

Développement de systèmes de transport ciblé basés sur des nanoparticules d'or pour le traitement du carcinome hépatocellulaire

Alexandra Pusta

Département de Chimie Analytique,
Département des Dispositifs Médicaux.
Université de Médecine et Pharmacie
Iuliu Hațieganu
Cluj-Napoca, Roumaine
alexandra.pusta@umfcluj.ro

Valentin Toma

Centre de recherche MEDFuture
Université de Médecine et Pharmacie
Iuliu Hațieganu
Cluj-Napoca, Roumaine
valentin.toma@umfcluj.ro

Mihaela Tertis

Département de Chimie Analytique Université
de Médecine et Pharmacie
Iuliu Hațieganu
Cluj-Napoca, Roumaine
Mihaela.Tertis@umfcluj.ro

Emoke Pall

Institut des Sciences de la Vie Université des
Sciences Agricoles et Médecine Vétérinaire
Cluj-Napoca, Roumaine
emoke.pall@usamvcluj.ro

Cecilia Cristea

Département de Chimie Analytique Université
de Médecine et Pharmacie
Iuliu Hațieganu
Cluj-Napoca, Roumaine ccristea@umfcluj.ro

Rares Stăniuc

Département de Biophysique Pharmaceutique
Université de Médecine et Pharmacie
Iuliu Hațieganu
Cluj-Napoca, Roumaine
rares.staniuc@umfcluj.ro

Tamara Topala

Département de Chimie Inorganique
Université de Médecine et Pharmacie
Iuliu Hațieganu
Cluj-Napoca, Roumaine
topala.liana@umfcluj.ro

Résumé — Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est l'une des formes les plus fréquentes et mortelles de cancer du foie, avec une incidence en augmentation constante dans le monde entier. Le sorafénib (SOR), un inhibiteur multi-kinasique, est l'un des médicaments utilisés en première ligne dans le traitement systémique du CHC avancé. L'objectif principal de l'étude était le développement de nanoparticules d'or (AuNP) modifiées avec l'aptamère TLS11a et SOR pour le traitement du CHC. Les conditions de fabrication optimales ont été déterminées et la caractérisation des nanoparticules optimales après chaque étape de fonctionnalisation a été réalisée par diverses techniques spectroscopiques. Les paramètres de chargement en SOR et son remplacement, ainsi que la cytotoxicité *in vitro* sur deux lignées cellulaires : les cellules cancéreuses HepG2 et les fibroblastes sains, ont été évalués.

Mots-clés — nanoparticules d'or, aptamère, carcinome hépatocellulaire, transport ciblé.

I. INTRODUCTION

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est le type de cancer du foie le plus courant, avec une incidence en constante augmentation dans le monde entier [1]. Le traitement conventionnel du CHC inclut des options telles que la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie, mais ces méthodes présentent souvent des limites significatives en termes d'efficacité et d'effets secondaires [2], [3]. Le sorafénib (SOR), un inhibiteur multi-kinasique, est l'un des médicaments de première ligne dans le traitement systémique du CHC avancé [3]. Bien qu'il ait été démontré qu'il augmente le taux de survie des patients, le SOR présente certains inconvénients tels que sa faible solubilité dans l'eau [4], une biodisponibilité réduite, des effets secondaires systémiques et une efficacité limitée chez certains patients [3].

Dans ce contexte, l'utilisation de nanoparticules (NP) de métaux précieux comme l'or, l'argent et le platine, a suscité un intérêt considérable dans le domaine de l'oncologie [5]. Les NP de métaux précieux offrent de nombreux avantages grâce à leurs propriétés uniques, y compris une grande surface spécifique, la capacité de pénétrer les cellules tumorales et la possibilité d'être fonctionnalisées avec divers agents thérapeutiques ou molécules cibles [6]. L'or, en particulier, a été largement étudié pour ses applications biomédicales en raison de sa biocompatibilité et de sa

capacité à générer des effets photothermiques par conversion de la lumière en chaleur, détruisant ainsi les cellules cancéreuses [5]. Les NP d'or (AuNP) peuvent être fonctionnalisées avec divers ligands pour augmenter leur sélectivité envers la cible, tels que des anticorps, des enzymes ou des aptamères. Les aptamères sont des séquences nucléotidiques d'ADN ou d'ARN, synthétisées *in vitro*, qui présentent une grande spécificité pour une cible particulière (ion métallique, protéine, cellule).

Dans cette étude, des AuNP modifiées avec du SOR et l'aptamère TLS11a, spécifique aux cellules tumorales hépatiques HepG2, ont été développées. Des AuNP commerciales fonctionnalisées avec du polyéthylène glycol (PEG) et des groupements carboxyle ont été activées et ensuite fonctionnalisées avec l'aptamère pour obtenir AuNP-PEG_Apt. Après cette étape, le SOR a été chargé, donnant AuNP-PEG_Apt_SOR. Les conditions optimales de fabrication ont été déterminées et les NP modifiées ont été caractérisées après chaque étape de la fonctionnalisation par diverses techniques spectroscopiques. Les paramètres de charge et de remplacement du SOR, ainsi que la cytotoxicité *in vitro* des NP obtenues, ont été évalués.

II. MATÉRIAUX ET MÉTHODES

A. Matériaux

Les AuNP ont été achetées chez Nanovex (Asturies, Espagne). Le SOR et les autres réactifs utilisés ont été achetés chez Sigma-Aldrich (USA) et utilisés tels quels, sans traitement supplémentaire.

B. Méthodes

1) Fonctionnalisation des AuNP avec l'aptamère

L'aptamère utilisé était TLS11a, un aptamère spécifique aux cellules tumorales HepG2, avec la séquence suivante : 5'-ACA-GCA-TCC-CCA-TGT-GAA-CAA-TCG-CAT- TGT-GAT-TGT-TAC-GGT-TTC-CGC-CTC-ATG-GAC- GTG-CTG-3' (Kd = 4,51 ± 0,39 nM) [7]. Son extrémité 5' était fonctionnalisée avec un groupement amino. Une solution stock d'aptamère de concentration 100 μM a été préparée et diluée avant la fonctionnalisation. La fonctionnalisation a été réalisée en deux étapes distinctes : d'abord, les groupements carboxyle des AuNP ont été activés à l'aide d'un mélange de *N*-hydroxysuccinimide (NHS) 2 mM et de *N*-éthyl-*N*-(3-(diméthylamino)propyl)

carbodiimide (EDC) 4 mM. Les suspensions préparées dans le mélange NHS/EDC ont été laissées en réaction sous agitation continue sur un HulaMixer.

Ensuite, les AuNP ont été séparées du mélange d'activation par centrifugation, lavées, puis resuspendues dans une solution d'aptamère pour obtenir AuNP-PEG_Apt. Le surnageant contenant l'aptamère a été analysé par spectroscopie UV-Vis pour confirmer la fonctionnalisation avec l'aptamère. Le temps et la température d'incubation ainsi que la concentration de l'aptamère ont été optimisés.

2) Chargement et remplacement de SOR

Une solution de SOR à une concentration de 1 mg/mL a été préparée dans de l'éthanol à 96 % et incubée avec les AuNP-PEG_Apt pendant 72 heures pour obtenir AuNP-PEG_Apt_SOR. L'efficacité d'encapsulation (EE%) et la capacité de charge (LC%) ont été calculées.

Pour étudier le remplacement de SOR, les AuNP-PEG_Apt_SOR ont été incubées dans un tampon phosphate (PBS) à pH 5,5 sous agitation continue. Des échantillons prélevés dans le milieu de remplacement ont été dilués dans du PBS à pH 5,5 et la concentration de SOR dans les solutions obtenues a été déterminée par spectrophotométrie UV-Vis. Le remplacement cumulatif de SOR a été déterminé.

3) La spectroscopie Raman

La spectroscopie Raman a été réalisée sur des échantillons solides déposés sur des substrats CaF_2 à l'aide d'un microscope confocal Renishaw® inVia (Renishaw plc, Wotton-under-Edge, Gloucestershire, Royaume-Uni) couplé à un microscope Leica (Leica Microsystems GmbH, Allemagne). L'acquisition des images spectrales a été réalisée avec des objectifs $50\times$ (NA 0,75) et $100\times$ (NA 0,85), couvrant la plage de 150 à 1700 cm^{-1} . L'excitation était assurée par une diode laser de 785 nm (Renishaw, Royaume-Uni) avec une puissance de sortie inférieure à 2 mW à la surface du substrat. Le temps d'acquisition a été fixé à 10 secondes. Le système était équipé d'un réseau de 1200 lignes/mm et d'une caméra CCD refroidie par effet Peltier. Chaque spectre a été obtenu en faisant la moyenne de 25 spectres sur une zone de $5\times 5\text{ }\mu\text{m}^2$. Pour valoriser les données après l'analyse, les intensités Raman ont été normalisées en les divisant par le produit de la puissance laser et du temps d'exposition.

4) La spectroscopie FT-IR

Les spectres FT-IR ont été mesurés avec un spectromètre Jasco FT-IR 4100, doté d'un cristal ZnSe ATR. Les mesures ont été effectuées sur la plage spectrale de 4000 à 550 cm^{-1} avec une résolution de 4 cm^{-1} , et avec une moyenne de 32 balayages par spectre. L'analyse des données a été réalisée à l'aide du logiciel Jasco Manager 2.

5) Études sur des cultures cellulaires

Les effets cytotoxiques du SOR et des AuNP modifiées ont été évalués en parallèle sur les cellules cancéreuses HepG2 et les fibroblastes en utilisant le test MTT. Ce test a été utilisé pour évaluer la capacité métabolique des cellules viables. Les cellules ont été ensemencées sur des plaques à 96 puits et laissées à adhérer pendant la nuit.

III. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

A. Optimisation de la fabrication des AuNP-PEG_Apt_SOR

Lors du développement des AuNP-PEG_Apt_SOR, les paramètres suivants ont été optimisés : le temps d'incubation avec l'aptamère, la température d'incubation avec l'aptamère, la concentration de l'aptamère, le temps de chargement avec le SOR et le solvant utilisé pour préparer la solution de SOR. La diminution de l'absorbance à la longueur d'onde spécifique de l'aptamère (260 nm) et du SOR (269 nm) avant et après incubation

a été attribuée à la liaison de l'aptamère et au chargement en SOR. Les résultats sont présentés dans le Tableau 1, et les paramètres optimaux sont marqués en gras.

TABEAU I. OPTIMISATION DU PROCESSUS DE FABRICATION

Fonctionnalisation avec l'aptamère		
Paramètre optimisé	Conditions	ΔA (%)
Temps d'incubation (h)	1	0,11
	2	0,15
	4	0,46
	24	1,49
Température d'incubation (°C)	4	1,60
	25	1,49
	37	1,83
Concentration de l'aptamère (μM)	1	0,92
	2	1,83
Incubation avec SOR		
Paramètre optimisé	Conditions	ΔA (%)
Solvant utilisé	DMSO	-
	Éthanol 96%	14,23
Temps d'incubation (h)	2	13,85
	24	14,23
	48	16,54
	72	29,26

L'augmentation du temps d'incubation de 4 à 24 heures a conduit à un triplement de la valeur ΔA , le temps optimal étant fixé à 24 heures. La hausse de la température à 37°C a également entraîné une augmentation de la valeur ΔA , et les incubations suivantes avec l'aptamère ont été effectuées à cette température. ΔA a varié proportionnellement à la concentration de l'aptamère, et la concentration a doublé. L'incubation avec une solution de SOR préparée dans le diméthylsulfoxyde a entraîné la dégradation des AuNP, ce qui a conduit à l'utilisation de l'éthanol à 96 %.

B. Chargement et remplacement de SOR

Le chargement de SOR a été évalué en calculant EE% à partir de la courbe d'étalonnage obtenue pour SOR dans l'éthanol. L'équation $A = 0,0707[\text{SOR}] + 0,2313$ ($R^2 = 0,9834$) a été utilisée. La valeur obtenue pour EE% était de 16,33 %. Bien que faible, cette valeur est prometteuse et pourrait être augmentée en augmentant la concentration de la solution de SOR.

Le profil de remplacement cumulatif a été représenté graphiquement (Fig. 1). L'étude a montré un remplacement de 26,5 % du SOR chargé après 24 heures. L'augmentation de la durée de remplacement à 48 heures n'a pas augmenté le pourcentage de SOR remplacé.

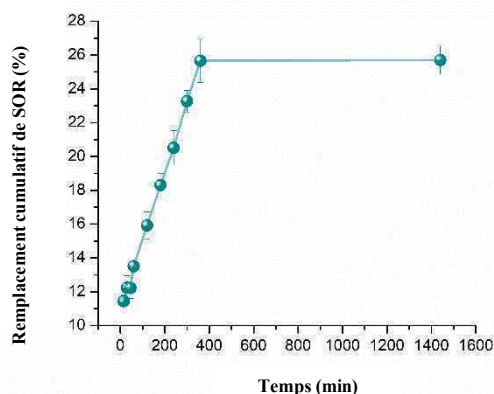


Fig. 1. Remplacement cumulatif de SOR
ement cumulatif de SOR

La hausse de la concentration de la solution de SOR utilisée pour l'incubation pourrait entraîner une augmentation de la quantité chargée et, par conséquent, de celle remplacée.

C. La spectroscopie Raman

La spectroscopie Raman a été utilisée pour surveiller les interactions moléculaires entre divers composés impliqués dans le développement du système d'administration de médicaments. Les spectres Raman ont été enregistrés pour l'AuNP avant et après la fonctionnalisation avec l'aptamère, ainsi qu'après le chargement du SOR, et comparés au spectre du SOR.

Une comparaison des spectres Raman de l'AuNP et du SOR non fonctionnalisés avec ceux obtenus après l'immobilisation de l'aptamère et le chargement chimiothérapeutique a révélé une correspondance entre les signaux caractéristiques, confirmant la réussite de chaque étape de fonctionnalisation.

D. La spectroscopie FT-IR

Les spectres FT-IR ont été enregistrés pour les AuNP avant et après la fonctionnalisation avec l'aptamère, ainsi qu'après le chargement du SOR, et comparés au spectre du SOR. Les spectres ont indiqué la réussite de chaque étape de fonctionnalisation.

E. Études sur cultures cellulaires

Les études sur cultures cellulaires ont montré une augmentation de la biocompatibilité des AuNP-PEG Apt par rapport aux fibroblastes, démontrant ainsi les effets positifs de la fonctionnalisation avec l'aptamère.

CONCLUSIONS

Dans cette étude, des nanoparticules d'or fonctionnalisées avec un aptamère spécifique des cellules tumorales HepG2, l'aptamère TLS11a, ont été développées. Les nanoparticules modifiées obtenues ont été chargées avec du sorafénib, un inhibiteur multi-kinasique utilisé dans le traitement du carcinome hépatocellulaire.

Les étapes de fonctionnalisation avec l'aptamère et de chargement en sorafénib ont été optimisées, et le remplacement du sorafénib par le système de transport ciblé développé a ensuite été évalué. Après chaque étape de modification, les nanoparticules développées ont été caractérisées par des techniques spectroscopiques pour confirmer les fonctionnalités réalisées. La cytotoxicité des nanoparticules a été évaluée sur deux lignées cellulaires : les cellules HepG2 et les fibroblastes montrent que la fonctionnalisation a été bien réalisée et que le système proposé est prometteur.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été soutenu par le Ministère Roumain de l'Éducation et de la Recherche, CNCS-UEFISCDI, avec pour numéro de projet PN-IV-P8-8.1-PRE-HE-ORG-2023-0076.

RÉFÉRENCES

- [1] J. M. Llovet *et al.*, "Hepatocellular carcinoma," *Nature Reviews Disease Primers*, vol. 7, no. 1. Nature Research, pp. 1–28, Dec. 01, 2021, doi: 10.1038/s41572-020-00240-3.
- [2] P. R. Galle *et al.*, "EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma," *J. Hepatol.*, vol. 69, no. 1, pp. 182–236, 2018, doi: 10.1016/j.jhep.2018.03.019.
- [3] A. G. Singal, F. Kanwal, and J. M. Llovet, "Global trends in hepatocellular carcinoma epidemiology: implications for screening, prevention and therapy," *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, vol. 20, no. 12, pp. 864–884, 2023, doi: 10.1038/s41571-023-00825-3.
- [4] A. Aman, S. Ali, P. Mahalapbutr, K. Krusong, P. Wolschann, and T. Rungrotmongkol, "Enhancing solubility and stability of sorafenib through cyclodextrin-based inclusion complexation: in silico and in vitro studies," *RSC Adv.*, vol. 13, no. 39, pp. 27244–27254, Sep. 2023, doi: 10.1039/d3ra03867j.
- [5] A. Pusta, M. Tertis, I. Crăciunescu, R. Turcu, S. Mirel, and C. Cristea, "Recent Advances in the Development of Drug Delivery Applications of Magnetic Nanomaterials," *Pharmaceutics*, vol. 15, no. 7, 2023, doi: 10.3390/pharmaceutics15071872.
- [6] J. Fan, Y. Cheng, and M. Sun, "Functionalized Gold Nanoparticles: Synthesis, Properties and Biomedical Applications," *Chem. Rec.*, vol. 20, no. 12, pp. 1474–1504, Dec. 2020, doi: <https://doi.org/10.1002/tcr.202000087>.
- [7] D. Shangguan *et al.*, "Identification of liver cancer-specific aptamers using whole live cells," *Anal. Chem.*, vol. 80, no. 3, pp. 721–728, Feb. 2008, doi: 10.1021/ac701962v.