafénib** (Stivarga®) est un inhibiteur de multiples protéines kinases, dont celles participant à l'activité angiogénique (VEGFR 1, 2 et 3), à l'activité oncogénique (KIT, RET, RAF-1, BRAF (*v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*)) ainsi qu'à la migration métastatique (PDGFR et FGFR). Dans l'étude RESORCE, randomisée contre placebo, en double aveugle, le régorafénib a montré une efficacité thérapeutique *versus* placebo en augmentant la survie globale (51). Cette molécule fait donc partie de la 2<sup>nd</sup> ligne de traitement dans l'hépatocarcinome avancé après échec du SOR, chez des patients adultes ayant une fonction hépatique Child-Pugh A est sans intolérance préalable au SOR.

Le **cabozéentinib** (Cabometyx®) est un inhibiteur de tyrosine kinase multiple à activité antiproliférative et antiangiogénique. Il a été identifié comme inhibiteur de MET (*Mesenchymal Epithelial Transition*), de différents VEGFR principalement. Dans l'étude de phase III CELESTIAL, randomisée en double aveugle contre placebo, la cabozéantinib a permis d'augmenter la survie globale dans le groupe traité (52). Ce traitement s'inscrit donc en 2<sup>nd</sup> ligne dans la prise en charge du CHC, pour des patients adultes non éligibles à un traitement curatif, en bon état général avec un Child-Pugh A et présentant un échec (progression ou intolérance) sous SOR.

Le **ramucirumab** (Cyramza®) est un anticorps monoclonal humain recombinant, bloqueur spécifique du VEGFR de type 2. Il empêche ainsi la fixation des VEGF A, C et D au VEGFR-2 diminuant ainsi la prolifération et la migration des cellules endothéliales. Les études randomisées de phase III REACH et son extension, REACH-2 ont permis de mettre en avant une amélioration significative de la survie globale et de la survie sans progression du ramucirumab vs. placebo, mais seulement pour les patients possédants un dosage de l'alpha fœto-protéine > 400 ng/mL (53,54). De plus, une analyse poolée de ces deux études a mis en lumière un meilleur profil de tolérance par rapport à d'autres inhibiteurs de tyrosine kinase, associé à un délai avant détérioration clinique augmenté (55). Ce traitement est donc indiqué en 2<sup>nd</sup> ligne dans le CHC, chez des patients adultes non éligibles à un traitement curatif, en bon état général avec un Child-Pugh A et présentant un échec (progression ou intolérance) sous SOR.

### **3<sup>ème</sup> ligne de traitement**

En cas d'impasse ou d'échec thérapeutique des autres médicaments systémiques de 2<sup>nd</sup> ligne, le cabozantinib est également indiqué en 3<sup>ème</sup> ligne.

#### **2.7.3. Principaux effets indésirables des traitements médicamenteux**

Parmi l'ensemble des thérapeutiques médicamenteuses mises à disposition des cliniciens contre le CHC, aucune n'est exempte d'effets indésirables. Les effets indésirables majeurs les plus fréquents ont été répertoriés dans la Tableau 2. Tous ces traitements possèdent des effets indésirables digestifs et cutanés. Tous, à l'exception de l'association trémélimumab – durvalumab, engendrent une hypertension artérielle. Pour les patients hypertendus ou avec antécédents cardiaques, il est donc préférable d'opter pour l'association trémélimumab – durvalumab en 1<sup>ère</sup> intention. Le SOR est la seule thérapie ne pas entraîner des perturbations endocriniennes. Il est donc plus adapté de privilégier le SOR pour des patients possédant des pathologies endocriniennes préexistantes, si la situation clinique du patient l'autorise. *In fine*, le choix du traitement reposera toujours sur l'appréciation du clinicien quant à son patient.

Ces problèmes d'effets indésirables peuvent être contournés par l'utilisation de vecteurs à l'échelle nanométrique : les NPs. L'encapsulation d'anticancéreux cytotoxiques dans ces dernières peut non seulement diminuer les effets indésirables de l'actif mais aussi augmenter leur biodisponibilité (56). Le 3<sup>ème</sup> chapitre portera donc sur une présentation des différents types de NPs existants. Une description de leur atouts et inconvénients sera faite ainsi qu'une analyse de leur utilisation dans le domaine biomédical, en particulier dans le CHC.

Tableau 2. Effets indésirables fréquents retrouvés chez les patients traités par les molécules de 1ère, 2ème et 3ème ligne de traitement dans le CHC

Système	Type d'effet indésirable	Atézolizumab/ bévacicumab	Trémélimumab/ Durvalumab	Sorafénib	Lenvatinib	Régorafénib	Cabozantinib
Hématologique	Lymphopénie			X	X		
	Leucopénie		X	X	X	X	
	Neutropénie	X	X	X	X		
	Anémie	X	X	X		X	
	Thrombocytopénie		X	X	X	X	
Gastro-intestinal	Diarrhées	X	X	X	X	X	X
	Constipation	X			X		
	Vomissements		X	X	X	X	X
	Nausées	X			X	X	X
	Douleurs abdominales			X	X		
Cutané	Prurit			X			
	Rash cutané		X	X	X		
	Syndrome main-pied			X	X	X	X
	Alopécie		X	X	X	X	
Endocrinien	Hypothyroïdie	X	X		X	X	X
	Hyperthyroïdie		X				
	Thyroïdite						
Vasculaire	Hémorragies	X			X	X	X
	HTA	X		X	X	X	X
Cardiaque	Insuffisance cardiaque			X	X		
	IDM			X	X		
Respiratoire	Rhinorrhée			X			
	Dysphonie			X	X	X	
Hépatobiliaire	ASAT/ALAT			Augmentation	Augmentation	Augmentation	Augmentation
	Bilirubine				Augmentation		
	Lipase					X	
	Amylase					X	
Musculo-squelettique	Myalgies			X	X		
	Arthralgies			X	X		
Rénal & voies urinaires	Insuffisance rénale			X	X		
	Protéinurie			X	X	X	
Reproduction	Dysfonction érectile			X			
Troubles du métabolisme	Hyponatrémie			X		X	
	Hypophosphatémie			X		X	
	Hypokaliémie			X	X	X	
	Hypoglycémie			X			
	Hypocalcémie			X	X	X	
Troubles généraux	Fièvre						
	Asthénie	X	X	X	X	X	X
	Perte de poids			X	X		
	Diminution de l'appétit		X		X	X	X
Système nerveux	Vertiges				X		
	Dysgueusie			X	X	X	
	Encéphalopathie						
	Neuropathie			X		Périphérique	

### 3. Chapitre 3 : une stratégie innovante pour augmenter la biodisponibilité d'actifs liposolubles : les vecteurs nanoparticulaires

Les NPs ont vu leur utilisation exploser au cours des dernières décennies dans de multiples domaines tels que l'électronique, la chimie, l'industrie agro-alimentaire et surtout dans le domaine de la santé (57). L'attrait pour ces composés nanométriques vient justement de leur taille qui leur confère des propriétés physico-chimiques particulières, notamment leur rapport surface/volume élevé. L'intérêt principal des NPs dans le domaine médical réside dans leur capacité à encapsuler des médicaments peu solubles afin d'améliorer leur biodisponibilité et diminuer leurs effets indésirables. Ainsi, une première partie descriptive introduira les NPs et décrira succinctement les différents types de NPs d'intérêt dans le domaine médical. L'aspect réglementaire, en particulier l'évaluation de sécurité des NPs, sera également abordé. La seconde partie correspondra à un état de l'art des NPs développées pour traiter le CHC.

#### 3.1. Introduction sur les nanoparticules

Les NPs sont par définition des nano-objets donc les trois dimensions sont à l'échelle nanométrique (1 à 100 nm) avec aucune dimension disproportionnée par rapport aux autres (norme ISO 80004-1:2023). Le concept des nanotechnologies a tout d'abord été introduit par Richard Feynman en 1959 avec son discours « **There's plenty of room at the bottom** » (Feynman, 1959) au congrès de la société américaine de physique. Il est pourtant retrouvé des traces d'utilisation de procédés nanométriques dans l'Égypte ancienne, en Mésopotamie, ainsi que pendant l'ère des mayas (59). L'un des exemples les plus parlants est représenté par la coupe de Lycurgue, datant de l'époque romaine. Après analyse par microscopie électronique à transmission, il s'est avéré que la coupe contenait des NPs d'or et d'argent (50 à 100 nm) permettant de modifier la couleur de cette dernière en fonction de l'orientation de la source lumineuse (60). À la suite de la découverte par Feynman de ce nouveau domaine, différentes approches ont été développées pour la synthèse de composés nanométriques. La première méthode, descendante ou « **top-down** », consiste à décomposer des matériaux bruts, par lithographie par exemple, afin d'obtenir des composés nanométriques. À l'inverse, la méthode ascendante ou « **bottom up** » correspond à la construction de nanostructures

atomes par atomes ou molécules par molécules par des méthodes physiques ou chimiques (Figure 13).

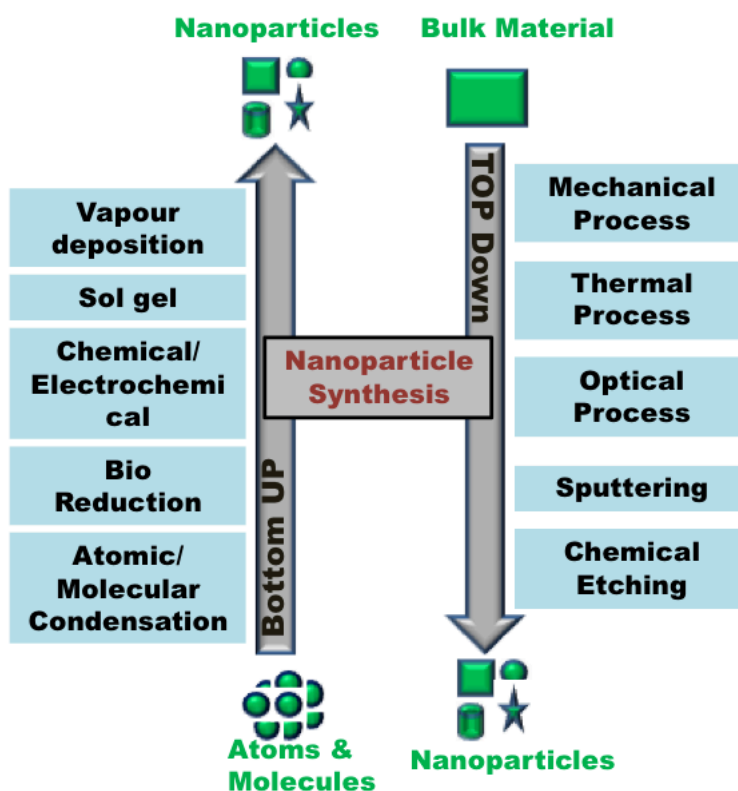


Figure 13. Représentation des méthodes, descendante ou ascendante, de fabrication des composés nanométriques.

Extrait de Bayda et al., 2020

En 1986, la publication du premier livre sur les nanotechnologies « **Engines of creation: the coming era of nanotechnology** » par K. Eric Drexler (Drexler, 1986) ouvre de manière plus large la connaissance des nanotechnologies aux communautés scientifiques. Cinq ans plus tard, Drexler, Peterson et Pergamit publient un autre ouvrage « Unbounding the future: the nanotechnology revolution » dans lequel sera utilisé pour la première fois le terme des nanomédecines (Drexler *et al.*, 1991). La machine nanotechnologique est en route et le développement des nanomédecines est alors lancé dans une multitude de domaines médicaux, pour une visée diagnostique, thérapeutique ou bien regroupant les deux avec la théranostique. Deux classifications principales existent, la première repose sur les dimensionnalités des nanomatériaux (Tableau 3) tandis que la seconde est organisée selon la nature de leur composition. Dans ce dernier



cas, les NPs peuvent être divisées en trois groupes : les NPs dérivées du carbone, les NPs inorganiques et organiques.

Tableau 3. Classification des nanomatériaux en fonction de leur dimensionnalité

Classification	Caractéristiques	Exemples
Nanomatériaux de dimension 0	3 dimensions à l'échelle nanométrique	Nanoparticules, fullerènes, points quantiques
Nanomatériaux unidimensionnels	L'une des dimensions est en dehors de l'échelle nanométrique	Nanotubes, nanotiges, nanofibres
Nanomatériaux bidimensionnels	Deux des dimensions sont en dehors de l'échelle nanométrique	Nanofeuilles, nanofilms
Nanomatériaux tridimensionnels	Aucune des dimensions à l'échelle nanométrique	Dispersion de nanoparticules, réseau de nanofilm/nanotubes

Les **NPs dérivées du carbone** sont constituées uniquement d'atomes de carbone. Les exemples les plus connus de cette catégorie sont les fullerènes, les NPs de noir de carbone et les points quantiques de carbone (Figure 14). Ces NPs possèdent des liaisons carbone hybrides  $sp^2$  combinées avec les propriétés de l'échelle nanométrique, leur conférant des propriétés de conductivité électrique, optique et thermique. Leur champ d'application environnemental (stockage/capteurs d'énergie, absorbants, filtres composites) est large, tandis que les applications médicales sont plus limitées du fait de leur toxicité (63). En effet, ce type de nanomatériaux entraîne une toxicité cellulaire (génération d'espèces réactives de l'oxygène, atteinte mitochondriale et lysosomale, etc ...) ainsi qu'une activation du système immunitaire (64).

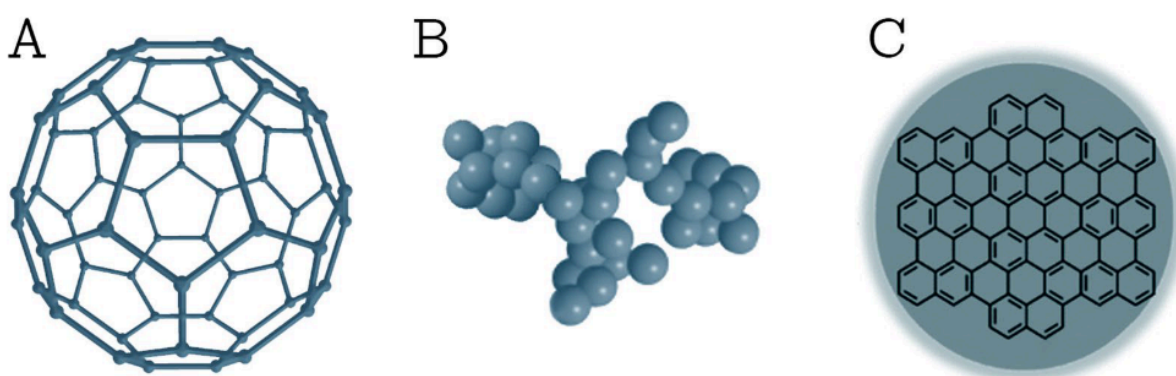


Figure 14. Représentation de différents types de NPs dérivées du carbone : (A) un fullerène C<sub>60</sub>, (B) des NPs de noir de carbone et (C) des points quantiques de carbone.

Extrait de Joudeh et al., 2022

Les **NPs inorganiques** ne contiennent ni éléments organiques, ni carbone. Les métaux, la silice, les semiconducteurs ou bien la céramique composent ce type de NPs. Les NPs d'or (Au-NPs) et d'argent (Ag-NPs) ont un diamètre compris de 10 à 300/400 nm. Du fait de leur composition liée à un seul élément métallique, elle possèdent des caractéristiques physico-chimiques spécifiques et démontrent une bonne biocompatibilité, offrant ainsi de nouvelles options thérapeutiques en particulier dans le traitement du cancer (65,66). Les **Au-NPs** sont largement utilisées dans les applications biomédicales grâce à leur facilité de production et de fonctionnalisation, autant en diagnostic via de l'imagerie qu'en thérapeutique (67–69). Les **Ag-NPs** ont des propriétés antifongiques importantes, antibactériennes, antivirales, antiparasitaires, anti-inflammatoires et antiagrégantes plaquettaires. De plus, leur coût de production faible permet une production à grande échelle. Leurs domaines d'application majeurs restent toutefois la chirurgie ainsi que la dentisterie (70).

D'autres NPs métalliques, telles que celles de titane (**TiO<sub>2</sub>-NPs**) sont utilisées de manière importante par de nombreuses industries (peinture, cosmétique, etc ...) et représentent un danger pour l'environnement et potentiellement pour la santé humaine en fonction de la voie d'exposition. La toxicité des TiO<sub>2</sub>-NPs par voie cutanée ou inhalée est faible et limitée à certaines conditions, tandis l'absorption de ces NPs par voie orale ou intraveineuse entraîne une toxicité rénale et hépatique (71). Elles ont été retirées du marché dans l'alimentation en Europe en 2022 mais restent présentes dans de nombreuses spécialités médicamenteuses comme opacifiant (Spasfon®, Doliprane®, Tardyferon®, etc ...).

Les NPs de silice (**Si-NPs**) existent sous deux formes : cristalline et amorphe. Les effets indésirables, en particulier pulmonaires, des Si-NPs cristallines ont limité l'utilisation de ces dernières en thérapeutique (72). A l'inverse, les Si-NPs amorphes montrent de nombreuses qualités telles qu'une bonne biocompatibilité, une facilité de production à coût faible, une libération contrôlée des médicaments et surtout une capacité d'encapsulation importante grâce à leur structure poreuse (73,74).

Dans les NPs semiconductrices sont retrouvées les nanoparticules de magnétite (Mn-NPs). Elles sont connues pour avoir une bonne biocompatibilité et biodégradabilité, la capacité de délivrer des actifs anticancéreux, et possèdent des propriétés superparamagnétiques. Ces propriétés magnétiques permettent de manipuler à distance les

Mn-NPs grâce à un champ magnétique externe pour de l'imagerie médicale à visée diagnostique (75,76).

Comparativement aux NPs inorganiques, les **NPs organiques** se composent d'atomes de carbones. Leur structure, lipidique, protéique ou à base de sucre leur confère habituellement une meilleure biocompatibilité et une moindre toxicité que les NPs inorganiques. Toutefois, leur stabilité dans le temps, notamment dans les milieux biologiques est un peu moins bonne que celle des NPs inorganiques (77). Les principaux nanosystèmes organiques sont les NPs polymériques, les liposomes, les NPs lipidiques et les micelles.

Les **NPs polymériques** sont composées par les polyesters tels que le *PolyLactic Acid* (PLA) et le PLGA. Ils ont une bonne biocompatibilité, sont biodégradables, et leur nature amphiphile permet l'autoassemblage ce qui en fait d'excellents matériaux pour l'encapsulation et la délivrance de médicaments, aussi bien lipophiles qu'hydrophiles.

Les **liposomes** (LPs) sont des vésicules sphériques produites lors de l'assemblage de multiples ou d'uniques bicouches lipidiques avec de l'eau. Leur structure amphiphile (phospholipides et cholestérol) leur permet d'encapsuler des médicaments lipophiles dans la bicouche lipidique tandis que les médicaments hydrophiles sont encapsulés dans la phase aqueuse (78,79). Les LPs ont notamment été les premiers nanovecteurs (liposomes pégylés de doxorubicine) à être autorisés sur le marché par l'administration américaine des denrées alimentaires et des médicaments (FDA) (80). Les nanoparticules lipidiques regroupent les nanoparticules lipidiques solides (**NPLS**) et les nanocapsules lipidiques (**NCLs**). Les **NPLS** sont composées de lipides physiologiques, liquides et solides qui restent, pour les derniers, sous forme solide à la fois à température ambiante et corporelle. Les lipides solides utilisés forment une matrice pour l'encapsulation des médicaments et peuvent correspondre à des acides gras, des mono-, di- ou triglycérides ou bien encore à un mélange de glycérides. Cette matrice est stabilisée par l'action de polymères et tensioactifs. Quelques exemples de NPLS sont illustrés dans la Figure 15 (81,82). La taille de ces particules est comprise entre 50 et 1000 nm. Leurs propriétés regroupent biocompatibilité, stabilité dans le temps ainsi que la libération contrôlée des composés hydrophiles et lipophiles (83).

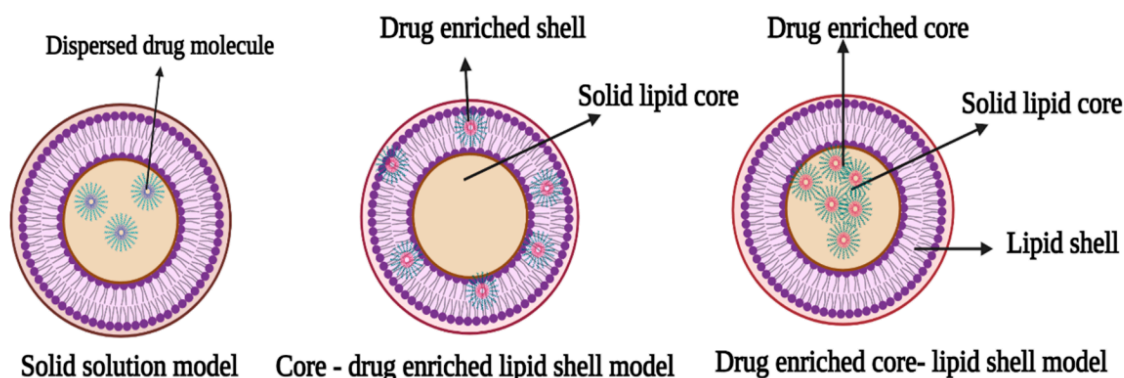


Figure 15. Représentation de trois différents types de NPLS. Extrait de Madkhali et al., 2022

Les NPLS possèdent toutefois quelques inconvénients tels qu'une capacité d'encapsulation limitée et surtout un risque d'expulsion du médicament du vecteur à cause de processus de cristallisation lors du stockage (84–86). Les **NCLs**, quant à elles, se situent structurellement entre les liposomes et les NPs polymériques : elles sont constituées d'un noyau huileux entouré d'une enveloppe externe composée de phospholipides et de tensioactifs. Un ingénieux procédé de formulation par inversion de phase a été mis au point en 2002 par Heurtault et al. (Figure 16). Ce procédé n'utilise aucun solvant, ce qui limite la toxicité (87). De plus, tous les excipients sont considérés comme *generally recognized as safe* (GRAS). Les NCLs ont donc comme avantage une très grande biocompatibilité.

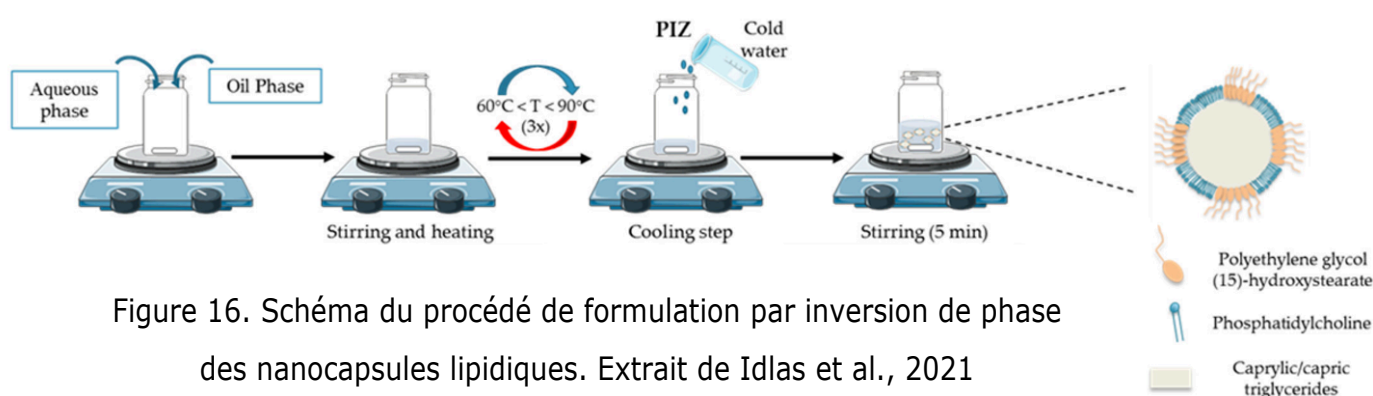


Figure 16. Schéma du procédé de formulation par inversion de phase des nanocapsules lipidiques. Extrait de Idlas et al., 2021

Leur taille, entre 20 à 120 nm, peut être ajustée par modification quantitative et qualitative de ses composés (88). L'encapsulation d'actifs lipophiles dans le noyau huileux améliore leur biodisponibilité et les protège contre les dégradations de l'organisme (89). Ces nanovecteurs sont capables de délivrer des médicaments via de multiples voies

d'administrations telles que les voies orale, IV, parentérale, oculaire et pulmonaire ... (90). Les fonctions pégylées présentes dans la structure de base possèdent une furtivité par rapport au système immunitaire pouvant être améliorée par un recouvrement avec des chaînes pégylées supplémentaires (91,92).

Concernant l'aspect réglementaire, les instances officielles (FDA, EMA, ICH) doivent faire face aux problèmes inhérents aux NPs : les innombrables types de NPs, leur très petite taille et leurs propriétés physico-chimiques particulières. Ces caractéristiques limitent l'application des méthodes d'analyses standardisées définies par les instances. Le test de Ames (évaluation du potentiel mutagène) a par exemple été reconnu comme non pertinent pour évaluer la mutagénicité des Au-NPs (93). Par ailleurs, Piret *et al.* dans le cadre du projet « European FP7 Nanovalid » se sont heurtés à des limites inter laboratoires lors du développement et de la validation de *Standard Operating Procedure* (94). Il existe toutefois des recommandations officielles provenant de certaines instances. Le développement et la standardisation de méthodes manquantes ont été pris en compte par le projet REFINE du centre commun de recherche de la commission européenne en 2019 (95). En 2022, d'autres « *guidelines* » ont été publiées par la FDA concernant l'évaluation des nanomatériaux (96). De manière encore plus récente, c'est le conseil scientifique de l'ANSM qui a statué quant à l'évaluation réglementaire des nanomatériaux dans les produits de santé (97). Il est notamment spécifié que, depuis la directive modificative européenne de 2017 (directive 2001/83/EC), les nanomatériaux présents dans les dispositifs médicaux sont réglementés.

Dans cette introduction les différents types de NPs utilisées dans le domaine biomédical ont été présentées, ainsi que leurs avantages et inconvénients. L'immense variété de NPs existante rend complexe leur évaluation réglementaire par des méthodes standardisées. Il existe malgré tout un certain nombre de nanosystèmes sur le marché assurant la délivrance d'actifs anticancéreux (98). De plus, de nombreuses études se sont intéressées à l'efficacité de délivrance de médicaments destinés à traiter le CHC (Kumar *et al.* 2021). Dans la prochaine partie, les différentes stratégies utilisées (ciblage passif, ciblage actif, utilisation d'ARN interférents, etc ...) seront décrites et discutées en fonction du type de NPs utilisé.

## 3.2. Nanoparticules inorganiques et hépatocarcinome

### 3.2.1. Les nanoparticules d'or

Les propriétés anti-angiogéniques des Au-NPs ont été démontrées sur des lignées cellulaires endothéliales, impliquant plusieurs voies de signalisation telles que celle du VEGF/VEGFR et du FGF. Des propriétés anti-inflammatoires ont également été mises en avant avec une diminution de la sécrétion de certaines cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$  (100). La Figure 17 résume ces mécanismes d'action. Plusieurs équipes se sont intéressées aux effets, *in vitro* et *in vivo*, de l'encapsulation de micro-ARN (miR) à l'intérieur d'Au-NPs. La première étude a ainsi mis en lumière l'amélioration de l'effet thérapeutique du SOR encapsulé (anti-miR-221 Au-NPs) vs. SOR seul via l'activation de la voie de signalisation DNMT1 sur deux lignées cancéreuses hépatiques (HepG2 et Huh7) (101). La seconde a pu mettre en avant une délivrance efficace de miR-375 (miR-375 Au-NPs), un gène suppresseur de tumeur, dans les lignées HepG2 et Hep3B entraînant alors une inhibition de la prolifération cellulaire, de la migration/invasion et de la formation de colonies et induisant l'apoptose. Il a également été démontré sur un modèle murin de tumeur primaire et xénogreffée, une bonne internalisation intra tumorale avec une efficacité thérapeutique sans toxicité apparente (102). L'utilisation d'Au-NPs pour la délivrance ciblée d'actifs représente donc, dans le cadre du CHC, une solution intéressante potentialisant l'effet thérapeutique du SOR tout en conservant une bonne tolérance.

### 3.2.2. Les nanoparticules d'argent

La littérature regroupe un ensemble conséquent d'études des Ag-NPs sur des lignées cancéreuses du sein et pulmonaires mais peu sur lignées cancéreuses hépatiques (103). Dans une étude de Faedmaleki *et al.*, les résultats ont montré une prolifération de cellules cancéreuses hépatiques (HepG2) 44 fois inférieure à celle de cellules hépatiques normales (cellules hépatiques primaires de souris) après exposition aux Ag-NPs (104). Singh *et al.* ont injecté des Ag-NPs dans un modèle murin de cancer hépatique développé par leur laboratoire. L'analyse des sérum de ces rats Wistars a mis en évidence un effet antiinflammatoire de Ag-NPs par diminution de cytokines pro inflammatoires (e.g. IL-6, TNF- $\alpha$  et NF-kB) via une atténuation de la voie de signalisation NF-kB (105). Les Ag-NPs ont prouvé leur intérêt antiinflammatoire sur des cultures cellulaires hépatiques. Toutefois

des études plus approfondies sont nécessaires avant d'envisager leur intégration dans l'arsenal contre le cancer du foie.

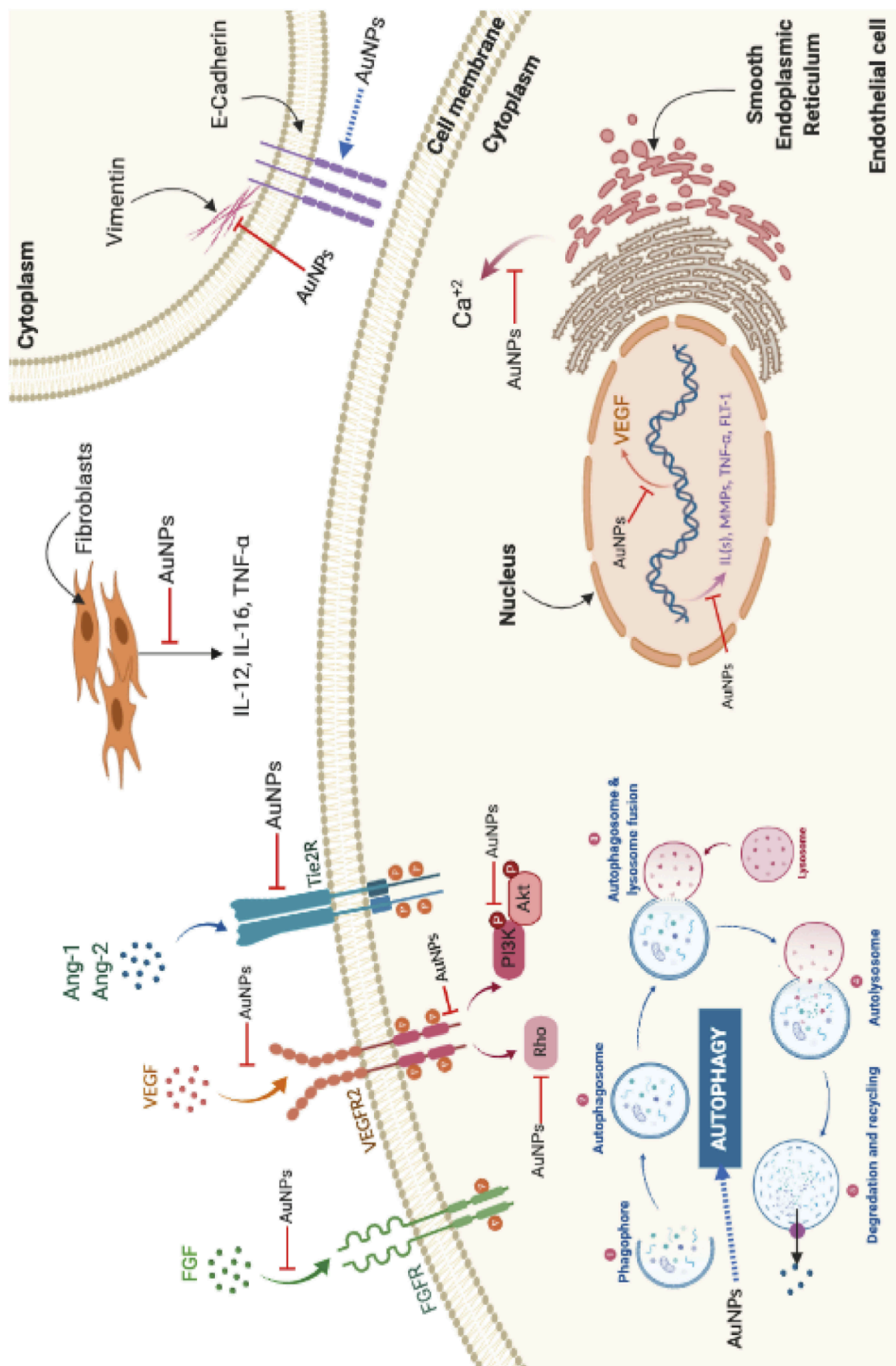


Figure 17. Représentation schématique des différentes voies de signalisation impliquées dans les effets anti-angiogéniques et anti-inflammatoires liés aux Au-NPs. Extrait de Darweesh et al., 2019



### 3.2.3. Les nanoparticules de silice

Ye *et al.* ont ciblé les cellules cancéreuses hépatiques en ajoutant des lipoprotéines à la surface de Si-NPs contenant de la doxorubicine et du SOR. Leur résultats *in vitro* et *in vivo* ont mis en évidence une meilleure efficacité des médicaments encapsulés par rapport aux traitements seuls (74). Dans une autre étude, Tsai *et al.* ont obtenu des résultats encourageant en combinant thérapie génique et CIS à l'intérieur de Si-NPs. Un blocage des cellules Huh7 en phase S avec apoptose a été observé (106). Toutefois, trop peu de données sont disponibles à l'heure actuelle concernant les interactions des Si-NPs avec les cellules hépatiques. De plus, une étude récente a démontré la toxicité de Si-NPs au niveau hépatique *in vitro* sur des hépatocytes L02 et *in vivo* sur modèle murin. Les Si-NPs ont contribué à l'aggravation de la stéatose hépatique via un stress oxydatif (107).

### 3.2.4. Les nanoparticules de magnétite

Les Mn-NPs peuvent être fonctionnalisées par des groupements de polyéthylène glycol (PEG), de polyéthylène oxide ou de dextran afin d'augmenter la furtivité par rapport au système immunitaire. D'autres revêtements peuvent être utilisés afin de cibler efficacement les cellules cancéreuses *in vitro* et *in vivo*, dont celles de l'hépatocarcinome. Dans une étude de 2017, des souris Balb/c porteuses de cancer hépatique induit ont été traitées par des Mn-NPs recouvertes de crocine. Le traitement était associé à une régression des lésions pré-cancéreuses, une régulation négative du gène Bcl-2, des marqueurs d'angiogenèse, d'inflammation et de stress oxydatif (108).

## 3.3. Nanoparticules organiques et hépatocarcinome

### 3.3.1. Les nanoparticules polymériques

Le *Poly (Lactic-co-Glycolic Acid)* (PLGA), le chitosan, le pullulane et la pectine, sous forme naturelle ou synthétique, représentent les composés principaux utilisés dans le développement des NPs polymériques (109,110). Leur composition permet aux NPs polymériques d'obtenir une meilleure solubilité des principes actifs ainsi qu'une meilleure protection contre les dégradations de l'organisme, une excellente biocompatibilité ainsi qu'une possibilité de *coating* pour le ciblage. Les aires thérapeutiques ciblées sont aussi variées que les types de polymères utilisés et regroupent les anticancéreux aussi bien que les anti-infectieux, les antidiabétiques, les anti-inflammatoires, etc ... (111).



### a) Les dérivés des polyesters

L'équipe de Craparo *et al.* a formulé des NPs micellaires polymériques de SOR à base de PLA et lactose intégrant une modification pour le ciblage du récepteur hépatique *ASialoGlycoProtein* (ASGP-R). Les résultats expérimentaux sur souris femelles adultes ont mis en évidence une accumulation préférentielle du SOR au niveau hépatique (112). D'autres récepteurs membranaires hépatiques peuvent être ciblés afin d'améliorer la délivrance ciblée de médicaments au niveau du foie. Les récepteurs à l'acide glycyrrhétinique (fortement exprimés dans le CHC) ont par exemple été exploités par Zhan *et al.*. En 2015, ils ont validé, *in vitro*, le ciblage hépatique de leur micelles polymériques modifiées (conjugaison de la L-histidine, avec l'acide glycyrrhétinique puis du PEG), avec une internalisation marquée dans la lignée cancéreuse hépatique Hep3B comparativement à la lignée de cancer du sein MDA-MB-231 (113). La validation de l'hypothèse *in vitro* a été validé en 2017 sur des souris CHC xénogreffées (114). Une accumulation hépatique intra tumorale importante et une inhibition de la prolifération furent observées suite à l'injection IV de doxorubicine encapsulée dans un système poly micellaire, ciblant le foie par son acide glycyrrhétinique et grâce notamment à son peptide pénétrant (*trans-activator of transcription* (TAT)) permettant une meilleure internalisation (114). Plus récemment, une équipe chinoise a validé le pouvoir ciblant spécifique du peptide SP94 dirigé contre le CHC. Des polysomes de doxorubicine décorés du peptide SP94, illustrés dans la Figure 18, ont permis d'obtenir une internalisation 3 fois plus importante que le contrôle non décoré dans la ligné SMMC-7721. De plus, cette même formulation vs. la formulation non modifiée et vs. une formulation de doxorubicine liposomale commerciale, a permis d'augmenter l'efficacité thérapeutique et la survie après injection IV dans un modèle murin orthotopique de CHC (115,116). D'autres polymères, tels que le PEG ou encore le *PolyCaproLactone* (PCL) peuvent former des gels thermosensibles, idéals pour la libération continue ou prolongée de principes actifs. Grâce à un ingénieux système sous forme d'hydrogel nanoparticulaire, une libération prolongée de SOR pendant 15 jours a été possible *in vivo* (117). Les polymères peuvent donc limiter les prises médicamenteuses, avantage considérable pour l'observance du patient.

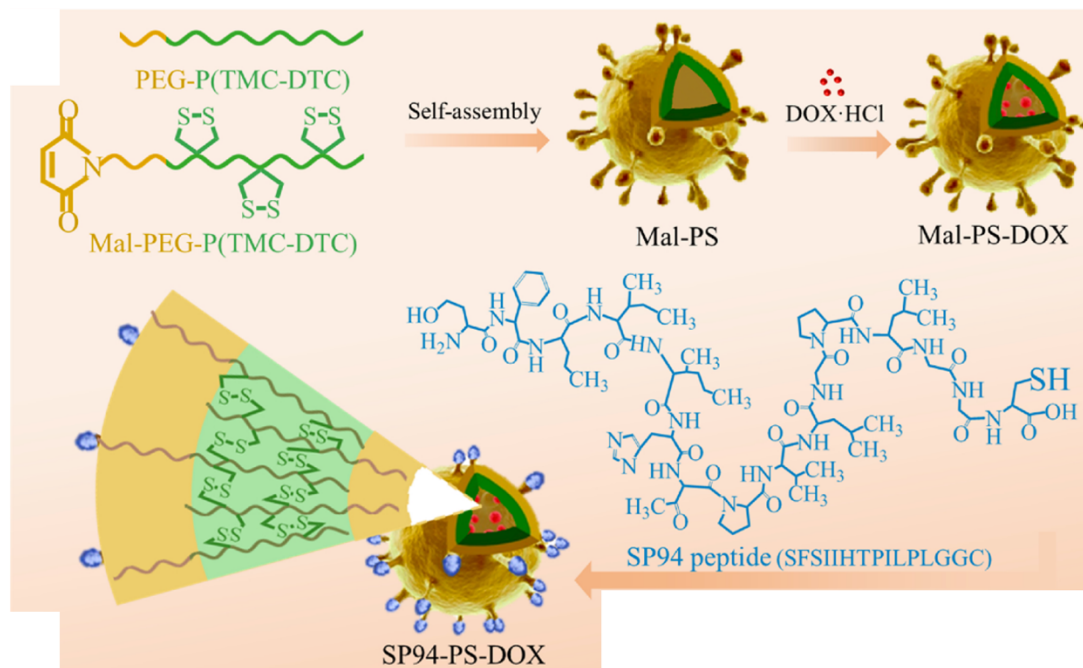


Figure 18. Schéma de synthèse des polysomes de doxorubicine décorés du peptide SP94. Extrait de Zhang et al., 2021

### b) Les dérivés du chitosan

Le chitosan est un polysaccharide pouvant être d'origine naturelle ou semi synthétique, issu de la désacétylation de la chitine dans ce cas. Ce composé, abordable, faiblement immunogène et biocompatible permet l'encapsulation de doxorubicine. Jain *et al.* ont synthétisé des nanoparticules de chitosan galactosylées encapsulant de la doxorubicine. Ils ont pu démontrer la forte affinité de ces vecteurs pour les ASGP-R des cellules HepG2, entraînant par la suite une toxicité associée (118).

### c) Les dérivés du pullulane

Le pullulane est un polysaccharide naturel isolé à partir d'un champignon, l'*Aureobasidium pullulans*. De manière similaire au chitosan, il possède une haute biocompatibilité et peu de toxicité et ses caractéristiques amphiphiles facilitent son autoassemblage en NPs (119). Zhao *et al.* ont développé avec succès une formulation de NPs à base de pullulane, sensible au pH et co-encapsulant de la doxorubicine et du SOR dans le contexte du traitement du cancer du sein (120). L'environnement tumoral étant dans la grande majorité des cas acide, cela permet une dégradation de la formulation par le pH tumoral afin d'obtenir une libération spécifique de l'actif sur le site de la tumeur. Une étude plus récente s'est intéressée à la co-encapsulation de doxorubicine et de pyrrolidinedithiocarbamate (PDTC), un inhibiteur de NF- $\kappa$ B, dans des NPs de pullulane

également sensible au pH. Ces NPs d'environ 150 nm de diamètre ont entraîné la mort cellulaire par apoptose de cellules HepG2 chimiorésistante ainsi que dans un modèle murin portant le même type de tumeur hépatique chimiorésistante : une diminution de prolifération associée à une diminution du volume tumoral ont été observées ainsi qu'une survie à 50 jours post traitement de 100% (121).

#### **d) Les dérivés de la pectine**

La pectine est une substance naturellement présente dans les légumes et les fruits (e.g. les carottes, les pommes, etc ...). Cette substance est un polysaccharide polyanionique et se compose d'acide D-polygalaturonique. Tout comme les autres polymères naturels, la pectine dispose d'une bonne biocompatibilité et permet l'encapsulation de médicaments anti-cancéreux. En effet, Chittasupho *et al.* ont formulé des NPs de pectine sphériques chargées en méthotrexate (MTX-P-NPs) par réaction carbodiimide permettant ainsi une libération prolongée à pH physiologique *in vitro*. De plus, les MTX-P-NPs ont entraîné une toxicité sur cellules HepG2 supérieure à celle observée pour le méthotrexate seul (122). Plus récemment, la doxorubicine a pu être encapsulée dans des NPs de pectine autoassemblées (DOX-P-NPs) (123), induisant ainsi plus de mortalité des cellules cancéreuses HepG2 que la forme libre. De la même manière, la réduction du volume tumoral *in vivo* (souris nude BALB/c) était plus important avec les DOX-P-NPs. De plus, les DOX-P-NPs n'ont induit aucun effet indésirable cardiaque (analyses tissulaires avec marquage hématoxyline/éosine) et n'ont entraîné la mort d'aucune souris après 14 jours contrairement à la doxorubicine seule.

#### **3.3.2. Les nanotubes de carbone**

Les nanotubes de carbone (C-NTs) sont des tubes cylindriques composés de feuilles de graphène en forme d'aiguille ouverte d'un côté et scellée de l'autre. En fonction du nombre de couches formant les C-NTs, ces derniers seront monos ou multi parois (Figure 19). Les C-NTs peuvent servir de vecteurs à de multiples agents antimicrobiens et anticancéreux réduisant ainsi leur toxicité (124). Les nanovecteurs non sphériques, tels que les C-NTs, ont un tropisme lymphatique pouvant être mis à profit dans le traitement de métastases ganglionnaires (125). La stabilité du SOR ainsi que son « *drug loading* » ont pu être améliorés grâce à une encapsulation à l'intérieur d'oxydes de graphène fonctionnalisés par des groupements d'acide folique (ciblage de cellules cancéreuses) (126). En 2019, le SOR a été encapsulé avec succès dans des C-NTs pégylés (SOR-PEG-

C-NTs). L'analyse de la toxicité *in vitro* (cellules HepG2) a souligné un effet antiprolifératif deux fois plus important du SOR-PEG-C-NTs vs. SOR seul. Des effets thérapeutiques antitumoraux *in vivo* (rats mâles Wistar) ont également été confirmés avec des effets indésirables hépatiques réduits dans le cas du SOR-PEG-C-NTs vs. SOR seul (127).

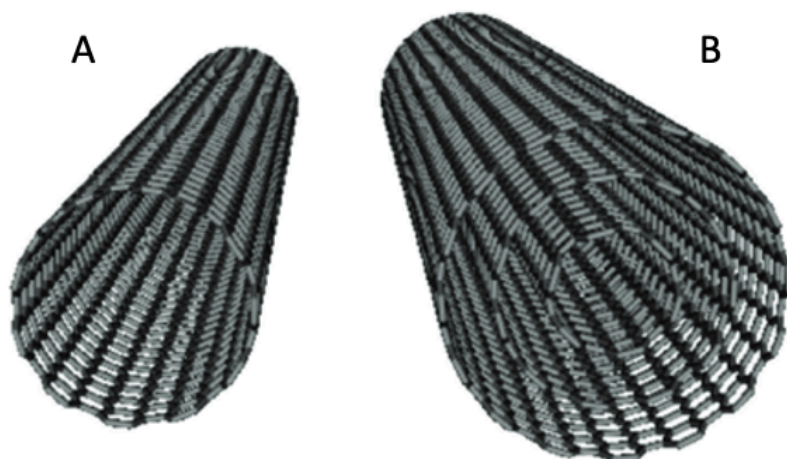


Figure 19. Représentation de nanotubes de carbone (A) mono paroi et (B) multi parois. Extrait de Elsayed et al., 2019

### 3.3.3. Les nanoparticules dérivées de l'albumine

L'albumine, protéine la plus abondante dans l'organisme humain, est l'un des transporteurs majeurs du compartiment vasculaire (bilirubine, acides gras, etc ...). Du fait de son ubiquité dans le compartiment sanguin, l'albumine représente un vecteur attractif quant à la délivrance de médicaments. L'encapsulation d'actifs anticancéreux à l'intérieur de nanoparticules d'albumine (Alb-NPs) s'est développée au cours des dernières années (128), aboutissant à une AMM de l'Abraxane® (paclitaxel encapsulé à l'intérieur d'Alb-NPs, étude IMPACT CA046) en France en 2014 dans le traitement du cancer du pancréas (129). Depuis, des équipes de chercheurs ont développé des systèmes de délivrance de SOR à partir d'albumine de sérum bovin (BSA). Pascalau *et al.* ont réussi à synthétiser un gel à base de BSA encapsulant de manière efficace le SOR. La libération de ce dernier dans les cellules HepG2 entraîne une diminution importante de la viabilité pour des concentrations de l'ordre du  $\mu\text{M}$  (130). Récemment, Wang *et al.* ont pu démontrer, *in vitro* et *in vivo*, la pertinence de l'utilisation d'Alb-NPs dans le traitement du CHC. En effet, leurs Alb-NPs décorées de groupements folates et chargées en SOR ont montré une internalisation et une efficacité thérapeutique sur cellules cancéreuses hépatiques (SMMC-7721). De plus, le ciblage de la tumeur hépatique a été

confirmé sur souris (131). L'omniprésence de l'albumine dans la circulation reste un atout pour la délivrance seulement si cette dernière est fonctionnalisée afin d'améliorer le ciblage. Dans le cas contraire, son intérêt serait limité dans la stratégie du CHC.

### 3.3.4. Les systèmes nanoparticulaires lipidiques

Les systèmes nanoparticulaires lipidiques, tels que les NPLS, les LPs et NCLs sont majoritairement composés de lipides mais diffèrent dans leur structure (Figure 20). Ces systèmes améliorant la biodisponibilité de l'actif (132) peuvent être fonctionnalisés *i)* dans l'optique de diminuer la captation par le système immunitaire (pégylation), augmentant ainsi considérablement le temps de circulation, *ii)* ou bien afin d'obtenir un meilleur ciblage des cellules cancéreuses (133–135). L'utilisation de ces trois types de NPs sera discutée dans le contexte du CHC.

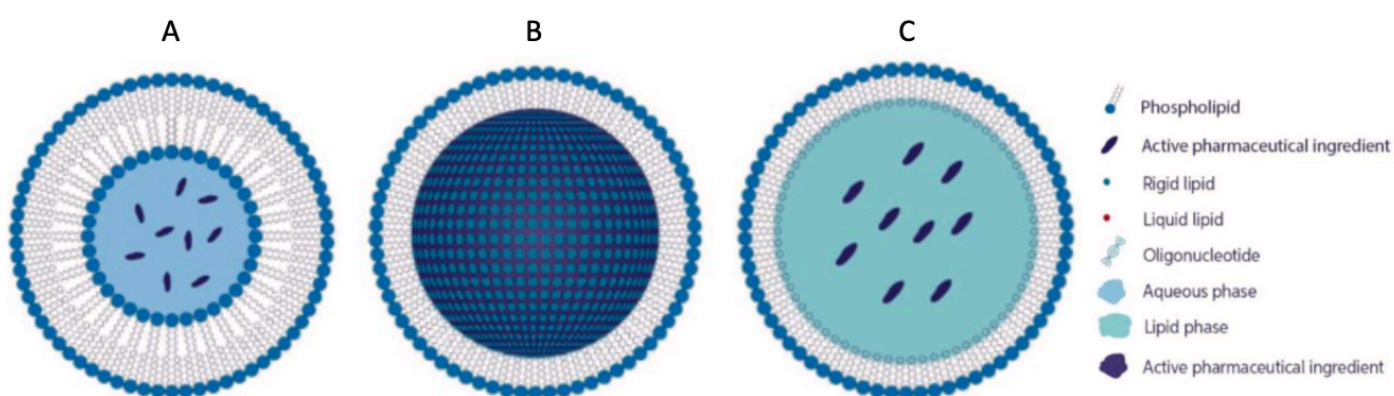


Figure 20. Schéma de trois différents types de systèmes nanoparticulaires lipidiques, (A) les liposomes, (B) les nanoparticules lipidiques solides et (C) les nanocapsules lipidiques. Extrait de Sheoran et al., 2022

#### a) Les liposomes

Des fonctionnalisations sur des LPs ont été développées afin d'augmenter la sensibilité au pH, aux champs magnétiques ou bien à la température. Yan *et al.*, ont par exemple développé des LPs sensibles au pH chargés en doxorubicine, améliorant de manière importante l'efficacité thérapeutique de celle-ci (136). Soenen et son équipe ont développé un ciblage spécifique des cellules HepG2 dans un modèle de coculture à partir de magnétoliposomes en ajoutant des groupements galactoses à des LPs à noyau d'oxyde de fer (137). D'autres formulations liposomales comme des liposomes pégylés de cantharidine ou des liposomes cationiques de curcumine ont montrés d'excellents

résultats sur les lignées cellulaires HepG2 et H-22 respectivement. En effet, chacune des formulations liposomales a induit une diminution de la prolifération cellulaire par mort apoptotique à la fois *in vitro* et *in vivo* sur des modèles murins (138,139).

### **b) Les nanoparticules lipidiques solides**

Les NPLS sont de bons vecteurs améliorant l'efficacité thérapeutique de molécules anticancéreuses en particulier dans le cancer du sein triple négatif (140,141). Le développement de NPLS dans le cadre du traitement de l'hépatocarcinome n'est pas en reste. En effet, plusieurs études ont démontré que l'encapsulation d'actifs, notamment le SOR, pouvait être réalisée à l'intérieur de NPLS. Les NPLS ont permis le relargage efficace du SOR dans les cellules hépatiques cancéreuses, améliorant de manière considérable son efficacité thérapeutique tant *in vitro* qu'*in vivo* (142–144). Grillone *et al.* ont ingénieusement encapsulé du SOR ainsi que des NPs d'oxyde de fer superparamagnétiques à l'intérieur de NPLS grâce à une matrice de palmitate d'hexadécyle. Les NPLS formulées ont montré une excellente biocompatibilité et stabilité tout en inhibant de manière importante la prolifération tumorale *in vitro* des cellules HepG2 (145).

### **c) Les NCLs**

Dans une étude de Yang *et al.*, les petits ARN interférents (ARNsi), capables d'inhiber spécifiquement l'expression d'un gène ont été combinés aux NCLs. La chimiorésistance, partiellement due à la présence de cellules souches a été contournée grâce à la combinaison de Bmi1 (protéine complexe polycomb) ARNsi à l'intérieur de nanocapsules lipidiques cationiques de cisplatine (CIS) (146). L'activité antitumorale des Bmi1-ARNsi-CIS-NCLs était significativement supérieure à celle du CIS seul ou du CIS-NCLs dans des souris nues Balb/c porteuses de CHC induit. La spécificité de ciblage des cellules souches (marquage CD133) a ensuite été confirmée sur modèle HepG2 résistant au CIS. Les Bmi1-ARNsi-CIS-NCLs ont entraîné une diminution drastique de la population CD133+. Rahman *et al.* ont évalué l'efficacité anticancéreuse de NCLs d'acide ganodérique (AG) (AG-NCLs) *in vitro* sur des cellules HepG2 et *in vivo* sur des rats mâles Wistar. Les AG-NCLs ont inhibé la prolifération *in vitro* par rapport aux NCLs blanches et à l'AG en solution. *In vivo*, les AG-NCLs ont induit une régression des nodules tumoraux de cellules HepG2 comparativement à l'AG en solution (148,149). Plus récemment, une équipe

dirigée par Rahman a co-encapsulé du SOR et de l'AG dans des NCLs (AG-SOR-NCLs) d'environ 30 nm. Leurs études *in vitro* ont prouvé la stabilité de la formulation dans différents pH acides (comparaison au pH gastrique) et la libération des actifs sur 6h atteignait presque les 70% de la quantité initiale encapsulée. Sur rats Wistar, les AG-SOR-NCLs ont supprimé les nodules hépatiques, arrêté la croissance tumorale et diminué la sécrétion de cytokines pro inflammatoires (150). Clavreul *et al.* ont démontré l'effet antiprolifératif ainsi qu'anti-angiogénique de SOR-NCLs *in vivo* sur un modèle murin de glioblastome (151). En 2019, des NCLs ont été utilisées afin de codélivrer du SOR et de la quercétine. Un double ciblage des cellules cancéreuses hépatique a été proposé grâce à l'addition sur les NCLs de deux ligands, la lactoferrine (LF) et l'acide glycyrrhétinique AG. L'efficacité antitumorale de ces NCLs décorées a été validée à la fois sur modèle cellulaire ainsi que sur modèle murin (152). Les NCLs permettent donc d'avoir de bons taux d'encapsulation du SOR, une libération contrôlée de l'actif et surtout d'obtenir un effet antitumoral élevé tant sur cultures cellulaires que sur modèles murins. Les analyses histopathologiques, issues des résultats *in vivo* des études précédemment citées ne montrent pas de lésions des cellules hépatiques saines : ceci met en valeur la diminution des effets indésirables liés à l'actif encapsulé ainsi que la grande biocompatibilité de ces vecteurs. Les NCLs représentent donc un réel atout dans la délivrance ciblée de médicaments destinés à traiter le CHC.

L'analyse de la littérature a permis de mettre en avant l'intérêt des NCLs comme vecteurs d'actifs dirigés contre le CHC. Il paraissait donc intéressant d'analyser, dans un premier temps *in vitro*, les interactions entre NCLs et cellules hépatiques. Ces interactions ont été étudiées dans le prochain chapitre. Deux modèles hépatiques, l'un cancéreux (analyse du ciblage par les NCLs) et l'autre différencié (analyse de la biocompatibilité) ont été mis en contact avec des NCLs à base de Transcutol®. Les profils de toxicité sur chaque modèle ont été caractérisés et les mécanismes d'internalisation explorés.



## 4. Transcutol® lipid nanocapsules and the proof of concept of their interest for the vectorization of HCC treatment

Flavien Delaporte<sup>a,b</sup>, Emilie Roger<sup>a</sup>, Jérôme Bejaud<sup>a</sup> and Camille Savary<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Univ Angers, CHU Angers, Inserm, CNRS, MINT, SFR ICAT, F-49000 Angers, France

<sup>b</sup>CHU Angers, 4 rue Larrey, 49033 Angers, France

### 4.1. Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC), the major form of liver cancer, is the third leading cause of cancer worldwide. Late detection of the disease is often seen due to a poor symptomatology. A solution was brought in 2008 by the development and market authorization approval of sorafenib (SOR), a tyrosine kinase inhibitor. Unfortunately, SOR exhibits important side effects (hand-foot syndrome, vomiting, liver damage, etc ...) and its bioavailability needs to be improved. Thus, LNCs were developed to overcome these drawbacks as they can increase drug's bioavailability and decrease its side effects. Herein, blank LNCs were formulated to evaluate their uptake and cytotoxicity/biocompatibility inside HepG2 cancer cells and HepaRG differentiated cells. Results showed a fast internalization and high intracellular accumulation of LNCs in HepG2 cells associated with an important cytotoxicity. In contrast, internalization was much lower and slower in HepaRG cells and LNCs exhibited a good biocompatibility even for high concentrations. Therefore, this preliminary study proved that LNCs were attractive vectors for HCC therapy, and it would be of great interest to evaluate their uptake and toxicity *in vivo*.

Keywords: liver; lipid nanocapsules; hepatocellular carcinoma; cytotoxicity/biocompatibility; internalization

### 4.2. Introduction

Liver cancer is the third leading cause of cancer-related death worldwide, with almost one million new cases per year (1). HCC represents around 90% of total liver cancer and its curative treatments, such as transplantation and ablation, allow an overall survival rate of 50 to 70% after 5 years. Unfortunately, late diagnosis due to poor symptoms is observed in most cases, thus only early HCC stages patients can benefit this type of



therapy. SOR (Nevaxar®), a multi-tyrosine kinase inhibitor, had been the first and only approved drug in advanced HCC for 10 years before sharing the first line of treatment with immunotherapies in 2018 (atézolizumab - bevacizumab) and more recently in 2023 (tremelimumab - durvalumab) (7,46). Overall survival given by SOR is only around 1 year so drug's bioavailability must be improved, inherent drug's side effects need to be decreased, and cancer resistance has to be evaded somehow. Indeed, multiple intrinsic tumor parameters such as cancer stem cells renewal, dysregulation of multiples pathways, particularly the downregulation of protein kinase mediators (Ras, Raf, MEK and ERK), and the complexity of the tumor microenvironment decrease treatment efficiency (153–155). A potential solution to overcome these drawbacks was found in the development of nanosystems drug delivery (99,156). These nanosystems have attracted interest in cancer thanks to their capacity to target cancer cells, and so improve drug's efficiency, and reduce their side effects (132,157). Among these nanosized vectors, lipid nanocapsules (LNCs) can enhance drug's bioavailability and they already demonstrated their ability to encapsulate SOR (151). Moreover, LNCs present an hepatic tropism that could be used against HCC as a passive targeting (158,159). Besides, cancer therapies imply taking a chronic treatment, therefore LNCs' interactions with liver cells after repeated exposure needed to be evaluated. For this study, two hepatic cell lines were chosen: HepG2 cancer cells and differentiated HepaRG cells. HepG2 model was selected as an hepatocarcinoma model whereas HepaRG one, the closest model to primary human hepatocytes, as a mimicking model to healthy liver cells. HepaRG cell line expresses high metabolic activity and is differentiated over one month, consequently allowing chronic studies. Furthermore, HepaRG cell line might be considered as no tumorigenic cells (160). In this context, this preliminary study aimed to evaluate the interactions of blank LNCs (as potential nanovectors for HCC therapy) with HepG2 and HepaRG cells after acute exposure, and after 4 weeks of exposure on HepaRG cell line. Toxicity assessment has been performed through mitochondrial and lysosomal activity and highlighted a higher toxicity of LNCs on HepG2 cells. Evaluation of kinetics was in accordance with toxicity data showing a faster internalization in HepG2 model. Overall data suggest an interest of using LNCs for hepatocarcinoma vectorized therapy.

### 4.3. Material and methods

#### 4.3.1. Materials

Dulbecco's phosphate buffer saline (DPBS), trypsin (0.25 and 0.05%), non-essential amino-acids, sodium pyruvate, hydrocortisone, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), 3-Amino-7-dimethylamino-2-methylphenazine (NRU), hydrochloridechlorpromazine hydrochloride (CPZ), genistein (GEN), dimethyl sulfoxide (DMSO), insulin from bovine pancreas, acetaminophen and penicillin/streptomycin were obtained from Sigma-Aldrich (Munich, Germany; St. Quentin-Fallavier, France; Zwijndrecht, The Netherlands). Williams'E medium, minimum essential medium (MEM), Hyclone® fetal bovine serum (FBS) and GlutaMAX™ supplement were purchased from Fisher Scientific (Illkirch, France). Dutcher® FBS was purchased from Dutcher (Bernolsheim, France). Lipoid® S100 and Kolliphor® HS15 were purchased from Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany) and BASF (Ludwigshafen, Germany), respectively. Labrafil® M1944CS, Transcutol® HP and Labrafac® lipophile WL1349 were purchased from Gattefossé France (Neuilly-sur-Seine, France). NaCl was purchased from Prolabo VWR International (Fontenay-sous-Bois, France). Ultrapure water was obtained from a Milli-Q® Advantage A10 System (Merck Millipore, Darmstadt, Germany).

#### 4.3.2. Formulation and characterization of lipid nanocapsules

##### a) Preparation of DiD-TPB

DiD-TPB, was synthesized using a previously described method. (161). Briefly, 100 mg of 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine perchlorate (DiD, Life Technologies, Carlsbad, California, USA) was mixed with 0.71 g (20 mol eq.) of sodium tetraphenylborate in ethyl acetate, which dissolved both salts easily. Then, a thin-layer chromatography was performed to confirm the formation of the modified salt, where the product progressed faster than the starting DiD perchlorate (dichloromethane/methanol, 95/5). After evaporation of the solvent, the product (DiD-TPB) was purified by column chromatography (dichloromethane/methanol, 95/5).

##### b) Formulation of LNCs

LNCs were formulated according to a previously described method (151) corresponding to a phase inversion temperature solvent-free process. Composition of LNCs is detailed in Table 4. Mix of Labrafac® and Labrafil® was used for unloaded-LNCs (LNCs) and DiD-

TPB was solubilized in Labrafac® and Labrafil® for DiD loaded-LNCs (DiD-LNCs). Briefly, Lipoid® S100 was solubilized in Labrafac® (Labrafac®/Labrafil® mix for DiD-LNCs) at around 60°C under magnetic stirring, then Labrafil® was added following Transcutol® HP. Then, Kolliphor® HS15, NaCl, and water were weighed and added to the formulation vial. Three cycles of heating, up to 95°C, and cooling, down to 60°C, were performed under magnetic stirring. Then, quenching water at 4°C was added to obtain LNCs' suspension. Magnetic stirring was then maintained for 5 min at room temperature. Finally, LNCs' suspensions were filtered (0.22 µm sterile poly ethersulfone membrane (Dutscher, Bernolsheim, France)).

### **c) Physico-chemical characterization of LNCs**

The size distribution, zeta(ζ)-potential and polydispersity index (PDI) were determined by dynamic light scattering (DLS) on a Zetasizer® Nano serie DTS 1060 (Malvern Instruments S.A., Worcestershire, UK), with a prior 1/400 dilution in water of LNCs' suspension. LNCs' size was also characterized using nanoparticle tracking analysis on a NanoSight NS300 device (Malvern Instruments S.A., Worcestershire, UK) with a prior 1/500,000 dilution in water. Fluorescence was measured on a FluoroMax®-4 spectrophotometer (HORIBA Jobin Yvon Inc., New Jersey, USA). Fluorescence emission spectra were recorded at room temperature with 650 nm excitation wavelength, with an excitation slit width of 3 nm and an integration time of 0.5 s. Emission spectra were collected from 655 to 750 nm with a slit width of 2 nm and a 1 nm increment. LNCs' suspension was diluted at 1/10,000 in water.

The concentration of the suspensions was calculated in mg/mL by dividing the weight of all excipients by the weight of water.

Tableau 4. Composition of two batches of LNCs

Constituents	LNCs	DiD-LNCs
	Amount in mg	
Transcutol® HP	700	87.5
Labrafil® M1944CS	1000	53.6
Labrafac® lipophile WL 1349	400	21.4
DiD-TPB (2%) in Labrafil® M1944CS (71,4% w/w) & Labrafac® lipophile WL1349 (28,6% w/w) mix solution		100
Lipoid® S100	150	18.75
Kolliphor® HS15	1000	125
NaCl	100	12.5
Purified water	1800	225
Purified water at 4°C	5000	625

### 4.3.3. Cells and cell culture conditions

#### a) HepG2 cell line

HepG2 cells (ATCC® HB-8065) were cultivated from 3<sup>rd</sup> to 18<sup>th</sup> passages in MEM supplemented with 10% (v/v) FBS, 1X NEAA, 1 mM of sodium pyruvate in solution, and antibiotic solution (100 units/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin) in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>, 95% air at 37 °C. When cells reach 80% confluence, they were washed with DPBS, then trypsinized, and seeded at 2.10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup> in a T25 flask.

#### b) HepaRG cell line

HepaRG cells (Biopredict International) were seeded at 2.6.10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup> in a T75 flask and cultivated from 12<sup>th</sup> to 18<sup>th</sup> passages in Williams'E medium supplemented with 10% (v/v) FBS, antibiotic solution (100 units/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin), 1X GlutaMAX™, hydrocortisone (25 µg/mL) and insulin (5 µg/mL) in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>, 95% air at 37 °C. Once 100% confluence is reached, usually after two weeks of growth, 2% DMSO was added in the media for 2 more weeks in order to potentiate the differentiation in hepatocytes (50%) and biliary like cells (50%). This

model expresses a high metabolic activity (phase I and II enzymes) which is stable and maintained over 4 weeks, thus allowing chronic studies (162,163).

#### **4.3.4. Treatment conditions**

For acute treatment, both hepatoma cell lines were seeded at the same density described above in either 12, 24 or 96 multiwell (MW) plates according to the corresponding assay. Then cells were treated only once with LNCs. Only HepaRG model was suitable for repeated exposure treatment. Briefly, after differentiation HepaRG cells were exposed to LNCs every 2 to 3 days while media was renewed. After 2 and 4 weeks of treatment, viability, kinetics and pathways of internalization were evaluated. Time of exposure as well as LNCs' concentrations will be detailed more specifically in the following sections.

#### **4.3.5. Toxicity assessment**

MTT, likewise NRU viability assays were performed to evaluate LNCs' toxicity. In this assay, HepG2 and HepaRG cells were seeded in 96MW plate. Cells were treated for 24 h with LNCs' concentrations ranging from 0.001 to 10 mg/mL, diluted in supplemented media with 10% FBS. Then media was removed and 100  $\mu$ L MTT solution (final concentration of 0.5 mg/mL) was added per well for 1h. The MTT was subsequently removed and 100  $\mu$ L of DMSO was used to solubilize MTT crystals. Plates were mixed for 5 minutes before reading the absorbance at 540 nm on a Clariostar® plate reader (BMG Labtech, Champigny-sur-Marne, France).

#### **4.3.6. LNCs uptake by liver cells**

##### **a) Kinetics of internalization**

The uptake of LNCs by liver cells was analyzed by measuring the fluorescence of the DiD using Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS). Briefly, HepG2 cells were seeded in 12MW plate and HepaRG cells in 24MW plate. Both cellular models were exposed to different concentrations of LNCs suspension (0.10, 0.25 and 0.50 mg/mL), diluted in supplemented media. Cells were exposed to LNCs from 15 min to 24 h and from 4 to 96 h for HepG2 and HepaRG cells, respectively. Cells were trypsinized from plates and washed twice with 4°C PBS (kept on ice during washing steps) before measuring fluorescence on a CytoFLEX LX (Beckman Coulter, Brea, USA). A total of 10,000 cells were gated and analyzed for each condition.

For chronic treatment conditions, HepaRG cells were exposed to 0.25 mg/mL DiD-LNCs for 4, 24 and 48 h, following either 2 or 4 weeks of exposure to unloaded-LNCs at the same concentration. Similarly to acute conditions, a total of 10,000 cells were gated and analyzed for each condition.

## **b) Pathways of internalization**

Seeding conditions and LNCs' treatment concentrations were the same than the kinetics ones. In order to identify the type of transport used by LNCs, endocytosis blocking agents were utilized, as well as 4°C temperature condition to evaluate the use of energy. Clathrin-mediated endocytosis (CME) was inhibited by using 20 µM of chlorpromazine and genistein at 200 µM was used to inhibit caveolin-mediated endocytosis (CavME) (164). Cell lines were sensitized with blocking agents for 1h prior to LNCs exposure, then cells were exposed to LNCs, 2 h for HepG2 cells and 4 h for HepaRG cells, in the presence of the endocytosis inhibitors.

Regarding chronic exposure, seeding and treatment conditions were the same as the ones used for kinetics of internalization.

### **4.3.7. Data analysis**

Results were expressed as mean values  $\pm$  SEM. A Mann-Whitney and a Kruskal-Wallis tests were used for statistical/comparison analysis between two groups and three or more groups, respectively. In both cases,  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## **4.4. Results and discussion**

### **4.4.1. Characterization of LNCs**

Transcutol® based-LNCs were selected because they are able to encapsulate SOR (151). Moreover, their stability have been validated over 10 months in storage conditions (2-8 °C) and also in gastrointestinal fluids *in vitro* (165,166). Thus, LNCs were formulated, unloaded or loaded with DiD, and a mean particle diameter close to 50 nm for both formulations was obtained, with both Zetasizer® and Nanosight analysis; that means that the solubilization of DiD inside the oily core did not modify the formulation size. A narrow size distribution was found with a polydispersity index (PDI) lower than 0.2.  $\zeta$ -potential values ranged from - 4.22 mV for LNCs to 3.28 mV for DiD-LNCs (Table 5). DiD-TPB is a dye with a cationic counter ion which can explain the positive  $\zeta$ -potential. However, these

values were still around 0, and therefore considered as neutral in term of nanoparticle surface charge.

Tableau 5. Characterization of LNCs: mean diameter in intensity (Zetasizer®) and in number (Nanosight), PDI and  $\zeta$ -potential. Data are shown as mean ( $n = 4-6$ )  $\pm$  SEM

Type of LNCs	Hydrodynamic diameter with Zetasizer® (nm)	Hydrodynamic diameter with Nanosight (nm)	PDI	$\zeta$ -potential (mV)
LNCs	50.5 $\pm$ 3.2	45.2 $\pm$ 2.5	0.13 $\pm$ 0.03	- 4.2 $\pm$ 1.5
DiD-LNCs	50.0 $\pm$ 2.4	49.03 $\pm$ 4.0	0.15 $\pm$ 0.02	3.3 $\pm$ 0.8

#### 4.4.2. Toxicity assessment after acute exposure

Toxicity profiles of LNCs were analyzed by measuring both mitochondria activity (MTT assay) and lysosomal activity (NRU) after 24h of exposure, varying concentrations from 0.001 to 10 mg/mL on HepG2 and HepaRG cell lines (Figure 21). HepG2 cell line was chosen as it is a very well-known liver cancerous model, easy and low cost to work with. HepaRG cells were selected because they are a differentiated liver cells considered as no tumorigenic (160), they allow chronic studies and express a high metabolic activity. Toxicity of LNCs is expected to be as high as possible on HepG2 cells, therefore potentializing the toxicity of a future drug on liver cancer cells. Contrariwise, LNCs will hopefully induce the lowest toxicity on HepaRG cells as they represent the future non-targeted healthy liver cells.

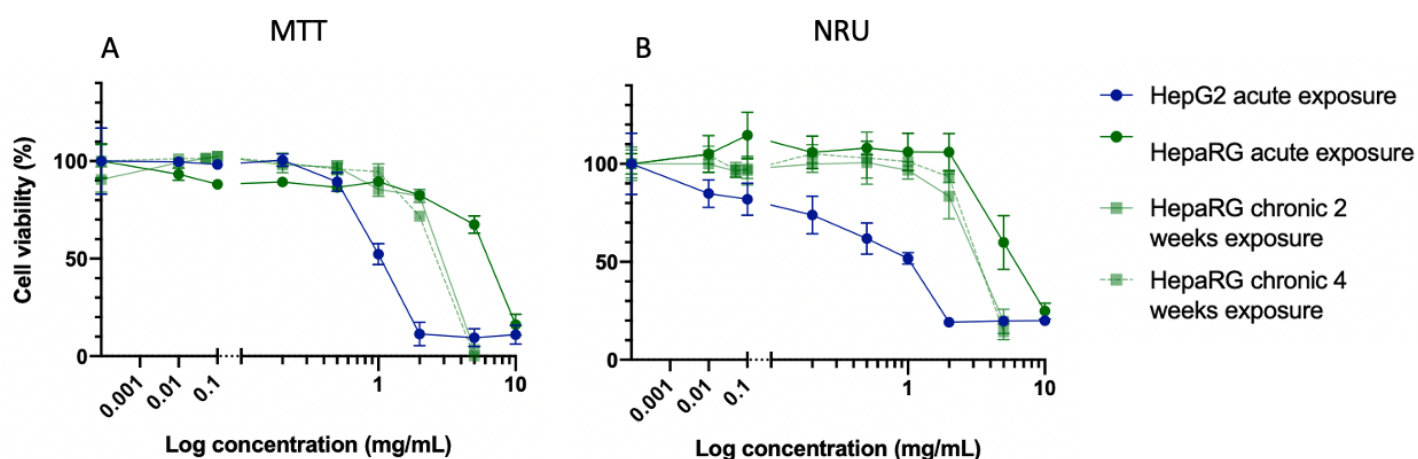


Figure 21. Cell viability assessed by (A) MTT and (B) NRU assays on HepG2 and HepaRG cells after acute (24 h) exposure, and on HepaRG cells after 2 and 4 weeks of chronic exposure to LNCs. Data are represented as % of viability in vehicle control cells ( $n = 3-4$ )  $\pm$  SEM

Toxicity was found to be concentration dependent on both hepatoma cells for MTT and NRU assays, reaching around 10 and 20% of viability for the 10 mg/mL LNCs concentration, respectively. LNCs had a higher toxicity on HepG2 cells compared to HepaRG. Indeed, lethal concentrations at 50% of cell viability ( $LC_{50}$ ), calculated from MTT curves, were around 0.90 mg/mL for HepG2 cells and 6.4 mg/mL for HepaRG cells (Table 6). Close results were found from NRU assay, highlighting a higher toxicity of LNCs on HepG2 model. This difference in toxicity might be explained by the difference of xenobiotic metabolic activities: HepaRG cell line highly expresses cytochromes P450, phase I and II enzymes when HepG2 cells lack of it. Another explanation could be related to the difference in membrane composition between normal and cancer cells. Elfiky *et al.* showed that cancer cells have a membrane enriched in negatively charged phospholipids compared to normal cells (167). The affinity of our neutrally/positively charged-LNCs for the HepG2 cells membrane might be higher than the one for HepaRG cells, hence improving LNCs penetration as well as their toxicity in HepG2 cells. Besides, HepaRG model is nowadays the closest one to the gold standard, represented by primary human hepatocytes (168,169). Thus, it could be hypothesized that LNCs would have a limited toxicity on hepatocytes and bile cells, while inducing a high mortality on HepG2. Hence, LNCs could potentiate the efficacy of an anticancer drug such as SOR. Differences between cancer and normal cells had been studied by Yan *et al.*. They analyzed the uptake of polyester nanoparticles (NPs) on a pair of matched lung cells coming from the same patient: a cancerous one, HCC401, and a normal one HBEC30-KT. They have found that polyester NPs could enter via clathrin-dependent endocytosis in HCC4017 while being arrested at the membrane of HBEC30-KT (170). This result support our findings regarding the difference in toxicity between HepG2 and HepaRG cells. Thus, with around 7-fold difference in  $LC_{50}$ , HepG2 cells were more sensitive to LNCs whereas HepaRG cells were more resistant to LNCs.



Tableau 6. LC<sub>50</sub> of LNCs after 24 h of exposure on HepG2 and HepaRG cell lines, and after 2 and 4 weeks of exposure on HepaRG cell line. Data are shown as LC<sub>50</sub> (mg/mL) (n = 3-4) ± SEM. \*, + and # represent a significative difference between cell lines, time of exposure and type of assay, respectively (p < 0.05)

Cell line	Type of assay	Time of exposure (days)		
		1	14	28
HepG2 cells	MTT	0.91 ± 0.02 *		
	NRU	0.77 ± 0.21 *		
HepaRG cells	MTT	6.37 ± 0.82 *	3.30 ± 0.16 +	2.40 ± 0.28 +
	NRU	6.91 ± 1.25 *	3.25 ± 0.91 +	3.68 ± 0.70 #

Additionally, it must be precised that both mitochondria and lysosomal activities were higher than 80% for concentration of LNCs equal or below to 2 mg/mL. Thus, biocompatibility of LNCs on HepaRG cells was demonstrated for these concentrations and below. Assessment of LNCs toxicity was already done by Le Roux *et al.* on RAW264.7 cells (immortalized macrophages cells) and close results were found (171). These cells exhibited cell viability (MTS) of around 80% after 24h of exposure to 2 mg/mL of unloaded- 50 nm LNCs. Moreover, LNCs did not induce any genotoxicity (comet and micronucleus assays) on human lymphocytes. Therefore, LNCs up to 2 mg/mL concentration, might be biocompatible with hepatocytes and hypothetically, might not induce toxicity on resident (macrophages) and circulating (lymphocytes) immune cells.

#### 4.4.3. Toxicity assessment after chronic exposure

As advanced HCC is corelated with taking long term treatments, cell viability was also evaluated on HepaRG cells after 2 and 4 weeks of exposure to LNCs, varying concentration from 0.001 up to 5 mg/mL (Figure 20). This assay will give an insight on the potential hazard of LNCs after repeated exposure and thus a better understanding of the side effects on hepatocytes and bile cells.

LNCs induced a decrease in mitochondrial activity at the highest concentration (5 mg/mL) resulting in the death of all HepaRG population after both 2 and 4 weeks of exposure. Metabolic activity of lysosomes gave similar results although around 15% of HepaRG cells were still alive. Furthermore, it could be highlighted that toxicity of LNCs was time dependent. Indeed, LC<sub>50</sub> decreased after 2 weeks compared to the acute 24h of exposure and decreased even more after 4 weeks (Table 6). Even though LNCs generated a high

toxicity at 5 mg/mL, for concentrations equal or below to 2 mg/mL cell viability was between 70 to 80% for both MTT and NRU assays, which validate the LNCs hepatic chronic biocompatibility, *in vitro*, below these concentrations. To date, assessment of LNCs' toxicity on liver cells after one month of chronic exposure has not been studied *in vitro* nor *in vivo*. Nevertheless, Voigt *et al.* analyzed rats' organs after intravenous injection of polybutylcyanoacrylate NPs (PBCA-NPs) once a week during a month. They showed that the weight of the animal was not affected. A histological analysis of some organs, notably the liver, was performed and no abnormalities were found in any of them (172). Similar results were observed by Hureauux *et al.* while studying the toxicity and the efficacy of unloaded- and paclitaxel-loaded LNCs after *i.v.* administration in mice. After daily injections for five consecutive days, no mortality was observed nor histological lesions (liver, spleen, kidneys), and the complete blood count came back normal (173).

The present preliminary study aims to investigate the relevance of using LNCs for SOR drug delivery against HCC. Interestingly, SOR has already been successfully encapsulated inside 50 nm LNCs by Clavreul *et al.* with a high encapsulation efficiency (90%). They studied the efficiency of SOR-LNCs on glioblastoma bearing mice and had good results, but liver parameters weren't assessed (151). Therefore, an evaluation of LNCs' toxicity on a murine model would be needed, after 1 month of repeated exposure, to validate *i)* the *in vivo* biocompatibility of SOR-LNCs and *ii)* the *in vivo* efficacy on HCC xenograft model.

#### **4.4.4. LNCs uptake by liver cells**

It is crucial to understand the kinetics of LNCs inside cancerous and non-cancerous liver cells to know where the drug will preferentially be uptaken. Three concentrations (0.10, 0.25 and 0.50 mg/mL) were kept from the toxicological studies as they induced either no or sub toxicity (cell viability > 95%).

Tracking of LNCs was achievable by detecting DiD fluorescence combined with a detection by FACS method. The cytometer used for this assay allowed the measurement of two kinetics parameters. The first one is the percentage of positive cells to the DiD fluorescence; this parameter gives feedback on how much cells, out of the total living population, internalized the LNCs (Figure 22. A, B and C). The second, called median fluorescence intensity (MFI), reflects the intracellular accumulation of LNCs (Figure 22.

D, E and F). By raising LNCs concentration, internalization was increasing but not significantly, therefore no concentration effect was detected. LNCs were quickly internalized inside HepG2 cells with more than 90% of positivity after only 4 h of exposure (Figure 22. A). In comparison, around 40% of LNCs were internalized after 4 h in HepaRG cells, and 48 h were needed for LNCs to be internalized by around 70% of these cells. Besides, a saturation phenomenon was observed on HepaRG cell line. Indeed, it seems that from 48 to 96 h of exposure, LNCs will not be uptaken by more than 70 to 80% of HepaRG cells. Apparently intracellular accumulation followed the same logic because the MFI did not increase after 48 h (Figure 22. E). In contrast, the MFI of HepG2 cells continued to increase up to 24 h of exposure to LNCs (Figure 22. D), with a 2-fold difference compared to HepaRG cells for the same concentration at the same time of exposure. LNCs were internalized preferentially inside cancerous HepG2 cell line with a high intracellular accumulation, whereas in HepaRG cells, internalization as well as intracellular accumulation took a lot more time and were limited, probably due to a saturation effect. Thus, LNCs were quickly internalized (passive targeting) and exhibited a high toxicity on HepG2 cells, when conversely a much lower toxicity was observed on HepaRG cells due to a slow and limited internalization.

Moreover, internalization of LNCs upon chronic exposure had to be assessed in order to evaluate possible modifications of kinetics and mechanisms. LNCs kinetics of internalization did not change after 4 nor 24 h of exposure on HepaRG cells when comparing acute and chronic exposure (Figure 22. C and F). Interestingly, after 48 h of exposure following the chronic exposure, both uptake and intracellular accumulation were lower when comparing to the acute results. Therefore, the saturation effect observed at 48 h, after a unique exposure to LNCs, was even more exacerbated following repeated exposure. This outcome means that over repeated exposure, LNCs do not accumulate in HepaRG cell line.

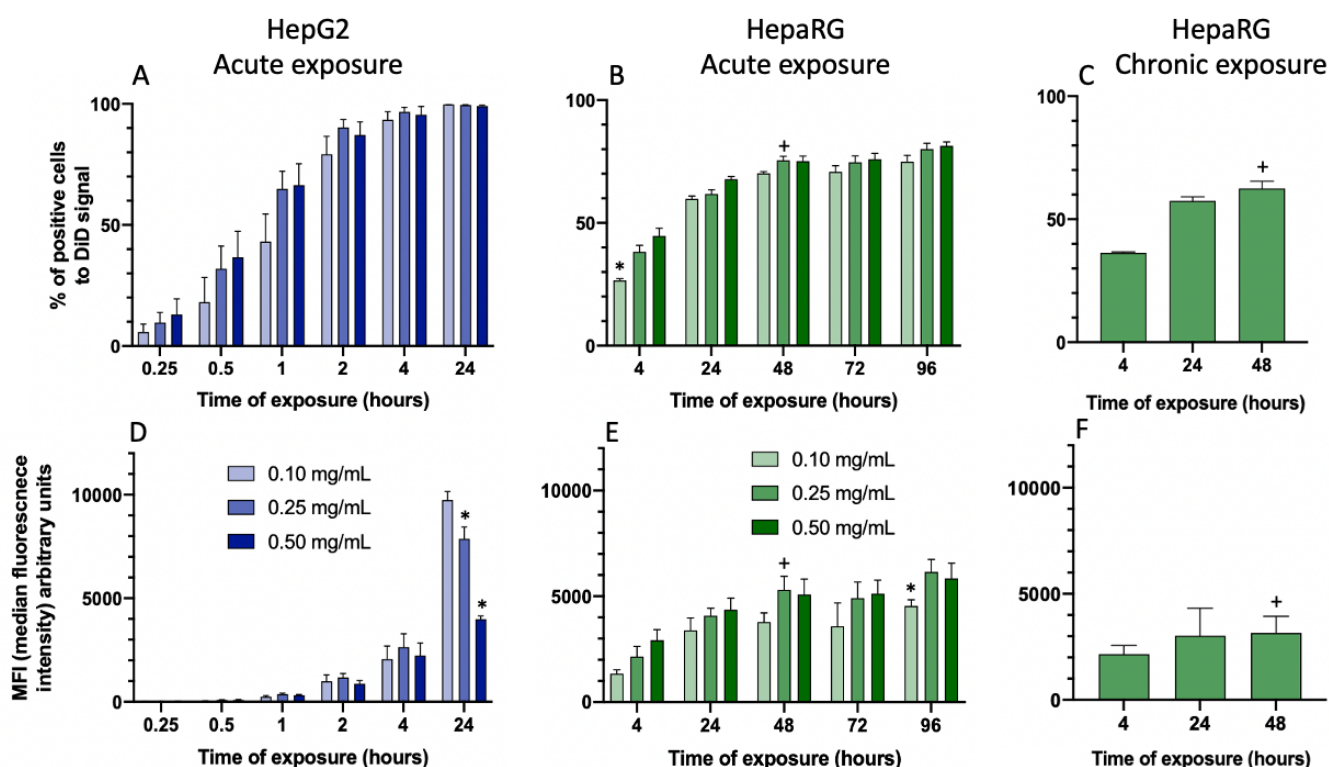


Figure 22. Uptake of LNCs in HepG2 (A and D) and HepaRG (B and E) cells after acute exposure, and in HepaRG cells after 4 weeks of chronic exposure (C and F). Data represent the % of positive cells to DiD signal (A, B and C) and the MFI in arbitrary unit (D, E and F) (n = 3-4)  $\pm$  SEM. \* and + (p < 0.05) represent a significative difference between samples concentrations and time of exposure, respectively.

Finally, evaluation of internalization mechanisms was achieved to determine if the uptake mechanisms were energy- or not dependent, and which was the major signaling pathway. Knowing cellular transport of LNCs is essential because if they are dependent on a specific pathway, its inhibition might block LNCs internalization and therefore decreasing the drug's availability. Herein, after acute exposure, around 80% of LNCs internalization was inhibited by the 4°C condition on both cell lines (Figure 23). Thus, LNCs were mainly internalized via an active pathway. This active mechanism of uptake was confirmed on both cellular models by using metabolic inhibitors. Genistein, a caveolin-mediated endocytosis (CavME) inhibitor, could block around 30% and 80% of internalization on HepG2 and HepaRG cells, respectively. Thus, CavME was confirmed to be involved in

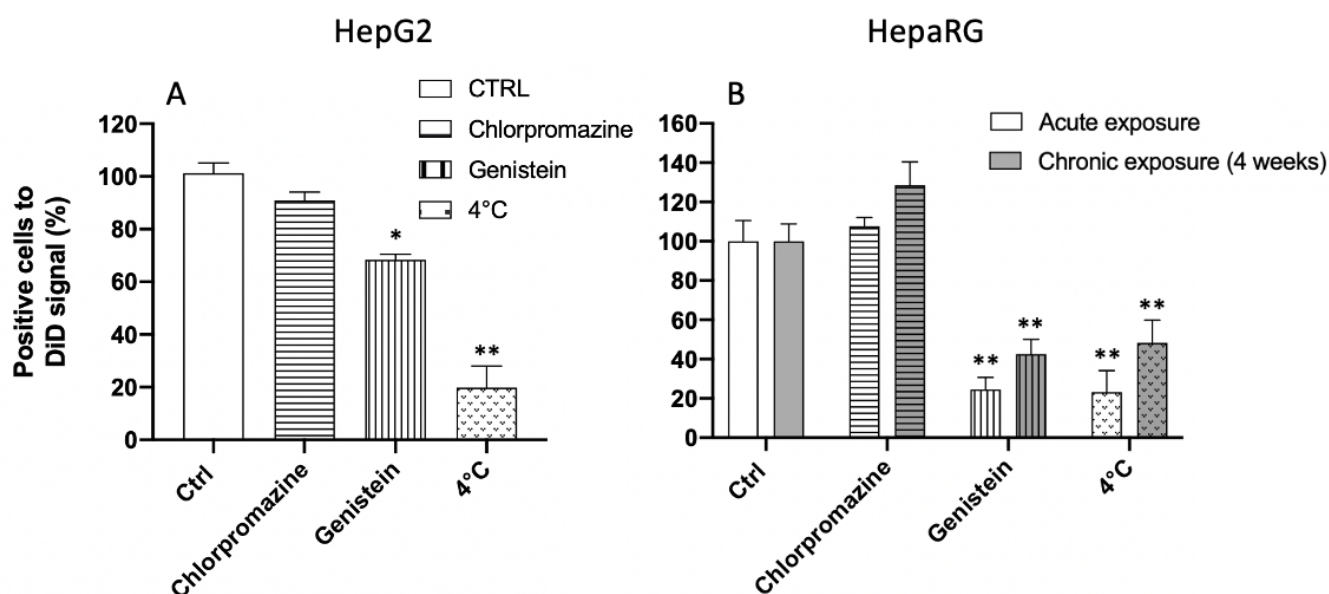


Figure 23. Assessment of endocytosis-mediated pathways of internalization after acute exposure on HepG2 cells (A), and after acute and chronic exposure on HepaRG cells (B). Data are expressed in % of positive cells to DiD signal ( $n = 3$ )  $\pm$  SEM. \* ( $p < 0.05$ ) and \*\* ( $p < 0.001$ ) represent a significative difference compared to the control.

LNCs transport through HepG2 and HepaRG cells. In contrast, chlorpromazine did not modify LNCs uptake which means that LNCs were not internalized via clathrin-mediated endocytosis (CME) in any cell line. In an ovarian cancer cell line (IGROV-1), 50 nm cisplatin-LNCs were found to be uptaken by CavME (174). In A549 cells, caveolae were involved as well in the uptake of 60 nm poly-lactic acid NPs (175). Additionally, knowing that the size of caveolin is around 60 nm, LNCs of 50 nm in diameter were expected to be internalized by CavME (164). However, Paillard *et al.* showed that LNCs of 50 nm were mainly internalized via CME in F98 cell line (176), and paclitaxel-loaded LNCs shared CME and CavME for their transport across Caco-2 cell line (177). Ultimately, cellular trafficking is dependent on cell type but also depends on size and surface charge of NPs (178–181). The saturation effect observed after acute and chronic exposure on HepaRG model might be linked to cellular trafficking. CavME was the main pathway used by LNCs in HepaRG cell line, but if receptors for caveolae are saturated and CavME can't be relayed by another pathway, LNCs might be blocked at the membrane and thus not internalized anymore. The results regarding the pathways after chronic exposure were very close to the ones observed after acute exposure; therefore, repeated exposure over 4 weeks did not seem to influence intracellular trafficking (Figure 22. B). As no one studied yet LNCs

trafficking after repeated exposure over a month, the biological answer remained to be discovered but it was hoped that no changes will be observed. To assure a controlled release, it is essential to know that after a long-term exposure intracellular trafficking is not modified, which was the case for this study.

#### **4.5. Conclusion**

LNCs were found to be internalized faster in HepG2 cancer cells than in HepaRG differentiated ones. Moreover, LNCs were accumulated in HepG2 model, whereas in HepaRG a saturation effect was detected. In accordance with uptake results, LNCs toxicity on HepG2 cell line was 7-fold higher than in HepaRG cells. Additionally, results after 24 h of unique exposure, and up to one month of repeated exposure on HepaRG cells, showed that LNCs could be biocompatible (cell viability above 70%) even at a high concentration (2 mg/mL). Repeated exposure did not change the kinetics nor pathways of internalization. Regarding the encouraging results from our study and knowing that LNCs can encapsulate SOR, *in vivo* assessment is now needed to confirm the usefulness of LNCs as SOR carriers for HCC vectorized therapy.

## Discussion

Les NCLs ont prouvé leur intérêt vectoriel dans diverses pathologies grâce à leur capacité d'encapsulation d'actifs anticancéreux variés (SOR, CIS, quercétine, paclitaxel, etc ...). De plus, les NCLs sont connues pour posséder un fort tropisme hépatique (133,159). Cette accumulation hépatique peut s'avérer délétère pour une vectorisation ne ciblant pas le foie (effets indésirables). Toutefois, cette propriété peut devenir un avantage et être mise à profit afin de potentialiser la distribution des anticancéreux au niveau hépatique et limiter les effets indésirables dans le traitement du CHC. Les NCLs semblent donc être de bons candidats vecteurs contre le CHC. Cependant, le ciblage des cellules cancéreuses hépatiques devait être étudié tout autant que l'innocuité sur cellules hépatiques saines.

Ce travail de thèse s'est intéressé aux différentes stratégies vectorielles déjà étudiées pour le traitement du CHC ainsi qu'à un travail expérimental *in vitro* préliminaire étudiant les interactions entre les NCLS et les cellules hépatiques. Ce travail a mis en évidence une internalisation rapide et complète des NCLs par les cellules cancéreuses HepG2 après 4 h d'exposition. En comparaison, des liposomes cationiques n'ont été internalisés que par 65% des cellules HepG2 après 3 h d'exposition (182). Afin d'améliorer le ciblage des cellules cancéreuses hépatiques, il est possible de rajouter des groupements fonctionnels sur les NPs qui pourront interagir avec des récepteurs ou protéines surexprimés chez les patients atteints de CHC. Parmi ces cibles sont retrouvés le glypican-3 (GPC3), une glycoprotéine non détectée dans les hépatocytes normaux mais exprimée par les cellules cancéreuses hépatiques (183), les récepteurs de l'acide folique (AFr) et aussi les récepteurs de l'acide rétinoïque (99). Des NPs polymériques chargées en SOR et fonctionnalisées avec un peptide ciblant le récepteur du GPC3 ont augmenté la régression tumorale *in vivo* comparativement aux NPs sans peptide (184). Des résultats similaires ont été observés sur la lignée HepG2 : des micelles polymériques fonctionnalisées avec du folate ont augmenté la proportion de cellules HepG2 apoptotiques par rapport aux micelles sans folate (185). Dans notre étude, les NCLs ciblent de manière passive les cellules HepG2 et sont internalisées très rapidement par rapport à des cellules non cancéreuses, mettant en doute l'intérêt d'ajouter une fonctionnalisation ciblante.

Concernant la biocompatibilité, la composition ainsi que le procédé de formulation par inversion de phase permettent aux NCLs d'induire peu d'effets toxiques par rapport à d'autres systèmes nanoparticulaires. Dans la littérature, la majorité des études *in vitro* se concentrent sur l'évaluation de l'efficacité thérapeutique des vecteurs sans vérifier leur effet sur cellules non cancéreuses. Dans notre étude, l'innocuité hépatique des NCLs a été évaluée sur les cellules HepaRG. Ces dernières internalisent de manière lente et incomplète les NCLs. De plus, la mort cellulaire induite par les NCLs sur la lignée HepaRG était environ 7 fois moins importante que sur les cellules HepG2. Pour la première fois, l'innocuité hépatique des NCLs a été étudiée après 4 semaines d'exposition *in vitro*, expérience possible grâce à la stabilité du modèle HepaRG. Les résultats ont démontré une bonne tolérance des NCLs à des concentrations élevées après un mois d'expositions répétées. Leur biocompatibilité a également été confirmée, en particulier au niveau hépatique, chez la souris après des études de toxicité aiguë (dose unique) et subaiguë (une dose par jour pendant 1 mois) (186). En comparaison, les NPs métalliques induisent une forte toxicité hépatique (187). Les études démontrent, comparativement aux autres types de nanovecteurs, une excellente biocompatibilité hépatique des NCL. Les Ag-NPs entraînent par exemple une nécrose hépatique avec hémorragies (188) tandis que les NPs de titane induisent un début de fibrose associée à une infiltration de cellules inflammatoires hépatiques (189).

Tous les excipients entrant dans la formulation des NCLs sont validés par la FDA et considérés comme « GRAS ». Pourtant, deux équipes de recherche ont mis en évidence une certaine toxicité de l'un des composés, le Kolliphor®. Ce dernier a entraîné une augmentation de la production de monoxyde d'azote (NO) dans une lignée macrophagique murine (RAW264.7) (171). Maupas *et al.* ont confirmé la toxicité du Kolliphor® sur une lignée de kératinocytes humains (cellules HaCaT) : l'analyse des concentrations létales à 50% (CL50) de 6 tensioactifs différents classe le Kolliphor en 2<sup>ème</sup> position du plus toxique. Le Cremophor® EL, classé en 5<sup>ème</sup> position, possède une toxicité 4 fois moins importante que celle du Kolliphor® lorsqu'ils sont analysés seuls en solution et environ 10 fois moins importante lorsqu'ils sont associés aux autres excipients sous forme nanoparticulaire (190). De plus, la taille des NCLs ne paraît pas être modifiée par l'utilisation de l'un ou l'autre de ces tensioactifs. Il serait donc intéressant, après validation des caractères physico-chimiques, d'utiliser le Cremophor® EL à la place du



Kolliphor® dans nos formulations. Il serait ainsi possible de comparer les profils de toxicité et les cinétiques d'internalisation de ces deux formulations sur les modèles cellulaires hépatiques que nous avons utilisés. L'innocuité des nanovecteurs reste primordiale quelque que soit la pathologie ciblée, il est donc nécessaire d'optimiser la biocompatibilité des NCLs afin de minimiser les risques de toxicité potentiels lors de développements cliniques futurs.

La prochaine étape de développement correspondrait donc à l'encapsulation du SOR dans les NCLs. Ces formulations seraient ensuite testées sur des lignées hépatiques cancéreuses, résistantes et non résistantes, ainsi que sur lignée hépatique saine tels que les cellules HepaRG et les cellules hépatiques primaires. Par la suite, des tests *in vivo* seraient nécessaires afin d'évaluer les hypothèses observées *in vitro*. Les NCLs chargées en SOR pourront être testées sur 3 groupes murins différents : un groupe sain (contrôle, analyse de l'innocuité), un groupe HCC normal et un troisième HCC résistant. Les modèles xénogreffés sont souvent choisis par les chercheurs car rapides à mettre en place mais ne reflètent que peu la réalité de l'environnement tumoral. Il existe également des modèles murins avec des HCC induits qui sont plus longs à mettre en place mais qui représentent davantage la physiopathologie de la pathologie étudiée (191). Cela permettrait de profiter du ciblage passif des NCL au niveau hépatique tout en prenant en compte l'environnement tumoral qui risque de modifier la cinétique des NCLs.

## Conclusion et perspectives

Depuis 2018 les immunothérapies sont venues compléter l'arsenal thérapeutique du CHC et représentent le 1<sup>er</sup> choix de traitement, doublant ainsi la survie globale des patients comparativement au traitement par SOR. Le SOR, juste derrière, reste toutefois en 1<sup>ère</sup> ligne de traitement mais possède une biodisponibilité par voie orale limitée et n'est pas exempt d'effets indésirables. Plusieurs laboratoires de recherche ont pu utiliser différents types de NPs afin d'encapsuler le SOR et ainsi tenter de surmonter les inconvénients inhérents à cette molécule. Parmi ces NPs, les NCLs semblent être une option de choix grâce à leur innocuité, leur capacité d'encapsulation élevée ainsi que leur accumulation hépatique. Notre étude préliminaire a confirmé à la fois la biocompatibilité hépatique des NCLs (lignée HepaRG) ainsi que le ciblage passif des cellules hépatiques cancéreuses (HepG2). Clavreul *et al.* ont déjà démontré que des NCLs de 50 nm, de composition identique à celle utilisée dans notre étude, pouvaient encapsuler  $2.11 \pm 0.03$  mg de SOR par gramme de formulation. Dans notre partie expérimentale, les NCLs entraînaient 90% de mortalité sur la lignée HepG2 à la dose de 2 mg/mL tandis qu'elles restaient biocompatibles sur la lignée HepaRG pour la même concentration, et ce même après 4 semaines d'exposition. Il serait donc possible d'encapsuler, en théorie, jusqu'à 4.22 µg de SOR dans les NCLs (SOR-LNCs), potentialisant ainsi l'efficacité du SOR par amélioration du ciblage hépatique. Ces SOR-LNCs seraient ensuite injectées en IV dans un modèle murin HCC induit de préférence. L'efficacité thérapeutique, par réduction du volume tumoral, serait alors mesurée et pourra être comparée vs. le SOR seul par voie orale. Enfin, la tolérance globale des NCLs devrait être étudiée en se basant sur les effets indésirables fréquents observés dans le cas d'un traitement par SOR. Ainsi, un ionogramme sanguin, des bilans rénaux et hépatiques ainsi qu'une analyse de l'épiderme, un bilan hématologique et un bilan cardiaque devraient être réalisés.

En conclusion, les NCLs possèdent un avenir prometteur dans la stratégie thérapeutique du CHC sous réserve de validation *in vivo* alliant une efficacité thérapeutique limitant les effets indésirables.

## Bibliographie

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA A Cancer J Clin.* mai 2021;71(3):209-49.
2. Bosetti C, Levi F, Boffetta P, Lucchini F, Negri E, La Vecchia C. Trends in mortality from hepatocellular carcinoma in Europe, 1980-2004. *Hepatology.* juill 2008;48(1):137-45.
3. Bosetti C, Turati F, La Vecchia C. Hepatocellular carcinoma epidemiology. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology.* oct 2014;28(5):753-70.
4. El-Serag HB. Epidemiology of Viral Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology.* mai 2012;142(6):1264-1273.e1.
5. Blach S, Zeuzem S, Manns M, Altraif I, Duberg AS, Muljono DH, et al. Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology.* mars 2017;2(3):161-76.
6. Guntipalli P, Pakala R, Kumari Gara S, Ahmed F, Bhatnagar A, Endaya Coronel MK, et al. Worldwide prevalence, genotype distribution and management of hepatitis C. *AGEB.* déc 2021;84(4):633-52.
7. Cheng AL, Kang YK, Chen Z, Tsao CJ, Qin S, Kim JS, et al. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet Oncology.* janv 2009;10(1):25-34.
8. Rushing BR, Selim MI. Aflatoxin B1: A review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods. *Food and Chemical Toxicology.* févr 2019;124:81-100.
9. Testino G, Burra P, Bonino F, Piani F, Sumberaz A, Peressutti R, et al. Acute alcoholic hepatitis, end stage alcoholic liver disease and liver transplantation: An Italian position statement. 20(40).
10. Testino G, Leone S, Borro P. Alcohol and hepatocellular carcinoma: A review and a point of view. *WJG.* 2014;20(43):15943.
11. Donato F. Alcohol and Hepatocellular Carcinoma: The Effect of Lifetime Intake and Hepatitis Virus Infections in Men and Women. *American Journal of Epidemiology.* 15 févr 2002;155(4):323-31.
12. Nordenstedt H, White DL, El-Serag HB. The changing pattern of epidemiology in

hepatocellular carcinoma. *Digestive and Liver Disease*. juill 2010;42:S206-14.

13. McGlynn KA, Petrick JL, London WT. Global Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma. *Clinics in Liver Disease*. mai 2015;19(2):223-38.

14. Kanda T, Goto T, Hirotsu Y, Masuzaki R, Moriyama M, Omata M. Molecular Mechanisms: Connections between Nonalcoholic Fatty Liver Disease, Steatohepatitis and Hepatocellular Carcinoma. *IJMS*. 23 févr 2020;21(4):1525.

15. Ruiz-Margáin A, Román-Calleja BM, Moreno-Guillén P, González-Regueiro JA, Kúsulas-Delint D, Campos-Murguía A, et al. Nutritional therapy for hepatocellular carcinoma. *WJGO*. 15 oct 2021;13(10):1440-52.

16. Sawada N, Inoue M, Iwasaki M, Sasazuki S, Shimazu T, Yamaji T, et al. Consumption of n-3 Fatty Acids and Fish Reduces Risk of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. juin 2012;142(7):1468-75.

17. Kiruthiga C, Devi KP, Nabavi SM, Bishayee A. Autophagy: A Potential Therapeutic Target of Polyphenols in Hepatocellular Carcinoma. *Cancers*. 29 févr 2020;12(3):562.

18. Bravi F, Bosetti C, Tavani A, Gallus S, La Vecchia C. Coffee Reduces Risk for Hepatocellular Carcinoma: An Updated Meta-analysis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. nov 2013;11(11):1413-1421.e1.

19. Kennedy OJ, Roderick P, Buchanan R, Fallowfield JA, Hayes PC, Parkes J. Coffee, including caffeinated and decaffeinated coffee, and the risk of hepatocellular carcinoma: a systematic review and dose-response meta-analysis. *BMJ Open*. mai 2017;7(5):e013739.

20. Zhang Y, Wang H, Xiao H. Metformin Actions on the Liver: Protection Mechanisms Emerging in Hepatocytes and Immune Cells against NASH-Related HCC. *IJMS*. 9 mai 2021;22(9):5016.

21. Nkontchou G, Cosson E, Aout M, Mahmoudi A, Bourcier V, Charif I, et al. Impact of Metformin on the Prognosis of Cirrhosis Induced by Viral Hepatitis C in Diabetic Patients. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. août 2011;96(8):2601-8.

22. Wang Y, Wang W, Wang M, Shi J, Jia X, Dang S. A Meta-Analysis of Statin Use and Risk of Hepatocellular Carcinoma. *Granito A, éditeur. Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 20 mars 2022;2022:1-15.

23. Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, Hardy T, Henry L, Eslam M, et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. janv 2018;15(1):11-20.

24. Hashimoto E, Tanai M, Tokushige K. Characteristics and diagnosis of NAFLD/NASH: Non-invasive alternatives to liver biopsy. *J Gastroenterol Hepatol.* déc 2013;28:64-70.
25. Sauzay C, Petit A, Bourgeois AM, Barbare JC, Chauffert B, Galmiche A, et al. Alpha-fetoprotein (AFP): A multi-purpose marker in hepatocellular carcinoma. *Clinica Chimica Acta.* déc 2016;463:39-44.
26. Lersritwimanmaen P, Nimanong S. Hepatocellular Carcinoma Surveillance: Benefit of Serum Alfa-fetoprotein in Real-world Practice. *Euroasian Journal of Hepato-Gastroenterology.* 1 juin 2018;8(1):83-7.
27. Wang X, Zhang Y, Yang N, He H, Tao X, Kou C, et al. Evaluation of the Combined Application of AFP, AFP-L3%, and DCP for Hepatocellular Carcinoma Diagnosis: A Meta-analysis. *BioMed Research International.* 17 sept 2020;2020:1-10.
28. Blanc JF, Debaillon-Vesque A, Roth G, Barbare JC, Baumann AS, Boige V, et al. Hepatocellular carcinoma: French Intergroup Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up (SNFGE, FFCD, GERCOR, UNICANCER, SFCD, SFED, SFRO, AFEF, SIAD, SFR/FRI). *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology.* mars 2021;45(2):101590.
29. Compagnon P, Grandadam S, Lorho R, Turlin B, Camus C, Jianrong Y, et al. Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma Without Preoperative Tumor Biopsy. *Transplantation.* 27 oct 2008;86(8):1068-76.
30. Marrero JA, Kulik LM, Sirlin CB, Zhu AX, Finn RS, Abecassis MM, et al. Diagnosis, Staging, and Management of Hepatocellular Carcinoma: 2018 Practice Guidance by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology.* août 2018;68(2):723-50.
31. Reig M, Forner A, Rimola J, Ferrer-Fàbrega J, Burrel M, Garcia-Criado Á, et al. BCLC strategy for prognosis prediction and treatment recommendation: The 2022 update. *Journal of Hepatology.* mars 2022;76(3):681-93.
32. Mehta N, Bhangui P, Yao FY, Mazzaferro V, Toso C, Akamatsu N, et al. Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma. Working Group Report from the ILTS Transplant Oncology Consensus Conference. *Transplantation.* juin 2020;104(6):1136-42.
33. Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* nov 2005;42(5):1208-36.
34. Lim KC, Chow PKH, Allen JC, Siddiqui FJ, Chan ESY, Tan SB. Systematic review of

outcomes of liver resection for early hepatocellular carcinoma within the Milan criteria. *British Journal of Surgery*. 6 nov 2012;99(12):1622-9.

35. Hocquelet A, Aubé C, Rode A, Cartier V, Sutter O, Manichon AF, et al. Comparison of no-touch multi-bipolar vs. monopolar radiofrequency ablation for small HCC. *Journal of Hepatology*. janv 2017;66(1):67-74.

36. Kim TH, Koh YH, Kim BH, Kim MJ, Lee JH, Park B, et al. Proton beam radiotherapy vs. radiofrequency ablation for recurrent hepatocellular carcinoma: A randomized phase III trial. *Journal of Hepatology*. mars 2021;74(3):603-12.

37. Wang H, Liu A, Bo W, Feng X, Hu Y, Tian L, et al. Adjuvant immunotherapy with autologous cytokine-induced killer cells for hepatocellular carcinoma patients after curative resection, a systematic review and meta-analysis. *Digestive and Liver Disease*. nov 2016;48(11):1275-82.

38. Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma: An update. *Hepatology*. mars 2011;53(3):1020-2.

39. Allaire M, Bruix J, Korenjak M, Manes S, Maravic Z, Reeves H, et al. What to do about hepatocellular carcinoma: Recommendations for health authorities from the International Liver Cancer Association. *JHEP Reports*. déc 2022;4(12):100578.

40. Llovet J. Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival. *Hepatology*. févr 2003;37(2):429-42.

41. Vilgrain V, Pereira H, Assenat E, Guiu B, Ilonca AD, Pageaux GP, et al. Efficacy and safety of selective internal radiotherapy with yttrium-90 resin microspheres compared with sorafenib in locally advanced and inoperable hepatocellular carcinoma (SARAH): an open-label randomised controlled phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. déc 2017;18(12):1624-36.

42. Ricke J, Klumpen HJ, Amthauer H, Bargellini I, Bartenstein P, De Toni EN, et al. Impact of combined selective internal radiation therapy and sorafenib on survival in advanced hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*. déc 2019;71(6):1164-74.

43. Chow PKH, Gandhi M, Tan SB, Khin MW, Khasbazar A, Ong J, et al. SIRveNIB: Selective Internal Radiation Therapy Versus Sorafenib in Asia-Pacific Patients With Hepatocellular Carcinoma. *JCO*. 1 juill 2018;36(19):1913-21.

44. Hermann AL, Dieudonné A, Ronot M, Sanchez M, Pereira H, Chatellier G, et al. Relationship of Tumor Radiation-absorbed Dose to Survival and Response in Hepatocellular Carcinoma Treated with Transarterial Radioembolization with <sup>90</sup>Y in the

SARAH Study. *Radiology*. sept 2020;296(3):673-84.

45. Salem R, Padia SA, Lam M, Bell J, Chiesa C, Fowers K, et al. Clinical and dosimetric considerations for Y90: recommendations from an international multidisciplinary working group. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. juill 2019;46(8):1695-704.
46. Abou-Alfa GK, Lau G, Kudo M, Chan SL, Kelley RK, Furuse J, et al. Tremelimumab plus Durvalumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma. *NEJM Evidence* [Internet]. 26 juill 2022 [cité 18 juill 2023];1(8). Disponible sur: <https://evidence.nejm.org/doi/10.1056/EVIDoa2100070>
47. Walko CM, Grande C. Management of Common Adverse Events in Patients Treated With Sorafenib: Nurse and Pharmacist Perspective. *Seminars in Oncology*. févr 2014;41:S17-28.
48. Wilhelm SM, Adnane L, Newell P, Villanueva A, Llovet JM, Lynch M. Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. *Molecular Cancer Therapeutics*. 1 oct 2008;7(10):3129-40.
49. Llovet JM, Hilgard P, de Oliveira AC, Forner A, Zeuzem S, Galle PR, et al. Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma. *n engl j med*. 2008;
50. Kudo M, Finn RS, Qin S, Han KH, Ikeda K, Piscaglia F, et al. Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial. *The Lancet*. mars 2018;391(10126):1163-73.
51. Bruix J, Qin S, Merle P, Granito A, Huang YH, Bodoky G, et al. Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet*. janv 2017;389(10064):56-66.
52. Abou-Alfa GK, Meyer T, Cheng AL, El-Khoueiry AB, Rimassa L, Ryoo BY, et al. Cabozantinib in Patients with Advanced and Progressing Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med*. 5 juill 2018;379(1):54-63.
53. Zhu AX, Park JO, Ryoo BY, Yen CJ, Poon R, Pastorelli D, et al. Ramucirumab versus placebo as second-line treatment in patients with advanced hepatocellular carcinoma following first-line therapy with sorafenib (REACH): a randomised, double-blind, multicentre, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. juill 2015;16(7):859-70.
54. Zhu AX, Kang YK, Yen CJ, Finn RS, Galle PR, Llovet JM, et al. Ramucirumab after sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma and increased  $\alpha$ -fetoprotein

concentrations (REACH-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. févr 2019;20(2):282-96.

55. Zhu AX, Finn RS, Edeline J, Cattan S, Ogasawara S, Palmer D, et al. Pembrolizumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma previously treated with sorafenib (KEYNOTE-224): a non-randomised, open-label phase 2 trial. *The Lancet Oncology*. juill 2018;19(7):940-52.

56. Odiba A, Ukegbu C, Anunobi O, Chukwunonyelum I, Esemonu J. Making drugs safer: improving drug delivery and reducing the side effect of drugs on the human biochemical system. *Nanotechnology Reviews* [Internet]. 1 janv 2016 [cité 19 sept 2023];5(2). Disponible sur: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/ntrev-2015-0055/html>

57. Harish V, Tewari D, Gaur M, Yadav AB, Swaroop S, Bechelany M, et al. Review on Nanoparticles and Nanostructured Materials: Bioimaging, Biosensing, Drug Delivery, Tissue Engineering, Antimicrobial, and Agro-Food Applications. *Nanomaterials*. 28 janv 2022;12(3):457.

58. Feynman RP. There's Plenty of Room at the Bottom.

59. Godale C, Sharon M. Contemporary History of Nanotechnology. In: Sharon M, éditeur. *History of Nanotechnology* [Internet]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2019 [cité 25 août 2023]. p. 213-69. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781119460534.ch8>

60. Barber DJ, Freestone IC. AN INVESTIGATION OF THE ORIGIN OF THE COLOUR OF THE LYCURGUS CUP BY ANALYTICAL TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY. *Archaeometry*. févr 1990;32(1):33-45.

61. Drexler KE. Engines of Creation : The Coming Era of Nanotechnology.

62. Drexler E, Peterson C, Morrow W. Unbounding the Future: the Nanotechnology Revolution.

63. Mauter MS, Elimelech M. Environmental Applications of Carbon-Based Nanomaterials. *Environ Sci Technol*. 1 août 2008;42(16):5843-59.

64. Yuan X, Zhang X, Sun L, Wei Y, Wei X. Cellular Toxicity and Immunological Effects of Carbon-based Nanomaterials. *Part Fibre Toxicol*. déc 2019;16(1):18.

65. Raoof M, Corr SJ, Zhu C, Cisneros BT, Kaluarachchi WD, Phounsavath S, et al. Gold nanoparticles and radiofrequency in experimental models for hepatocellular carcinoma. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. août



2014;10(6):1121-30.

66. Gurunathan S, Park JH, Han JW, Kim JH. Comparative assessment of the apoptotic potential of silver nanoparticles synthesized by *Bacillus tequilensis* and *Calocybe indica* in MDA-MB-231 human breast cancer cells: targeting p53 for anticancer therapy. *IJN*. juin 2015;4203.

67. Zhang Q, Iwakuma N, Sharma P, Moudgil BM, Wu C, McNeill J, et al. Gold nanoparticles as a contrast agent for *in vivo* tumor imaging with photoacoustic tomography. *Nanotechnology*. 30 sept 2009;20(39):395102.

68. Singh P, Pandit S, Mokkapati VRSS, Garg A, Ravikumar V, Mijakovic I. Gold Nanoparticles in Diagnostics and Therapeutics for Human Cancer. *IJMS*. 6 juill 2018;19(7):1979.

69. Amina SJ, Guo B. A Review on the Synthesis and Functionalization of Gold Nanoparticles as a Drug Delivery Vehicle. *IJN*. déc 2020;Volume 15:9823-57.

70. Xu L, Wang YY, Huang J, Chen CY, Wang ZX, Xie H. Silver nanoparticles: Synthesis, medical applications and biosafety. *Theranostics*. 2020;10(20):8996-9031.

71. Rashid MM, Forte Tavčer P, Tomšič B. Influence of Titanium Dioxide Nanoparticles on Human Health and the Environment. *Nanomaterials*. 10 sept 2021;11(9):2354.

72. Meijer E, Kromhout H, Heederik D. Respiratory effects of exposure to low levels of concrete dust containing crystalline silica. *Am J Ind Med*. août 2001;40(2):133-40.

73. Tang F, Li L, Chen D. Mesoporous Silica Nanoparticles: Synthesis, Biocompatibility and Drug Delivery. *Adv Mater*. 22 mars 2012;24(12):1504-34.

74. Ye J, Zhang R, Chai W, Du X. Low-density lipoprotein decorated silica nanoparticles co-delivering sorafenib and doxorubicin for effective treatment of hepatocellular carcinoma. *Drug Delivery*. 1 janv 2018;25(1):2007-14.

75. Wu K, Su D, Liu J, Saha R, Wang JP. Magnetic nanoparticles in nanomedicine: a review of recent advances. *Nanotechnology*. 13 déc 2019;30(50):502003.

76. Li X, Wei J, Aifantis KE, Fan Y, Feng Q, Cui FZ, et al. Current investigations into magnetic nanoparticles for biomedical applications: Magnetic Nanoparticles for Biomedical Applications. *J Biomed Mater Res*. mai 2016;104(5):1285-96.

77. Khalid K, Tan X, Mohd Zaid HF, Tao Y, Lye Chew C, Chu DT, et al. Advanced in developmental organic and inorganic nanomaterial: a review. *Bioengineered*. 1 janv 2020;11(1):328-55.

78. Jiang W, Kim BY, Rutka JT, Chan WC. Advances and challenges of nanotechnology-

- based drug delivery systems. *Expert Opinion on Drug Delivery*. nov 2007;4(6):621-33.
79. Yingchoncharoen P, Kalinowski DS, Richardson DR. Lipid-Based Drug Delivery Systems in Cancer Therapy: What Is Available and What Is Yet to Come. Barker EL, éditeur. *Pharmacol Rev*. juill 2016;68(3):701-87.
80. Barenholz Y (Chezy). Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. *Journal of Controlled Release*. juin 2012;160(2):117-34.
81. Mehnert W. Solid lipid nanoparticles Production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 25 avr 2001;47(2-3):165-96.
82. Musielak E, Feliczak-Guzik A, Nowak I. Optimization of the Conditions of Solid Lipid Nanoparticles (SLN) Synthesis. *Molecules*. 28 mars 2022;27(7):2202.
83. Madkhali OA. Perspectives and Prospective on Solid Lipid Nanoparticles as Drug Delivery Systems. *Molecules*. 24 févr 2022;27(5):1543.
84. Muller RH, Radtke M, Wissing SA. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2002;
85. Rohmah M, Raharjo S, Hidayat C, Martien R. Application of Response Surface Methodology for the Optimization of  $\beta$ -Carotene-Loaded Nanostructured Lipid Carrier from Mixtures of Palm Stearin and Palm Olein. *J Am Oil Chem Soc*. févr 2020;97(2):213-23.
86. Subroto E, Andoyo R, Indiarto R. Solid Lipid Nanoparticles: Review of the Current Research on Encapsulation and Delivery Systems for Active and Antioxidant Compounds. *Antioxidants*. 3 mars 2023;12(3):633.
87. Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE, Benoit JP. A Novel Phase Inversion-Based Process for the Preparation of Lipid Nanocarriers. 2002;6.
88. Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Venier-Julienne MC, Proust JE, Phan-Tan-Luu R, et al. The influence of lipid nanocapsule composition on their size distribution. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. janv 2003;18(1):55-61.
89. Huynh NT, Passirani C, Saulnier P, Benoit JP. Lipid nanocapsules: A new platform for nanomedicine. *International Journal of Pharmaceutics*. sept 2009;379(2):201-9.
90. Dabholkar N, Waghule T, Krishna Rapalli V, Gorantla S, Alexander A, Narayan Saha R, et al. Lipid shell lipid nanocapsules as smart generation lipid nanocarriers. *Journal of Molecular Liquids*. oct 2021;339:117145.
91. Béduneau A, Saulnier P, Anton N, Hindré F, Passirani C, Rajerison H, et al. Pegylated Nanocapsules Produced by an Organic Solvent-Free Method: Evaluation of their

Stealth Properties. Pharm Res. sept 2006;23(9):2190-9.

92. Lainé AL, Gravier J, Henry M, Sancey L, Béjaud J, Pancani E, et al. Conventional versus stealth lipid nanoparticles: Formulation and in vivo fate prediction through FRET monitoring. Journal of Controlled Release. août 2014;188:1-8.

93. George JM, Magogotya M, Vetten MA, Buys AV, Gulumian M. An Investigation of the Genotoxicity and Interference of Gold Nanoparticles in Commonly Used *In Vitro* Mutagenicity and Genotoxicity Assays. Toxicol Sci. 20 janv 2017;kfw247.

94. Piret JP, Bondarenko OM, Boyles MSP, Himly M, Ribeiro AR, Benetti F, et al. Pan-European inter-laboratory studies on a panel of in vitro cytotoxicity and pro-inflammation assays for nanoparticles. Archives of Toxicology. juin 2017;91(6):2315-30.

95. Halamoda-Kenzaoui B, Box H, Elk M van, Gaitan S, Geertsma RE, Gainza Lafuente E, et al. Anticipation of regulatory needs for nanotechnology-enabled health products: the REFINE white paper. Luxembourg: Publications Office of the European Union; 2019.

96. Drug Products, Including Biological Products, that Contain Nanomaterials.

97. Oualikene-Gonin W, Sautou V, Ezan E, Bastos H, Bellissant E, Belgodère L, et al. Regulatory assessment of nano-enabled health products in public health interest. Position of the scientific advisory board of the French National Agency for the Safety of Medicines and Health Products. Front Public Health. 2 mars 2023;11:1125577.

98. Farjadian F, Ghasemi A, Gohari O, Roointan A, Karimi M, Hamblin MR. Nanopharmaceuticals and nanomedicines currently on the market: challenges and opportunities. Nanomedicine. janv 2019;14(1):93-126.

99. Kumar V, Rahman M, Gahtori P, Al-Abbasi F, Anwar F, Kim HS. Current status and future directions of hepatocellular carcinoma-targeted nanoparticles and nanomedicine. Expert Opinion on Drug Delivery. 3 juin 2021;18(6):673-94.

100. Darweesh RS, Ayoub NM, Nazzal S. Gold nanoparticles and angiogenesis: molecular mechanisms and biomedical applications. IJN. sept 2019;Volume 14:7643-63.

101. Cai H, Yang Y, Peng F, Liu Y, Fu X, Ji B. Gold nanoparticles-loaded anti-miR221 enhances antitumor effect of sorafenib in hepatocellular carcinoma cells. Int J Med Sci. 2019;16(12):1541-8.

102. Xue HY, Liu Y, Liao JZ, Lin JS, Li B, Yuan WG, et al. Gold nanoparticles delivered miR-375 for treatment of hepatocellular carcinoma. Oncotarget. 27 déc 2016;7(52):86675-86.

103. Sakthi Devi R, Girigoswami A, Siddharth M, Girigoswami K. Applications of Gold

and Silver Nanoparticles in Theranostics. Appl Biochem Biotechnol. sept 2022;194(9):4187-219.

104. Faedmaleki F, Shirazi FH, Salarian AA, Ashtiani HA, Rastegar H. Toxicity Effect of Silver Nanoparticles on Mice Liver Primary Cell Culture and HepG2 Cell Line. 2014;

105. Singh D, Singh M, Yadav E, Falls N, Komal U, Dangi DS, et al. Amelioration of diethylnitrosamine (DEN)-induced hepatocellular carcinogenesis in animal models *via* knockdown oxidative stress and proinflammatory markers by *Madhuca longifolia* embedded silver nanoparticles. RSC Adv. 2018;8(13):6940-53.

106. Tsai PH, Wang ML, Chang JH, Yarmishyn AA, Nhi Nguyen PN, Chen W, et al. Dual Delivery of HNF4 $\alpha$  and Cisplatin by Mesoporous Silica Nanoparticles Inhibits Cancer Pluripotency and Tumorigenicity in Hepatoma-Derived CD133-Expressing Stem Cells. ACS Appl Mater Interfaces. 5 juin 2019;11(22):19808-18.

107. Abulikemu A, Zhao X, Xu H, Li Y, Ma R, Yao Q, et al. Silica nanoparticles aggravated the metabolic associated fatty liver disease through disturbed amino acid and lipid metabolisms-mediated oxidative stress. Redox Biology. févr 2023;59:102569.

108. El-Kharrag R, Amin A, Hisaindee S, Greish Y, Karam SM. Development of a therapeutic model of precancerous liver using crocin-coated magnetite nanoparticles. International Journal of Oncology. janv 2017;50(1):212-22.

109. Torchilin VP, Trubetskoy VS. Which polymers can make nanoparticulate drug carriers long-circulating? Advanced Drug Delivery Reviews. sept 1995;16(2-3):141-55.

110. Masood F. Polymeric nanoparticles for targeted drug delivery system for cancer therapy. Materials Science and Engineering: C. mars 2016;60:569-78.

111. Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. janv 2010;75(1):1-18.

112. Craparo EF, Sardo C, Serio R, Zizzo MG, Bondì ML, Giammona G, et al. Galactosylated polymeric carriers for liver targeting of sorafenib. International Journal of Pharmaceutics. mai 2014;466(1-2):172-80.

113. Zhang J, Zhang M, Ji J, Fang X, Pan X, Wang Y, et al. Glycyrrhetic Acid-Mediated Polymeric Drug Delivery Targeting the Acidic Microenvironment of Hepatocellular Carcinoma. Pharm Res. oct 2015;32(10):3376-90.

114. Zhang J, Zheng Y, Xie X, Wang L, Su Z, Wang Y, et al. Cleavable Multifunctional Targeting Mixed Micelles with Sequential pH-Triggered TAT Peptide Activation for Improved Antihepatocellular Carcinoma Efficacy. Mol Pharmaceutics. 6 nov

2017;14(11):3644-59.

115. Li Y, Hu Y, Xiao J, Liu G, Li X, Zhao Y, et al. Investigation of SP94 Peptide as a Specific Probe for Hepatocellular Carcinoma Imaging and Therapy. *Sci Rep*. 21 sept 2016;6(1):33511.

116. Zhang J, Wang X, Cheng L, Yuan J, Zhong Z. SP94 peptide mediating highly specific and efficacious delivery of polymersomal doxorubicin hydrochloride to hepatocellular carcinoma in vivo. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. janv 2021;197:111399.

117. Zheng L, Li C, Huang X, Lin X, Lin W, Yang F, et al. Thermosensitive hydrogels for sustained-release of sorafenib and selenium nanoparticles for localized synergistic chemoradiotherapy. *Biomaterials*. sept 2019;216:119220.

118. Jain NK, Jain SK. Development and In Vitro Characterization of Galactosylated Low Molecular Weight Chitosan Nanoparticles Bearing Doxorubicin. *AAPS PharmSciTech*. juin 2010;11(2):686-97.

119. Swierczewska M, Han HS, Kim K, Park JH, Lee S. Polysaccharide-based nanoparticles for theranostic nanomedicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*. avr 2016;99:70-84.

120. Zhao T, Zhang S, Guo Y, Wang Q.  $\text{TiC}_2$ : a new two-dimensional sheet beyond MXenes. *Nanoscale*. 2016;8(1):233-42.

121. Li H, Sun Y, Liang J, Fan Y, Zhang X. pH-Sensitive pullulan-DOX conjugate nanoparticles for co-loading PDTC to suppress growth and chemoresistance of hepatocellular carcinoma. *J Mater Chem B*. 2015;3(41):8070-8.

122. Chittasupho C, Jaturanpinyo M, Mangmool S. Pectin nanoparticle enhances cytotoxicity of methotrexate against hepG2 cells. *Drug Delivery*. janv 2013;20(1):1-9.

123. Ye PJ, Huang C, Yang S, Gao P, Li ZP, Tang SY, et al. Facile fabrication of a novel hybrid nanoparticles by self-assembling based on pectin-doxorubicin conjugates for hepatocellular carcinoma therapy. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 12 nov 2018;46(sup3):661-70.

124. Elhissi AMA, Ahmed W, Hassan IU, Dhanak VinodR, D'Emanuele A. Carbon Nanotubes in Cancer Therapy and Drug Delivery. *Journal of Drug Delivery*. 18 oct 2012;2012:1-10.

125. Yang F, Jin C, Yang D, Jiang Y, Li J, Di Y, et al. Magnetic functionalised carbon nanotubes as drug vehicles for cancer lymph node metastasis treatment. *European*

Journal of Cancer. août 2011;47(12):1873-82.

126. Kim JO, Thapa RK, Choi JY, Poudel BK, Choi HG, Yong CS. Receptor-targeted, drug-loaded, functionalized graphene oxides for chemotherapy and photothermal therapy. IJN. juin 2016;2799.

127. Elsayed MMA, Mostafa ME, Alaaeldin E, Sarhan HAA, Shaykoon MShA, Allam S, et al. Design And Characterisation Of Novel Sorafenib-Loaded Carbon Nanotubes With Distinct Tumour-Suppressive Activity In Hepatocellular Carcinoma. IJN. oct 2019;Volume 14:8445-67.

128. Spada A, Emami J, Tuszynski JA, Lavasanifar A. The Uniqueness of Albumin as a Carrier in Nanodrug Delivery. Mol Pharmaceutics. 3 mai 2021;18(5):1862-94.

129. Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, Chiorean EG, Infante J, Moore M, et al. Increased Survival in Pancreatic Cancer with nab-Paclitaxel plus Gemcitabine. N Engl J Med. 31 oct 2013;369(18):1691-703.

130. Paşcalău V, Tertis M, Pall E, Suciu M, Marinca T, Pustan M, et al. Bovine serum albumin gel/polyelectrolyte complex of hyaluronic acid and chitosan based microcarriers for Sorafenib targeted delivery. J Appl Polym Sci. 10 sept 2020;137(34):49002.

131. Wang H, Sun S, Zhang Y, Wang J, Zhang S, Yao X, et al. Improved drug targeting to liver tumor by sorafenib-loaded folate-decorated bovine serum albumin nanoparticles. Drug Delivery. 1 janv 2019;26(1):89-97.

132. Desai PP, Date AA, Patravale VB. Overcoming poor oral bioavailability using nanoparticle formulations – opportunities and limitations. Drug Discovery Today: Technologies. juin 2012;9(2):e87-95.

133. Hoarau D, Delmas P, David S, Roux E, Leroux JC. Novel Long-Circulating Lipid Nanocapsules. Pharm Res. oct 2004;21(10):1783-9.

134. Alavi M, Hamidi M. Passive and active targeting in cancer therapy by liposomes and lipid nanoparticles. Drug Metabolism and Personalized Therapy [Internet]. 26 mars 2019 [cité 10 août 2023];34(1). Disponible sur: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/dmpt-2018-0032/html>

135. Lebreton V, Kaeokhamloed N, Vasyliki A, Hilairret G, Mellinger A, Béjaud J, et al. Pharmacokinetics of intact lipid nanocapsules using new quantitative FRET technique. Journal of Controlled Release. nov 2022;351:681-91.

136. Yan L, Crayton SH, Thawani JP, Amirshaghghi A, Tsourkas A, Cheng Z. A pH-Responsive Drug-Delivery Platform Based on Glycol Chitosan-Coated Liposomes. Small.

oct 2015;11(37):4870-4.

137. Soenen SJH, Brisson AR, Jonckheere E, Nuytten N, Tan S, Himmelreich U, et al. The labeling of cationic iron oxide nanoparticle-resistant hepatocellular carcinoma cells using targeted magnetoliposomes. *Biomaterials*. févr 2011;32(6):1748-58.

138. Zhang X, Lin CC, Chan WKN, Liu KL, Yang ZJ, Zhang HQ. Augmented Anticancer Effects of Cantharidin with Liposomal Encapsulation: In Vitro and In Vivo Evaluation. *Molecules*. 24 juin 2017;22(7):1052.

139. Chang M, Wu M, Li H. Antitumor activities of novel glycyrrhetic acid-modified curcumin-loaded cationic liposomes *in vitro* and in H22 tumor-bearing mice. *Drug Delivery*. 1 janv 2018;25(1):1984-95.

140. Guney Eskiler G, Cecener G, Egeli U, Tunca B. Synthetically Lethal BMN 673 (Talazoparib) Loaded Solid Lipid Nanoparticles for BRCA1 Mutant Triple Negative Breast Cancer. *Pharm Res*. nov 2018;35(11):218.

141. Pindiprolu SKSS, Chintamaneni PK, Krishnamurthy PT, Ratna Sree Ganapathineedi K. Formulation-optimization of solid lipid nanocarrier system of STAT3 inhibitor to improve its activity in triple negative breast cancer cells. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 1 févr 2019;45(2):304-13.

142. Zhang J, Wang T, Mu S, Olerile LD, Yu X, Zhang N. Biomacromolecule/lipid hybrid nanoparticles for controlled delivery of sorafenib in targeting hepatocellular carcinoma therapy. *Nanomedicine*. avr 2017;12(8):911-25.

143. Rahman M, Beg S, Alharbi KS, Alruwaili NK, Alotaibi NH, Alzarea AI, et al. Implications of Solid Lipid Nanoparticles of Ganoderic Acid for the Treatment and Management of Hepatocellular Carcinoma. *J Pharm Innov*. juin 2021;16(2):359-70.

144. Benizri S, Ferey L, Alies B, Mebarek N, Vacher G, Appavoo A, et al. Nucleoside-Lipid-Based Nanocarriers for Sorafenib Delivery. *Nanoscale Res Lett*. déc 2018;13(1):17.

145. Grillone A, Riva ER, Mondini A, Forte C, Calucci L, Innocenti C, et al. Active Targeting of Sorafenib: Preparation, Characterization, and In Vitro Testing of Drug-Loaded Magnetic Solid Lipid Nanoparticles. *Adv Healthcare Mater*. août 2015;4(11):1681-90.

146. Yang T, Chen Y, Zhao P, Xue H, You J, Li B, et al. Enhancing the therapeutic effect via elimination of hepatocellular carcinoma stem cells using Bmi1 siRNA delivered by cationic cisplatin nanocapsules. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. oct 2018;14(7):2009-21.

147. Adams D, Gonzalez-Duarte A, O’Riordan WD, Yang CC, Ueda M, Kristen AV, et al. Patisiran, an RNAi Therapeutic, for Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *N Engl J Med*. 5 juill 2018;379(1):11-21.
148. Wang X, Sun D, Tai J, Wang L. Ganoderic acid A inhibits proliferation and invasion, and promotes apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Molecular Medicine Reports*. oct 2017;16(4):3894-900.
149. Rahman M, Al-Ghamdi SA, Alharbi KS, Beg S, Sharma K, Anwar F, et al. Ganoderic acid loaded nano-lipidic carriers improvise treatment of hepatocellular carcinoma. *Drug Delivery*. 1 janv 2019;26(1):782-93.
150. Wang B, Sun L, Wen M, Tan Y, Almalki WH, Katouah H, et al. Nano lipidic carriers for codelivery of sorafenib and ganoderic acid for enhanced synergistic antitumor efficacy against hepatocellular carcinoma. *Saudi Pharmaceutical Journal*. août 2021;29(8):843-56.
151. Clavreul A, Roger E, Pourbaghi-Masouleh M, Lemaire L, Tétaud C, Menei P. Development and characterization of sorafenib-loaded lipid nanocapsules for the treatment of glioblastoma. *Drug Delivery*. 1 janv 2018;25(1):1756-65.
152. Abdelmoneem MA, Elnaggar MA, Hammady RS, Kamel SM, Helmy MW, Abdulkader MA, et al. Dual-Targeted Lactoferrin Shell-Oily Core Nanocapsules for Synergistic Targeted/Herbal Therapy of Hepatocellular Carcinoma. *ACS Appl Mater Interfaces*. 31 juill 2019;11(30):26731-44.
153. Libra M. The tumor microenvironment in hepatocellular carcinoma (Review). *Int J Oncol* [Internet]. 22 mars 2012 [cité 3 août 2023]; Disponible sur: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.2012.1408>
154. Hernandez-Gea V, Toffanin S, Friedman SL, Llovet JM. Role of the Microenvironment in the Pathogenesis and Treatment of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. mars 2013;144(3):512-27.
155. Ho DWH, Lo RCL, Chan LK, Ng IOL. Molecular Pathogenesis of Hepatocellular Carcinoma. *Liver Cancer*. 2016;5(4):290-302.
156. Kong FH, Ye QF, Miao XY, Liu X, Huang SQ, Xiong L, et al. Current status of sorafenib nanoparticle delivery systems in the treatment of hepatocellular carcinoma. *Theranostics*. 2021;11(11):5464-90.
157. Frank LA, Contri RV, Beck RCR, Pohlmann AR, Guterres SS. Improving drug biological effects by encapsulation into polymeric nanocapsules: Improving drug effects



- by nanocapsules. WIREs Nanomed Nanobiotechnol. sept 2015;7(5):623-39.
158. Zhang YN, Poon W, Tavares AJ, McGilvray ID, Chan WCW. Nanoparticle–liver interactions: Cellular uptake and hepatobiliary elimination. Journal of Controlled Release. oct 2016;240:332-48.
159. Resnier P, Lepeltier E, Emina AL, Galopin N, Bejaud J, David S, et al. Model Affitin and PEG modifications onto siRNA lipid nanocapsules: cell uptake and *in vivo* biodistribution improvements. RSC Advances. 2019;9(47):27264-78.
160. Cerec V, Glaise D, Garnier D, Morosan S, Turlin B, Drenou B, et al. Transdifferentiation of hepatocyte-like cells from the human hepatoma HepaRG cell line through bipotent progenitor. Hepatology. avr 2007;45(4):957-67.
161. Roger E, Gimel JC, Bensley C, Klymchenko AS, Benoit JP. Lipid nanocapsules maintain full integrity after crossing a human intestinal epithelium model. Journal of Controlled Release. mai 2017;253:11-8.
162. Guillouzo A. Nouvelles perspectives d'utilisation des hépatocytes humains au cours du développement préclinique des médicaments. Annales Pharmaceutiques Françaises. nov 2008;66(5-6):288-95.
163. Anthérieu S, Chesné C, Li R, Camus S, Lahoz A, Picazo L, et al. Stable Expression, Activity, and Inducibility of Cytochromes P450 in Differentiated HepaRG Cells. Drug Metabolism and Disposition. mars 2010;38(3):516-25.
164. Rennick JJ, Johnston APR, Parton RG. Key principles and methods for studying the endocytosis of biological and nanoparticle therapeutics. Nat Nanotechnol. mars 2021;16(3):266-76.
165. Roger E, Lagarce F, Benoit JP. The gastrointestinal stability of lipid nanocapsules. International Journal of Pharmaceutics. sept 2009;379(2):260-5.
166. Roger E, Lagarce F, Benoit JP. Development and characterization of a novel lipid nanocapsule formulation of Sn38 for oral administration. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. sept 2011;79(1):181-8.
167. Elfiky AA, Ibrahim IM, Elghareib AM, Bashandy YS, Samir A, Hamdy MM, et al. Simulation of gold nanoparticle movement through normal and cancer cell membranes. Computers in Biology and Medicine. sept 2023;164:107363.
168. Andersson TB, Kanebratt KP, Kenna JG. The HepaRG cell line: a unique *in vitro* tool for understanding drug metabolism and toxicology in human. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology. juill 2012;8(7):909-20.

169. Mueller D, Krämer L, Hoffmann E, Klein S, Noor F. 3D organotypic HepaRG cultures as in vitro model for acute and repeated dose toxicity studies. *Toxicology in Vitro*. févr 2014;28(1):104-12.
170. Yan Y, Liu L, Xiong H, Miller JB, Zhou K, Kos P, et al. Functional polyesters enable selective siRNA delivery to lung cancer over matched normal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* [Internet]. 27 sept 2016 [cité 31 août 2023];113(39). Disponible sur: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1606886113>
171. Le Roux G, Moche H, Nieto A, Benoit JP, Nessler F, Lagarce F. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid nanocapsules. *Toxicology in Vitro*. juin 2017;41:189-99.
172. Voigt N, Henrich-Noack P, Kockentiedt S, Hintz W, Tomas J, Sabel BA. Toxicity of polymeric nanoparticles in vivo and in vitro. *J Nanopart Res*. juin 2014;16(6):2379.
173. Hureauux J, Lagarce F, Gagnadoux F, Rousselet MC, Moal V, Urban T, et al. Toxicological Study and Efficacy of Blank and Paclitaxel-Loaded Lipid Nanocapsules After i.v. Administration in Mice. *Pharmaceutical Research*. mars 2010;27(3):421-30.
174. Hamelers IHL, Staffhorst RWHM, Voortman J, De Kruijff B, Reedijk J, Van Bergen En Henegouwen PMP, et al. High Cytotoxicity of Cisplatin Nanocapsules in Ovarian Carcinoma Cells Depends on Uptake by Caveolae-Mediated Endocytosis. *Clinical Cancer Research*. 15 févr 2009;15(4):1259-68.
175. da Luz CM, Boyles MSP, Falagan-Lotsch P, Pereira MR, Tutumi HR, de Oliveira Santos E, et al. Poly-lactic acid nanoparticles (PLA-NP) promote physiological modifications in lung epithelial cells and are internalized by clathrin-coated pits and lipid rafts. *J Nanobiotechnol*. déc 2017;15(1):11.
176. Paillard A, Hindré F, Vignes-Colombeix C, Benoit JP, Garcion E. The importance of endo-lysosomal escape with lipid nanocapsules for drug subcellular bioavailability. *Biomaterials*. oct 2010;31(29):7542-54.
177. Roger E, Lagarce F, Garcion E, Benoit JP. Lipid nanocarriers improve paclitaxel transport throughout human intestinal epithelial cells by using vesicle-mediated transcytosis. *Journal of Controlled Release*. déc 2009;140(2):174-81.
178. Hirsjärvi S, Dufort S, Gravier J, Texier I, Yan Q, Bibette J, et al. Influence of size, surface coating and fine chemical composition on the in vitro reactivity and in vivo biodistribution of lipid nanocapsules versus lipid nanoemulsions in cancer models. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. avr 2013;9(3):375-87.
179. Suen WLL, Chau Y. Size-dependent internalisation of folate-decorated

nanoparticles via the pathways of clathrin and caveolae-mediated endocytosis in ARPE-19 cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 17 mars 2014;66(4):564-73.

180. Pinton L, Magri S, Masetto E, Vettore M, Schibuola I, Ingangi V, et al. Targeting of immunosuppressive myeloid cells from glioblastoma patients by modulation of size and surface charge of lipid nanocapsules. *Journal of Nanobiotechnology* [Internet]. déc 2020 [cité 8 juin 2020];18(1). Disponible sur:

<https://jnanobiotechnology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12951-020-00589-3>

181. Zhang W, Taheri-Ledari R, Ganjali F, Mirmohammadi SS, Qazi FS, Saeidirad M, et al. Effects of morphology and size of nanoscale drug carriers on cellular uptake and internalization process: a review. *RSC Adv*. 2023;13(1):80-114.

182. Jagwani S, Jalalpure S, Dhamecha D, Jadhav K, Bohara R. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Evaluation of Resveratrol Loaded Cationic Liposomes for Targeting Hepatocellular Carcinoma. *ACS Biomater Sci Eng*. 14 sept 2020;6(9):4969-84.

183. Wu Y, Liu H, Ding HG. GPC-3 in hepatocellular carcinoma: current perspectives. *JHC*. nov 2016;Volume 3:63-7.

184. Feng S, Zhou J, Li Z, Appelman HD, Zhao L, Zhu J, et al. Sorafenib encapsulated in nanocarrier functionalized with glypican-3 specific peptide for targeted therapy of hepatocellular carcinoma. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. déc 2019;184:110498.

185. Zhang L, Gong, Zhang, Ma, Zhang, Shen. Targeted therapy for human hepatic carcinoma cells using folate-functionalized polymeric micelles loaded with superparamagnetic iron oxide and sorafenib in vitro. *IJN*. avr 2013;1517.

186. Ranganathan A, Hindupur R, Vallikannan B. Biocompatible lutein-polymer-lipid nanocapsules: Acute and subacute toxicity and bioavailability in mice. *Materials Science and Engineering: C*. déc 2016;69:1318-27.

187. Yao Y, Zang Y, Qu J, Tang M, Zhang T. The Toxicity Of Metallic Nanoparticles On Liver: The Subcellular Damages, Mechanisms, And Outcomes. *IJN*. nov 2019;Volume 14:8787-804.

188. Recordati C, De Maglie M, Bianchessi S, Argenti S, Cella C, Mattiello S, et al. Tissue distribution and acute toxicity of silver after single intravenous administration in mice: nano-specific and size-dependent effects. *Part Fibre Toxicol*. déc 2015;13(1):12.

189. Suker DK, Jasim FA. Liver histopathological alteration after repeated intra-tracheal instillation of titanium dioxide in male rats.

190. Maupas C, Moulari B, Béduneau A, Lamprecht A, Pellequer Y. Surfactant

dependent toxicity of lipid nanocapsules in HaCaT cells. International Journal of Pharmaceutics. juin 2011;411(1-2):136-41.

191. Liu S, Huang F, Ru G, Wang Y, Zhang B, Chen X, et al. Mouse Models of Hepatocellular Carcinoma: Classification, Advancement, and Application. Front Oncol. 30 juin 2022;12:902820.



## Stratégie thérapeutique de l'hépatocarcinome : pertinence de la vectorisation ?

### RÉSUMÉ

Ce mémoire de thèse, après un rappel sur le foie (anatomie, histologie et fonctions hépatiques) et ses pathologies associées, a présenté la stratégie thérapeutique décisionnelle du CHC intégrant les nouvelles recommandations de 2023. Un état de l'art résume ensuite quelles sont les NPs développées dans le cadre de leur utilisation contre le CHC. Une partie expérimentale a permis de mettre en évidence l'intérêt des NCLs dans la stratégie thérapeutique du CHC. En effet, les NCLs démontrent une internalisation préférentielle et rapide dans les cellules cancéreuses hépatiques (HepG2) comparativement aux cellules hépatiques différenciées (HepaRG). De plus, la faible toxicité engendrée sur les cellules HepaRG, après exposition aiguë et chronique, a mis en valeur une bonne biocompatibilité hépatique des vecteurs *in vitro*. Pour finir, la discussion a mis en évidence des points d'amélioration, notamment l'amélioration du ciblage du CHC par ajout de groupements/peptides ciblant. Pour conclure, les NCLs semblent être de bons candidats nanovectoriels complétant l'arsenal thérapeutique du CHC, nécessitant toutefois une confirmation de ces hypothèses *in vivo* avant de pouvoir passer aux étapes de développement clinique futures.

**Mots-clés :** foie, hépatocarcinome, nanocapsules lipidiques, toxicité/biocompatibilité, internalisation

## Hepatocellular carcinoma therapeutic strategy: relevance of vectorization?

### ABSTRACT

This thesis dissertation, following a short reminder about the liver (anatomy, histology and hepatic functions) and its associated diseases, presented the HCC therapeutic strategy in respect of the new 2023 recommendations. Then, a state of art summarized which NPs were developed in the framework of the HCC. An experimental part highlighted the interest of LNCs in the therapeutic strategy against HCC. Indeed, LNCs showed a quick and preferential internalization inside cancerous liver cells (HepG2) rather than in differentiated liver cells (HepaRG). Moreover, the low toxicity observed on HepaRG cells, after acute and chronic exposure, underlined the *in vitro* liver biocompatibility of LNCs. Finally, the discussion showed some points of improvement, notably using some targeting functions/peptides in order to obtain a better liver targeting. To conclude, LNCs seem to be good nanovector candidates for the therapeutic arsenal against HCC, although an *in vivo* confirmation of the hypothesis is required before proceeding to further clinical development.

**Keywords:** liver, hepatocellular carcinoma, lipid nanocapsules, toxicity/biocompatibility, internalization