Université de Paris

École doctorale 563 : Médicament, Toxicologie, Chimie, Imageries

Laboratoire Unité de Technologies Chimique et Biologique pour la Santé

Co-encapsulation de la fisétine et du cisplatine dans des liposomes pour le traitement de cancers vascularisés

Par Morgane Renault

Thèse de doctorat de Biothérapie

Dirigée par le Pr Karine Andrieux

Présentée et soutenue publiquement le 04/06/2020

Devant un jury composé de :

Mme Amélie Bochot, PU, Université Paris Saclay	Rapporteur
Mme Marie-Paule Mingeot-Leclercq, Professor, UCL	Rapporteur
M. Guillaume Bastiat, MCU-HDR, Université d'Angers	Examinateur
Mme Muriel Paul, PhD, MCA, Université de Paris	Membre invitée du jury
Mme Karine Andrieux, PU, Université de Paris	Directrice de thèse

Except where otherwise noted, this is work licensed under
https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/

A mes grand-pères

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier les membres de mon jury pour avoir accepté d'évaluer mes travaux :

Au **Professeur Amélie Bochot** et au **Professeur Marie-Paule Mingeot-Leclercq** pour l'honneur qu'elles m'ont fait en acceptant d'être rapporteur de cette thèse.

Au **Docteur Guillaume Bastiat**, pour avoir accepté d'être examinateur de ce travail et de siéger au sein de ce jury.

J'adresse tous mes remerciements à ma directrice de thèse, le **Professeur Karine Andrieux**, et à ma co-encadrante, le **Docteur Muriel Paul**, pour m'avoir fait confiance en me proposant ce sujet de thèse et donné les moyens d'y arriver. Pour vos conseils avisés, un grand merci.

Merci au **Docteur Nathalie Mignet** et au **Professeur Alain Astier**, pour m'avoir accueillie dans vos équipes et dans vos structures. Pour vos précieux conseils, ma profonde reconnaissance.

J'adresse également mes remerciements à tous ceux qui ont participé au projet :

Au **Docteur Victoire Vieillard**, pour m'avoir formée sur tant de techniques et pour son aide précieuse. Au **Docteur Johanne Seguin**, pour son expertise en culture cellulaire et son aide inestimable sur le vivo. Merci à vous d'avoir toujours répondu présente à mes très nombreuses sollicitations.

Au **Docteur Philipe Espeau**, pour son aide inestimable sur les analyses thermiques.

Au **Docteur Cyrille Richard**, pour son aide également inestimable sur la RMN.

A **René Lai Kuen** pour son expertise en imagerie.

Au **Docteur Christine Charrueau** pour son aide avec le lyophilisateur.

A **Dang-Tri Le**, pour son implication et son aide durant son stage de master 2.

Merci également à tous **les membres de l'UTCBS** qui m'ont accueillie chaleureusement et plus particulièrement aux Docteurs **Rabah Gahoual**, **Caroline Roques** et **Khair Alhareth.** A toute **l'équipe de la PUI Henri Mondor** chez qui je suis depuis si longtemps, ainsi qu'à tous mes co-internes, co-externes et les poules d'eau avec qui j'ai tant partagé. Merci à **François** pour son expertise sur le cancer du poumon.

Mes plus profonds remerciements à tous mes co-doctorants pour leur amitié, leur soutien indéfectible et leur aide inconditionnelle, toujours là même quand j'étais loin : **Lucie**, **Thomas**, **Brice**, **Katia**, **Geoffroy**, **Shayan**, **Doan, Pauline, Guillaume, Jianhua** ainsi que tous les plus jeunes, **Louise**, **Panpan**, **Gabriel** et **Xiaojing**. Merci à **Balthazar** pour ses précieux apports statistiques.

Je voudrais également remercier mes **amis de lycée et d'avant**, qui ont su quand me sortir de mon trou et quand me laisser m'y terrer.

Un immense merci à ma **famille**, qui m'a toujours soutenue, chacun à sa manière. Pour les pauses dimanche en famille, les diners couz, les soirées télé de haute qualité, les discussions quotidiennes par message. Je suis ravie d'être la dernière officiellement diplômée de notre génération.

01/07/1991
✉ 54 rue Beaubourg 75003 PARIS
✆ 06 85 61 29 73
@ morgane.renaultm@hotmail.com

Morgane RENAULT-MAHIEUX

Pharmacien

Expérience professionnelle

Interne en Pharmacie Hospitalière

Nov 2013 – Avr 2019

Hôpitaux Universitaires Henri Mondor (APHP) – Unité de reconstitution des chimiothérapies.

Hôpitaux Universitaires Henri Mondor (APHP) – Laboratoire de Contrôle.

Institut Mutualiste Montsouris – Pharmacotechnie et Pharmacie Clinique en Oncologie.

Hôpitaux Universitaires Henri Mondor (APHP) – Secteur Médicaments.

AGEPS (APHP) – Prospection et contrôle des matières premières.

Hôpitaux Universitaires Henri Mondor (APHP) – Laboratoire de Contrôle.

Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil – Secteur Dispositifs Médicaux.

Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil – Secteur médicament.

Validation des prescriptions des cytotoxiques et biothérapies injectables (CHIMIO®). Préparation en isolateur de classe A. Contrôle des chimiothérapies (Microdom Multispec®, photos, visuel), des matières premières et des eaux d'hémodialyses selon la PE, des préparations hospitalières et magistrales. Prospection de fournisseurs de matières premières (documentation technico-réglementaires, offre de prix, demande d'échantillons).

Analyse pharmaceutique d'ordonnances (pédiatrie, oncologie, médecine interne, rhumatologie et dermatologie), suivi du bon usage des anti-infectieux, des produits hors-GHS, des médicaments hors livrets, contingentés et en compassionnel; participations et présentations aux COMEDIMS et COMAI. Rétrocession. Gestion des appels d'offres « champs et casaques » et « fils et ligatures », des matériovigilances, de la traçabilité des DMI, des DMS hors-stock. Validation de charges de stérilisation.

Gestion des essais cliniques. Cours aux préparateurs. Encadrements d'externes.

Expérience de recherche

Fev 2016 – en cours

Doctorat d'Université au sein de l'UTCBS, UMR CNRS 8258 INSERM U 1267, Université Paris Descartes - Hôpitaux Universitaires Henri Mondor (APHP)

Pr Andrieux, Dr Paul

Développement galénique de liposomes co-encapsulant de la fisétine et du cisplatine

Gestion de projet. Préparation et caractérisation de liposomes (injection éthanolique, hydratation de film), lyophilisation, mise au point de méthodes d'analyse (HPLC (fisétine), SAA four (cisplatine)), culture cellulaire, techniques d'imagerie (microscopie optique, TEM), DSC.

Etudes et diplômes

2016 - en cours	**Doctorat d'Université** - ED563 Médicament Toxicologie Chimie Image Directrice de thèse : Pr Andrieux
2013 – 2019	**DES de Pharmacie Hospitalière – Filière PH-PR -** Université Paris 11 Mention Très Bien. Médaille d'argent du Prix de l'Internat en Pharmacie dit « Concours de la Médaille » Obtention du Concours de l'Internat en Pharmacie, promotion 2013, classée 156ème
2008 - 2013	**Premier et deuxième cycles d'étude en Pharmacie** - Université Paris 11 (Concours 1ère année classée 12/890) 4ème année de pharmacie en ERASMUS – Università degli Studi di Parma
2015 - 2016	**Master 2 Sciences, Technologie, Santé**, parcours **Pharmacotechnie** - Université Paris Descartes Reçue 1/10 (17,2/20) – mention Très Bien
2014 - 2015	**DIU Centre d'Enseignement de la Statistique Appliquée à la Médecine**– Université Pierre et Marie-Curie, Paris
2014 - 2015	**DIU Pharmacotechnie Hospitalière** – Université Paris Descartes

Connaissances techniques et informatiques

Langues	Français (maternelle), anglais (courant), italien (courant)
Logiciels	Microsoft Office®, Orbis medical®, Phedra®, Copilote®, Chroméléon®, Clinipharm®, Clinicom®, Chimio®, Pharma®, DXCare®
Techniques analytiques	HPLC (chaines DIONEX ULTIMATE 3000, ICS-2000), spectroscopie UV, titrimétrie, spectroscopie d'absorption atomique de flamme/four, diffusion dynamique de la lumière (Nanosizer), culture cellulaire
	Travail sous hotte (classe A) et en zone d'atmosphère contrôlée (ISO-5)

Publications et travaux

Communications orales

Communications orales internationales

M. Renault-Mahieux, M. Paul, K. Andrieux. **"Development and stability of liposomes co-encapsulating fisetin and cisplatin"**. Nanomedicine, Rome, Italy, Jun. 2018

M. Renault-Mahieux, M. Paul, K. Andrieux. "**Freeze-drying protocol for liposomes co-encapsulating fisetin and cisplatin"**. International Conference on Pharmaceutical Chemistry, Paris, France, Jul. 2018.

Communications orales nationales

N. Maaziz, **M. Renault-Mahieux (orateur)**, M. Carvalho, M. Paul, V. Vieillard. **« Stabilité étendue de la doxorubicine à 6,67 mg/mL pour une amélioration des pratiques** ». SFPO, Avignon, Oct. 2019

Communications affichées

Communications affichées internationales

M. Renault-Mahieux, M. Paul, K. Andrieux. "**Coencapsulation of antitumor and antiangiogenic drugs in liposomes for glioblastoma therapy**". European Conference on Pharmaceutics, Krakow, Poland, Apr. 2017.

M. Renault-Mahieux, W. Akrout, I. Cohen, C. Cordonnier-Jourdin, A. Amiot, M. Paul. "**Vedolizumab for inflammatory bowel diseases: proper use and efficacy**". ESCP, Heidelberg, Germany, Oct. 2017.

M. Renault-Mahieux, D.T. Le, M. Paul, P. Espeau, K. Andrieux. "**Use of Differential Scanning Calorimetry for designing liposomes co-encapsulating two therapeutic agents**". SFNano, Montpelliers, France, Dec. 2018.

M. Renault-Mahieux, V. Vieillard, J. Séguin, P. Espeau, N. Mignet, M. Paul, K. Andrieux. "**In vitro evaluation of co-encapsulation of fisetin and cisplatin into liposomes**". 12th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, March 23-26, Vienna, Austria.

Communications affichées nationales

V. Hazard, M. Renault, S. Tarnagda, E. Iraola, S. Nicolas, A. Benachi, A. Decottignies, S. Barbault-Foucher. « **Guide de prescription de la sage-femme : intérêt d'une mise en place dans une maternité de niveau III** ». CSH, Marseille, Sept. 2013.

M. Renault, N. Thiriat, L. Tounsi, A. Dassy, D. Cottin, S. Poullain. « **Évaluation des pratiques professionnelles sur l'administration des formes orales solides dans un service de soins de suite et de réadaptation** ». Journées qualité du CHIC, Créteil, Nov 2014. Prix Poster.

M. Renault-Mahieux, G. Perrin, V, Vieillard, A. Astier, M. Paul. « **Développement et validation d'une méthode d'analyse chromatographique par exclusion stérique pour peptides : exemple du ziconotide** ». CSH, Avignon, Sept. 2016.

M. Renault-Mahieux, G. Boccadifuocco, P. Legrand, B. Lages, S. Dufay, V. Planas. « **Mise au point d'une méthode d'analyse chromatographique commune à la méthacholine, le béthanéchol et leurs substances apparentées** ». APHIF, Paris, Nov. 2016.

M. Renault-Mahieux, A. Sapin, S. Camps. « **Audit des modalités et de la pertinence des prescriptions de KCl injectable** ». CSH, Dijon, Sept. 2017.

M. Renault-Mahieux, A. Sapin, B. Le Menn, S. Camps. « **Mise en place d'une formation continue pour les préparateurs impliqués dans la préparation des cytotoxiques** ». SFPO, Nantes, Oct 2017.

M. Renault-Mahieux, A. Benbouzid, A. Sapin, D. Jalaguier, A. Kammoun, S. Camps. « **Pertinence de la conciliation médicamenteuse à l'admission dans deux services de soins** ». APHIF, Paris, Nov. 2017.

M. Renault-Mahieux, A. Ficar, M. Azegouar, V. Vieillard, S. Bonnot-Lours, B. Do, M. Paul. « **Les méthodes chromatographiques de la Pharmacopée Européenne sont-elles applicables à des études de stabilité ? Exemple de la carbidopa** ». APHIF, Paris, Nov. 2018.

M. Renault-Mahieux, C. Saldana, A. Lebel, C. Joly, C. Tournigand, M. Paul, M. Carvalho. « **Expérience monocentrique de l'association carboplatine–cabazitaxel en énième ligne pour le cancer de la prostate résistant à la castration métastatique** ». SFPO, Avignon, Oct. 2019

RESUME

L'émergence de la nanomédecine dans la lutte pour le cancer a conduit à la commercialisation de plusieurs formulations liposomales de molécules cytotoxiques dont l'association cytarabine/daunorubicine (Vyxeos®). L'association de plusieurs molécules agissant par des mécanismes différents est une stratégie couramment employée afin de lutter contre la chimiorésistance. L'utilisation des nanovecteurs pour co-encapsuler plusieurs substances actives pourrait permettre de délivrer l'association des chimiothérapies dans un rapport synergique au sein de la tumeur en s'affranchissant des différences de pharmacocinétique et de biodistribution de ces molécules.

Ce travail porte sur la co-encapsulation de deux molécules, la fisétine et le cisplatine, dans un seul nanovecteur dans l'objectif 1/ d'exercer une action synergique en combinant l'effet anti-angiogénique de la fisétine avec l'effet cytotoxique du cisplatine, 2/ de pouvoir administrer la fisétine, molécule fortement insoluble dans l'eau, et 3/ de réduire la toxicité du cisplatine en utilisant le ciblage passif du cisplatine vers les tumeurs fortement vascularisées grâce à l'effet EPR (*enhanced permeability and retention*). Le choix du nanovecteur s'est porté sur les liposomes du fait de leur capacité à pouvoir encapsuler des molécules hydrophiles dans leur cœur aqueux et lipophiles dans leur bicouche lipidique. La première partie de ce travail a consisté en la mise au point et la validation des méthodes de dosages nécessaires pour l'évaluation des liposomes préparés. La deuxième partie a porté sur l'optimisation du procédé de préparation et de la formulation des liposomes. Le procédé optimisé a consisté en la méthode d'hydratation de film suivie d'une extrusion au travers de membranes de polycarbonate de porosité 0,4 et 0,2 µm et d'une purification par dialyse suivie d'une filtration. Le challenge de la formulation portait sur l'optimisation du rapport molaire cholestérol/phospholipides afin de permettre l'incorporation de la fisétine dans la bicouche lipidique tout en retenant le cisplatine dans le cœur aqueux. Nos travaux ont montré que la solubilité de la fisétine dans la bicouche lipidique était de 3,2% w/w environ et qu'à partir de 29,6% molaire de cholestérol dans la formulation lipidique la fisétine n'était plus incorporée. La formulation optimisée comporte un rapport molaire DOPC/cholestérol/DSPE-PEG2000 de 75,3:20,8:3,9 et permet d'encapsuler la fisétine et le cisplatine avec un *drug loading* de 2,10 ± 0,33 et 0,85 ± 0,09 respectivement dans des liposomes faisant 166 ± 14 nm de diamètre (PDI = 0,13 ± 0,04). Un procédé de lyophilisation a été développé afin d'améliorer la stabilité de la préparation. La troisième partie du travail a porté sur l'évaluation de la formulation *in vitro* sur une lignée de cellules endothéliales et deux lignées tumorales de glioblastome et de cancer du poumon, et *in vivo* sur un modèle murin ectotopique de Lewis Lung carcinoma. Nous

avons montré pour la première fois à notre connaissance une activité de la fisétine sur les cellules de glioblastome U 87-MG, un effet synergique de la fisétine et du cisplatine co-encapsulés dans des liposomes ou en association sur les cellules de cancer du poumon 3LL, et une réduction de la toxicité *in vivo* du cisplatine grâce à la co-encapsulation. Ces résultats prometteurs démontrent l'intérêt de la co-encapsulation de molécules actives dans des liposomes pour une activité synergique anti-cancéreuse.

ABSTRACT

The emergence of nanomedicine in the fight against cancer has led to the commercialization of several liposomal formulations of cytotoxic drugs, including the combination cytarabine/daunorubicin (Vyxeos®). The combination of different drugs with different mechanisms of action is a commonly used strategy to prevent the emergence of resistance during chemotherapy. The use of nanocarriers to co-encapsulate several active substances could make it possible to deliver the association of chemotherapies in a synergistic ratio within the tumor by overcoming differences in pharmacokinetics and biodistribution of these drugs.

This work consisted in the coencapsulation of two drugs, fisetin and cisplatin, in one nanocarrier to aim to 1/ obtain a synergistic effect by combining the anti-angiogenic effect of fisetin with the cytotoxic effect of cisplatin, 2/ administrate fisetin, hihgly insoluble in water and 3/ decrease cisplatin toxicity by passive targeting to highly vascularized tumors using the EPR effect (enhanced permeability and retention). The choice of the nanocarrier fell on liposomes able to encapsulate hydrophilic molecules in their aqueous core and lipophilic ones in their lipid bilayer. The first part of this work presented the development and validation of the assay methods necessary for the evaluation of the prepared liposomes. The second part focused on optimizing the preparation process and the formulation of the liposomes. The optimized process consisted of the thin-film hydration method followed by extrusion through polycarbonate membranes with porosity of 0.4 and 0.2 µm and purification by dialysis followed by filtration. The challenge of the formulation development was the optimization of the cholesterol/phospholipid molar ratio in order to allow the incorporation of fisetin in the lipid bilayer while retaining cisplatin in the aqueous core. Our work has shown that the solubility of fisetin in the lipid bilayer was approximately 3.2% w/w and that above 29.6mol% of cholesterol in the lipid formulation fisetin was no longer incorporated. The optimized formulation was composed by DOPC/cholesterol/DSPE-PEG2000 at a molar ratio of 75.3/20.8/3.9 and encapsulated fisetin and cisplatin with a drug loading of 2.10 ± 0.33 and 0.85 ± 0.09 respectively in liposomes with a diameter of 166 ± 14 nm (PDI = 0.13 ± 0.04). A freeze-drying process was developed to stabilize as a function of time the formulation. The third part of the work focused on the evaluation of the *in vitro* formulation on an endothelial cell line and two tumor cell lines of glioblastoma and lung cancer, and *in vivo* on an ectotopic mouse model of Lewis Lung carcinoma. We have shown for the first time to our knowledge a cytotoxic activity of fisetin on glioblastoma U 87-MG cells, a synergistic effect of fisetin and cisplatin co-encapsulated into liposomes or in association on lung cancer cells 3LL, and a reduction in the *in vivo* toxicity of cisplatin through co-encapsulation with fisetin.

Those promising results evidenced the interest of co-encapsulation of active molecules into liposomes for synergistic anti-cancer activity.

TABLE DES MATIERES

Listes des figures 1

Liste des tableaux 5

Abbréviations 9

Introduction generale 15

Partie bibliographique 19

Tumeurs vascularisées : exemple du glioblastome et du cancer bronchique 21

1. Le glioblastome 21

1.1. Epidémiologie 21

1.2. Description clinique 21

1.3. Physiopathologie 21

1.4. Prise en charge et traitement 24

1.4.1. Traitement symptomatique 24

1.4.2. Traitement de première ligne 24

1.4.3. Traitement du glioblastome en rechute 25

1.5. Approche anti-angiogénique 26

1.5.1. Mécanismes de l'angiogenèse dans le GBM 27

1.5.2. Thérapies anti-angiogéniques 32

2. Le cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) 34

2.1. Epidémiologie 34

2.2. Description clinique 34

2.3. Physiopathologie 34

2.4. Prise en charge et traitement 35

2.5. Approche anti-angiogénique 35

Approche combinée 37

1. Les liposomes 37

2. La fisétine 40
2.1. Propriétés anti-angiogéniques de la fisétine 41
2.2. La fisétine, un défi galénique 41
3. Le cisplatine 44
Co-encapsulation of flavonoids with anti-cancer drugs: a challenge ahead 49
Partie expérimentale 51
Validation des méthodes analytiques permettant la caractérisation des liposomes 53
1. Introduction 53
2. Matériels et méthodes 53
2.1. Réactifs 53
2.2. Préparation des liposomes 54
2.3. Dosage de la fisétine 54
2.3.1. Conditions chromatographiques 54
2.3.2. Préparation des standards et contrôles qualité pour le dosage de la fisétine liposomale dans le tampon HEPES 55
2.3.3. Préparation des standards et contrôles qualité pour le dosage de la fisétine liposomale dans le milieu de culture 55
2.3.4. Validation de la méthode 55
2.4. Dosage du cisplatine 56
2.4.1. Conditions spectroscopiques 56
2.4.2. Choix de la gamme 56
2.4.3. Validation de la méthode 56
2.5. Dosage des phospholipides 56
2.5.1. Analyses spectrales en RMN 56
2.5.2. Spectre des composés et choix des pics d'intérêts 57
2.5.3. Sensibilité de la méthode 58
3. Résultats et discussion 58
3.1. Dosage de la fisétine 58

3.1.1. Dosage de la fisétine liposomale en tampon aqueux 59
3.1.2. Dosage de la fisétine liposomale en DMEM-C 59
3.1.2.1. Sans étalon interne 60
3.1.2.2. Avec étalon interne 60
3.2. Dosage du cisplatine 61
3.2.1. Choix de la gamme 61
3.2.2. Validation de la méthode 63
3.3. Dosage des phospholipides 63
3.3.1. Choix des pics d'intérêt 63
3.3.2. Sensibilité de la méthode 66
4. Conclusion 67
5. Bibliographie 68
Etude préliminaire : optimisation du procédé de préparation des liposomes 69
1. Introduction 69
2. Matériels et méthodes 70
2.1. Réactifs 70
2.2. Préparation des liposomes 70
2.3. Détermination de la taille et de la polydispersité des liposomes 71
2.4. Hydratation du film lipidique 71
2.5. Calibration de la taille des liposomes 71
2.5.1. Calibration de la taille par extrusion 71
2.5.2. Calibration de la taille par microfluidiseur 71
2.6. Influence de la formulation lipidique sur la taille et la stabilité des liposomes vides ... 72
3. Résultats et discussion 72
3.1. Optimisation du procédé de préparation des liposomes 72
3.1.1. Influence de la méthode d'hydratation 73
3.1.2. Influence de la méthode de calibration de tailles 74

3.2. Influence du rapport lipidique sur la taille et la polydispersité de formulations liposomales vides 76
4. Conclusion 79
5. Bibliographie 79
Co-encapsulation of fisetin and cisplatin for glioma therapy: from formulation to cell evaluation. 81
1. Introduction 83
2. Materials and methods 85
2.1. Reagents 85
2.2. Preparation of liposomes 85
2.3. Purification of liposomes 86
2.4. Formulation tested 86
2.5. Characterization of liposomes 86
2.5.1. Determination of size and morphology 86
2.5.1.1. Dynamic light scattering (DLS) 86
2.5.1.2. Transmission electronic microscopy (TEM) 86
2.5.2. Fisetin quantification 87
2.5.3. Cisplatin quantification 87
2.5.4. Determination of encapsulation efficiency (EE) and drug loading (DL) 87
2.5.5. Differential scanning calorimetry 88
2.6. Stability studies 88
2.7. Formulation optimisation of fisetin-loaded liposomes 88
2.7.1. Impact of the fisetin ratio 88
2.7.2. Impact of the cholesterol ratio 88
2.7.3. Impact of the saturation of the phospholipids 89
2.8. Formulation optimisation of cisplatin-loaded liposomes 89
2.9. Formulation optimisation of liposomes encapsulating both cisplatin and fisetin 89
2.10. In vitro release 89
2.11. Colloidal stability in culture medium 89

2.12. Cell culture 90
2.13. Morphological effect of fisetin on EA.hy926 endothelial cells 90
2.14. Cytotoxicity assay on EA.hy926 and U 87-MG 90
2.15. Statistics 91
3. Results and discussion 91
3.1. Study of the influence of fisetin incorporation into the lipid bilayer 91
3.2. Impact of the cholesterol ratio on fisetin-loaded and cisplatin-loaded liposomes 94
3.3. Impact of the saturation of the phospholipid 96
3.4. Impact of the co-encapsulation on the encapsulation of each drug 96
3.5. Stability over time of the liposomes 97
3.6. Release study of the co-loaded formulation 4 in PBS 99
3.7. Colloidal stability and release study in culture medium of F4 100
3.8. Effects of fisetin on endothelial cells EA.hy 926 101
3.9. *In vitro* cytotoxicity assay on glioblastoma cells U 87-MG 104
4. Conclusion 108
5. References 108
Supplementary content to article 1 109
1. Materials and methods 109
1.1. Study of the interaction of DOPC with DODA-Gly-PEG2000 DSC 109
1.2. Influence of the cisplatin concentration of the hydration solution. 109
1.3. Influence of the purification process 109
1.3.1. Evaluation of fisetin leakage without a purification step 109
1.3.2. Investigation on a new purification process 110
2. Results and discussion 110
2.1. Influence of the cisplatin concentration of the hydration solution 111
2.2. Influence of the purification process 112
2.2.1. Evaluation of fisetin leakage without a purification step 112
2.2.2. Investigation on a new purification process 114

2.2.2.1. Fisetin-loaded liposomes 114
2.2.2.2. Cisplatin-loaded liposomes 115
3. Additional references 117
Co-encapsulation of fisetin and cisplatin into liposomes: stability considerations and in vivo efficacy on lung cancer animal model 119
1. Introduction 121
2. Materials and methods 122
2.1. Reagents 122
2.2. Preparation of liposomes 122
2.3. Formulation tested 123
2.4. Characterization of liposomes 123
2.4.1. Determination of size and morphology 123
2.4.1.1. Dynamic light scattering (DLS) 123
2.4.1.2. Transmission electronic microscopy (TEM) 123
2.4.2. Fisetin quantification 123
2.4.3. Cisplatin quantification 124
2.4.4. Determination of encapsulation efficiency (EE) and drug loading (DL) 124
2.4.5. Lipid quantification 124
2.5. Stability studies 125
2.6. Impact of the purification method 125
2.7. Optimization of a freeze-drying process to improve the stability of the liposomes 125
2.7.1. Freeze-drying process 125
2.7.2. Choice of the lyopotectant and its concentration 126
2.7.3. Choice of the filling volume 126
2.7.4. Impact of the process of freeze-drying on co-loaded liposomes 126
2.8. *In vitro* cytotoxicity on 3LL cell line 126
2.9. *In vivo* anti-tumour evaluation in mice 127
2.10. Statistics 128

3. Results and discussion 128
3.1. Impact of the purification method 128
3.2. Stability of the liposomes in suspensions 131
3.3. Freeze-drying of the liposomes 131
3.3.1. Choice of the lyoprotectant and lyoprotectant-to-lipid ratio 132
3.3.2. Determination of the filling volume 134
3.3.3. Freeze-drying of the co-encapsulating liposomes 136
3.4. *In vitro* cytotoxicity assay on LL/2 cell line 138
3.5. Anti-tumour activity on mice 140
4. Conclusion 143
5. References 144
Discussion générale, conclusion et perspectives 145
Références 159
Annexe 185
Co-encapsulation of flavonoids with anti-cancer drugs: a challenge ahead 185
1. Introduction 185
1.1. Anti-cancer properties of flavonoids 185
1.2. Flavonoids: a need for vectorization 186
1.3. Co-encapsulation of flavonoids with anti-cancer agents 188
2. Formulation considerations 189
2.1. Choice of nanocarrier 189
2.2. Optimization of the formulation and the process of preparation 196
2.3. Stability of the co-encapsulating nanocarriers 200
3. *In vitro* prediction of the behavior of the co-encapsulating nanocarrier 201
3.1. Colloidal stability 201
3.2. *In vitro* release 201
3.3. Combination Index 205
4. *In vivo* efficacy 207

4.1. Breast cancer models 207
4.2. Lung cancer models 208
4.3. Other cancer models 208
5. Concluding remarks 208
6. References 209

LISTES DES FIGURES

Figure 1. Altérations génétiques et moléculaires dans le glioblastome primaire (A) et secondaire (B) en développement, par A. M. Popescu et al (Popescu et al., 2016). 23
Figure 2. Prise en charge du glioblastome selon le protocole EORTC/NCIC, par Stupp et al (Stupp et al., 2007). Le témozolomide (TMZ) est administré chaque jour à la posologie de 75 mg/m² une heure avant la radiothérapie (RT) pendant 40 à 49 jours. Le TMZ est ensuite administré 5 jours toutes les 4 semaines à la posologie de 200 mg/m² (150 mg/m² au cycle 1). Une prophylaxie contre la Pneumocystose (PcP) est recommandée lors de l'administration concomitante de TMZ et de RT, ou si le taux de lymphocytes diminue sous le seuil de 500/mm^3. 25
Figure 3. Les différentes approches pour le traitement du GBM en rechute, adapté de Bianco et al (Bianco et al., 2017). Les approches actuellement utilisées en clinique sont représentées en bleu. .. 26
Figure 4. Mécanismes de formation des vaisseaux au sein du GBM, par Jain et al (Jain et al., 2007). 28
Figure 5. Les médiateurs de l'angiogenèse dans les gliomes. 31
Figure 6. Mécanismes de la thérapie anti-angiogéniques, par Jain et al (Jain et al., 2007). 33
Figure 7. Schéma d'un liposome PEGylé. Les substances actives (SA) peuvent être encapsulés dans le cœur aqueux ou dans la bicouche lipidique. 38
Figure 8. Structure de la fisétine. 40
Figure 9. Structure du cisplatine. 45
Figure 10. Spectre RMN ^{1}H du mélange d'une suspension liposomale avec l'EI TMSP. 57
Figure 11. Chromatogrammes de la phase mobile (noir), la fisétine (orange), la fisétine + la morine (rouge) et de la morine (bleu). La fisétine est éluée à 8,50 ± 0,02 min et la morine à 8,80 min ± 0,03. 59
Figure 12. Spectres ^{1}H RMN de la DOPC (A), cholestérol (B), DSPE-PEG2000 (C) et de la fisétine (D). 65
Figure 13. Taux de recouvrement des concentrations mesurées de DOPC mesurées par ^{1}H RMN en fonction des déplacements considérés. Les lignes en pointillés représentent les seuils d'acceptation fixés à ± 10%. 66
Figure 14. Taux de recouvrement des concentrations de lipides totaux mesurées par ^{1}H RMN en fonction des déplacements considérés. Les lignes en pointillés représentent les seuils d'acceptation fixés à ± 10%. 67
Figure 15. Influence de la pression appliquée et du nombre de passages sur le diamètre (barre rouge) et la polydiseprsité (PDI) (points) des suspensions liposomales. 75
Figure 16. Procédé optimisé de préparation de liposomes par la méthode d'hydratation de film..... 76

Figure 17. Aspect d'un film lipidique contenant un fort pourcentage molaire de DODA-Gly-PEG2000. 77
Figure 18. Stabilité du diamètre hydrodynamique (A) et de la polydispersité (B) sur 30 jours de 6 formulations de liposomes vides (n = 3). Pour chaque formulation et chaque temps, la taille et le PDI ont été comparé aux valeurs de J0 à l'aide d'un test de Wilcoxon : aucune variation n'a été retrouvée significative. 78
Figure 19. Influence of fisetin insertion into lipid bilayer. A: Representative DSC thermograms of the melting of DOPC contained in the lipid bilayer of liposomes with increasing proportion of cholesterol (from 0 to 13wt%) at fisetin 3.2wt% (n = 2); cholesterol proportions of 20 and 30% led to an undectable main transition and thus data are not shown. B: Representative DSC thermograms of the melting of DOPC contained in the lipid bilayer of liposomes with increasing amount of fisetin at cholesterol 10wt% (n = 3). C: Encapsulation efficiency and drug loading of fisetin-loaded liposomes with increasing amount of fisetin incorporated into the formulation (n = 2). 93
Figure 20. Stability of the liposomal formulations. A: stability of size, PDI and drug leakage of the different liposomal formulations over 10 days. B: TEM of the liposomal formulations co-encapsulating cisplatin and fisetin three days after the preparation (1: formulation 3 and 2: formulation 4). 98
Figure 21. Stability of fisetin-loaded liposomes F4 with initial 1, 2, 3.2 or 4.5wt% fisetin (n = 2). Liposomes were purified using filtration to remove non-encapsulated and precipitated fisetin at each sampling time. 99
Figure 22. In vitro release of cisplatin and fisetin by formulation 4 co-encapsulating cisplatin and fisetin in PBS. Liposomal cisplatin (circle), free cisplatin (square) and liposomal fisetin (triangle) (n = 6).... 100
Figure 23. Stability of the formulation 4 co-encapsulating cisplatin and fisetin in complete culture medium (n = 3). A: stablity of size and PDI. B: In vitro release of cisplatin and fisetin by formulation 4 co-encapsulating cisplatin and fisetin in DMEM-C: liposomal cisplatin (circle) and liposomal fisetin (triangle). 101
Figure 24. Effect of free fisetin and liposomal fisetin on endothelial Ea.hy926 cell line. A: modification of EA.hy926 cells' morphology (magnification x125). B: form factor of empty liposomes (diamond), free fisetin (circle) and fisetin-loaded formulation 4 (triangle). 103
Figure 25. Comparison of the cytotoxicity of empty liposomes (star), free fisetin (circle), free cisplatin (diamond), fisetin-loaded liposomes (square), cisplatin-loaded liposomes (triangle), mixture of fisetin-loaded liposomes and cisplatin-loaded liposomes (cross in cirle) and liposomes co-encapsulating fisetin and cisplatin (hexagone) after 24 hours (A) or 48 hours (B) of exposure (n = 5). 106
Figure 26. Thermograms, in heating mode, of DOPC bilayers with increasing ratio of DODA-Gly-PEG2000 (from 0 to 4.7mol%) and of DODA-Gly-PEG2000 micelles 111

Figure 27. Comparison of liposomes hydrated using a 1 mg/mL (grey) or 2 mg/mL (black) solution of cisplatin, in term of size (A), PDI (B), encapsulation efficiency (C) and drug-loading (D). 112
Figure 28. Emission spectrum of fisetin in lipid bilayer (yellow line), fisetin in water (orange line), a mixture of fisetin in lipid bilayer and fisetin in water (blue line), fisetin-loaded liposomes (green line) and hepes buffer (black line) from 370 to 700 nm with an excitation wavelength of 370 nm. Fisetin in water maximum emission wavelength is 486 nm and fisetin in lipid bilayer maximum emission wavelength is 538 nm..... 113
Figure 29. Ratio between the signal at 486 nm and the signal at 538 nm as a function of storage time and initial amount of fisetin in formulations. 114
Figure 30. Comparison of the F3 fisetin-loaded liposomes stability as a function of the purification and repurification process (black: sephadex purification; white: filtration purification). (n = 2)..... 115
Figure 31. Comparison of the different cisplatin-loaded liposomes stability as a function of the purification and repurification process (black: sephadex purification (n = 2); white: dialysis purification (n = 1)). 117
Figure 32. Impact of the purification process on the stability of the co-loaded liposomes (n = 3): on the leakage of the drugs (A), average diameter (B) and the polydispersity (C) of the liposomes. 130
Figure 33. Stability over 30 days of the fisetin-loaded, cisplatin-loaded and co-loaded liposomes (n = 3). 131
Figure 34. Influence of the filling volume on the aspect of the cake. A: 0.5 mL, B: 2 mL, C: 4 mL. 136
Figure 35. Influence of the freeze-drying process on the stability of co-loaded liposomes. A: Comparison of the size, PDI and encapsulation stability between liposomes undergoing the process of freeze-drying after the first purification step (white) and liposomes undergoing the process of a second purification immediatly after the first purification step (black); grey represents co-loaded liposomes F4 characterized after the first purification step. B: TEM of co-loaded liposomes before (1) and after (2) undergoing the freeze-drying process. 137
Figure 36. Tumor growth inhibition of free cisplatin, cisplatin-loaded liposomes, mixture of fisetin-loaded and cisplatin-loaded liposomes and liposmes co-encapsuting fisetin and cisplatin in 3LL Lewis Lung carcinoma murine model. Black arrows show the days of i.p. administration. 141
Figure 37. Percent of weight loss of C54BL/6JRJ mice induced by the cisplatin and fisetin treatment. Weight was estimated every two days and expressed as a percentage of weight at day 5 of the experimentation. Black arrows show the days of i.p. administration. 141
Figure 38. Kaplan-Meier survival curves of 3LL cancer bearing C54BL/6JRJ mice treated by free cisplatin, cisplatin-loaded liposomes, mixture of fisetin-loaded and cisplatin-loaded liposomes and liposmes co-encapsuting fisetin and cisplatin. 143
Figure 39. Structure du DODA-Gly-PEG2000 (A) et du DSPE-PEG2000 (B) 148

Figure 40. Libération in vitro de la fisétine des liposomes F4 dans le PBS pH 7.4 153
Figure 41. Dégradation de la fisétine libre ou liposomale en milieu aqueux supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal. 154
Figure 42. Chemical structure of flavonoid and their classes. 186
Figure 43. Total publications per year concerning flavonoids nanocarriers (web of science). 188

LISTE DES TABLEAUX

Table 1. Les principaux acteurs de l'angiogenèse dans les gliomes, adapté de Nakada et al (Nakada et al., 2011). 30
Table 2. Exemple d'applications de liposomes dans le traitement de plusieurs maladies du système nerveux central, par Garcia-Garcia et al (Garcia-Garcia et al., 2005). 39
Table 3. Formulations liposomales encapsulants des molécules cytotoxiques en essai clinique (clinicaltrials.gov) pour le traitement du cancer du poumon. 40
Table 4. Propriétés physico-chimiques de la fisétine (drugbank.ca ; Merck Index). 42
Table 5. Différentes stratégies de nano-vectorisation de la fisétine. 43
Table 6. Composition des liposomes de fisétine d'après la formulation de Seguin et al (Mignet et al., 2012; Seguin et al., 2013). 44
Table 7. Propriétés physico-chimiques du cisplatine (drugbank.ca ; Merck Index). 45
Table 8. Compositions lipidiques de liposomes de cisplatine développés par différentes équipes, classés par leur méthode de préparation. PDI : Indice de polydispersité. 48
Table 9. Précision et exactitude de la méthode de dosage de la fisétine liposomale en tampon aqueux par CLHP-PI. 59
Table 10. Précision et exactitude de la méthode de dosage de la fisétine liposomale en DMEM-C par CLHP-PI sans utilisation d'étalon interne. 60
Table 11. Précision et exactitude de la méthode de dosage de la fisétine liposomale en DMEM-C par CLHP-PI avec utilisation d'étalon interne. 61
Table 12. Taux de recouvrement (TR) des différents points de gamme du cisplatine et du platine dans différentes matrices par rapport à la gamme de cisplatine dans la matrice complète (constituée de liposomes vides dans un tampon HEPES 20 mM pH = 7,4). Chaque gamme a été préparée deux fois et pour chacune les points ont été dosés en triplicate. 62
Table 13. Répétabilité des points de gamme de deux gammes de dosage du cisplatine. 62
Table 14. Précision et exactitude de la méthode de dosage du cisplatine par spectroscopie d'absorption atomique four 63
Table 15. Pics ^{1}H RMN caractéristiques des lipides sélectionnés pour leur quantification. 64
Table 16. Composition lipidique des différentes formulations testées, exprimée en pourcentage molaire. 72
Table 17. Effets du type et de la durée d'hydratation sur la taille et la polydispersité (PDI) des liposomes vides. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne ± écart-type. 73

Table 18. Comparaison de l'hydratation avec agitation par évaporateur rotatif ou par vortex. PDI = indice de polydispersité. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne ± écart-type. 74
Table 19. Influence de la taille de la membrane d'extrusion et du nombre de passages à travers ces membranes sur la taille et la polydispersité (PDI) des suspensions liposomales. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne ± écart-type. 75
Table 20. Influence de la composition lipidique sur la taille et la polydispersité (PDI) des liposomes (n = 3). Les résultats sont présentés sous la forme moyenne ± écart-type. 77
Table 21. Lipid formulations of the liposomes assayed (molar ratio) 91
Table 22. Size, PDI and drug encapsulation of fisetin-loaded, cisplatin-loaded and fisetin and cisplatin-co-loaded liposomes. 95
Table 23. IC50 values (µM) as function of fisetin on EA.hy926 cell line (n = 4). *: p<0.05 versus free drug. 104
Table 24. IC50 values (µM) as function of cisplatin and fisetin on U-87 MG cell line (n = 5). *: p<0.05 versus free drug. $: p<0.05 versus liposomal drug encapsulated alone. 107
Table 25. Enthalpie and onset temperature of thermic events evidenced on the thermograms of DOPC bilayers with increasing ratio of DODA Gly PEG2000 (from 0 to 4.7mol%) and of DODA Gly PEG2000 micelles. 111
Table 26. Size, PDI and encapsulation of the fisetin-loaded liposomes purified by filtration. 114
Table 27. Size, PDI and encapsulation of the cisplatin-loaded liposomes purified by dialysis. 116
Table 28. Impact of the purification process on the size, PDI and encapsulation of fisetin and cisplatin in co-loaded liposomes (n = 4). *p < 0.05 in comparison to size-exclusion chromatography. 129
Table 29. Impact of lyoprotectant and lyoprotectant-to-lipids ratio on freeze-drying of empty liposomes. 133
Table 30. Effect of the additive mannitol on the aspect of the freeze-dried cake and the preservation of size and PDI of empty liposomes (n = 1). 134
Table 31. Effect of the filling volume on the aspect of the freeze-dried cake and the preservation of size and PDI of empty liposomes (n = 1). 135
Table 32. IC50 values (µM) as function of cisplatin and fisetin on 3LL cell line (n = 4). Combination index were calculated using the Chou Talalay equation. *: p<0.05 versus free drug 139
Table 33. Antitumoral effect of free cisplatin, cisplatin-loaded liposomes, mixture of fisetin-loaded and cisplatin-loaded liposomes and liposomes co-encapsuting fisetin and cisplatin. $ could not be calculated because of the toxicity leading to mice sacrifice. 142
Table 34. Stabilité de taille, de PDI et de l'encapsulation des substances actives lors de la conservation des nanovecteurs co-encapsulant un flavonoïde et une molécule anti-cancéreurse. 151

Table 35. Log P of the different flavonoids reviewed in this article. BAI = baicalin, QUE = querccetin, BCL = baicalein, SIL = silibinin, SLB = silybin, RUT = rutine, GEN = genistein, NG = naringenin. 187
Table 36. Types, formulation, preparation method and targets of nanocarriers co-encapsulating a flavonoid with an anti-cancer agent. 191
Table 37. Characteristics and characterization methods of nanocarriers co-encapsulating a flavonoid with an anti-cancer agent..... 194
Table 38. Storage stability of nanocarriers co-encapsulating a flavonoid with another anti-cancer agent. 200
Table 39. In vitro release profile of the nanocarriers co-encapsulating flavonoids with another anti-cancer agent..... 202
Table 40. Combination index (CI) of the flavonoids and the other anti-cancer drugs evaluated for free drugs or encapsulated drugs. 206

ABBREVIATIONS

^{1}H NMR	*Proton nuclear magnetic resonance*
AAS	*Atomic absorption spectroscopy*
ACN	Acétonitrile
Akt	Protéine kinase B = PKB
AMM	Autorisation de mise sur le marché
Ang-1 et Ang-2	Angiopoiétines 1 et 2
ASP	*Aspirine*
BAI	*Baicalin*
BCL	*Baicalein*
BHE	Barrière hémato-encéphalique
CBNPC	Cancer bronchique non à petites cellules
CD	Cyclodextrine
CD_3OD	Méthanol deutéré
CED	*Convection enhanced delivery*
CI	*Combination index*
CI	*Combination Index*
CLHP	Chromatographie liquide haute performance
CUR	*Curcumin*
CV	Coefficient de variation
CXCL12 = SDF1	Facteur de croissance dérivé des cellules stromales - *stromal cell-derived factor 1*
DL	Charge en substance active – *drug loading*
DLS	Diffusion dynamique de la lumière - *Dynamic light scattering*
DMEM	*Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DMEM-C	*Dulbecco's Modified Eagle Medium* + 10% serum de veau foetal + 100 µg/mL streptomycine + 100 UI/mL 9enicillin
DODA-Gly-PEG2000	(2-dioctadecylcarbamoylmethoxyacetylamino) acetic acid-(ω-methoxy)-polyethyene glycol 2000 ester
DOPC	Dioleyl-phosphatidylcholine (18 :1 (Δ9-Cis) PC)
DOX	*Doxorubicin base*
DOX-HCL	*Doxorubicin hydrochloride*
DPPG	*1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)*

DSC	*Differential scanning calorimetry*
DSPC	1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (18:0 PC)
DSPE-PEG2000	1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-2000] (18:0 PEG2000 PE)
DTX	*Docetaxel*
EE	Efficacité d'encapsulation - e*ncapsulation efficiency*
EGCG	(-)-Epigallocatechin gallate
EGF	Facteur de croissance épidermique – *epidermal growth factor*
EGFR	Récepteur du facteur de croissance épidermique – *epidermal growth factor receptor*
EI	Etalon interne
EMA	*European Medicines Agency*
EMEM	*Eagle's minimum essential medium*
eNOS	*Endothelial nitric oxide synthase*
EPR	*Enhanced permeability and retention*
ERK	*Extracellular signal-regulated kinase*
ETO	Etoposide
FAK	*Focal adhesion kinase*
FBS	*Fœtal bovine serum*
FDA	*Food and drug administration*
FGF	Facteur de croissance des fibroblastes – *fibroblast growth factor*
FGFR	Récepteurs aux facteurs de croissance des fibroblastes – *fibroblast growth factor receptor*
FLA	*Flavonoids*
FTIR	*Fourier Transform InfraRed spectroscopy*
GBM	Glioblastome – *glioblastoma*
GCA	*Glycyrrhizic acid*
GEN	*Genistein*
GHS	*Gluthatione*
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HIF-1	Facteur induit par l'hypoxie – *hypoxia inducible factor*
HPLC	*High performance liquid chromatography*
IC50	*Concentration required to kill 50% of cells*
ICH	*International Conference on Harmonisation*

IDH	Isocitrate deshydrogénase
Il-6 et Il-8	Interleukine 6 ou 8
iNOS	*Inducible nitric oxide synthase*
IR	Infrarouge
ITK	Inhibiteur de tyrosine kinase
MAPK	*Mitogen-activated protein kinases*
MDM2	*Mouse double minute 2*
MEC	Matrice extracellulaire
MGMT	O^6-méthylguanine-DNA-méthyltransferase
MMP	Métalloprotéase
mTOR	Cible de la rapamycine chez les mammifères – *mammalian target of rapamycin*
MTT	(1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenyltetrazolium
NF-κB	*Nuclear factor-kappa B*
NG	*Naringenin*
NSCLC	*Non small cells lung cancer*
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PBS	*Phosphate buffer saline*
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes – *platelet-derived growth factor*
PDGFR	Récepteur aux facteurs de croissance dérivés des plaquettes – *platelet-derived growth factor receptor*
PDI	Indice de polydispersité – *polydispersity index*
PEG	Polyéthylène-glycol
PI	Phase inverse
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate
PLGA	*Poly(lactic-co-glycolic acid)*
PMX	*Pemetrexed*
PTEN	*Phosphatase and TENsin homologue*
PTX	*Paclitaxel*
QUE	*Quercetin*
RB	Rétinoblastome
RMN	Résonance magnétique nucléaire
Rpm	Rotation par minutes – *rotation per minute*
RUT	*Rutine*

SA	Substance active
SAA	Spectroscopie d'absorption atomique
SDF1 = CXCL12	Facteur de croissance dérivé des cellules stromales – *stromal cell-derived factor 1*
SEM	*Scanning electron microscopy*
SG	Survie globale
SGF	*Simulated gastric fluid*
SIF	*Simulated intestinal fluid*
SIL	*Silibinin*
SLB	*Silybin*
SNC	Systèmes nerveux central
SSP	Survie sans progression
STAT	S*ignal transducer and activator of transcription*
T - C	*Tumor growth delay*
T/C	*Tumor growth inhibition value*
TEK = TIE2	*Tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains*
TEM	*Transmission electronic microscopic*
TEM	*Transmission electron microscopy*
TERT	*Telomerase reverse transcriptase*
TGA	*Thermogravimetric analysis*
TGF-β	Facteur de croissance transformant β – *transforming growth factor β*
TIE2 = TEK	*Tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains*
TMSP	Acide 3-(trimethylsilyl)propionique-2,2,3,3-d4
TMX	Tamoxifen
TMZ	Témozolomide
TNF-α	Facteur de nécrose tumorale α – *tumor necrosis factor α*
Tp53	*Tumor protein 53*
TPT	*Topotecan*
TR	Taux de recouvrement
uPA	*Urokinase-type plasminogen activator*
UV	Ultraviolet
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire – *vascular endothelial growth factor*
VEGFR	Récepteur au facteur de croissance de l'endothélium vasculaire - *vascular endothelial growth factor receptor*

VIN	*Vincristine*
WHO	*World Health Organization*

INTRODUCTION GENERALE

Le glioblastome (GBM) est la tumeur cérébrale la plus fréquente chez l'adulte. Très agressive, le pronostic est sombre surtout si le traitement de première ligne, l'exérèse la plus large possible, ne peut être effectué. La chirurgie accompagnée d'une radiochimiothérapie a permis un bénéfice modeste mais clairement démontré. Les rechutes sont cependant systématiques et leur prise en charge reste actuellement peu efficace. Toutefois la forte angiogénèse de cette tumeur est apparue comme une piste prometteuse pour le développement d'une thérapie anti-angiogénique.

Un autre cancer fortement vascularisé est le cancer du poumon. C'est le cancer le plus fréquent au monde et également la principale cause de mortalité par cancer. Si les stratégies thérapeutiques sont standardisées, avec des traitements de première et seconde lignes bien définies (radiothérapie, chimiothérapie, immunothérapie, thérapie ciblée), il reste un cancer avec une survie relative à 5 ans faible, de l'ordre de 20%. C'est une tumeur fortement vascularisée et la densité des microvaisseaux formés par angiogenèse a été reliée au développement des métastases et à un mauvais pronostic

Une des stratégies pour traiter les cancers vascularisés est l'association d'un agent anticancéreux à une molécule anti-angiogénique de type flavonoïde. En vue de cet objectif, l'utilisation de nanovecteurs permet de co-encapsuler deux substances actives (SA) afin de les transporter à la tumeur pour un effet synergique.

Dans ce projet, nous proposons de co-encapsuler un agent cytotoxique hydrophile, le cisplatine avec un agent anti-angiogénique hydrophobe, la fisétine dans un nanovecteur capable de véhiculer ces SA aux cellules cancéreuses.

Les quatre objectifs principaux de ce travail de thèse sont :

1. Le développement analytique en l'absence de méthodes validées, notamment pour la fisétine liposomale,
2. La recherche de la formulation la plus adéquate pour la co-encapsulation de deux molécules aux propriétés physico-chimiques différentes,
3. L'obtention d'une préparation stable dans le temps,
4. L'évaluation *in vitro* et *in vivo* de l'efficacité de ces formulations.

La partie bibliographique se découpe en 3 parties.

La première partie présente le glioblastome, ses traitements et le potentiel d'une action anti-angiogènique. Elle accompagnée d'un plus bref chapitre sur le cancer du poumon montrant notamment le potentiel d'une approche anti-angiogénique.

La deuxième partie décrit les deux SA sélectionnées, la fisétine et le cisplatine, leurs activités sur le GBM et le cancer du poumon ainsi que leur encapsulation dans des nanovecteurs.

La troisième partie de la bibliographie correspond à une revue en cours d'élaboration sur la co-encapsulation des flavonoïdes avec des agents anticancéreux. Elle porte sur le défi de la formulation et de la préparation de nanovecteurs co-encapsulants deux SA pour le traitement des cancers et est accessible en annexe de la thèse.

La partie expérimentale comporte 4 chapitres et rassemble des articles à soumettre mais aussi des résultats préliminaires et supplémentaires à ces articles.

Le premier chapitre expose le développement des méthodes analytiques de dosage des SA (fisétine et cisplatine) et des lipides nécessaires aux études suivantes. Il expose également leur validation statistique.

Le deuxième chapitre propose une étude d'optimisation du procédé de préparation permettant d'obtenir des liposomes blancs et encapsulant la fisétine avec une taille et un indice de polydispersité compatible avec une utilisation à visée antitumorale. L'influence de la durée et vitesse de l'hydratation du film est évaluée, et deux méthodes de calibration de tailles sont étudiées. Le procédé de préparation optimisée permet ensuite d'évaluer l'influence de la composition lipidique sur la taille et la polydispersité des liposomes vides.

Le troisième chapitre présente un article en cours de finalisation en vue d'une soumission prochaine. Il expose l'étude de la solubilité de la fisétine dans la bicouche lipidique ainsi que l'influence de la proportion de cholestérol sur l'encapsulation de la fisétine et du cisplatine dans les liposomes. L'effet anti-angiogènique de la fisétine sur les cellules endothéliales ainsi que les effets cytotoxiques de la fisétine et du cisplatine sur le glioblastome sont évalués *in vitro.*

Le quatrième chapitre est constitué d'un article en cours d'élaboration. Il expose l'optimisation de la méthode de purification des liposomes co-encapsulant la fisétine et le cisplatine ainsi que la mise au point d'un procédé de lyophilisation pour stabiliser la préparation. L'effet de la formulation est étudié *in vitro* sur des cellules murines de cancer du poumon. Enfin, une première évaluation *in vivo* sur un

modèle ectopique murin de carcinome du poumon de Lewis de la toxicité et de l'efficacité de la formulation est présentée.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Tumeurs vascularisées : exemple du glioblastome et du cancer bronchique

1. Le glioblastome

1.1. Epidémiologie

Le glioblastome (GBM) est une tumeur cérébrale astrocytaire agressive (grade IV selon la classification OMS (Louis et al., 2016)) d'une incidence de 3,2 pour 100 000 en Europe et augmentant avec l'âge de 74 à 84 ans. Sa prévalence aux Etats-Unis est de 9,23 pour 100 000. L'âge médian du diagnostic est de 65 ans. Non traité, le GBM est associé à une survie globale (SG) médiane de 6 mois et de 12 mois après traitement avec une survie relative de 8,8% à 3 ans et de 5,6% à 5 ans (Ostrom et al., 2018).

1.2. Description clinique

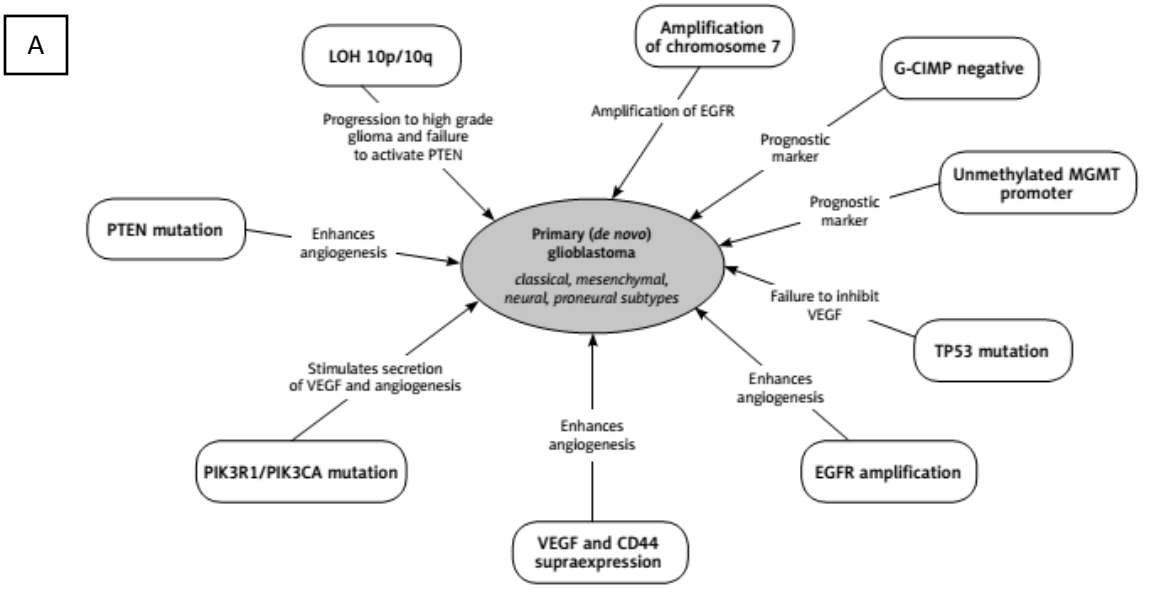
L'évolution est souvent rapide, en deux ou trois mois. Les symptômes dépendent de trois mécanismes. Une crise d'épilepsie est le symptôme révélateur de la maladie dans 20 à 40% des cas (Omuro and DeAngelis, 2013). La nécrose du tissu cérébral peut conduire à un déficit neurologique focal tel que hémiparésie, perte d'audition ou d'acuité visuelle, changement de personnalité et difficultés cognitives, révélateur de l'emplacement de la tumeur. L'augmentation de la pression intracrânienne conduit à des céphalées chez 50% des patients et à des vomissements (Davis, 2016; Hanif et al., 2017; Omuro and DeAngelis, 2013).

1.3. Physiopathologie

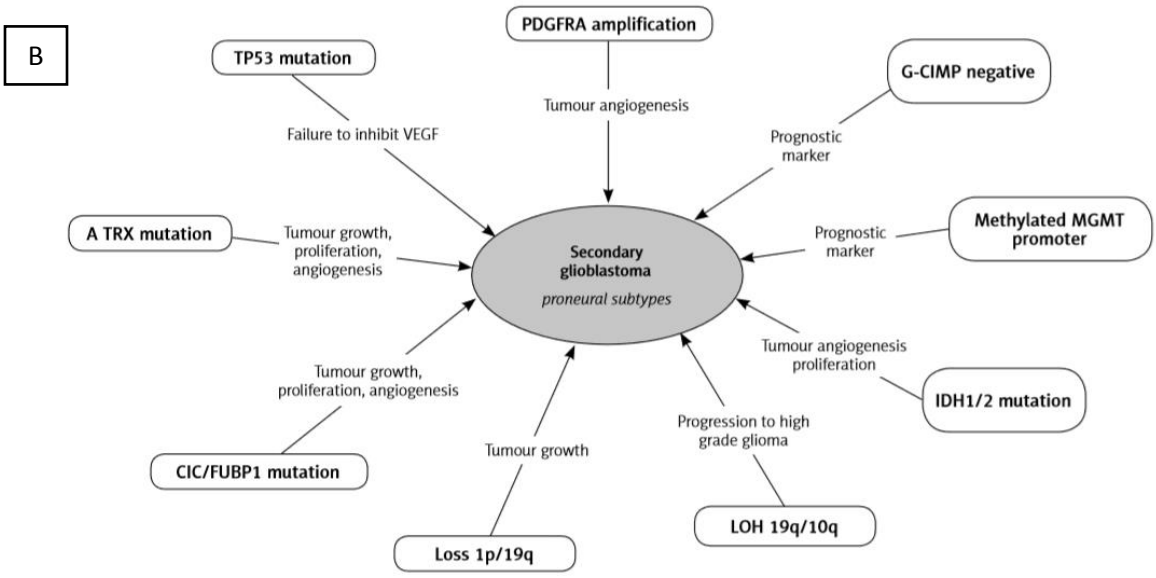
Représentant 50% des gliomes, le GBM se développe à partir de cellules de la neuroglie : les astrocytes. Dans 95% des cas, le GBM se développe dans la région sus-tentorielle, au niveau des hémisphères cérébraux (Nakada et al., 2011), mais il peut être localisé partout dans le système nerveux central (SNC). Ils sont caractérisés histologiquement par une densité cellulaire élevée, une forte activité mitotique, une prolifération vasculaire et une nécrose (Omuro and DeAngelis, 2013). Les GBM peuvent se développer *de novo* (GBM primaires) dans 90% des cas ou évoluer à partir d'un astrocytome (GBM secondaires) (Hanif et al., 2017).

Les principales altérations moléculaires des cellules du GBM primaire (Figure 1) sont la mutation et l'amplification du gène du récepteur du facteur de croissance épidermique (*epithelium growth factor receptor* (EGFR)), la surexpression du *mouse double minute 2* (MDM2), la délétion de p16 et la perte d'hétérozygotie du chromosome 10q sur lequel se trouve la *phosphatase and tensin homolog* (PTEN)

et la mutation du promoteur de la *telomerase reverse transcriptase* (TERT) (Hanif et al., 2017). Celles des cellules du GBM secondaire incluent la surexpression du facteur de croissance dérivé des plaquettes A (*platelet-derived growth factor A* (PDGFA)) et du récepteur aux facteurs de croissance dérivés des plaquettes (*platelet-derived growth factor receptor α* (PDGFRα)), du rétinoblastome (RB), la perte d'hétérozygotie du chromosome 19q et des mutations des gènes des isocitrates déshydrogénases 1 et 2 (IDH1/2) et de tp53 (*tumor protein p53*) (Hanif et al., 2017).



G-CIMP – CpG island methylation promoter phenotype; LOH 10p/10q – loss of heterozygosity of 10p/10q; PTEN – phosphatase and tensin homolog; VEGF – vascular endothelial growth factor; PIK3R1/PIK3CA – protein kinase B/phosphatidylinositol 3-kinase; TP53 – tumour protein p53; EGFR – epidermal growth factor receptor; MGMT – O6-methylguanine-DNA methyltransferase



G-CIMP – CpG island methylation promoter phenotype; LOH 19q/10q – loss of heterozygosity of 19q/10q; TP53 – tumour protein p53; MGMT – O6-methylguanine-DNA methyltransferase; IDH1/2 – isocitrate dehydrogenase 1/2; CIC/FUBP1 – homolog of Drosophila capicua/far-upstream binding protein 1; ATRX – α-thalassemia/mental retardation syndrome X-linked; PDGFRA – platelet-derived growth factor receptor A; VEGF – vascular endothelial growth factor

Figure 1. Altérations génétiques et moléculaires dans le glioblastome primaire (A) et secondaire (B) en développement, par A. M. Popescu et al (Popescu et al., 2016).

Les nombreuses altérations génétiques concernent principalement trois voies de signalisation : la voie du récepteur de la tyrosine kinase/RAS/phosphoinositide 3-kinase (PI3K) est altérée dans 88% des GBM, celle du p53 et celle de la protéine du RB dans respectivement 87% et 78% des cas (Aldape et al., 2015).

1.4. Prise en charge et traitement

1.4.1. Traitement symptomatique

Les soins de support vont consister à soulager le patient des symptômes du GBM. Pour lutter contre les symptômes neurologiques causés par l'œdème péritumoral, les corticostéroïdes, notamment la déxaméthasone (12-16 mg/jour en plusieurs prises), vont être utilisés ; en raison de leurs effets indésirables, une réduction progressive de la dose est indiquée dès que possible. Les crises convulsives sont traitées par du lévétiracetam. Il n'y a pas de preuve de l'intérêt d'une utilisation prophylactique des antiépileptiques chez les patients ne présentant pas ce symptôme (Hanif et al., 2017).

1.4.2. Traitement de première ligne

Le traitement standard du GBM consiste en l'exérèse, chaque fois que possible, de la tumeur en association à de la radiochimiothérapie. En effet, le GBM étant une tumeur invasive et le tissu atteint étant du tissu cérébral, il n'est pas possible d'effectuer une exérèse complète avec des marges de sécurité. C'est pourquoi le traitement chirurgical est complété 4 à 6 semaines après l'exérèse par de la radio- et chimiothérapie selon le protocole dit « de Stupp », développé suite à un essai de phase III de l'*European Organization for Research and Treatment of Cancer* et du *National Cancer Information Center* (EORTC/NCIC). Il consiste en de la radiothérapie (60 Gy en 30 fractions journalières) et de la chimiothérapie orale, du témozolomide (TMZ) à la posologie de 75 mg/m²/jour. Un traitement adjuvant par TMZ à 150-200 mg/m² pendant 5 jours est ensuite administré pour 6 cycles (Figure 2) (AROME, 2016; Stupp et al., 2007, 2005).

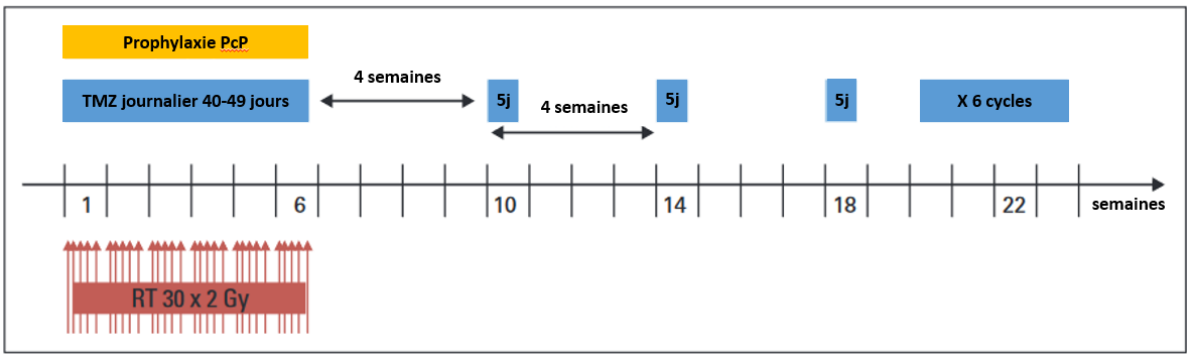


Figure 2. Prise en charge du glioblastome selon le protocole EORTC/NCIC, par Stupp et al (Stupp et al., 2007). Le témozolomide (TMZ) est administré chaque jour à la posologie de 75 mg/m² une heure avant la radiothérapie (RT) pendant 40 à 49 jours. Le TMZ est ensuite administré 5 jours toutes les 4 semaines à la posologie de 200 mg/m² (150 mg/m² au cycle 1). Une prophylaxie contre la Pneumocystose (PcP) est recommandée lors de l'administration concomitante de TMZ et de RT, ou si le taux de lymphocytes diminue sous le seuil de 500/mm³.

Le TMZ après administration est rapidement métabolisé en methyltriazeno-imidazole-carboximide capable de franchir la barrière hémato-encéphalique (BHE). Celui-ci va méthyler la guanine en position N^7 et 0^6, entraînant des *mismatchs* au niveau de l'ADN ce qui déclenche l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2-M (Newlands et al., 1997). Il existe cependant une enzyme de réparation de l'ADN protégeant les cellules tumorales des agents alkylants : la O^6-méthylguanine-DNA-méthyltransferase (MGMT) qui s'oppose à l'action du TMZ en déméthylant les groupes guanine. Une forte activité de la MGMT est associée à une mauvaise réponse au TMZ. Ainsi, la méthylation du promoteur du gène de la MGMT est un marqueur de réponse au traitement : l'hyperméthylation de ce promoteur entraîne une suppression de l'expression de cette enzyme. Dans le GBM, des mutations au niveau des gènes IDH 1/2 peuvent conduire à l'hyperméthylation de ce promoteur (Aldape et al., 2015; Hanif et al., 2017).

1.4.3.Traitement du glioblastome en rechute

La survie sans progression (SSP) du GBM est courte (environ 6-7 mois) et les rechutes sont quasi systèmatiques (Stupp et al., 2009). Le pronostic du GBM en rechute est sombre, avec une SSP médiane de 2,5 mois et une SG de 7,5 mois. Du fait d'une part, de la difficulté des traitements cytotoxiques à franchir la BHE pour atteindre les concentrations thérapeutiques efficaces et d'autre part, de l'hétérogénéité des cellules tumorales, les options thérapeutiques du GBM en rechute sont limitées et ne font pas l'objet d'un consensus (Weller et al., 2013; Bianco et al., 2017) (Figure 3). Ainsi, le traitement peut consister en :

- Une deuxième chirurgie avec ou sans implantation au niveau de la tumeur d'implant de carmustine (Park et al., 2010; Weller et al., 2013),

- Une deuxième radiothérapie (Kazmi et al., 2018; Torok et al., 2011),
- De la chimiothérapie par réintroduction de témozolomide, de nitrosurées (carmustine, lomustine, fotémustine), d'agents alkylants (procarbazine, cisplatine) seuls ou en association, de médicaments anti-angiogéniques (bevacizumab) seuls ou en association,… (Gallego, 2015)
- Une immunothérapie (Khansur et al., 2019; Schijns et al., 2015; Thomas et al., 2012).

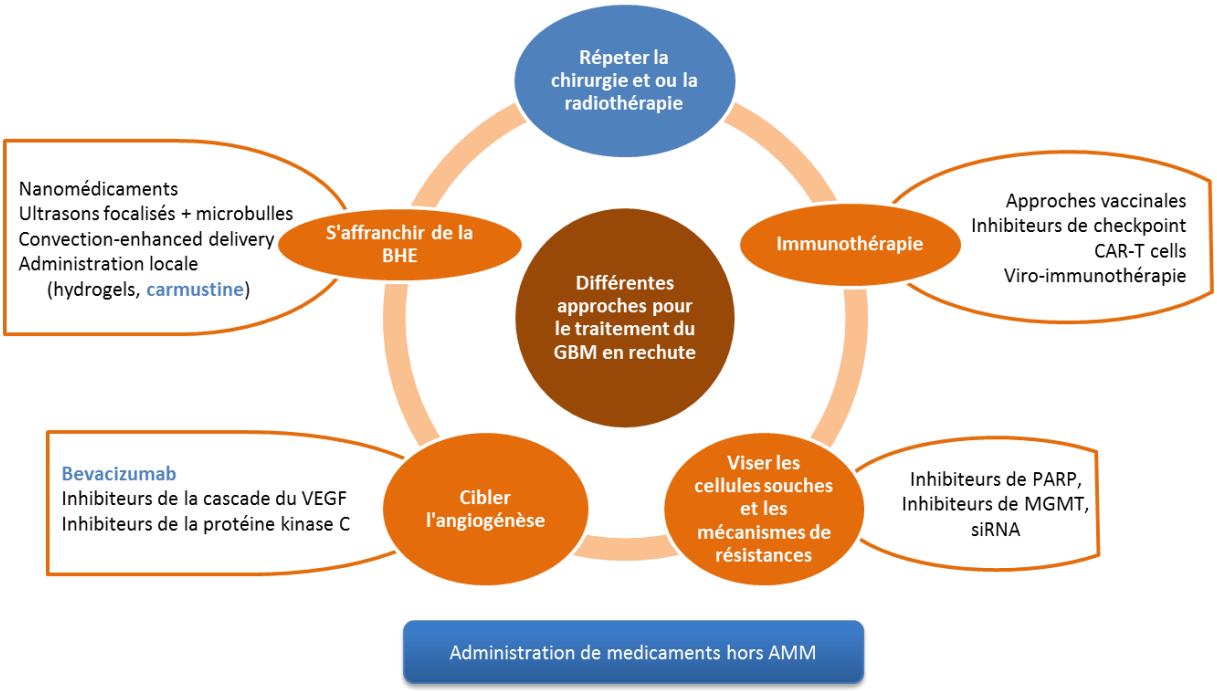


Figure 3. Les différentes approches pour le traitement du GBM en rechute, adapté de Bianco et al (Bianco et al., 2017). Les approches actuellement utilisées en clinique sont représentées en bleu.

Cependant, la plupart des essais cliniques ne montrent que des améliorations modestes et leurs résultats sont controversés. Il n'y a donc pas de traitement de référence du GBM en rechute. Le traitement est choisi en fonction de l'âge du patient, de son indice de performance (OMS), de l'histologie de la tumeur, de la réponse au premier traitement, de la durée avant récidive, …

1.5. Approche anti-angiogénique

Parmi les options thérapeutiques du GBM en rechute, cibler l'angiogenèse semble être une stratégie prometteuse du fait de la forte vascularisation de la tumeur. En effet, les GBM sont des tumeurs hautement invasives et angiogéniques (Jain et al., 2007).

1.5.1. Mécanismes de l'angiogenèse dans le GBM

La vascularisation du GBM est un processus complexe qui implique la co-option vasculaire, les angioblastes, la vasculogenèse et le micro-environnement de la tumeur.

Lors de la colonisation du tissu cérébral par les cellules cancéreuses, elles vont commencer par s'infiltrer le long des vaisseaux sanguins en prenant la place des cellules astrocytaires, ce qui perturbe le contact entre les cellules endothéliales et la membrane basale. Le mécanisme de co-option vasculaire va alimenter les cellules cancéreuses en oxygène et micro-nutriments. Avec l'augmentation en taille de la tumeur, celle-ci comprime et déforme les vaisseaux aboutissant à une diminution de leur diamètre et à la réduction du flux sanguin. Ce mécanisme conduit à la formation de zones hypoxiques et nécrotiques au sein de la tumeur, ce qui, combinée avec les mutations des cellules cancéreuses induit la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques (parmi lesquels le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire VEGF) déclenchant les mécanismes de l'angiogenèse (Figure 4) (Jain et al., 2007). La vascularisation des GBM est anormale sur le plan structurel et fonctionnel. Elle est corrélée à un œdème vasogénique, à une augmentation de la pression interstitielle et à un apport hétérogène d'oxygène et donc des substances actives (SA) (Jain et al., 2007).

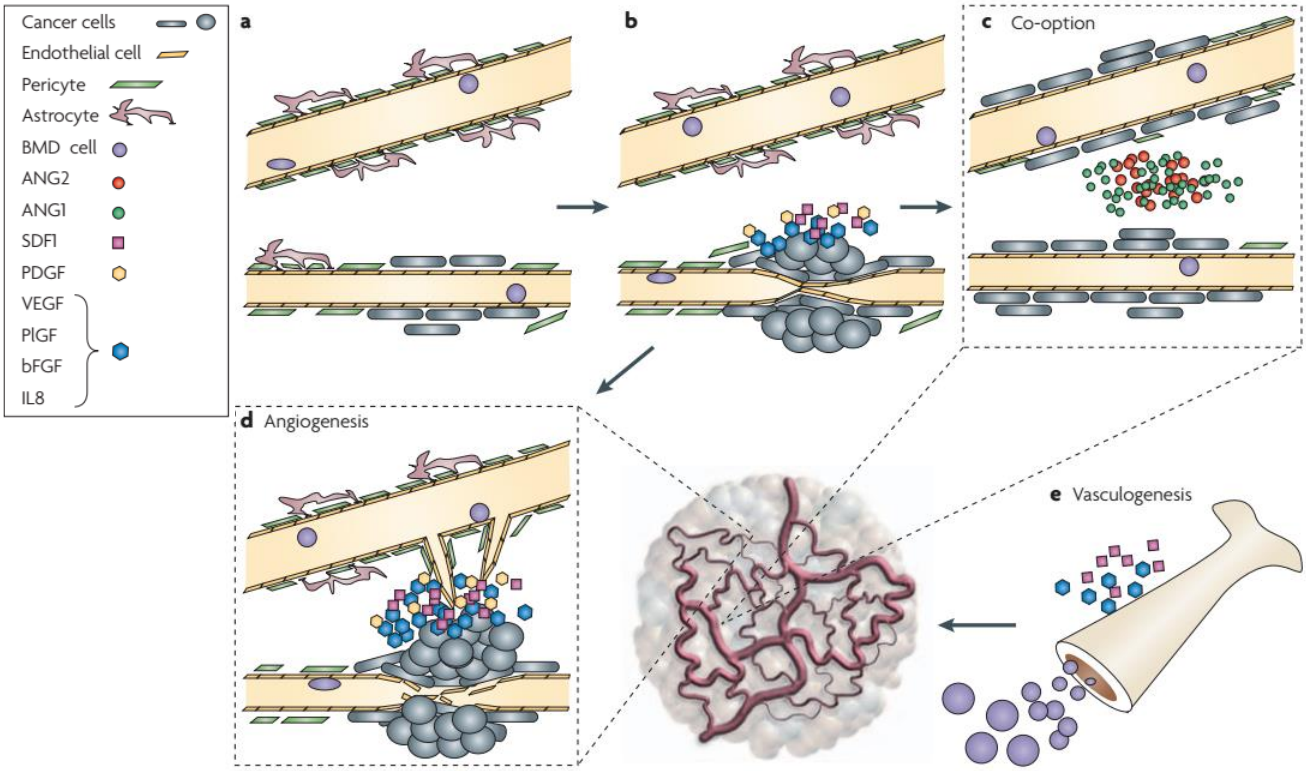


Figure 4. Mécanismes de formation des vaisseaux au sein du GBM, par Jain et al (Jain et al., 2007).

Les capillaires du tissu cérébral sont typiquement constitués de trois types cellulaires : les cellules endothéliales, les péricytes et les astrocytes (a). Ensemble, ils forment un environnement unique : la barrière hémato-encéphalique. Les tumeurs cérébrales, tout comme les tumeurs extra-cérébrales, peuvent utiliser quatre mécanismes pour former de nouveaux vaisseaux sanguins : la co-option vasculaire des vaisseaux cérébraux sains, l'angiogenèse, la vasculogenèse et l'intussusception (non montrée). Quand les cellules tumorales colonisent le cerveau, que ce soit à distance (métastases) ou localement, elles commencent par s'infiltrer le long des vaisseaux sanguins et de la substance blanche (b). La co-option vasculaire à partir des vaisseaux sains (c) fournit l'oxygène et les nutriments à la tumeur invasive. Le facteur de croissance dérivé des cellules stromales (stromal cell-derived factor 1 (SDF1 ou CXCL12)) contribue à l'invasion des cellules tumorales et à leur capacité à capter de nouveaux vaisseaux, tandis que l'angiopoïétine 1 (Ang-1) maintient l'intégrité des vaisseaux. Ang-2, produit par les cellules tumorales ou endothéliales, peut se lier au récepteur TIE2 (ou TEK) sur les cellules endothéliales et déstabiliser les vaisseaux. Lorsque la tumeur se développe, les cellules cancéreuses migrent le long des vaisseaux sanguins, les compressant et les déstabilisant. Ceci conduit à la régression des vaisseaux et à la réduction de la perfusion sanguine, conduisant à une hypoxie et même à la mort de cellules tumorales. L'hypoxie et les mutations des cellules cancéreuses induisent la sécrétion de facteurs de croissance, tels que le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), le facteur de croissance des fibroblastes basique (basic fibroblast growth factor (bFGF)), l'interleukine 8 (Il-8) et le SDF1, qui recrutent des nouveaux vaisseaux sanguins grâce à l'angiogenèse (d). De plus, le récepteur aux facteurs de croissance dérivé des plaquettes (platelet-derived growth factor receptor (PDGFR)) peut réguler à la hausse l'expression du VEGF, et exercer un effet autocrine sur les cellules endothéliales et périvasculaires. Ces facteurs peuvent également induire la vasculogenèse, qui est un autre mécanisme par lequel la tumeur cérébrale peut acquérir un nouveau système vasculaire (e). Les cellules dérivées de la moelle osseuse (BMD cell) peuvent être recrutées pour augmenter la densité vasculaire de la tumeur, et SDF1 semble être un modulateur important de la vasculogenèse. Les mécanismes moléculaires de l'intussusception sont mal connus.

D'un point de vue moléculaire, l'hypoxie va déclencher l'activation de facteurs de transcription dont le plus important est le facteur HIF-1 (*hypoxia inducible factor-1*), senseur de l'oxygène. Sa sous unité HIF-1α (*hypoxia inducible factor-1 alpha*) est en permanence dégradée en situation de normoxie, mais va être stabilisée en cas d'hypoxie, s'associer avec la sous-unité β et le facteur de transcription va alors être transloqué dans le noyau où il va activer un grand nombre de gènes dont celui du VEGF A (Shweiki et al., 1992; Popescu et al., 2016). Les cellules tumorales vont alors sécréter des facteurs pro-angiogéniques qui en se fixant sur leurs récepteurs présents sur les cellules endothéliales vont, après activation d'une cascade de transduction du signal, conduire à l'augmentation de la perméabilité capillaire, la prolifération des cellules endothéliales, la dégradation et le remodelage de la matrice extracellulaire et la prolifération et la migration des cellules endothéliales pour former de nouveaux vaisseaux (Guillamo, 2011).

L'angiogenèse est un mécanisme complexe faisant intervenir de nombreux médiateurs biologiques résumés dans la Table 1, et de nombreuses voies de signalisation intracellulaire telles que PI3K/Akt, la voie *PI3K/protein kinase B/mammalian target of rapamycin* (PI3K/AKT/mTOR), la voie RAS/RAF/*extracellular signal-regulated kinase* (ERK)/*mitogen-activated protein kinases* (MAPK), la voie *transducer and activator of transcription* (STAT)/*nuclear factor-kappa B* (NF-κB) ainsi que la voie *transforming growth factor β* (TGF-β) (Figure 5) (Caffo et al., 2013; M. Zhang et al., 2015; Y. Xu et al., 2018).

Table 1. Les principaux acteurs de l'angiogenèse dans les gliomes, adapté de Nakada et al (Nakada et al., 2011).

EGF : facteur de croissance épidermique ; FGF : facteur de croissance des fibroblastes - fibroblast growth factor ; IL : interleukine ; MEC : matrice extracellulaire ; MMP : métalloprotéase ; PDGF : facteur de croissance dérivé des plaquettes - platelet-derived growth factor ; TGF-β : facteur de croissance transformant β - transforming growth factor β ; TNF-α : tumor necrosis factor α ; VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire - vascular endothelial growth factor ; VEGFR : récepteur aux facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire - vascular endothelial growth factor receptor.

Facteurs angiogéniques	**Fonctions**
VEGF-A, -B, -C et -D	Angiogenèse, favorise la prolifération et la migration endothéliale, la mitose des cellules endothéliales et la création de la lumière des vaisseaux sanguins
VEGFR-1	Hématopoièse, favorise l'angiogenèse de la tumeur, participe à l'activation des MMP
VEGFR-2	Médiateur des effets mitogéniques, angiogéniques et améliorant la perméabilité du VEGF-A
Angiopoiétine	Induit la stabilisation, le remodelage et la maturation des vaisseaux sanguins
FGF acide et basique	Permettent la résistance des cellules endothéliales à l'apoptose, induisent la prolifération et la migration des cellules endothéliales
PDGF	Recrute les péricytes et facilite la migration des péricytes dans les néo-vaisseaux
EGF	Stimule la production de VEGF dans les cellules de gliome
TGF-β	Participe à la régulation de la prolifération, de la migration, de la différentiation des cellules endothéliales et de leur synthèse de la MEC
IL-6	Induit l'activation transcriptionnelle du VEGF et régule l'activité du promoteur du gène du VEGF
IL-8	Exerce de puissantes propriétés angiogéniques sur les cellules endothéliales via l'interaction avec les récepteurs aux chimiokines CXC 1 et 2
TNF-α	Impliqué dans l'inflammation systémique, induit *in vitro* la morphogenèse tubulaire
Intégrines	Responsables des interactions entre les cellules endothéliales et tumorales avec la MEC
MMP-2 et MMP-9	Impliqués dans la dégradation protéolytique des composants de la MEC, et facilitent la motilité cellulaire pendant l'invasion et l'angiogenèse de la tumeur

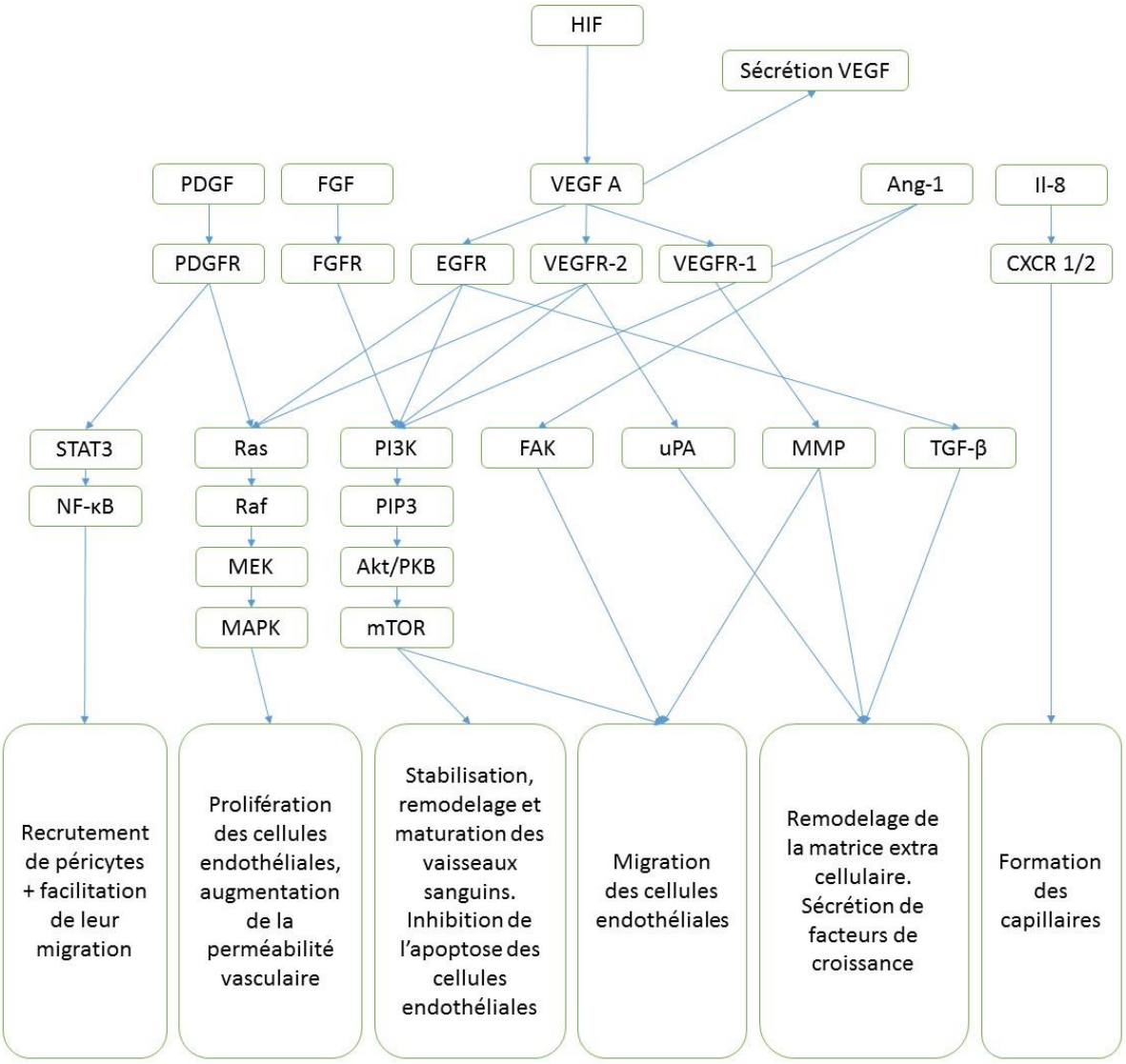


Figure 5. Les médiateurs de l'angiogenèse dans les gliomes.

Akt : protéine kinase B = PKB ; Ang-1 : angiopoietines 1 ; CKCR : récepteurs de chimiokines CXC ; EGFR : récepteur au facteur de croissance épidermique - epidermal growth factor receptor ; ERK : extracellular signal-regulated kinase ; FAK : focal adhesion kinase ; FGF : facteur de croissance des fibroblastes - fibroblast growth factor ; FGFR : récepteurs aux facteur de croissance des fibroblastes - fibroblast growth factor receptor ; HIF : facteur induit par l'hypoxie - hypoxia inducible factor ; Il-8 : interleukine 8 ; MAPK : mitogen-activated protein kinases ; MMP : métalloprotéase ; mTOR : cible de la rapamycine chez les mammifères - mammalian target of rapamycin ; NF-κB : nuclear factor-kappa B ; PDGF : facteur de croissance dérivé des plaquettes - platelet-derived growth factor ; PDGFR : récepteur aux facteurs de croissance dérivés des plaquettes - platelet-derived growth factor receptor ; PI3K : phosphoinositide 3-kinase ; PIP3 : phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate ; PKB : protéine kinase B = Akt ; STAT : signal transducer and activator of transcription ; TGF-β : facteur de croissance transformant β - transforming growth factor β ; uPA : urokinase-type plasminogen activator ; VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire - vascular endothelial growth factor ; VEGFR : récepteur aux facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire - vascular endothelial growth factor receptor..

1.5.2. Thérapies anti-angiogéniques

L'objectif d'un traitement anti-angiogénique est de rétablir l'équilibre entre les facteurs pro- et anti-angiogéniques afin de revenir à un réseau capillaire normalisé permettant l'amélioration de la distribution des SA à la tumeur (Figure 6).

Le bevacizumab, un anticorps ciblant le VEGF, a obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM) aux Etats-Unis dans cette indication. Il est cependant utilisé hors AMM en Europe car l'EMA (European Medicines Agency) n'a pas jugé les études suffisantes (Friedman et al., 2009; Kreisl et al., 2009).

D'autres thérapies anti-angiogéniques ont été utilisées en traitement du GBM dans des essais cliniques. L'aflibercept, un leurre soluble du VEGF, a été administré à des patients en rechute de GBM après traitement standard lors d'une étude de phase II : la SSP était de 12 semaines contre 9 semaines. Cependant, la SSP à 6 mois était seulement de 7,7% (plus faible qu'avec le bevacizumab) et l'aflibercept était modérément toléré (Groot et al., 2011). Un essai de phase II a montré que le traitement par cetuximab (anticorps anti-EGFR) avait une faible activité contre le GBM en rechute mais semblait avoir une meilleure activité chez les patients dont la tumeur amplifiait l'EGFR (SSP médiane 3,03 contre 1,63 mois ($p = 0,006$); SG médiane de 5,57 contre 3,97 mois ($p = 0,12$)) (Neyns, 2012). Une autre étude de phase II a montré que l'association d'erlotinib (inhibiteur du récepteur à l'EGFR) et du temsirolimus (inhibiteur de mTOR) avait une faible efficacité (SSP médiane de 8 semaines) (Wen et al., 2014). D'autres anti--angiogéniques ont été utilisés dans des essais cliniques, comme le sunitinib, le pazopanib, le sorafenib, l'everolimus, … (Garcia-Garcia et al., 2005). Cependant, la plupart des études n'ont pas atteint leur critère principal (SSP de 6 mois). Les hypothèses principales avancées ont été une toxicité empêchant l'administration de fortes doses de médicament, la faible pénétration de la SA dans la tumeur, associée au faible franchissement de la BHE, et des mécanismes de résistance. De plus, l'hétérogénéité des cellules tumorales du GBM entraîne l'activation de voies secondaires de l'angiogenèse. Il est donc nécessaire d'adapter le traitement au patient et à sa tumeur (Ameratunga et al., 2018).

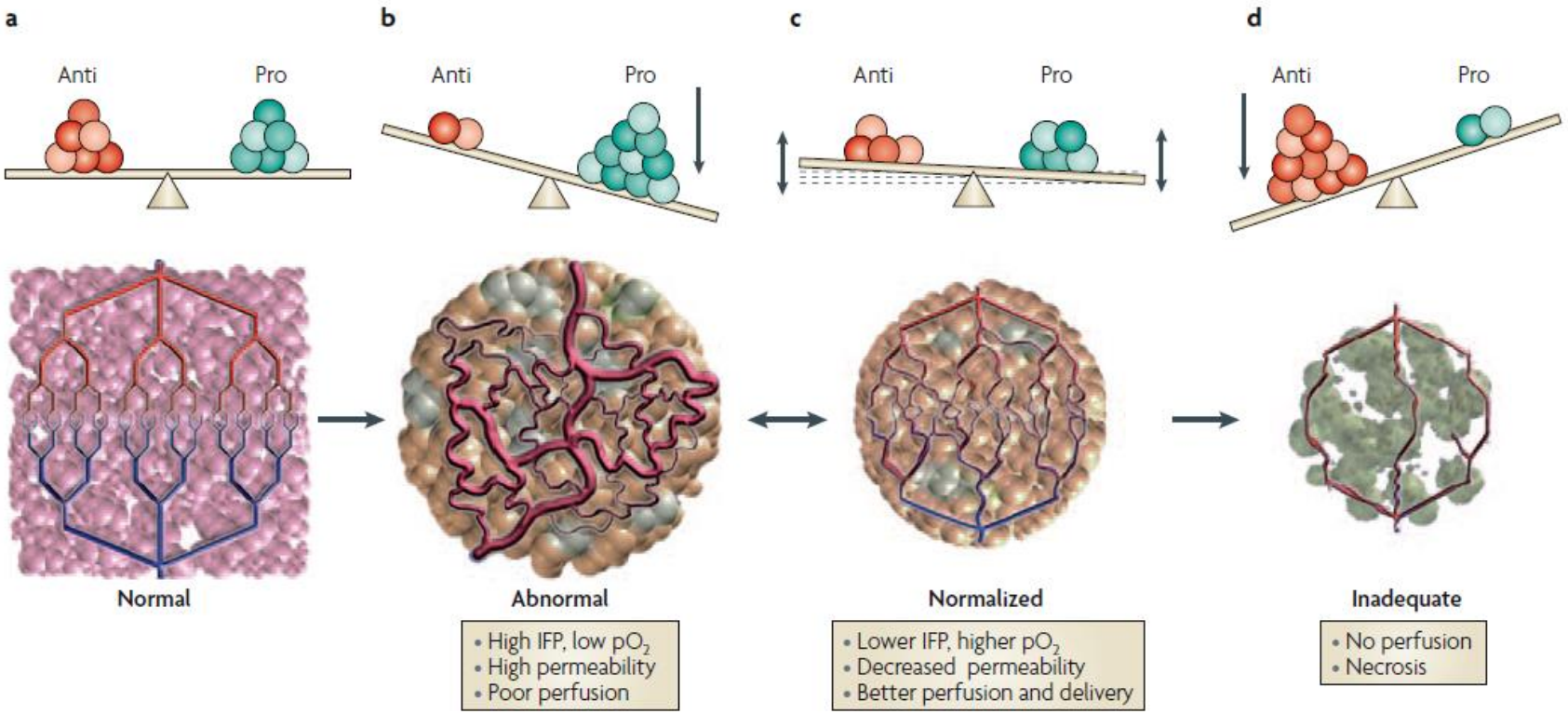


Figure 6. Mécanismes de la thérapie anti-angiogéniques, par Jain et al (Jain et al., 2007).

*(a) Dans le tissu sain, il existe un équilibre parfait entre les molécules pro- et anti-angiogéniques qui maintiennent un réseau vasculaire organisé et efficace. (b) La tumeur produit des facteurs angiogéniques qui induisent un réseau vasculaire anormal et non efficace. (c) Une thérapie anti-angiogénique bien administrée peut permettre de ramener cet équilibre à son état normal en normalisant le réseau vasculaire, ce qui améliore la distribution des médicaments dans la tumeur et leur efficacité. (d) Si l'anti-angiogenèse est efficace et/ou persistante, elle peut détruire complétement le réseau vasculaire, empêchant la distribution de l'oxygène et des nutriments à la tumeur, ce qui à terme affame la tumeur. Dans les modèles pré-cliniques utilisant les agents anti-angiogéniques possédant une autorisation de mise sur le marché, (c) progresse habituellement vers (d) (flèche simple). Cependant, dans les tumeurs humaines, (c) retourne vers (b) après une « fenêtre de normalisation » (double flèche). IFP = pression du fluide interstitiel ; pO_2 = niveau d'oxygénation du tissu.*Le cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC).

2. Le cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC)

2.1. Epidémiologie

Le cancer du poumon est le cancer le plus fréquent au monde avec 2 093 876 nouveaux cas diagnostiqués dans le monde en 2018. Il est aussi la principale cause de mortalité par cancer dans le monde ; il représente à lui seul un quart des décès par cancer aux Etats-Unis et 18,4% des décès par cancer dans le monde (Globocan, 2018; Siegel et al., 2018). La majorité des cancers du poumon sont des cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC) (84%). La survie relative à cinq ans est faible, de 19% (16% pour les hommes et 22% pour les femmes) aux Etats-Unis ; elle est plus haute pour les cancers bronchiques non à petites cellules (23%) que pour ceux à petites cellules (6%) (American Cancer Society, 2019). Le principal facteur de risque est le tabagisme actif et passif, suivi par les expositions à l'amiante, au radon, à la pollution de l'air ou à des expositions professionnelles. Il existe également des susceptibilités génétiques professionnelles (Bilello et al., 2002; Molina et al., 2008; Zappa and Mousa, 2016; American Cancer Society, 2019).

2.2. Description clinique

Les symptômes sont peu spécifiques et apparaissent au stade avancé du cancer, ce qui implique un diagnostic tardif (Wu and Raz, 2016). Les symptômes sont une toux persistante pouvant s'accompagner de sang dans le mucus expulsé lors de la toux, un essoufflement, une respiration sifflante, une douleur thoracique ainsi que des infections broncho-pulmonaires récurrentes (Hoffman et al., 2000).

2.3. Physiopathologie

Le CBNPC se développe à partir d'une série de modifications chromosomiques à l'origine des différents types histologiques retrouvés : adénocarcinomes, carcinome épidermoïde, carcinomes à grandes cellules et carcinomes neuroendocrines à grandes cellules. Ils sont caractérisés par un déséquilibre chromosomique, notamment des anomalies chromosomiques numériques comme l'aneuploïdie ou des anomalies de structure telles que des délétions, des amplifications et des translocations. Les principales altérations génétiques concernent principalement deux grandes classes : les gènes suppresseurs de tumeurs et les proto-oncogènes. L'activation de proto-oncogènes, principalement due à des mutations ponctuelles, des réarrangements ou des amplifications géniques, va concerner les gènes de la famille Ras (KRAS), de la famille des récepteurs des neurorégulines erbB (EGFR et HER2), les enzymes cyclooxygénases, le peptide libérateur de gastrine et Bcl-2. La délétion structurale d'un allèle combiné à une mutation ou une inactivation génétique par méthylation de l'autre allèle conduit

à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs. Les familles concernées sont p53 et des protéines homologues et la voie p16–cycline D1–*cyclin-dependent kinase 4* (CDK4)–RB (Fong and Minna, 2002).

2.4. Prise en charge et traitement

Le traitement du cancer du CBNPC dépend du stade et du type de CBNPC. La résection chirurgicale va être effectuée dès que possible. Cependant, presque 70% des patients sont diagnostiqués au stade avancé ou métastatique (Hirsch et al., 2017). Pour les CBNPC localement avancés non résecables, le traitement consiste en de la radiothérapie associée à une chimiothérapie par sels de platines (principalement le cisplatine) associé à la vinorelbine (poison du fuseau), l'étoposide (inhibiteur de la topo-isomérase II) ou le paclitaxel (poison du fuseau) (Aupérin et al., 2010). Ce traitement est suivi par l'administration de durvalumab (anticorps anti-PD-L1) toutes les 2 semaines pendant 12 mois (Antonia et al., 2017). Pour le CBNPC métastatiques, le traitement de première ligne est l'association du pembrolizumab (anticorps anti-PD1), avec un sel de platine et le pemetrexed (antimétabolite) (Gandhi et al., 2018). Un traitement de maintenance est effectué par pemetrexed. En cas de contre-indication au pembrolizumab, une chimiothérapie par association d'un sel de platine avec de la gemcitabine ou de la vinorelbine ou du paclitaxel ou du docetaxel est proposée (Schiller et al., 2002). Le traitement des lignes suivantes dépendra des SA préalablement administrées, de l'état du patient et du type histologique du CBNPC : traitement à base de sels de platine si l'état le permet, de l'immunothérapie si non reçue en première ligne. En fonction des mutations retrouvées, des thérapies ciblées peuvent être proposées : inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) (erlotinib, gefitinib, afatinib) pour les mutations activatrices de l'EGFR (Lee et al., 2015), l'alectinib en cas en cas de réarrangement ALK (Peters et al., 2017).

2.5. Approche anti-angiogénique

La densité des microvaisseaux formés par angiogenèse a été reliée au développement des métastases et à un mauvais pronostic dans le CBNPC. Une surexpression du VEGF et du VEGFR a été observé dans des CBNPC et celle-ci était corrélée avec l'angiogenèse de la tumeur, ainsi qu'à une SSP et une SG plus faible (Ballas and Chachoua, 2011). Le bevacizumab, un anticrops anti-VEGF, à une AMM en association avec la chimiothérapie à base de sels de platine (Reck et al., 2010; Soria et al., 2013; Alshangiti et al., 2018). Le ramucirumab, un anticorps anti-VEGFR2, a également été approuvé en association au docetaxel en deuxième ligne. (Garon et al., 2014). D'autres essais ont évalués des ITK, sorafenib, vandetanib et nindetanib (ITK à plusieurs cibles), erlotinib et gefitinib (ITK de l'EGFR), en association avec la chimiothérapie à base de sels de platine, le docetaxel ou le pemetrexed, ou avec un anticorps anti-VEGF, ou en association avec l'immunothérapie. ils montrent des améliorations en terme de PFS mais peu montrent une augmentation de la SG. Cibler l'angiogenèse en association avec les autres

traitements pourrait conduire à un effet synergique, mais la très forte hétérogénéitée des CBNPC a conduit à la difficulté à démontrer les effets cliniques de ce ciblage. Les associations et les rythmes d'administration doivent être étudiées afin de déterminer le meilleur traitement (Ballas and Chachoua, 2011; Chu and Otterson, 2016; Qu et al., 2017; Qiang et al., 2020).

Approche combinée

Malgré tous les essais en cours, le GBM reste une tumeur avec un pronostic très sombre. Par ailleurs, malgré les nombreux traitements validés pour le CBNPC, ce cancer reste responsable du plus grand nombre de décès par cancer dans le monde et sa survie relative à 5 ans n'est que de 23%. Pour ces deux cancers, l'utilisation de médicaments anti-angiogéniques a mis en évidence la nécessité d'une thérapie personnalisée comprenant la caractérisation histologique et moléculaire de la tumeur.

En effet, en plus de normaliser le flux sanguin au sein de la tumeur, les anti-angiogéniques utilisés en combinaison avec un agent cytotoxique pourrait sensibiliser les cellules endothéliales à des agents cytotoxiques tels que les radiations. De plus, ces agents anti-angiogéniques pourraient également contrecarrer l'augmentation soudaine du VEGF après irradiation de la tumeur. Pour finir, la thérapie anti-angiogénique pourrait perturber la niche hypoxique et périvasculaire des cellules souches du GBM, permettant ainsi l'éradication de ces cellules souches (Jain et al., 2007; Turpin et al., 2015).

L'association de plusieurs SA avec des mécanismes d'action différents est une stratégie couramment employé dans les traitements de cancers afin d'éviter l'apparition de résistance, d'obtenir un effet additif ou synergique et de réduire les effets indésirables des traitements (Bayat Mokhtari et al., 2017). L'action synergique de deux SA dépend très fortement de leur rapport molaire ou massique. Cependant, les différences de pharmacocinétique et de biodistribution des SA pourraient empêcher leur action synergique au niveau de la tumeur. L'encapsulation de SA avec des propriétés physico-chimiques et pharmaceutiques différentes dans un même nanovecteur pourrait maintenir le rapport idéal des deux SA jusqu'au site d'action (Mayer et al., 2006; Tardi et al., 2007, 2009; Gurunathan et al., 2018). En 2017, une formulation liposomale (DSPC/DSPG/cholesterol (rapport molaire 7:2:1)) co-encapsulant la cytarabine et la daunorubicine avec le rapport molaire 5:1 (CPX-351, Vyxeos®) contre la leucémie aigüe myéloïde a été approuvée par la FDA (Tardi et al., 2009; Alfayez et al., 2020).

Dans les paragraphes suivants, nous présentons une approche combinée associant un anticancéreux, le cisplatine, et un anti-angiogénique, la fisétine, encapsulés dans des liposomes.

1. Les liposomes

Les liposomes (Figure 7) sont des vésicules composées d'une ou plusieurs bicouches lipidiques entourant une cavité aqueuse présentant l'avantage de pouvoir encapsuler ensemble ou séparément

des molécules hydrophiles et hydrophobes. La composition de la bicouche lipidique ainsi que la taille et la charge de surface de la vésicule peuvent moduler l'encapsulation de la SA et la distribution de celle-ci dans l'organisme. Les SA hydrophiles se retrouvent dans le cœur aqueux tandis que celles hydrophobes se retrouvent dans la bicouche lipidique.

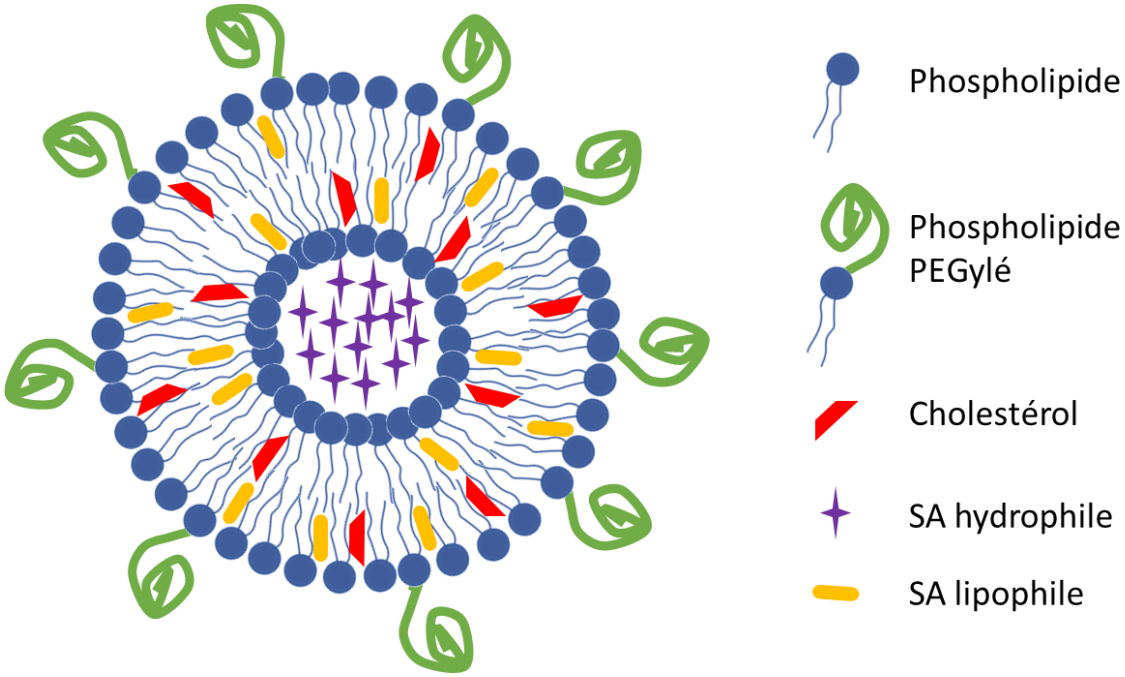


Figure 7. Schéma d'un liposome PEGylé. Les substances actives (SA) peuvent être encapsulés dans le cœur aqueux ou dans la bicouche lipidique.

La bicouche lipidique est composée principalement de phospholipides, des lipides composés de deux chaines d'acides gras greffées à une tête polaire capable de s'auto-assembler en lamelles dans l'eau. L'apport d'énergie permet la fermeture en sphère, les liposomes. La bicouche lipidique peut également contenir d'autres amphiphiles minoritaires (sphingolipides, tensioactifs non ioniques), du cholestérol, permettant de diminuer la fluidité et la perméabilité membranaire, des phospholipides chargés afin de modifier la charge de surface pour éviter l'agrégation des liposomes en suspension, de l'α-tocophérol pour éviter l'oxydation des lipides, et des lipides PEGylés pour apporter une couche hydrophile autour du liposome afin de diminuer les interactions avec les protéines plasmatiques, ou des lipides liés à d'autres polymères (Vauthier and Couvreur, 2008).

Les liposomes développés pour le traitement des maladies du SNC sont des liposomes PEGylés, afin d'éviter leur opsonisation conduisant à leur métabolisation, ou des liposomes cationiques permettant la délivrance de matériel génétique. Les liposomes cationiques nécessitent généralement un acte invasif ou la perturbation de la BHE pour atteindre le tissu cérébral. Les liposomes PEGylés peuvent être administrés par voie intraveineuse dans le but de traverser la BHE et de diffuser jusqu'aux cellules

tumorales grâce à un endothélium qui est fenêtré au niveau de la tumeur. Afin d'améliorer la distribution au niveau du tissu tumoral, les liposomes peuvent être conjugués à des ligands ou anticorps permettant leur transcytose (Karim et al., 2016). Lors d'essais concernant le traitement de maladies du SNC, plusieurs formulations de SA sous forme liposomale ont été administrées par voie intraveineuse ou intracérébrale et ont pu atteindre leur cible avec une efficacité améliorée et une toxicité réduite (Table 2) (Garcia-Garcia et al., 2005).

Table 2. Exemple d'applications de liposomes dans le traitement de plusieurs maladies du système nerveux central, par Garcia-Garcia et al (Garcia-Garcia et al., 2005).

Examples of liposomes used as brain drug delivery during CNS diseases

Molecule tested (reference)	Liposome type	CNS diseases	Model of study	Via of administration	Relevant results
CM-Dil (fluorescent molecule) (Omori et al., 2003)	PEG-liposomes coupled with transferrin	Ischemia	Rat with middle cerebral occlusion (ischemic rat)	Intravenously	Increased brain accumulation
Amphotericin B (Groll et al., 2000)	Liposomes (commercial formulation ambisone; Fujisawa, USA, Deerfiel)	Infection	Rabbit model of hematogenous *candida albicans* meningoencephalitis	Intravenously	Antifungal efficacy
[^{3}H]-prednisolone (Schmidt et al., 2003a)	Pegylated liposomes	Experimental autoimmune encephalitis	Rat	Intravenously	Effective restoration of the BBB integrity, reduction of cellular inflammation and macrophage infiltration
Doxorubicin (Koukourakis et al., 2000; Hau et al., 2004)	Pegylated liposomes (commercial formulation Caelyx®)	Brain Tumor	Clinical study	Intravenously	Non-severe toxicity, higher drug accumulation in glioblastoma than in metastatic tumors and long-term survival
IFN-β gene plasmid (Yoshida et al., 2004)	Cationic liposomes	Brain tumor	Clinical study	Intratumoral	Inhibition of growth tumor of resistant malignant glioma and aggressive tumor
Recombinant adenoviral vector: herpes simplex virus thymidine kinase (Mizuno et al., 2002)	Cationic liposomes	Brain tumor	Mouse glioma model	Intratumoral	Reduction of immunogenicity and maintained anticancer activity
Antisense epidermal growth factor (Sugawa et al., 1998)	Cationic liposomes	Brain tumor	Human malignant glioma cell lines (U-87M6, TM-1 and TM2)	-	Inhibition of tumor growth

E. García-García et al. / International Journal of Pharmaceutics 298 (2005) 274–292

Les liposomes développés pour le cancer du poumon sont également des liposomes furtifs, PEGylés. Certains sont également conjugués à un ligand afin de permettre une meilleure sélectivité de délivrance de l'agent cytotoxique. Le cetuximab pour cibler l'EGFR, récepteurs surexprimés sur les cellules cancéreuses, l'acide hyaluronique pour cibler le CD44 exprimés sur les cellules souches, l'acide arginylglycylaspartique afin de cibler les intégrines dans le micro-environnement de la tumeur, … (Skupin-Mrugalska, 2019). De nombreuses formulations liposomales encapsulant des molécules cytotoxiques ont été envisagées pour le traitement du cancer du poumon, et certaines sont évaluées par des essais cliniques chez l'humain (Table 3).

Table 3. Formulations liposomales encapsulants des molécules cytotoxiques en essai clinique (clinicaltrials.gov) pour le traitement du cancer du poumon.

Molécule testée	Type de liposomes	Molécule en co-administration	Voie d'administration	Phase
Irinotecan	Liposome PEGylé (Onyvide®)		Intraveineuse	II
Paclitaxel	(Lipusu®)	+ Cisplatine	Intraveineuse	IV
Lurtotecan	Liposome (OSI-211)	+ Cisplatine	Intraveineuse	I complétée
		-	Intraveineuse	II, complétée
Topotecan	(FF-10850)		Intraveineuse	I
Doxorubicine	Liposome PEGylé (Doxil®)	+ Topotécan	Intraveineuse	I, complétée

2. La fisétine

La fisétine (3,3',4',7-tetrahydroxyflavone, Figure 8) est un flavonoïde naturel retrouvé dans certains fruits et légumes. Elle possède plusieurs activités biologiques comme une action anti-oxydante, une action anti-inflammatoire et une action anti-angiogénique (Bhat et al., 2012; Fotsis et al., 1997). De plus, elle peut inhiber *in vitro* l'invasion tumorale du GBM (Chen et al., 2014). Plusieurs études *in vitro* ont montré une activité cytotoxique de la fisétine sur des cellules de cancers du poumon (Khan et al., 2012; Kang et al., 2015, 2016). D'autres ont mis en évidence un effet inhibiteur de la fisétine sur l'invasion et la migration de cellules d'adénocarcinomes de poumons, montrant une éventuelle action anti-métastatique de celle-ci (Liao et al., 2009; Wang and Huang, 2018). Une étude *in vitro* a montré que la fisétine pouvait inverser la résistance acquise au cisplatine des cellules de cancer du poumon A549 par l'inhibition de la voie des MAPK (Zhuo et al., 2015).

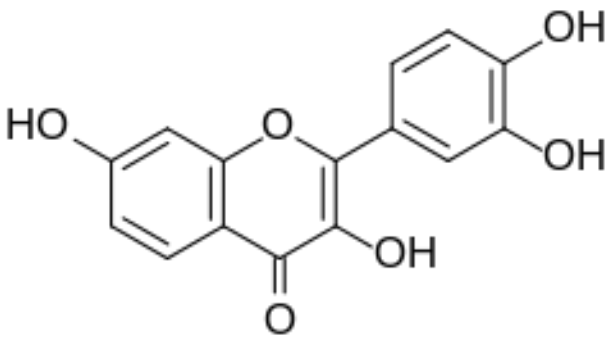


Figure 8. Structure de la fisétine.

2.1. Propriétés anti-angiogéniques de la fisétine

La fisétine est capable d'inhiber la croissance et la prolifération de cellules endothéliales HUVECs (Fotsis et al., 1997) de façon dose et temps-dépendants (10 à 50 µM/L à 24, 48 et 72h), et même en présence de VEGF. Elle inhibe également la formation et perturbe l'organisation de type capillaire des cellules endothéliales humaines HUVEC *in vitro* et *in vivo* chez la souris (Bhat et al., 2012). A une concentration de 50 µM pendant 24h, elle est capable d'inhiber l'expression protéique du VEGF ainsi que la transcription des gènes de nombreux facteurs pro-angiogéniques (VEGF, eNOS, iNOS, MMP-2 and MMP-9) dans des lignées tumorales de carcinome pulmonaire humain (A549) et de carcinome prostatique (DU145) (Bhat et al., 2012) ; l'inhibition de l'expression du VEGF par la fisétine a également été montré dans la lignée cellulaire de cancer épidermoïde du poumon NCI-H157 (Ansó et al., 2010). Park *et al* ont montré que la fisétine était capable d'inhiber l'activité des MMPs (notamment la MMP-14) et de stabiliser *in vitro* les microtubules des cellules endothéliales, ce qui pourrait lui conférer des propriétés anti-angiogéniques (J. H. Park et al., 2013). Touil *et al* ont également montré un effet stabilisant de la fisétine sur les microtubules en induisant une morphologie inhabituelle pour un poison du fuseau : au lieu d'induire un arrondissement des cellules, elle induit une augmentation de l'asymétrie cellulaire à l'aide de nombreuses extensions et filopodes (Touil et al., 2009) ; ils ont également montré que la fisétine inhibait la migration des cellules endothéliales humaines EA.hy926 ainsi que leur organisation en capillaire *in vitro* et *in vivo* (Touil et al., 2011b).

2.2. La fisétine, un défi galénique

Les caractéristiques physicochimiques de la fisétine sont résumées dans la Table 4.

Table 4. Propriétés physico-chimiques de la fisétine (drugbank.ca ; Merck Index).

Nom IUPAC	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,7-dihydroychromen-4-one
CAS	528-48-3
Formule chimique	$C_{15}H_{10}O_6$
Masse molaire	286,239 g/mol
Point de fusion	330°C
λmax (éthanol)	252, 320, 360 nm
logP	3.2 (Mignet et al)
Solubilité dans l'eau	0,151 mg/mL
	< 5 mg/L (travail expérimental)
Solubilité	Soluble dans les alcools, l'acétone, l'acide acétique, le DMSO; pratiquement insoluble dans l'eau, l'éther, le benzène, le chloroforme et l'éther de pétrole

La fisétine est une molécule hydrophobe et insoluble dans l'eau. Elle est faiblement soluble dans les huiles (Ragelle et al., 2012). Afin de permettre son administration, des formulations à base de nano-vecteurs ont été développées : nanoémulsions, complexation avec des cyclodextrines, micelles polymériques, nanoparticules, nanocochléates (bicouche de phospholipides chargée négativement enroulée sur elle-même à l'aide de cations multivalents), éthosomes et transéthosomes (vésicules composées de phospholipides et d'une haute proportion d'éthanol à visée cutanée et transcutanée) et liposomes (Table 5).

Table 5. Différentes stratégies de nano-vectorisation de la fisétine.

EE = efficacité d'encaspulation correspond au pourcentage de SA introduite lors de la préparation effectivement encapsulé par la formulation ; DL = charge en substance active correspond à la quantité de SA encapsulée par rapport à la quantité de lipides ou de polymères, exprimé en pourcentage.

Type de nanomédicament	Diamètre	PDI	Incorporation de la fisétine	Reference
Nanoémulsion	146 ± 3 nm	0,015	5 mg/g d'excipients	(Ragelle et al., 2012)
Complexation avec des cyclodextrines (CD)			Solubilité améliorée dans des β-CD ; instables avec α-CD	(Guzzo et al., 2006)
			Solubilité = 4,5 mg/mL (β-CD) 7,8 mg/mL (γ-CD)	(J. Zhang et al., 2015)
Micelles polymériques	22,4 ± 3 nm	0,163 ± 0,032	DL = 9,88 ± 0,14%	(Chen et al., 2015) (Xiao et al., 2018)
	89 nm	0,120	DL = 10,56%	(L. Wang et al., 2017)
	89,3 ± 4,1 nm 103,2 ± 6,1 nm		EE = 84,12 ± 2,15% 82,50 ± 1,78%	(Pawar et al., 2018)
Nanoparticules polymériques	140 à 200 nm	< 0,16	DL de 3,5 à 4,1%	(Sechi et al., 2016)
	226,85 ± 4,78 nm	0,12 ± 0,02	EE = 90,35 ± 2,34%	(Feng et al., 2019)
Nanoparticules à base d'albumine	220 ± 8 nm		EE = 84%	(Ghosh et al., 2016)
Nanocochléates	275 ± 4 nm	0,39 ± 0,05	EE = 84,31 ± 2,52%	(Bothiraja et al., 2014)
Liposomes	173,5 ± 2,4 nm	0,181 ± 0,016	18 mg/g d'excipients	(Mignet et al., 2012; Seguin et al., 2013)
Transéthosomes	74,21 ± 2,65 nm		EE = 68,31 ± 1,48%	(Moolakkadath et al., 2018)
Ethosomes binaires	99,89 ± 3,24 nm		EE = 89,23 ± 2,13%	(Moolakkadath et al., 2019)

Parmi ces options, seule la formulation sous forme de liposomes permet d'encapsuler simultanément une molécule hydrophobe et une molécule hydrophile, tout en ayant un diamètre inférieur à 200 nm. Les liposomes ont donc été retenus dans ce projet pour une co-encapulation de la fisétine et d'un agent anticancéreux. De plus, des travaux précédents du laboratoire avaient permis d'établir une

formulation liposomale efficace de fisétine pour une activité anti-angiogénique (Mignet et al., 2012). La composition lipidique de ces liposomes est rapportée dans la Table 6.

Table 6. Composition des liposomes de fisétine d'après la formulation de Seguin et al (Mignet et al., 2012; Seguin et al., 2013).

Composant	Rapport massique	Rapport massique lipidique	Rapport molaire lipidique
Fisétine	3,2	-	-
DOPC	76,9	82,2	87
DODA-Gly-PEG2000	13,2	13,6	4,1
Cholestérol	4	4,1	8,9

3. Le cisplatine

Historiquement, les composés du platine ont souvent été considérés comme un traitement de deuxième ligne dans les astrocytomes de haut grade et ont été administrés aux patients (Dazzi et al., 2000; Grossman et al., 1997; Huncharek and Muscat, 1998). Ils continuent de nos jours à être utilisés, en association, chez les patients en rechute dans l'espoir de prolonger leur survie (Brandes et al., 2004; Y. Wang et al., 2017).

Le cisplatine (Figure 9 ; Table 7) est un agent alkylant possédant une AMM dans le traitement de plusieurs cancers, notamment les CBNPC, le cancer de la vessie, les cancers de l'estomac et de l'œsophage, et les cancers de la tête et du cou. Il s'est montré efficace *in vitro* sur des cellules de GBM (Shang et al., 2015; Taghavi et al., 2013) et *in vivo* administré localement dans la tumeur lors de la chirurgie (Sheleg et al., 2002).

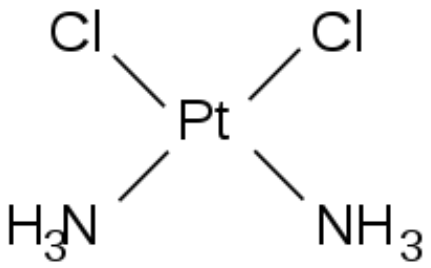


Figure 9. Structure du cisplatine.

Table 7. Propriétés physico-chimiques du cisplatine (drugbank.ca ; Merck Index).

Nom IUPAC	cis-diaminedichloroplatine (II)
CAS	15663-27-1
Formule chimique	$H_6Cl_2N_2Pt$
Masse molaire	300,05 g/mol
Point de fusion	270°C
λmax	n'absorbe pas en UV ni en IR
logP	-2,19
Solubilité dans l'eau	2530 mg/L (à 25 °C)
Solubilité	Insoluble dans les solvants organiques excepté le diméthylformamide

Afin de permettre au cisplatine de traverser la BHE et de réduire sa toxicité vis-à-vis des tissus sains, il a été envisagé d'encapsuler le cisplatine dans des nanovecteurs.

Les effets sur le GBM de plusieurs nanovecteurs de cisplatine ont été étudiés *in vitro* ou *in vivo* sur l'animal :

- Nanoparticules :
    - Des nanoparticules de cisplatine recouvertes de protamine (diamètre 173 ± 7,9 nm) ont permis de distribuer de plus grandes quantités de cisplatine à travers des cellules endothéliales de cerveau de bœuf (*in vitro*) par rapport à une solution de cisplatine et à des nanoparticules de cisplatine non greffées (Dhami et al., 2014);
    - Des nanoparticules de cisplatine recouvertes d'une forte densité de PEG administrées par *convection enhanced delivery* (CED) ont permis d'augmenter de façon significative la survie de rats porteurs d'un gliome implanté de façon orthotopique (C. Zhang et al., 2017).

- Nanotubes protéiques (Thanasupawat et al., 2015) : ils ont permis l'accumulation du cisplatine dans les cellules de GBM et d'induire leur apoptose de façon sélective *in vitro* et *in vivo* chez l'animal *;* cependant ils ont été injecté *in vivo* chez la souris directement dans la tumeur, et le passage de la BHE n'a pas été étudié.
- Nanogels (Baklaushev et al., 2015) : couplés à des anticorps ciblant Cx43 and BSAT1 (fortement exprimés sur la tumeur gliale), ils ont permis l'augmentation de la survie médiane chez la souris après administration intraveineuse par rapport à des nanogels non couplés à un anticorps.
- Nanofibres d'acide poly(lactic-co-glycolic) (PLGA) (Tseng et al., 2015) : conçus pour être implanté directement dans la cavité d'exérèse, ils ont permis la libération prolongée avec maintien d'une concentration constante de cisplatine (et d'autres cytotoxiques) dans cette cavité.
- Liposomes (Yang and Horng, 2013), détaillés ci-dessous.

Des liposomes PEGylés chargés en cisplatine et conjugués à la transferrine ont été testés in vitro par une équipe chinoise (Lv et al., 2013). Le diamètre moyen était de 294 nm, le potentiel zêta de 1,27 mV (neutre) et la concentration en cisplatine de 478 µg/mL. Ces liposomes ont montré un fort effet inhibiteur sur la prolifération des cellules de gliome C6 (concentration inhibitrice médiane quatre fois inférieure à celle du cisplatine non encapsulé), ont pu traverser un modèle cellulaire de BHE (cellules bEnd3 sur un insert de culture pré-enrobé à 2% de gélatine) et ont pu atteindre des cellules de gliome C6 après avoir traversé un modèle cellulaire de BHE (co-culture bEnd3/C6) avec une activité anticancéreuse accrue par rapport au cisplatine non encapsulé et aux liposomes non conjugués chargés en cisplatine.

Une équipe canadienne a étudié différentes voies d'administration du cisplatine non encapsulé, de liposomes de cisplatine (Lipoplatin™) et d'autres composés du platine (oxaliplatine et carboplatine non encapsulés, liposomes d'oxaliplatine) chez des rats portant un modèle de gliome F98 (Charest et al., 2013). Le cisplatine (dose de 3 mg) était le seul médicament à s'accumuler dans le cerveau avec une durée de survie moyenne accrue des animaux après l'administration intraveineuse, mais il présentait une toxicité élevée. Le Lipoplatin™ (3 mg de cisplatine) n'a montré aucune toxicité, mais a nécessité une injection intra-carotidique (accumulation de la formulation multipliée par 153 par rapport à une perfusion intraveineuse) pour observer l'effet anticancéreux. Le diamètre moyen de Lipoplatin™ est de 110 nm (Charest et al., 2012) : malgré sa taille inférieure à 200 nm, il ne pouvait pas s'accumuler de manière importante dans la tumeur cérébrale.

Ces deux essais ont eu des résultats mitigés, et semblent indiquer qu'une stratégie de ciblage actif de la BHE ou du GBM serait nécessaire. Cependant, des liposomes non conjugués à un ligand spécifique ont pu traverser la BHE (Table 2).

De nombreux nanovecteurs ont également été développés pour le cancer du poumon et ont été étudiés *in vitro* et *in vivo* chez l'animal :

- Nanoparticules polymériques :
    - Des nanoparticules d'acide poly(l-glutamique)-g-méthoxy poly(éthylène glycol 5K) de 36,7 ± 8,1 nm encapsulant le cisplatine ont montré une efficacité *in vivo* sur un modèle murin de tumeur du poumon de Lewis plus faible que le cisplatine libre mais avec également une plus faible toxicité et une plus faible accumulation rénale du cisplatine (Shi et al., 2015).
    - Des nanoparticules d'héparine fonctionnalisées par un fragment d'anticorps constitué d'un seul domaine ciblant l'EGFR de 150 ± 10 nm ont permis une meilleure internalisation du cisplatine dans les cellules de carcinome mucoépidermoïde pulmonaire H292, ainsi qu'une meilleure activité cytotoxique par rapport au cisplatine libre. Elles ont également montré une activité anti-tumorale supérieure chez la souris, ainsi qu'une toxicité systèmique réduite (Peng et al., 2011).
    - Des nanoparticules formées par nanoprécipitation d'une prodrogue du cisplatine, le cisplatine conjugué à l'acide folique, et de l'acide oléique conjugué à la transferrine ont permis d'obtenir une efficacité antitumorale *in vivo* supérieure au cisplatine libre et aux nanoparticules non bifonctionnalisées, ainsi qu'une absence de perte de poids des souris, contrairement au cisplatine libre (Tan and Wang, 2018).
- Nanogels : des nanogels cationiques encapsulant le cisplatine ont montré une cytotoxicité équivalent au cisplatine libre *in vitro* sur des cellules de CBNPC (Gonzalez-Urias et al., 2019).
- Liposomes :
    - Des liposomes PEGylés de 174 nm ont permis une activité cytotoxique supérieure au cisplatine libre *in vitro* sur des cellules de CBNPC A549 (Carvalho Júnior et al., 2007).
    - Les liposomes PEGylés thermosensibles de cisplatine associés à de l'hyperthermie locale ont montré une activité antitumorale *in vivo* chez la souris par rapport au cisplatine libre ou au Lipoplatin™ avec ou sans hyperthermie locale et aux liposomes PEGylés thermosensibles non associé à de l'hyperthermie locale (Dou et al., 2016).

Par ailleurs, de nombreux liposomes de cisplatine ont été développés par plusieurs équipes (Table 8). La plupart des formulations présentent une proportion de cholestérol supérieur à 20% pour maintenir le cisplatine dans la cavité aqueuse des liposomes.

Table 8. Compositions lipidiques de liposomes de cisplatine développés par différentes équipes, classés par leur méthode de préparation. PDI : Indice de polydispersité.

Méthode de fabrication	**Composition (rapport molaire)**			**Diamètre après purification en nm (PDI)**	Références
	Phospho-lipide(s)	**Lipide PEGylé**	**Choles-térol**		
Evaporation en phase inverse	44,3*	5,1	50,6	80-160 < 100-140 < 100-120	Brevet WO1998007409 A
	57	5	38	174 (0,03)	(Carvalho Júnior et al., 2007)
	57	5	38	444,5 ± 184,6 (0,589)	(Vieira et al., 2013)
	64	4	32	230	(Lv et al., 2013)
	55	5	40	251.0 ± 12.0 (0.046)	(Ghaferi et al., 2020)
	60	5	35	115,36 ± 4.99	(Toro-Cordova et al., 2018)
Hydratation de film	96,2*	3,8		109,5 ± 9,2	(Dou et al., 2014)
	80	5	15	155,4 ± 16	(Zhou et al., 2015)
	77	-	23		(Shibata et al., 1990)
	90	-	10	100 ± 20	(Zisman et al., 2011)
	87,7	-	12,3	190 - 230	(Liu et al., 2015)
	84*	4	12	110-140 (0,1)	(Catanzaro et al., 2018)
	62,2	4,8	33	133 ± 10 (0,08 ± 0,02)	(Shein et al., 2016)
Emulsion-évaporation	65*	5	30		
	56,3	5,3	38,4	75-125	Brevet US 20140271821 A1
	65	5	30		
Injection éthanolique	56,5*	38,5	5	111,1 ± 2,42 (0,112 ±0,002)	(Marzban et al., 2015)
	51	5	44	132 (0,06)	(Kieler-Ferguson et al., 2017)
	80	5	15	110 (0,06)	
Lyophilisation-réhydratation	54	-	46		(Lee et al., 2002)

* : utilisation de deux phospholipides différents ou plus

Co-encapsulation of flavonoids with anti-cancer drugs: a challenge ahead

Résumé en français :

Les flavonoïdes sont connus pour leurs activités pléiotropiques comme des effets anticancéreux, inhibiteurs de pompes d'efflux et anti-angiogénique qui ont été mis à profit pour une approche combinée avec des anticancéreux dans le traitement du cancer.

Les objectifs de cette revue sont de recenser les travaux ayant développé cette co-encapsulation afin d'étudier les stratégies de formulation, de préparation et de caractérisation des nanoobjets mis au point en parallèle des résultats d'évaluation *in vitro* et *in vivo* réalisés. En effet peu de publications ont détaillé le challenge relevé afin de mettre au point des formulations de nanovecteurs capables de co-encapsuler les deux types de molécules actives, flavonoïdes et anticancéreux, de rester stable au cours du stockage et de libérer en milieu biologique les deux agents tout en maintenant leur rapport pour atteindre un effet synergétique sur des cellules tumorales ou une tumeur.

Cette étude bibliographie est présentée sous la forme d'une revue en cours de rédaction en annexe de la thèse et a été mise à profit dans le développement de ces travaux de thèse.

PARTIE EXPERIMENTALE

Validation des méthodes analytiques permettant la caractérisation des liposomes

1. Introduction

La préparation et l'étude de liposomes encapsulant la fisétine et/ou le cisplatine nécessite la mise au point de méthodes d'analyse robustes et fiables, en particulier pour l'évaluation de l'encapsulation et de la libération de ces principes actifs, afin d'être certain que les phénomènes observés sont bien dus au comportement des liposomes et non à des artéfacts analytiques. Ces méthodes doivent donc être exactes, précises et spécifiques sur un intervalle de concentrations identifié. Les incertitudes liées à ces méthodes d'analyses doivent être étudiées et quantifiées. Trois méthodes de dosage ont donc été développées : dosage de la fisétine, du cisplatine et des lipides.

Concernant la fisétine, plusieurs méthodes de dosage validées par chromatographie liquide haute performance (CLHP) en phase inverse (PI) existent dans la littérature (Novak et al., 2008; Sun et al., 2010), mais aucune ne concerne des formulations liposomales et elles ne tiennent donc pas compte du procédé d'extraction de la fisétine des liposomes. Une méthode de dosage de la fisétine liposomale est décrite par Mignet *et al* mais sans mention de validation (Mignet et al., 2012). L'utilisation d'une méthode chromatographique présente l'avantage de pouvoir évaluer la teneur en fisétine mais aussi d'étudier l'apparition de produits de dégradation. Une méthode d'analyse en CLHP-PI et des procédés d'extraction ont donc été développés et validés.

Concernant le cisplatine, une méthode de d'extraction et de dosage du cisplatine liposomal (SPI-77) dans du plasma humain utilisant la spectrométrie d'absorption atomique de four (SAA) a été validée et publiée par Meerum Terwogt *et al* (Meerum Terwogt et al., 2000). Un transfert analytique de cette méthode a donc été effectué.

Une méthode de dosage des lipides a également été développée à partir des travaux de Hein *et al* (Hein et al., 2016).

2. Matériels et méthodes

2.1. Réactifs

La fisétine (pureté 98%) a été achetée auprès de Shanghai FWD Chemicals Limited (Shanghai, China). Le cisplatine, le cholestérol, l'acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique) (HEPES), l'acide 3-(Trimethylsilyl)propionique-2,2,3,3-d4 (TMSP), la morine, l'acétonitrile (ACN) et le méthanol

ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Missouri, Etats-Unis). La dioleyl-phosphatidylcholine (DOPC), et le 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-2000] (DSPE-PEG2000) ont été achetés auprès de Polar Avanti Lipids, Inc (Coger, Paris, France). Le Dubelcco's modified Eagle's medium (DMEM), le sérum de veau fœtal, la streptomycine et la pénicilline ont été achetés auprès de Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, États-Unis). Le chloroforme, l'éthanol, l'hydroxyde de sodium 1N et le méthanol deutéré (CD_3OD) ont été achetés auprès de Carlo Erba Reagents (Val de Reuil, France). La solution étalon de platine, le triton 100X et l'acide chlorhydrique 37% ont été achetés auprès de VWR Chemicals (Fontenay-sous-Bois, France). L'acide acétique glacial, l'acide perchlorique et l'acide nitrique 65% ont été achetés auprès de Merck Millipore (Darmstadt, Allemagne). L'eau milli Q a été obtenue à l'aide d'un appareil Direct-Q3 de chez Merck Millipore (Darmstadt, Allemagne).

2.2. Préparation des liposomes

Le procédé, à l'exception de l'extrusion, a été réalisé dans un bain chauffant à 40°C. Tous les liposomes ont été préparés en utilisant la méthode d'hydratation du film (Bangham et al., 1965). La DOPC, le cholestérol et le DSPE-PEG2000 ont été dissous dans un mélange chloroforme-éthanol avec ou sans fisétine et introduits dans un ballon à fond rond propre et sec et connectés à un évaporateur rotatif Buchi R-100 équipé d'une pompe V100 et d'un refroidisseur à recirculation F105. Le mélange a été exposé à une pression de départ de 250 mbar puis 100 mbar pour former un film régulier. La pression a ensuite été diminuée pour atteindre la pression de 10 mbar qui a été maintenue pendant trois heures. L'hydratation du film s'est faite par ajout de tampon HEPES (20 mM, pH = 7,4) avec ou sans cisplatine avec une agitation de 60 rpm à l'évaporateur rotatif pendant une nuit. Les suspensions liposomales ainsi obtenues ont été extrudées au travers de membranes en polycarbonate de 0,4 et 0,2 µm (Whatman) trois fois chacune en utilisant un mini-extrudeur (Avanti Polar Lipids, Inc) à température ambiante.

2.3. Dosage de la fisétine

2.3.1. Conditions chromatographiques

La fisétine a été dosée en CLHP-PI à l'aide d'une chaine CLHP Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France) équipée d'une colonne polymérique PRP-1 250*4.6 mm, porosité 5 µm (Nevada, États-Unis) et d'un détecteur UV fixé à 360 nm. L'élution s'est faite en gradient : la phase mobile A consistait en de l'eau acidifiée (acide acétique glacial 2% v/v) et la phase mobile B en de l'ACN. Le gradient utilisé consistait en une période d'équilibration de 3 minutes avec 15% de B, suivi d'un gradient de 15 à 50 % de B sur 3 minutes et d'une phase stationnaire à 50% de B sur 6 minutes avant

de revenir à 15 % de B. Le débit a été fixé à 1 mL/min, le volume d'injection à 10 µL. Les données ont été traitées à l'aide du logiciel Chromeleon® (v 6.8).

2.3.2. Préparation des standards et contrôles qualité pour le dosage de la fisétine liposomale dans le tampon HEPES

Une solution mère de fisétine a été préparée en dissolvant 10 mg de fisétine dans 10 mL de méthanol puis diluée également dans le méthanol pour obtenir des concentrations allant de 1 à 100 µg/mL. L'effet matrice a été étudié en préparant des gammes contenant également la matrice complète (liposomes vides dans un tampon HEPES 20 mM pH = 7,4).

2.3.3. Préparation des standards et contrôles qualité pour le dosage de la fisétine liposomale dans le milieu de culture

La courbe d'étalonnage a été préparée en dissolvant la fisétine dans du méthanol et en la diluant dans du DMEM supplémenté par 2 mg/mL de L-glutamine, 10% de sérum de veau fœtal, 100 µg/mL de streptomycine et 100 UI/mL de pénicilline (DMEM-C) afin d'obtenir une gamme entre 1 et 100 µg/mL. À 100 µL de ces standards ont été mélangés 60 µL de morine méthanolique 0,5 mg/mL utilisée comme étalon interne et 200 µL de méthanol acidifié avec de l'acide perchlorique. Après agitation au vortex pendant 5 minutes, les échantillons ont été placés dans de la glace pendant une heure afin de faire précipiter les protéines puis centrifugés à 10 000 x g à 4°C pendant 10 minutes, et 10 µL du surnageant ont été injectés dans le système CLHP. Le rapport de la surface du pic de fisétine sur la surface du pic de morine a été utilisé pour construire la courbe d'étalonnage.

Les contrôles qualités ont été préparés en suivant le même procédé d'extraction.

2.3.4. Validation de la méthode

La validation de la méthode a été réalisée selon les recommandations ICHQ2R1. La validation de chaque gamme a été réalisée par le passage d'une gamme et de cinq contrôles qualités (n = 3) répétés trois jours de suite afin d'étudier la linéarité, l'exactitude et la fidélité. L'exactitude a été évaluée en calculant les taux de recouvrement (TR) moyen entre les concentrations introduites et les concentrations calculées des contrôles qualités. La fidélité a été évaluée en calculant les coefficients de variation (CV) intra et inter jour des mesures de chaque contrôle qualité. Les limites d'acceptation ont été fixées à $CV_{\text{limite de quantification}}$ de 15% et $CV_{\text{autres points}}$ de 10% pour la matrice liposomale en tampon aqueux et à $CV_{\text{limite de quantification}}$ de 20% et $CV_{\text{autres points}}$ de 15% pour la matrice liposomale en DMEM-C, nécessitant plus d'étapes d'extraction.

2.4. Dosage du cisplatine

2.4.1.Conditions spectroscopiques

Le cisplatine a été dosé par SAA à l'aide d'un Spectrophotomètre à correction Zeeman AA240Z (Agilent Technologies, Santa Clara, Etats-Unis) comme décrit précédemment (Meerum Terwogt et al., 2000). La détection a été réalisée à 265,9 nm avec une bande de 0,2 nm et un courant de 10 mA. Le programme consistait en une phase de séchage de 50 à 250°C, une phase de décomposition à 1400°C, une phase d'atomisation à 2700°C et une phase de nettoyage à 2700°C suivi d'un refroidissement jusqu'à 50°C. Les échantillons étaient diluées dans une solution de chlorure de sodium 0,9% acidifiée par de l'acide chlorhydrique. La solution de modifiant de matrice était une solution de triton 0,1X acidifiée par de l'acide nitrique.

2.4.2.Choix de la gamme

Des gammes de cisplatine ou de platine (de 30,7 à 248,5 ng/mL de cisplatine soit de 20 à 160 ng/mL d'équivalent platine) ont été réalisées soit dans un tampon HEPES 20 mM pH = 7,4, soit dans la matrice complète constituée de liposomes vides dans le tampon décrit précédemment, pour apprécier l'effet matrice. Une gamme de cisplatine dans la matrice complète de 307 à 2485 ng/mL a été comparée à la gamme basse en termes de répétabilité. Chaque gamme a été préparée deux fois et pour chacune, les points ont été dosés en triplicate.

2.4.3.Validation de la méthode

La validation de la gamme a été réalisée par le passage d'une gamme et de trois contrôles qualités (n = 3) effectués trois jours de suite afin d'étudier la linéarité, l'exactitude et la fidélité. Les limites d'acceptation ont été fixées à un $CV_{\text{limite de quantification}}$ de 20% et $CV_{\text{autres points}}$ de 15%.

2.5. Dosage des phospholipides

Le dosage des phospholipides a été réalisé par résonance magnétique nucléaire (RMN) en utilisant le TMSP comme étalon interne (δ = 0 ppm), à l'aide d'une méthode transposée de Hein *et al* (Hein et al., 2016).

2.5.1.Analyses spectrales en RMN

Des mesures de RMN ^{1}H ont été effectuées à l'aide d'un spectromètre RMN Bruker 400 Ultrashield fonctionnant à 400 MHz (Massachusetts, États-Unis). Les échantillons ont été préparés dans le CD_3OD et 64 scans ont été effectués pour chaque mesure. Les données ont été traitées à l'aide du logiciel SpinWorks 3.1. Les pics ont été intégrés et l'aire des pics d'intérêts sélectionnés pour la quantification a été utilisée pour déterminer la concentration lipidique (Figure 10).

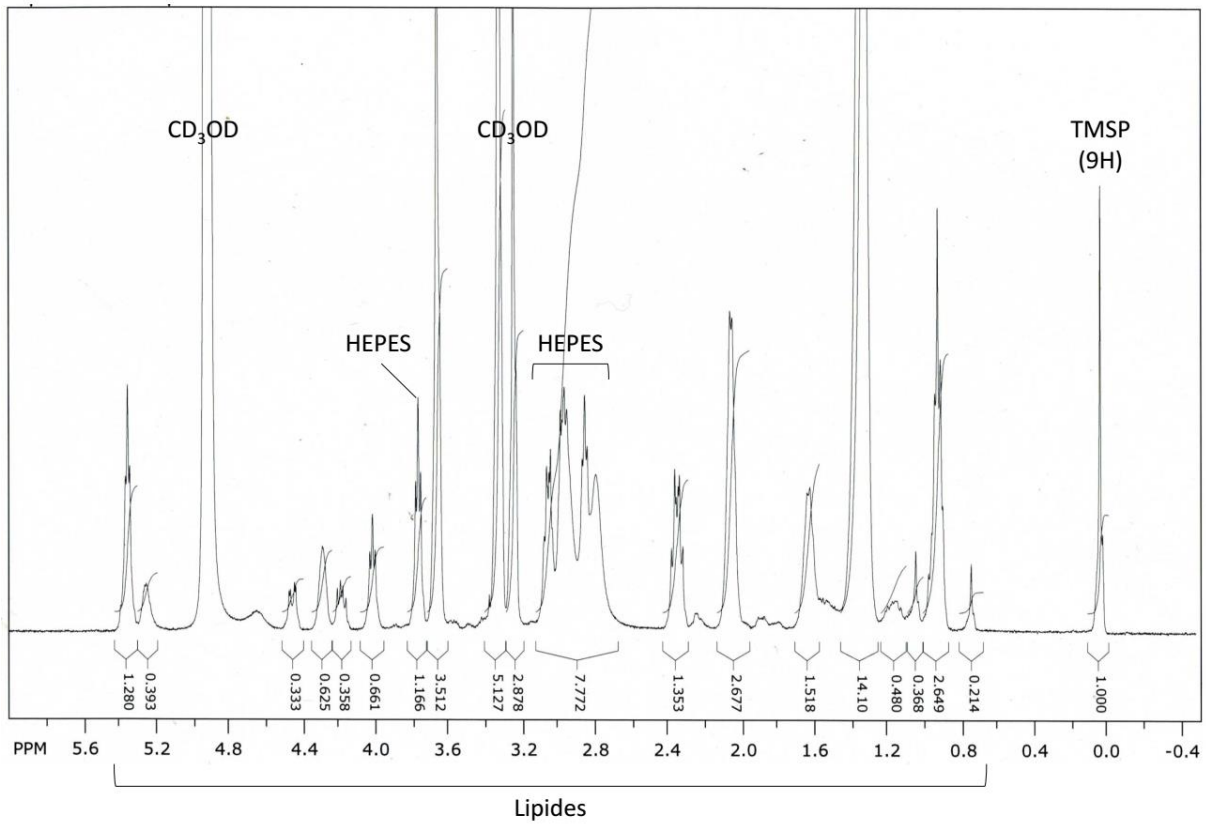


Figure 10. Spectre RMN ^{1}H du mélange d'une suspension liposomale avec l'EI TMSP.

La concentration lipidique (C_L) a été calculée en comparant la surface du pic du TMSP (A_{EI}) (concentration connue C_{EI}) avec celle du pic choisi pour le ou les lipides concernés (A_L) en utilisant l'équation suivante (E1) :

$$C_L = \frac{9A_L C_{EI} V_{EI}}{N_L A_{EI} V_L} \text{ (E1)}$$

Avec V_{EI} le volume d'étalon interne introduit, V_L le volume de solution lipidique introduite, N_L le nombre d'atomes d'hydrogène concernés par le pic et 9 le nombre d'atomes d'hydrogène du TMSP (δ = 0 ppm).

2.5.2.Spectre des composés et choix des pics d'intérêts

Environ 2 mg de DOPC, de DSPE-PEG2000, de cholestérol et de fisétine ont été dissouts séparément dans 600 µL de CD_3OD et analysé en RMN comme décrit dans la section 2.5.1. Les spectres ont été comparés et rapportés à la structure des composés, permettant de choisir des déplacements particuliers utilisables pour la quantification.

2.5.3.Sensibilité de la méthode

Afin d'étudier la sensibilité, des essais ont été réalisés sur la DOPC seule. Une solution stock de DOPC dans du CD_3OD a été préparée puis diluée en plusieurs étapes pour obtenir des quantités de lipides variables, de 0,5 à 2,0 µmol. A chaque échantillon a été rajouté 20 µL d'une solution de TMSP à 50 µmol/mL et du CD_3OD pour obtenir un volume final de 500 µL.

Des essais ont ensuite été réalisés sur un mélange de différents lipides (DOPC, cholestérol, DSPE-PEG2000) correspondant à une formulation liposomale. Les lipides ont d'abord été dissous dans le chloroforme puis mélangés pour obtenir un rapport molaire DOPC/cholestérol/DSPE-PEG2000 de 75,3:20,8:3,9. Une partie de ce mélange a subi une évaporation par l'évaporateur rotatif et a été resolubilisé dans 480 µL de CD_3OD, puis 20 µL de TMSP à 50 µM ont été ajoutés au mélange. L'autre partie a été soumise au procédé de préparation des liposomes décrit en section 2.2. L'eau a ensuite été retirée par lyophilisation de la suspension liposomale à l'aide d'un lyophilisateur Alpha 2-4 LD Christ (Bioblock Scientific, France) ; l'échantillon sec a été solubilisé dans 480 µL de CD_3OD, puis 20 µL de TMSP à 50 µM ont été ajoutés au mélange.

Les concentrations lipidiques ont été calculées selon l'équation E1 et rapportée à la quantité insérée pour obtenir le TR.

3. Résultats et discussion

3.1. Dosage de la fisétine

La longueur d'onde du maximum d'absorption de la fisétine dans le méthanol a été déterminée expérimentalement à 360 nm, et cette longueur d'onde a en conséquence été choisie pour la détection de la fisétine. Les pKa de la fisétine étant respectivement de 7,3, 8,5, 12,2 et 13,8 (Ghosh et al., 2016), la phase mobile devait avoir un pH < 5,3 pour que la fisétine soit sous forme non ionisée. La phase mobile a donc été acidifiée. Dans ces conditions chromatographiques, le temps de rétention de la fisétine était de 8,50 ± 0,02 min (Figure 11).

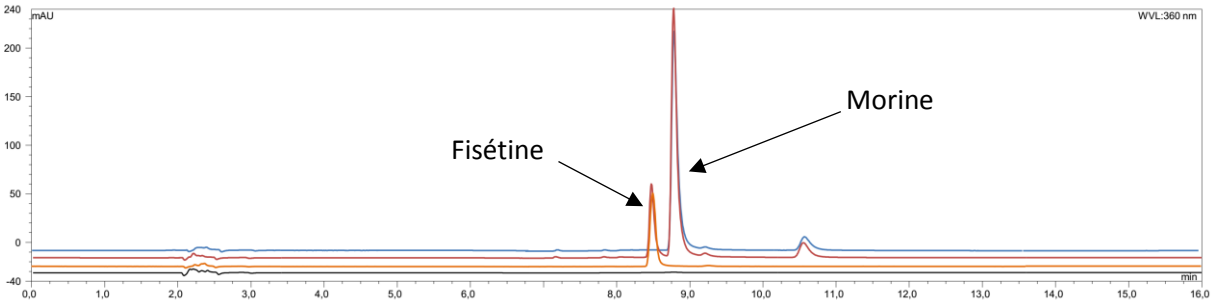


Figure 11. Chromatogrammes de la phase mobile (noir), la fisétine (orange), la fisétine + la morine (rouge) et de la morine (bleu). La fisétine est éluée à 8,50 ± 0,02 min et la morine à 8,80 min ± 0,03.

3.1.1.Dosage de la fisétine liposomale en tampon aqueux

La linéarité de la méthode a été vérifiée de 5 à 100 µg/mL ($Aire = 0{,}17732 \times Concentration + 0{,}85565$, R^2 = 0,999 ± 0,001). Les données de fidélité et d'exactitude sont rapportées dans la Table 9.

Table 9. Précision et exactitude de la méthode de dosage de la fisétine liposomale en tampon aqueux par CLHP-PI.

Concentrations introduites (µg/mL)	Répétabilité intra-jour (CV%)	Répétabilité inter-jour (CV%)	Exactitude (TR%)
1	9,86	42,95	67,26
5	1,13	4,93	89,46
10	3,73	5,18	101,30
50	1,10	1,94	101,37
100	1,74	3,28	98,76

L'effet matrice et le rendement d'extraction de la fisétine des liposomes ont été étudiés en calculant le rendement global par préparation de deux gammes, l'une sans matrice et l'autre avec ajout de la molécule à la matrice liposomale avant extraction, trois jours de suite. Le rapport des pentes était de 1,05 ± 0,05 et la variabilité analytique du rendement d'extraction de 4,52%, indiquant une extraction totale de la fisétine des liposomes. Le chromatogramme de la matrice seule ne présentant pas de pics supplémentaires à 360 nm, et compte-tenu du rapport des pentes et de la variabilité, une gamme matricielle n'a pas été nécessaire.

3.1.2.Dosage de la fisétine liposomale en DMEM-C

L'extraction de la fisétine du liposome dans le DMEM-C a été étudiée avec ou sans utilisation d'un étalon interne.

3.1.2.1. Sans étalon interne

La linéarité de la méthode a été vérifiée de 5 à 100 µg/mL ($Aire = -0{,}370086 \times Concentration + 0{,}826405$, R^2 = 0,999 ± 0,001). Les données de fidélité et d'exactitude sont rapportées dans la Table 10.

Table 10. Précision et exactitude de la méthode de dosage de la fisétine liposomale en DMEM-C par CLHP-PI sans utilisation d'étalon interne.

Concentrations introduites (µg/mL)	Répétabilité intra-jour (CV%)	Répétabilité inter-jour (CV%)	Exactitude (TR%)
1	4,28	40,98	150,65
5	3,30	6,78	100,45
10	7,25	9,08	92,20
50	9,58	11,82	97,67
100	3,75	8,46	100,08

Lors de l'étude du rendement global, le rapport des pentes était de 0,97 ± 0,02 et la variabilité analytique de 1,99%.

3.1.2.2. Avec étalon interne

Pour essayer d'améliorer la répétabilité, l'utilisation d'un étalon interne, la morine, a été investiguée. Le temps de rétention de la morine était de 8,80 min ± 0,03 min (résolution avec le pic de fisétine de 2,3) (Figure 11).

La linéarité de la méthode a été vérifiée de 5 à 100 µg/mL ($\frac{Aire_{fisétine}}{Aire_{morine}} = -0{,}0{,}01585 \times Concentration + 0{,}027162$, R^2 = 0,999 ± 0,001). Les données de fidélité et d'exactitude sont rapportées dans la Table 11.

Table 11. Précision et exactitude de la méthode de dosage de la fisétine liposomale en DMEM-C par CLHP-PI avec utilisation d'étalon interne.

Concentrations introduites (µg/mL)	Répétabilité intra-jour (CV%)	Répétabilité inter-jour (CV%)	Exactitude (TR%)
1	2,06	36,55	160,57
5	3,66	6,45	100,15
10	7,23	9,11	94,48
50	9,86	13,0	94,20
100	2,59	7,55	97,21

L'étalon interne n'a pas apporté d'amélioration en termes de fidélité et d'exactitude. Au vu du rendement global, une gamme non matricielle dans le méthanol s'est révélée suffisante.

Au vu des taux de recouvrement obtenus pour la concentration 1 µg/mL, supérieurs à chaque fois à 15%, les écarts entre les valeurs réelles et les valeurs de la courbe de régression des concentrations inférieures à 5 µg/mL ont été jugés trop important et les extractions de la fisétine des liposomes ont été réalisées dans des conditions analytiques permettant d'obtenir des concentrations de fisétine comprises entre 5 et 100 µg/mL.

3.2. Dosage du cisplatine

3.2.1. Choix de la gamme

La Table 12 présente les TR entre les points de gammes du cisplatine dans la matrice complète et les points de gammes des autres essais : cisplatine dans le tampon HEPES seul, platine dans la matrice complète et platine dans le tampon HEPES seul. Seuls les points de gamme du platine dans le tampon HEPES présentait des TR satisfaisants avec ceux du cisplatine dans la matrice complète (TR moyen compris entre 95 et 105%). Cependant, la répétabilité n'était pas acceptable : les CV de chaque point étaient tous supérieurs à 15%.

Table 12. Taux de recouvrement (TR) des différents points de gamme du cisplatine et du platine dans différentes matrices par rapport à la gamme de cisplatine dans la matrice complète (constituée de liposomes vides dans un tampon HEPES 20 mM pH = 7,4). Chaque gamme a été préparée deux fois et pour chacune les points ont été dosés en triplicate.

	Cisplatine dans la matrice complète	Cisplatine dans tampon HEPES	Etalon platine dans la matrice complète	Etalon platine dans tampon HEPES
Coefficient de détermination	0,9988	0,9960	0,9987	0,9998
TR moyen (%) par rapport au cisplatine dans la matrice		112,4	113,3	103,0
TR (%) min		104,3	105,9	98,6
TR(%) max		126,9	120,8	109,1

Au vu de ces résultats, il a été décidé de continuer avec une gamme réalisée dans la matrice complète. Il a été observé que sur les CV des points les plus faibles de la gamme (30,7 et 61,5 ng/mL) étaient supérieurs à 10% ; cependant, ces valeurs sont très loin des concentrations attendues en cisplatine des liposomes. C'est pourquoi des gammes avec des points de concentrations dix fois supérieurs ont été préparées (n = 3) et les CV de chaque points calculés. Les résultats de répétabilité sont présentés dans la Table 13.

Table 13. Répétabilité des points de gamme de deux gammes de dosage du cisplatine.

Concentration Cisplatine (ng/mL)	CV (%)	Concentration Cisplatine (ng/mL)	CV (%)
30,7	10,8	307	3,0
61,5	10,7	615	3,7
122,9	1,4	1229	3,6
153,6	2,3	1536	3,6
184,4	2,6	1844	3,2
215,1	2,8	2151	3,8
245,8	1,9	2458	3,7

Au vu des CV tous inférieurs à 5% et similaires entre les points, la gamme de dosage avec les hautes concentrations de cisplatine a été choisie. Ceci a également permis de réduire les étapes analytiques.

3.2.2.Validation de la méthode

La gamme de dosage du cisplatine obtenue a été déterminée à l'aide d'une une régression quadratique avec un $r^2 = 0,9999$. Les données de fidélité et d'exactitude sont rapportées dans la Table 14.

Table 14. Précision et exactitude de la méthode de dosage du cisplatine par spectroscopie d'absorption atomique four.

Concentrations introduites (ng/mL)	Répétabilité intrajour (CV%)	Répétabilité inter-jour (CV%)	Exactitude (TR%)
307	6,84	11,74	96,74
1536	3,12	5,51	105,69
2458	1,01	3,41	101,14

La gamme de dosage du cisplatine a donc été validée sur un intervalle de 307 à 2458 ng/mL et les extractions du cisplatine des liposomes ont été réalisées dans des conditions analytiques permettant d'obtenir des concentrations de cisplatine comprises entre 307 et 2458 ng/mL.

3.3. Dosage des phospholipides

3.3.1.Choix des pics d'intérêt

Les spectres RMN ^{1}H des différents composés sont présentés dans la Figure 12. Les pics caractéristiques des lipides envisagés pour la quantification et leur correspondance en nombre d'atomes d'hydrogène sont résumés dans la Table 15. Ces pics ont été choisis de telle sorte qu'ils n'apparaissent pas dans le spectre RMN ^{1}H de la fisétine et du cisplatine. Ainsi, le pic à $\delta = 0,88$ ppm (surligné en bleu, Figure 12) peut être utilisé pour la quantification de l'ensemble des lipides, tandis que le pic à $\delta = 4,44$ ppm (surligné en vert, Figure 12) peut être utilisé pour quantifier uniquement les phospholipides et le pic à $\delta = 0,74$ ppm (surligné en violet, Figure 12) pour quantifier uniquement le cholestérol. En utilisant en plus le pic à $\delta = 5,36$ ppm (surligné en jaune, Figure 12) qui permet de quantifier la DOPC et le cholestérol, il est envisageable de pouvoir remonter à la concentration de chaque lipide.

Table 15. Pics ^{1}H RMN caractéristiques des lipides sélectionnés pour leur quantification.

Déplacement (ppm)	Couleur du pic	DOPC	Cholestérol	DSPEPEG2000	N_L	Calcul de la concentration totale de lipides
0,74	Violet	-	3H (-CH_3)	-	3	Prise en compte du rapport molaire nécessaire
0,88	Bleu	6H (2 –CH_3)	6H (2 –CH_3)	6H (2 –CH_3)	6	Obtenue directement
4,44	Vert	1H	-	1H	1	Prise en compte du rapport molaire nécessaire
5,36	Jaune	4H (2 H=H)	1H	-	4 ou 1 prise en compte du rapport molaire nécessaire	Prise en compte du rapport molaire nécessaire

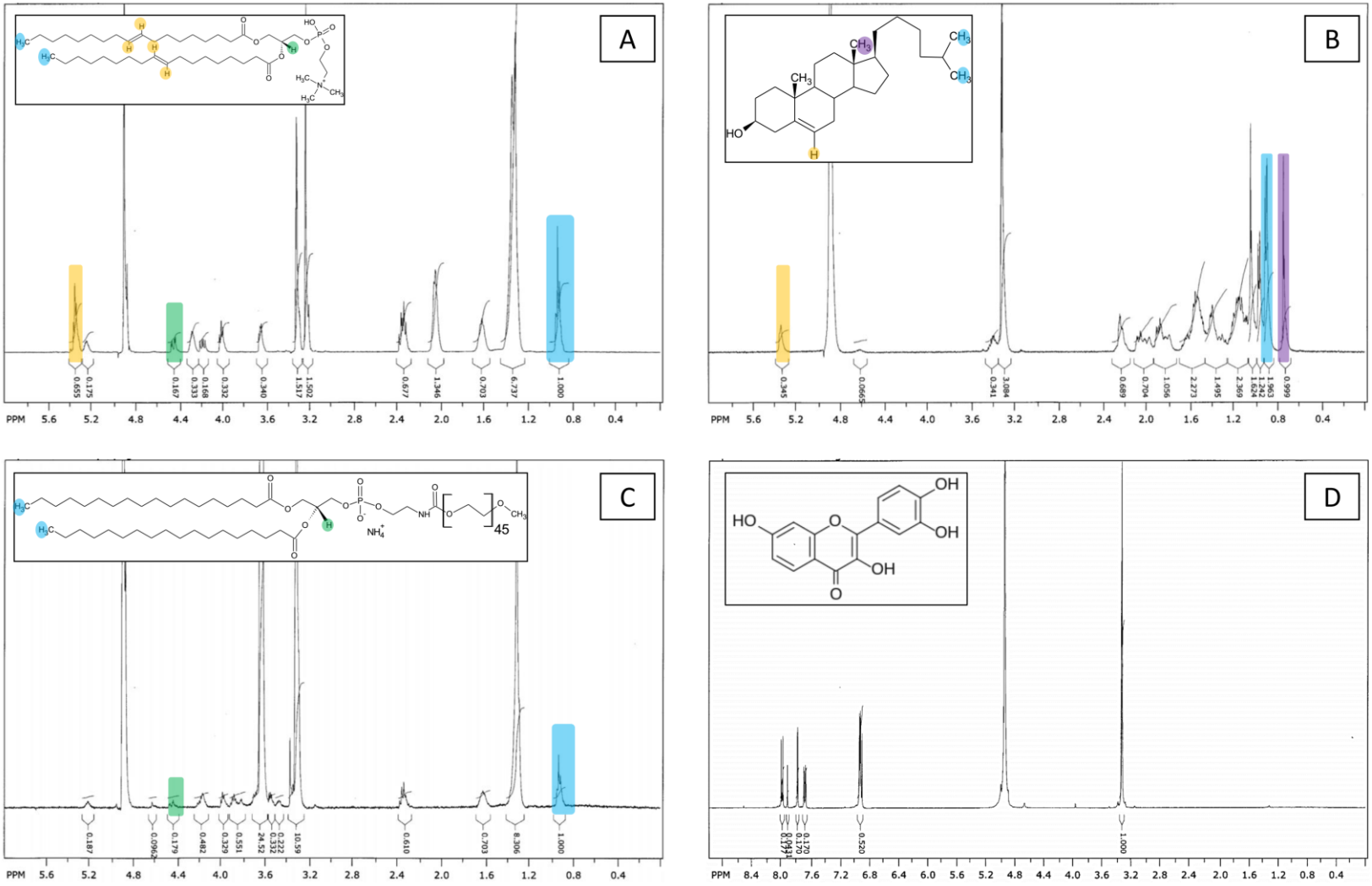


Figure 12. Spectres ^{1}H RMN de la DOPC (A), cholestérol (B), DSPE-PEG2000 (C) et de la fisétine (D).

3.3.2.Sensibilité de la méthode

Les TR des concentrations calculées à partir des déplacements δ = 0,88 ppm, δ = 4,44 ppm et δ = 5,36 ppm en comparaison avec les concentrations introduites sont présentés dans la Figure 13. Pour 0,5 µmol et 1 µmol de DOPC introduite, les concentrations calculées en utilisant les déplacements δ = 0,88 ppm et δ = 0,44 ppm se sont révélées bien supérieures aux concentrations introduites (TR > 120% ; Figure 13). Pour ces déplacements, la limite de quantification de la méthode est donc de 1,5 µmol de DOPC introduite, car en dessous, il y a une surestimation de la quantité de DOPC. Cette limite est donc supérieure à celle estimée par Hein *et al* (Hein et al., 2016) qui est de 65 nmol. L'utilisation du déplacement δ = 5,36 ppm permet une meilleure sensibilité car tous les TR sont compris entre 90% et 110%. Cependant, cela nécessite l'hypothèse d'une conservation des rapports molaires lipidiques lors du procédé de préparation, car il correspond à 4H pour la DOPC et 1H pour le cholestérol.

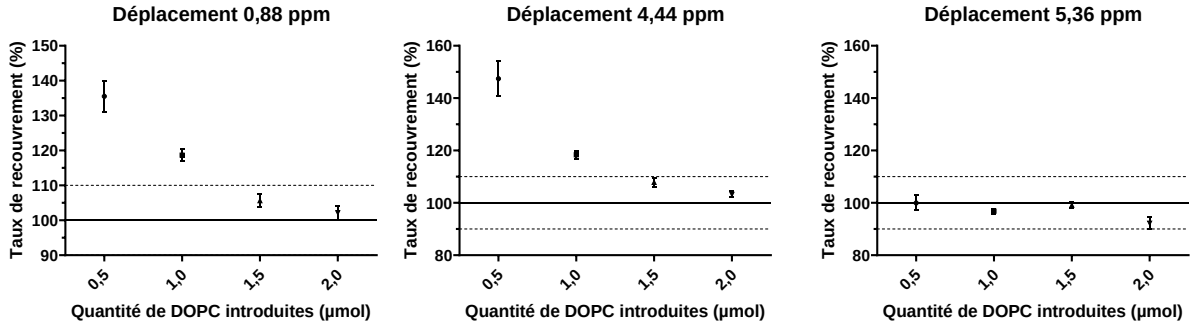


Figure 13. Taux de recouvrement des concentrations mesurées de DOPC mesurées par ^{1}H RMN en fonction des déplacements considérés. Les lignes en pointillés représentent les seuils d'acceptation fixés à ± 10%.

Les essais ont ensuite été faits sur un mélange complexe de lipides et sur des liposomes, avec introduction de 2 µmol de lipides. Les résultats sont présentés dans la Figure 14.

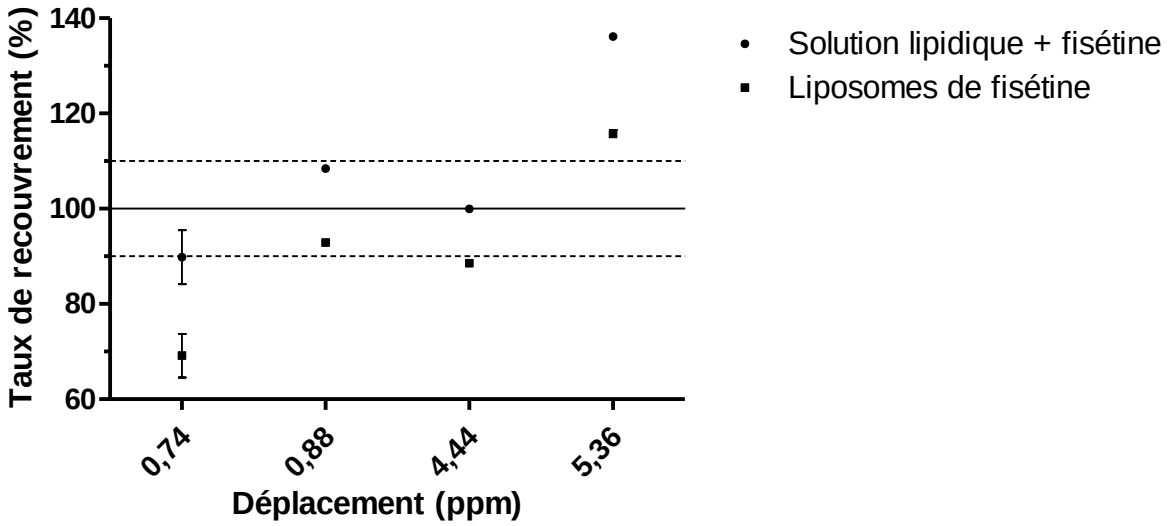


Figure 14. Taux de recouvrement des concentrations de lipides totaux mesurées par ^{1}H RMN en fonction des déplacements considérés. Les lignes en pointillés représentent les seuils d'acceptation fixés à ± 10%.

L'utilisation des déplacements δ = 0,88 ppm, δ = 4,44 ppm et δ = 0,74 ppm permettent d'obtenir des recouvrements de 100 ± 10%. L'utilisation du déplacement δ = 5,36 ppm surévalue la concentration de lipides contrairement aux résultats obtenus pour la DOPC seul. Une hypothèse est que la méthode de calcul nécessitant de prendre en compte les rapports molaires de cholestérol (1H) et DOPC (4H) introduits, si le rapport molaire n'est pas conservé au cours du procédé de préparation le résultat ne peut être fiable.

Le pic à 0,88 ppm a donc été choisi parmi ces options car il correspond à deux -CH_3 terminaux sur tous les lipides et ne montre aucun chevauchement avec les autres composants de la suspension liposomale. Ainsi, la teneur totale en lipides peut être déterminée en s'affranchissant d'un éventuel rapport molaire lipidique non conservé. Il est à noter que la limite de quantification est fixée à 1,5 µmol de lipides.

4. Conclusion

Trois méthodes d'analyses ont été validées : une méthode de quantification de la fisétine liposomale en tampons aqueux ou en milieu contenant 10% de sérum de veau fœtal par CLHP couplée à une détection UV, une méthode de quantification du cisplatine liposomal en tampon aqueux et une méthode de quantification des lipides totaux par RMN ^{1}H. Pour chacune, les limites de quantification ont été définies expérimentalement afin de déterminer la préparation optimale des échantillons.

Elles seront appliquées à la fisétine et au cisplatine encapsulés dans les liposomes, permettant une caractérisation fiable des systèmes, une compréhension de leur comportement et ainsi la validation de nos objets d'étude.

5. Bibliographie

Se reporter à la section Références, page 159.

Etude préliminaire : optimisation du procédé de préparation des liposomes

1. Introduction

Un nanomédicament est un médicament dont une des dimensions est de l'ordre du nanomètre ; c'est un principe actif encapsulé et véhiculé par une forme galénique spécifique : un nanovecteur (Couvreur, 2010). Les liposomes sont les nanomédicaments les plus développés et plusieurs formulations sont autorisées par l'EMA et la FDA (Bulbake et al., 2017). La première formue mise sur le marché en 1995 est la doxorubicine liposomale (Doxil®) (Barenholz, 2012). Récemment, une formulation liposomale co-encapsulant la daunorubicine et la cytarabine (ratio 1 :5) pour lutter contre la leucémie aigüe myéloïde (Vyxeos® liposomal) ainsi qu'une formulation liposomale encapsulant le patisiran, un ARN interférent induisant la dégradation de l'ARNm codant pour la protéine transthyrétine, pour lutter contre l'amylose à transthyrétine héréditaire (Onpattro®), ont obtenu leur autorisation de mise sur le marché (Anselmo and Mitragotri, 2019).

De nombreuses méthodes de préparation des liposomes ont été mises au point (Hendricks et al., 2015; Mozafari, 2005) ; les deux principalement utilisées sont la méthode d'hydratation de film dite « de Bangham » (Bangham et al., 1965) et l'injection éthanolique (Batzri and Korn, 1973). Parmi les nombreux critères de qualité requis pour les nanomédicaments (taille, polydispersité, charge, taux d'encapsulation, stabilité, biocompatibilité) (Dailey, 2018), la taille ressort comme un critère essentiel à contrôler. En effet elle détermine le devenir du nanomédicament *in vivo*, notamment sa capacité à échapper à l'opsonisation (Harashima et al., 1994; Woodle, 1995) ou à franchir des barrières, comme la barrière hémato-encéphalique (diamètre inférieur à 200 nm) (Karim et al., 2016). C'est pourquoi nous avons choisi le critère du diamètre hydrodynamique associé à la polydispersité (PDI) de la suspension pour optimiser notre procédé de préparation. Mignet *et al* avaient déjà investigué la méthode de préparations des liposomes de fisétine (Mignet et al., 2012) en concluant à la nécessité de formation d'un film lipidique. La précipitation de la fisétine lors des procédés d'injection éthanolique ou de sonication avait été mise en évidence. Cependant, les procédés d'hydratation du film lipidique, ainsi que les procédés de calibration de la taille n'avait pas été étudiés. Le film lipidique était hydratée durant une nuit entière et la suspension liposomale extrudée à travers des membranes de 0,8, 0,4 et 0,2 µm.

Dans cette étude préliminaire, nous avons voulu comparer plusieurs méthodes d'hydratation du film afin de pouvoir sélectionner plus rapidement les formulations, et nous avons voulu optimiser la méthode de calibration de taille des suspensions liposomales. Ces essais ont été réalisés sur des liposomes vides en utilisant le critère de taille associé à celui de polydispersité. Lorsque plusieurs méthodes se sont révélées satisfaisantes, nous avons préparé des liposomes encapsulant la fisétine afin d'évaluer le risque de la précipitation de la fisétine et la faisabilité du procédé. La revue de littérature a montré la nécessité d'une forte proportion de cholestérol pour les liposomes encapsulant le cisplatine (Table 8). Or, les liposomes de fisétine développés par Mignet *et al* comportent une faible proportion de cholestérol (Table 6). C'est pourquoi une formulation contenant une proportion intermédiaire de cholestérol a servie pour l'optimisation du procédé. Nous avons ensuite étudié la stabilité de taille et de la polydispersité de six formulations liposomales vides différentes préparées et calibrées *via* notre procédé optimisé afin d'évaluer l'effet de la composition lipidique sur le diamètre des liposomes.

2. Matériels et méthodes

2.1. Réactifs

La fisétine (pureté 98%) a été achetée auprès de Shanghai FWD Chemicals Limited (Shanghai, China). Le cholestérol et l'acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique) (HEPES), ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Missouri, Etats-Unis) et le dioleyl-phosphatidylcholine (DOPC) auprès de Polar Avanti Lipids, Inc (Coger, Paris, France). Le chloroforme, l'éthanol et l'hydroxyde de sodium 1N ont été achetés auprès de Carlo Erba Reagents (Val de Reuil, France). L'eau milli Q a été obtenue à l'aide d'un appareil Direct-Q3 de chez Merck Millipore (Darmstadt, Allemagne). Le (2-dioctadecylcarbamoylmethoxyacetylamino) acetic acid-(ω-methoxy)-polyethyene glycol 2000 ester (DODA-Gly-PEG2000) a été synthétisé comme décrit précédemment (Mignet et al., 2012).

2.2. Préparation des liposomes

Le procédé a été réalisé dans un bain chauffant à 40°C. Tous les liposomes ont été préparés en utilisant la méthode d'hydratation du film (Bangham et al., 1965). La DOPC, le cholestérol et le DODA-Gly-PEG2000 ont été dissous dans un mélange chloroforme-éthanol avec ou sans fisétine et introduits dans un ballon à fond rond propre et sec et connectés à un évaporateur rotatif Buchi R-100 équipé d'une pompe V100 et d'un refroidisseur à recirculation F105. Le mélange a été exposé à une pression de départ de 250 mbar puis 100 mbar pour former un film régulier. La pression a ensuite été diminuée pour atteindre la pression de 10 mbar qui a été maintenue pendant trois heures. Le film lipidique a ensuite été hydraté par un tampon HEPES (20 mM, pH = 7,4) sous agitation.

2.3. Détermination de la taille et de la polydispersité des liposomes

Le diamètre hydrodynamique et l'indice de polydispersité (PDI) des liposomes ont été déterminés après dilution dans du tampon HEPES à une concentration lipidique d'environ 0,5 mg/mL par diffusion dynamique de la lumière (DLS) en utilisant un Zeta Sizer NanoSeries Malvern (Malvern Instrument, Venissieux, France). Les valeurs de diamètre hydrodynamique rapportées sont les diamètres calculés à partir des pics obtenus calculés par l'intensité du signal.

2.4. Hydratation du film lipidique

L'influence du temps d'hydratation et de la vitesse d'agitation sur la taille des liposomes a été étudiée sur des liposomes vides (rapport molaire DOPC/cholestérol/DODA-Gly-PEG2000 75,3:20,8:3,9). Les critères de taille et PDI retenus ont été un diamètre inférieur à 200 nm et un PDI < 0.2. Les procédés optimisés sur les liposomes vides ont ensuite été testés sur des liposomes de même composition lipidique encapsulant la fisétine.

Après formation du film lipidique, celui-ci a été hydraté par du tampon HEPES (20 mM, pH = 7,4) selon trois procédés différents : agitation à 60 rpm pendant 3 heures en utilisant un évaporateur rotatif Buchi R-100, agitation à 500 rpm pendant 3 heures à l'agitateur magnétique et agitation à 1800 rpm pendant 5 minutes par vortex. La taille et la polydispersité des liposomes après 5 minutes ou 0,25, 0,5, 1, 2 et 3 heures a été étudiée après extrusion de la suspension liposomale.

2.5. Calibration de la taille des liposomes

Les essais de calibration de taille ont été réalisés sur des liposomes vides (rapport molaire DOPC/cholestérol/DODA-Gly-PEG2000 75,3:20,8:3,9). Les critères de taille et PDI retenus ont été un diamètre inférieur à 200 nm et un PDI inférieur à 0.2 (Karim et al., 2016). La présence d'agrégats a été évaluée par l'apparition d'une deuxième population en DLS.

2.5.1.Calibration de la taille par extrusion

L'extrusion des suspensions liposomales a été effectuée au travers de membranes de polycarbonates de porosité 0,4 et 0,2 µm (Whatman, GE Healthcare Life Science, Maidstone, Royaume-Uni) à l'aide d'un mini-extruder (Avanti Polar Lipids, Inc, Alabaster, Etats-Unis). L'influence du nombre de passages au travers des membranes ainsi que la combinaison des deux tailles de pores a été étudiée en termes de diamètre hydrodynamique et de PDI mesurés comme décrit en section 2.3.

2.5.2.Calibration de la taille par microfluidiseur

La calibration de la taille des liposomes par microfluidisation (homogénéisation haute pression) a été effectuée par un microfluidiseur Lv1 (Microfluidics, Westwood, Etats-Unis) : 1, 2, 5 ou 10 passages ont

été effectués à 1500 psi ou à 3300 psi. L'influence du nombre de passages et de la pression de travail a été étudiée en termes de taille et de PDI mesurés comme décrit en section 2.3.

2.6. Influence de la formulation lipidique sur la taille et la stabilité des liposomes vides

Plusieurs formulations contenant des rapports croissants de cholestérol et/ou de DODA-Gly-PEG2000 (Table 16) ont été préparées comme décrit en section 2.2 et ont été hydratées et extrudées selon le procédé optimal déterminé (n = 3). Les liposomes vides ont été extrudés au travers de membranes de polycarbonates à 0,4 et 0,2 µm à l'aide d'un mini-extruder mais n'ont pas eu besoin de subir une étape de purification.

Table 16. Composition lipidique des différentes formulations testées, exprimée en pourcentage molaire.

	Augmentation du cholestérol					Augmentation du DODA-Gly-PEG200		
Composition	**F1**	**F2**	**F3**	**F4**	**F5**	**F6**	**F7**	**F8**
DOPC	87,0	82,9	79,0	75,3	66,7	73,0	66,5	76,0
Cholestérol	8,9	13,0	17,0	20,8	29,6	21,5	9,7	8,5
DODA-Gly-PEG2000	4,1	4,1	4,0	3,9	3,7	5,5	23,8	15,5

Le diamètre hydrodynamique et le PDI ont été déterminés à J0. Les suspensions liposomales ont été conservées à 5°C ± 3°C et une étude de stabilité a été réalisée en mesurant régulièrement le diamètre hydrodynamique et le PDI des échantillons sur 30 jours.

3. Résultats et discussion

3.1. Optimisation du procédé de préparation des liposomes

Nous avons d'abord du sélectionner un processus de préparation. Plusieurs méthodes sont habituellement utilisées pour préparer les liposomes. L'injection éthanolique n'a pas été prise en compte car des travaux antérieurs ont écartés cette méthode de préparation qui provoquait la précipitation de la fisétine (Mignet et al., 2012). Ils ont également montré que la méthode d'homogénéisation et la méthode de sonication par ultrasons, qui sont des méthodes attrayantes ne nécessitant pas de solvant organique, ont conduit à des suspensions non homogènes et à l'agrégation de la fisétine (Mignet et al., 2012). Par conséquent, la méthode d'hydratation de film lipidique avait été choisie. L'hydratation avait été réalisée à l'évaporateur rotatif pendant une nuit et les suspensions

liposomales ont dues être extrudées au travers de membrane de polycarbonate 0,8, 0,4 et 0,2 µm, sans mention du nombre de passages à travers chaque membrane.

Les influences de la méthode d'hydratation, du temps d'hydratation et de la méthode de calibration de taille ont été étudiées dans cette étude pour optimiser la durée du processus.

3.1.1. Influence de la méthode d'hydratation

La taille et le PDI des suspensions liposomales en fonction de la durée et du type d'agitation sont présentés dans la Table 17. Ces résultats sont ceux obtenus après une étape d'extrusion car quelles que soient les méthodes d'hydratation, le diamètre et le PDI étaient supérieurs à 1000 nm et 0,60 respectivement sans calibration de taille. L'extrusion a été réalisée au travers de membrane de 0,8, 0,4 et 0,2 µm comme décrit précédemment, le nombre de passages au travers de chaque membrane fixé à 10 arbitrairement.

Une hydratation de minimum 3 heures a été nécessaire pour atteindre un diamètre des liposomes inférieur à 200 nm. L'hydratation par agitation magnétique a produit des liposomes de plus grande taille que la méthode d'évaporation rotative après 1 à 3 heures d'hydratation.

Table 17. Effets du type et de la durée d'hydratation sur la taille et la polydispersité (PDI) des liposomes vides. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne ± écart-type.

Temps d'hydratation	Agitation magnétique (500 rpm) (n = 2)		Evaporateur rotatif (60 rpm) (n = 2)	
	Diamètre (nm)	PDI (nm)	Diamètre (nm)	PDI (nm)
30 min	216 ± 19	0,20 ± 0,02	223 ± 15	0,22 ± 0,03
1h	210 ± 16	0,19 ± 0,02	198 ± 15	0,18 ± 0,03
2h	215 ± 21	0,19 ± 0,02	192 ± 11	0,18 ± 0,03
3h	196 ± 9	0,16 ± 0,02	183 ± 7	0,16 ± 0,04

De plus, l'hydratation par agitation magnétique ne permet pas de modifier l'inclinaison du ballon. Or, la solubilité de la fisétine dans l'éthanol et le chloroforme étant inférieure à celles des lipides, les volumes de solvant introduits dans le ballon avant évaporation ont donc été supérieurs au volume d'hydratation dès lors que la fisétine a été inclue dans la préparation. L'hydratation par agitation magnétique n'a donc pas été retenue car elle ne permettait pas de récupérer tout le film lipidique. L'inclinaison changeante du ballon sur l'évaporateur rotatif a permis de s'affranchir de ce problème.

Afin de réduire la durée d'hydratation, une troisième méthode rapide par vortex 1800 rpm pendant 5 minutes a été envisagée : les résultats sont présentés dans la Table 18.

Table 18. Comparaison de l'hydratation avec agitation par évaporateur rotatif ou par vortex. PDI = indice de polydispersité. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne ± écart-type.

	Evaporateur rotatif 60 rpm 3 heures	Vortex 1800 rpm 5 min	Mann-Whitney
n	3	3	
Diamètre (nm)	174 ± 5	184 ± 7	p = 0,2 (NS)
PDI	0,13 ± 0,01	0,13 ± 0,01	p = 1,0 (NS)
Agrégats	absence	absence	

L'agitation par évaporateur rotatif 60 rpm pendant 3 heures et par vortex 1800 rpm pendant 5 minutes ont conduit à des résultats similaires et satisfaisants en termes de taille et de PDI. Cependant, lorsque l'agitation par vortex a été testée sur des liposomes encapsulant la fisétine, cela a conduit à la sortie de la fisétine du liposome et à sa précipitation. L'hydratation à l'évaporateur rotatif pendant 3 heures a donc été choisie pour la suite des essais. Cependant, en fonction de la concentration lipidique insérée au départ, cette durée a pu être allongée pour s'assurer de remettre en suspension tout le film lipidique.

3.1.2. Influence de la méthode de calibration de tailles

L'étape de calibration de taille ne pouvait être évitée car les liposomes obtenus directement après l'hydratation avaient un diamètre moyen supérieur à 1000 nm et un PDI élevé ; de plus, au moins deux populations ont été observées à chaque fois. Ces valeurs sont supérieures aux critères de qualité définis : population monodisperse et diamètre < 200 nm. L'extrusion au travers de membranes de polycarbonate a mené à des résultats satisfaisants en termes de diamètre et de PDI uniquement si les deux types de membranes (0,4 et 0,2 µm) étaient utilisés l'une après l'autre. Trois passages successifs sur chaque type de membranes se sont révélés suffisants pour obtenir un diamètre inférieur à 200 nm et un PDI inférieur à 0,2. Pour limiter la perte du médicament encapsulé, l'extrusion à travers des membranes de 0,4 µm seulement a été envisagée mais ne permettaient pas d'obtenir des tailles inférieures à 200 nm tandis que l'utilisation de membranes 0,2 µm seules ne permettaient pas de s'affranchir de la présence d'agrégats (Table 19).

Table 19. Influence de la taille de la membrane d'extrusion et du nombre de passages à travers ces membranes sur la taille et la polydispersité (PDI) des suspensions liposomales. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne ± écart-type.

	Non extrudé	Membrane 0,2	Membrane 0,2	Membrane 0,4	Membrane 0,4	Membrane 0,4 puis 0,2	Membrane 0,4 puis 0,2
Nombre de passages	0	4	10	4	10	10 pour chaque	3 pour chaque
n	6	2	3	1	2	2	3
Taille (d.nm)	3111 ± 1135	278 ± 26	212 ± 10	439 ± 55	364 ± 53	**182 ± 10**	**175 ± 5**
PDI	0,98 ± 0,06	0,29 ± 0,07	0,17 ± 0,03	0,63 ± 0,04	0,50 ± 0,07	**0,17 ± 0,01**	**0,13 ± 0,01**
Agrégats	3 sur 18 mesures	4 sur 6	5 sur 9	3 sur 3	3 sur 6	**0 sur 6**	**0 sur 6**

L'utilisation d'un microfluidiseur nous a paru être intéressante car il s'agit d'un processus permettant l'agrandissement d'échelle. Cependant, la calibration par microfluidisation n'a pas permis d'obtenir des suspensions homogènes dans les conditions testées ($PDI_{1500psi}$ = 0,298 ± 0,074 et $PDI_{3300psi}$ = 0,307 ± 0,069) (Figure 15). De plus, nous avons observés lors de son utilisation l'apparition de particules noires malgré l'utilisation d'un bain de glace (probable dégradation des lipides, le processus de microfluidisation dégageant une forte chaleur) ce qui a conduit à l'arrêt des essais sur cette méthode de calibration.

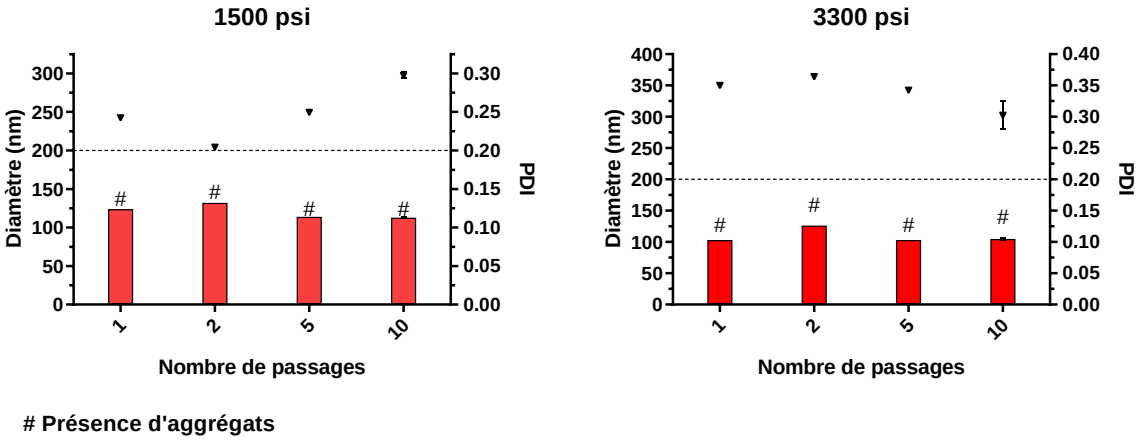


Figure 15. Influence de la pression appliquée et du nombre de passages sur le diamètre (barre rouge) et la polydiseprsité (PDI) (points) des suspensions liposomales.

La méthode de calibration de taille choisie a donc été l'extrusion successive au travers de membranes de 0,4 et 0,2 µm trois fois chacune.

Le procédé de préparation optimisé des liposomes est rapporté dans la Figure 16.

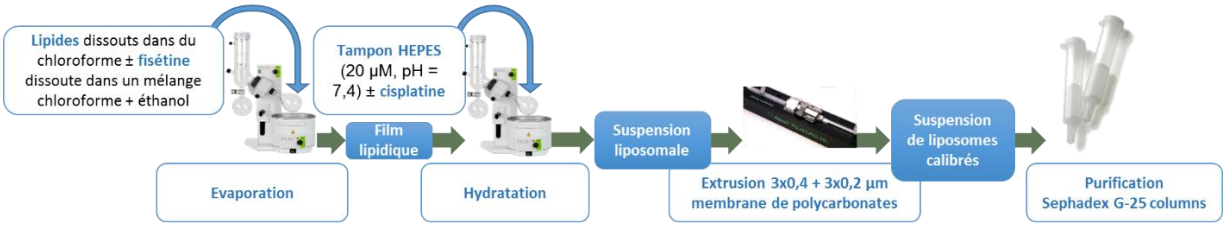


Figure 16. Procédé optimisé de préparation de liposomes par la méthode d'hydratation de film.

3.2. Influence du rapport lipidique sur la taille et la polydispersité de formulations liposomales vides

La composition lipidique de la formulation etait un facteur important à prendre en compte. Le défi galénique du projet consistait en l'optimisation de la proportion de cholestérol. En effet, la fisétine étant hydrophobe, l'hypothèse de son encapsulation au sein de la bicouche lipidique a été émise : la seule formulation liposomale de fisétine rapportée présentait un rapport molaire cholestérol/DOPC peu élevé (Mignet et al., 2012; Seguin et al., 2013). Une plus haute proportion de cholestérol pourrait entraîner une compétition entre celui-ci et la fisétine au sein de la bicouche lipidique. Cependant, la plupart des formulations liposomales de cisplatine ont des rapports molaires cholestérol/phospholipides supérieurs (Table 8) (Carvalho Júnior et al., 2007; Lee et al., 2002; Liu et al., 2015; Lv et al., 2013; Stras et al., 2016; Zhou et al., 2015) : le cholestérol semble nécessaire pour prévenir la fuite de cisplatine en rigidifiant la bicouche lipidique. Ainsi, le rapport molaire cholestérol/phospholipides optimal devait être le résultat d'un compromis entre l'encapsulation de la fisétine et la prévention de la fuite du cisplatine hors du liposome. Des formulations avec des rapports molaires cholestérol/DOPC croissants ont donc été testées (Table 16).

Des lipides PEGylés ont été ajoutés pour éviter l'opsonisation *in vivo*. En effet, les liposomes doivent avoir un long temps de circulation plasmatique pour augmenter leur distribution intracérébrale (Karim et al., 2016). Comme certaines formulations de cisplatine liposomal avaient une proportion élevé de phospholipides PEGylés, des proportions plus élevés de lipides PEGylés ont également été testées (Marzban et al., 2015). Cependant, les formulations 7 et 8 contenant cette plus haute proportion de lipides PEGylés ont conduit à la formation de films inhomogènes et ont été écartées de la suite des essais (Figure 17).



Figure 17. Aspect d'un film lipidique contenant un fort pourcentage molaire de DODA-Gly-PEG2000.

Toutes les formulations (1 à 6) ont conduit à des tailles satisfaisantes pour une administration intraveineuse et un passage de la BHE (diamètre inférieur à 200 nm et PDI inférieur à 0,2) (Table 20). Il n'a pas été mis en évidence de différence ni de tendance en terme de taille et de PDI des suspensions liposomales (test de Kruskal-Wallis non significatif).

Table 20. Influence de la composition lipidique sur la taille et la polydispersité (PDI) des liposomes (n = 3). Les résultats sont présentés sous la forme moyenne ± écart-type.

DOPC/Chol/DODA-Gly-PEG2000 (pourcentage molaire) [F]	Diamètre (nm)	PDI
87,0/8,9/4,1 [F1]	166 ± 2	0,11 ± 0,02
82,9/13,0/4,1 [F2]	165 ± 10	0,09 ± 0,06
79,0/17,0/4,0 [F3]	159 ± 7	0,10 ± 0,02
75,3/20,8/3,9 [F4]	169 ± 4	0,12 ± 0,01
66,7/29,6/3,7 [F5]	162 ± 5	0,09 ± 0,03
73,0/21,5/5,5 [F6]	166 ± 11	0,17 ± 0,03

Une étude de stabilité de la taille et du PDI de chaque formulation a été réalisée sur 30 jours et a montré que suspensions liposomales étaient physiquement stable sur un mois, quelle que soit la formulation (Figure 18).

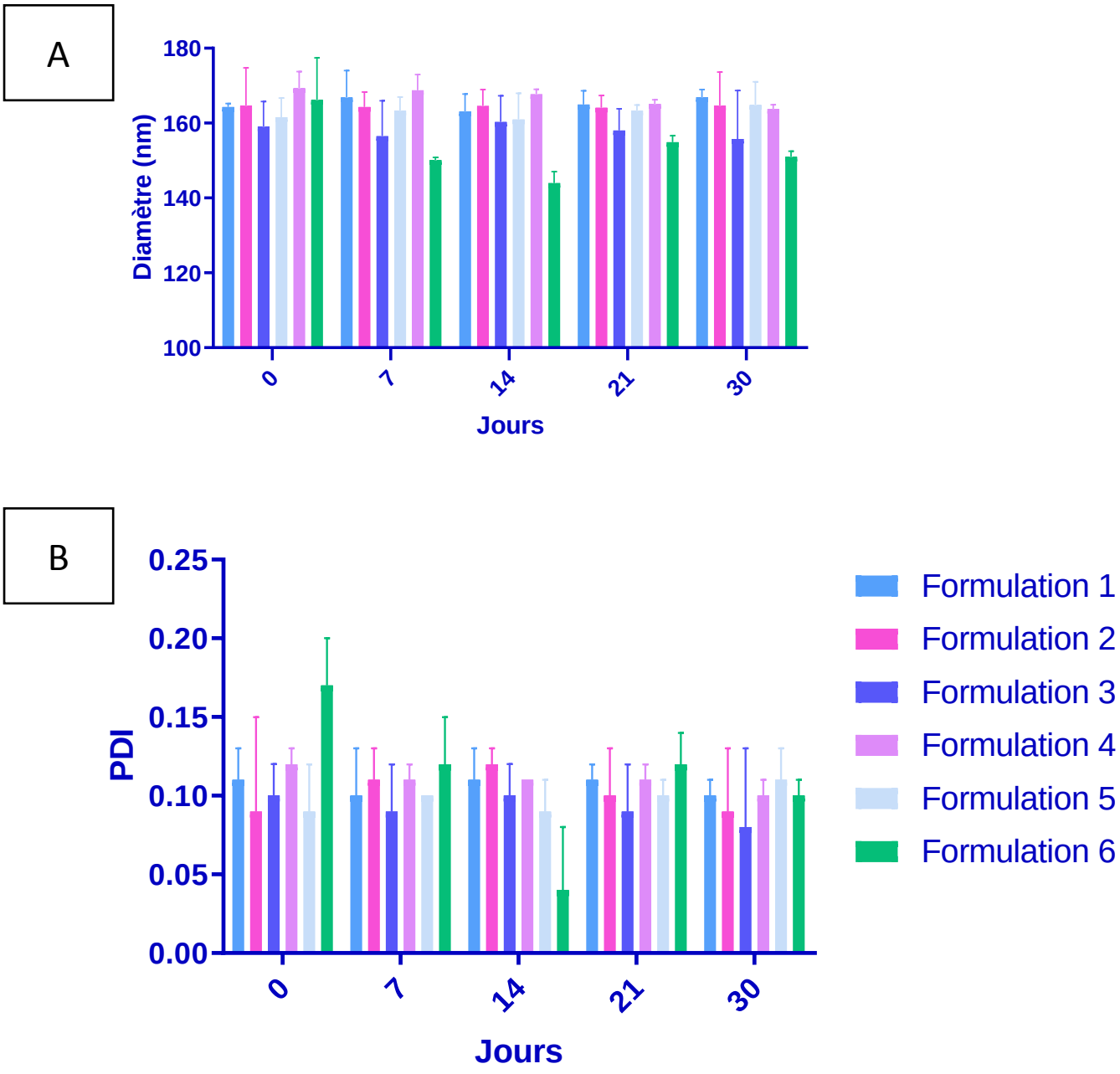


Figure 18. Stabilité du diamètre hydrodynamique (A) et de la polydispersité (B) sur 30 jours de 6 formulations de liposomes vides (n = 3). Pour chaque formulation et chaque temps, la taille et le PDI ont été comparé aux valeurs de J0 à l'aide d'un test de Wilcoxon : aucune variation n'a été retrouvée significative.

L'augmentation du rapport molaire cholestérol/DOPC n'a pas eu d'influence sur le diamètre hydrodynamique et le PDI des liposomes. La co-encapsulation de la fisétine et du cisplatine dans des liposomes nécessitant un compromis entre l'incorporation de la fisétine dans la bicouche lipidique et la prévention de la fuite du cisplatine hors des liposomes, trois rapports molaires lipidiques différents avec une proportion de cholestérol croissante (F3, F4 et F5), ont donc été choisis pour étudier l'influence de la proportion de cholestérol sur l'encapsulation de la fiséitne et du cisplatine (Article 1).

4. Conclusion

En résumé, la nécessité d'une réhydratation du film douce à 60 rpm s'est avérée nécessaire pour encapsuler la fisétine, l'apport de plus d'énergie conduisant à sa précipitation. L'extrusion par trois passages successifs au travers de membranes de 0,4 et 0,2 µm s'est révélée suffisante pour assurer une diamètre hydrodynamique et un PDI dans notre cahier des charges. Les modifications des rapports molaires lipidiques DOPC/cholestérol n'ont pas eu de conséquence sur la taille et la polydispersité des suspensions liposomales. Le diamètre des liposomes est donc principalement dépendant du procédé de calibration de taille des suspensions liposomales, qui a donc été déterminée comme paramètre critique de la préparation. Le procédé est maintenant optimisé pour les essais d'encapsulation des substances actives. Des contraintes telles que la solubilité de la fisétine dans les solvants ou la dégradation des lipides par le microfluidiseur rendent difficilement envisageable l'agrandissement d'échelle. Pour les lots de taille conséquente nécessaires aux essais cellulaires ou chez l'animal, la fabrication par *lipid-cake* décrite par Mignet *et al* (Mignet et al., 2012) sera utilisée, la calibration de taille restant celle définie dans ce chapitre.

5. Bibliographie

Se reporter à la section Références, page 159.

Co-encapsulation of fisetin and cisplatin for glioma therapy: from formulation to cell evaluation.

Résumé en français:

Le glioblastome (GBM) est la tumeur primaire cérébrale la plus fréquente avec un fort taux de récidives pour lesquels aucun traitement n'a été reconnu comme efficace et validé à ce jour. Il apparait donc nécessaire de proposer de nouvelles alternatives thérapeutiques comme celles combinant un traitement anticancéreux à un traitement anti-angiogénique pour viser un effet synergique. De plus la co-encapsulation de molécules actives dans des nanovecteurs comme les liposomes peut apporter une meilleure pénétration du tissu tumoral grâce à l'effet EPR et diminuer la toxicité vis-à-vis des tissus sains de l'anticancéreux.

Dans ce contexte, le projet a consisté à co-encapsuler la fisétine, une molécule hydrophobe anti-angiogénique et le cisplatine, un agent hydrophile anticancéreux dans des liposomes. La mise au point d'une formulation liposomale permettant la double encapsulation de ces deux molécules aux propriétés physicochimiques si différentes a présenté un réel défi. En effet le choix de la proportion de cholestérol s'est révélé nécessiter un compromis afin d'insérer le maximum de fisétine dans la bicouche lipidique tout en maintenant la rigidité de celle-ci pour limiter la fuite du cisplatine à partir du cœur aqueux du liposome. Des expériences de DSC ont montré que la solubilité de la fisétine dans la bicouche lipidique était de 3,2% w/w environ et d'établir une formulation optimisée de liposomes comportant un rapport molaire DOPC/cholestérol/DODAGLY-PEG2000 de 75,3:20,8:3,9.

Des essais d'encapsulation ont permis de préparer des liposomes de 173 ± 8 nm de diamètre (PDI = 0,12 ± 0,01) compatible avec une administration intraveineuse pour un ciblage tumoral et co-encapsulant la fisétine et le cisplatine avec une charge (*drug loading*) de 1,7 ± 0,3% et 0,8 ± 0.1% respectivement compatible avec une activité thérapeutique. Pour cette composition, la double encapsulation n'a pas d'effet sur la capacité des liposomes à encapsuler les deux molécules séparément ou non. Toutefois, une étude de stabilité a révélé la forte fuite des molécules actives et particulièrement de la fisétine (>65% après 10 jours) mettant en cause la méthode de purification utilisée pour séparer les molécules actives non encapsulées en fin de préparation mais aussi libérées à chaque temps de stabilité évalué.

Après une étude de libération dans le PBS et le milieu de culture, les formulations liposomales ont été testées *in vitro* sur des lignées cellulaires. L'activité anti-angiogénique des liposomes de fisétine a été

démontrée équivalente à la molécule libre sur une lignée de cellules endothéliales EA.hy926. L'activité anti-cancéreuse a été évaluée sur des cellules de GBM U 87-MG. Les résultats ont montré pour la première fois une activité cytotoxique sur cette lignée de la fisétine qu'elle soit encapsulée ou non et une activité additive de la fisétine et du cisplatine co-encapsulés sous la forme de liposomes.

Co-encapsulation of fisetin and cisplatin for glioma therapy: from formulation to cell evaluation.

Morgane Renault-Mahieux[1,2], Victoire Vieillard[2], Johanne Seguin[1], Philippe Espeau[1], Dang-Tri Le[1], René Lai-Kuen[3], Nathalie Mignet[1], Muriel Paul[2], Karine Andrieux[1]

1. Unité des Technologies Chimiques et Biologiques pour la Santé (UTCBS), CNRS UMR8258, INSERM U1267, Faculté de Pharmacie, Université de Paris, 75006 Paris, France

2. Pharmacy Department, Henri Mondor Hospital Group, AP-HP, 94000 Créteil, France

3. Plateau Technique Imagerie Cellulaire et Moléculaire, CNRS UMS3612, INSERM US25, Université de Paris, 75006 Paris, France

Keywords:

Co-encapsulation, liposomes, glioblastoma, fisetin, cisplatin.

1. Introduction

Glioblastoma (GBM) is the most frequent primary brain tumor. It is an aggressive astrocytic tumor (grade IV in the WHO designation) associated to a median overall survival of 12 months after standard therapy and a relative survival of 8.8% at 3 years and only 5.1% at 5 years (6.3% in Europe) (Brandes et al., 2008; Ostrom et al., 2018). The standard treatment of GBM consists in surgery associated with radiotherapy and chemotherapy with temozolomide, a prodrug of a cytotoxic agent able to alkylate DNA (AROME, 2016). However, there are no guidelines for the treatment of relapses. Amongst several options (Weller et al., 2013), anti-angiogenic therapy is an emerging and a promising strategy because of the high vascularization in GBM. The angiogenesis mechanisms of these tumors are related to multiple possible genetic alterations of the angiogenesis pathway and to the hypoxic environment of the tumor leading to a microvascular proliferation (Popescu et al., 2016). However, anti-angiogenic therapy alone do not seem to be sufficient and there is a need for combinational therapy with chemotherapy (Ameratunga et al., 2018). In fact, bevacizumab, an anti-VEGF antibody, is already approved by the FDA for the treatment of recurrent GBM in combination with irinotecan, a topoisomerase 1 inhibitor (Friedman et al., 2009; Kreisl et al., 2009).

Fisetin (3,3',4',7-tetrahydroxyflavone) is a natural flavonoid present in several fruits and vegetables. This hydrophobic molecule possesses several biological effects such as antioxidant, anti-inflammatory, and antiangiogenesis (Bhat et al., 2012; Fotsis et al., 1997). Its capacity to stabilize endothelial cell microtubules (J. H. Park et al., 2013; Touil et al., 2009) and to improve antiangiogenic effect and anticancer activity in mice bearing Lewis Lung carcinoma in association with cyclophosphamide has been demonstrated (Touil et al., 2011b; Seguin et al., 2013). Moreover it could inhibit *in vitro* the human glioma cancer cell invasion (Chen et al., 2014). However, due to its physico-chemical property, fisetin cannot be administered alone; it should be either solubilized into organic solvent which would not be appropriate, or encapsulated in a drug delivery system. Delivery of polyphenols is particularly challenging (Mignet et al., 2013), however interesting results were previously obtained upon fisetin encapsulation into liposomes or nanoemulsions (Mignet et al., 2012; Ragelle et al., 2012). Therefore, encapsulation of fisetin into a nanocarrier could overcome this limitation.

Cisplatin is a relatively water-soluble alkylating agent approved by the FDA and the EMA in several cancer treatments. It has been proven that cisplatin was efficient *in vitro* on glioblastoma cell lines (Dhami et al., 2014; Shang et al., 2015; Taghavi et al., 2013). However, systemic administration of cisplatin leads to side effects due to its ability to form covalent adducts with DNA. Cisplatin is well known for its nephrotoxicity, neurotoxicity, its capacity to induce nausea and vomiting, but also its ototoxicity and cardiotoxicity (Adams et al., 1989). Encapsulating cisplatin into a nanocarrier could prevent some toxicities by increased accumulation of the drug into the tumor using the EPR effect (Peer et al., 2007; B. Xu et al., 2018).

Combinational therapy using nano-structures delivery is highly investigated for cancer therapy (Parhi et al., 2012; Qi et al., 2017). A liposomal formulation encapsulating two anticancer drugs, daunorubicin and cytarabin (CPX-351, Vyxeos®) was approved by FDA in 2017 and EMA in 2018 (FDA) for the treatment of acute myeloid leukemia (Alfayez et al., 2019). Moreover, several drugs loaded in liposomal formulations, and administered intravenously or with an intracerebral route, have been used in several clinical trials for treatment of central nervous system diseases and have been able to reach their target, showing increased efficacy and reduced toxicity (Garcia-Garcia et al., 2005).

Temozolomide and quercetin encapsulated into PEGylated liposomes (DSPE-PEG2000, soy lecithin and surfactants) showed a significantly higher drug accumulation into the brain than quercetin-loaded liposomes and free temozolomide evidencing that co-encapsulation of two drugs to target GBM is feasible (Hu et al., 2016).

Based on this earlier work, we envisioned a synergistic effect of the antiangiogenic fisetin and the anticarcinogenic cisplatin and proposed a combination of both drugs against GBM. To enhance fisetin

solubility and decrease cisplatin toxicity, an encapsulation of the two drugs seemed compulsory. Liposomes due to their specific core/shell structure are promising candidate to co-encapsulate a hydrophilic drug such as cisplatin in its aqueous core and a hydrophobic one such as fisetin into the lipid bilayer. In a previous work, our group has designed a liposomal formulation of fisetin with a low content of cholesterol to provide high fisetin content (Mignet et al., 2012). Other authors have described cisplatin loaded liposomes with high content of cholesterol in order to limit its rapid release (Carvalho Júnior et al., 2007; Ghaferi et al., 2020; Kieler-Ferguson et al., 2017; Shein et al., 2016). The challenge here was to design a liposomal formulation able to encapsulate and retain both drugs.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Fisetin (98% purity) was purchased from Shanghai FWD Chemicals Limited (Shanghai, China), cisplatin, cholesterol (Chol), acetonitrile (ACN), methanol, HEPES, PBS (phosphate buffer saline), triton X-100 solution from Sigma-Aldrich (Missouri, USA) and dioleyl-phosphatidylcholine (DOPC) and 1,2--distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DSPC) from Polar Avanti Lipids, Inc (Coger, Paris, France). Chloroform, absolute ethanol and sodium hydroxide 1N were purchased from Carlo Erba Reagents (Val de Reuil, France), acetic acid (98-100%) and nitric acid 65% from Merck Millipore (Darmstadt, Germany), hydrochloric acid 37% from VWR Chemicals (Fontenay-sous-Bois, France) and sodium chloride from Cooper (Melun, France). Dubelcco's modified Eagle's medium (DMEM), Eagle's minimal essential medium (EMEM), fœtal bovine serum (FBS), streptomycin and penicillin were purchased from Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA). Deionized water was obtained using a Direct-Q3 device from Millipore. (2-dioctadecylcarbamoyl-methoxyacetylamino) acetic acid-(ω-methoxy)-polyethylene glycol 2000 ester (DODA-GLY-PEG2000) has been synthesized as described before (Mignet et al., 2012).

2.2. Preparation of liposomes

The process, except the extrusion, was carried out in a heating bath at 40°C. All liposomes were prepared using the film-hydration method (Bangham et al., 1965). Briefly, lipids with or without fisetin were dissolved in a chloroform-ethanol mixture and introduced in a clean dry round-bottom flask and connected to a Buchi evaporator R-100 equipped with a V-100 pump and a F-105 recirculating cooler. The mixture was exposed to a starting pressure at 250 mbar and then 100 mbar to form a regular film on the bottom. The pressure was then decreased to reach 10 mbar which was maintained during three hours. HEPES buffer (20 mM, pH = 7.4) with or without cisplatin dissolved in it was added to the flask

and the rehydration process was performed for 3 hours for the formulation optimization and overnight for the cell experiments, providing an aqueous suspension of liposomes.

The size calibration was performed using extrusion of the liposomes through 0.4 and 0.2 µm polycarbonate membranes (Whatman) three times each using a Mini-extruder (Avanti Polar Lipids, Inc) at room temperature for the DOPC liposomes and 65°C for the DSPC liposomes.

2.3. Purification of liposomes

In order to remove non encapsulated fisetin or cisplatin, a purification step is necessary. Fisetin-loaded liposomes were either purified using filtration under vacuum through a 0.45 µm filter (Sartorius) or using size-exclusion chromatography on Sephadex G-25 columns (GE Healthcare). Cisplatin-loaded liposomes and co-loaded liposomes purification was carried out using size-exclusion chromatography on Sephadex G-25 columns (GE Healthcare). For DSC experiments, there was no purification step.

2.4. Formulation tested

A formulation of fisetin loaded liposomes composed of DOPC/cholesterol/DODA-GLY-PEG2000 (87.0:8.9:4.1 molar ratio) was described in our previous work (Mignet et al., 2012) (F1, Table 21). Several formulations of liposomes with increasing cholesterol/DOPC ratio or cholesterol/DSPC ratio were prepared as described above.

2.5. Characterization of liposomes

2.5.1. Determination of size and morphology

2.5.1.1. Dynamic light scattering (DLS)

The liposome's diameter and the polydispersity index (PDI) were determined after dilution in HEPES buffer at a lipid concentration of approximatively 0.5 mg/mL by DLS using a Zeta Sizer NanoSeries Malvern (Malvern Instrument, Venissieux, France) at 25°C with a measurement angle of 173°. Position was fixed at 4.65 cm. Results presented in this article correspond to the diameter calculated by using the intensity of the signal.

2.5.1.2. Transmission electronic microscopy (TEM)

A liposomal suspension was deposed on a Formvar/carbon copper grid 200 mesh from Agar Scientific and uranyl acetate as a contrasting agent. TEM observations were performed on a microscope JEOL, JEM 100S with an accelerating voltage of 80 kV.

2.5.2.Fisetin quantification

Fisetin was assayed after purification using a reverse phase HPLC system (Dionex U3000) equipped with a polymeric PRP-1 250*4.6 mm, 5 µm (Nevada, United States). The injected volume was 10 µL. Eluent A consisted of 2% acetic acid in deionized water and eluent B was ACN. The flow rate was 1 mL/min. The elution gradient started with 15% B for 3 minutes. From 3 to 6 minutes, the percentage of eluent B was increased to achieve 50% which was maintained for 6 minutes, to turn back to 15% in 2 minutes, followed by an equilibrium phase of 2 minutes. The UV detection of the drugs was carried out at 360 nm. Data were processed using the Chromeleon® (v 6.8) software.

The calibration curve was prepared by dissolving fisetin in methanol. This method was validated according to ICH Q2(R1) ($Peak\ area = 0{,}17732 \times Concentration + 0{,}85565$, R^2 = 0,999 ± 0,001).

The purified fisetin-loaded or liposomes co-encapsulating fisetin and cisplatin were diluted in methanol prior the injection to range in the calibration curve (5-100 µg/mL).

2.5.3.Cisplatin quantification

Cisplatin was assayed after purification against a standard curve (300-2500 ng/mL) using a Zeeman Atomic Absorption Spectrometer AA240Z (Agilent Technologies) with a graphite tube atomizer (GTA120) connected to a programmable sample dispenser (PSD120) as previously described (Meerum Terwogt et al., 2000). The detection was monitored at 265.9 nm with a slit band width of 0.2 nm (lamp current fixed at 10 mA). The program consisted of a drying stage from 50 to 250°C, an ashing stage at 1400°C, an atomization phase at 2700°C and a burning-clean stage at 2700°C with cooling down at 50°C. The standard solutions were prepared using a solution of cisplatin 3.07 µg/mL in HEPES buffer 20 mM pH = 7.4 mixed with a suspension of blank liposomes; this stock solution was directly diluted by the autosampler with an acidic buffer (hydrochloric acid 0.6% in physiological serum). A matrix modifying solution of Triton X-100 0.1% + nitric acid 0.2% was applied to each standard solution and sample. Samples were diluted with the acidic buffer to fit in the range of the calibration range.

2.5.4.Determination of encapsulation efficiency (EE) and drug loading (DL)

Encapsulation Efficiency was determined as EE (%, w/w) = (drug concentration after purification/total amount of drug in the formulation) x 100.

Drug Loading was determined as DL (%, w/w) = (drug concentration after purification/(concentration of lipids + drug concentration after purification)) x 100.

The drug-to-lipids ratio, corresponding to the amount of drug (mg) per total lipid amount (g) was also calculated for fisetin.

2.5.5.Differential scanning calorimetry

Thermal analyses were conducted by differential scanning calorimetry (DSC), using a Mettler Toledo 822 DSC (Greifensee, Switzerland). 10 µL of samples were injected in aluminum standard pan of 40 µL and hermetically sealed. An empty, hermetically sealed aluminum pan was used as reference. Calibration was performed with indium (melting point. 156.60°C, Hm = 28.45 J/g). Since DOPC constituted the major component of the liposomal bilayer, we investigated the interaction of DOPC with fisetin and cholesterol inserted into the bilayer based on the thermal events of DOPC during the melting process (Tm ≈ -18°C). The experiments were carried out by a decrease in temperature from 25°C to -80°C and an increase from -80°C to 140°C with a heating rate of 10°K/min. The data were processed using the STAR^{e} Software.

2.6. Stability studies

Drug encapsulation into liposomes was followed as a function of time. Liposomal suspensions were stored at 5°C ± 3°C. Samples were withdrawn, purified again and characterized at each sampling time. Percentage of each drug leakage during storage was calculated as 100 - (concentration of drug still encapsulated at day of sampling/EE at day 0) x 100.

2.7. Formulation optimisation of fisetin-loaded liposomes

2.7.1.Impact of the fisetin ratio

Several liposomal formulations with an increasing ratio of cholesterol and a fixed amount of fisetin (3.2% w/w) were prepared and analyzed using DSC as described in section 2.5.5. The enthalpies and onset temperatures of the transition peaks were compared. Then Formulation F4 was chosen to investigate the solubility of fisetin inside the lipid bilayer. Liposomes with different amounts of fisetin inserted ranging from 0 to 26.5mol% were prepared in deionized water and analyzed using DSC as described in section 2.5.5.

F4 liposomes with fisetin ranging from 1 to 4.5% w/w of the liposomal bilayer were also prepared in HEPES buffer and purified using filtration under vacuum through a 0.45 µm filter (Sartorius). Their EE, DL and stability over 30 days were investigated.

2.7.2.Impact of the cholesterol ratio

Formulations 3, 4 and 5 were prepared and characterized as described in section 2.2 and 2.5 with the addition of fisetin in the lipid phase in order to obtain a theoretical concentration of 1.2 mg/mL in the

final suspensions. The liposomal suspensions were compared in term of size, PDI, DL and stability over 10 days.

2.7.3. Impact of the saturation of the phospholipids

Liposomes using DSPC instead of DOPC (F1' and F4', Table 21) were prepared and extruded at 65°C. Purification was carried out using size-exclusion chromatography on Sephadex G-25 columns (GE Healthcare) or filtration under vacuum through a 0.45 µm filter (Sartorius) to remove the non-encapsulated fisetin. The liposomal suspensions were compared in term of size, PDI, DL and stability over 10 days.

2.8. Formulation optimisation of cisplatin-loaded liposomes

Formulations 3, 4 and 5 (Table 21) were chosen to incorporate cisplatin. The cisplatin-loaded liposomes were prepared as described above, with the addition of cisplatin at a concentration of 2 mg/mL in HEPES buffer. The liposomal suspensions were compared in term of size, PDI, DL and stability over 10 days.

2.9. Formulation optimisation of liposomes encapsulating both cisplatin and fisetin

Formulation 3 and 4 (Table 21) were prepared as described above, with the addition of fisetin in the lipid phase in order to obtain a theoretical concentration of 1.2 mg/mL in the final suspensions and with the addition of cisplatin at a concentration of 2 mg/mL in HEPES buffer. The liposomal suspensions were compared in term of size, PDI, DL and stability over 10 days.

2.10. In vitro release

The release of fisetin and cisplatin from the co-loaded liposomes in PBS and in complete culture medium was investigated over 48 hours. The samples were put in a dialysis bag CelluSep H1 with a cut-off of 25,000 Da (Dutscher, France) with a volume of sample to volume of receiving medium ratio fixed at 1:100. The dialysis bag kept floating in receiving medium at 37°C with an agitation rate of 90 rpm. At each sampling times, the liposomal suspension was removed and fisetin and cisplatin were extracted and assayed as described in sections 2.5.2 and 2.5.3.

2.11. Colloidal stability in culture medium

F4 co-loaded liposomes were prepared and diluted forty fold in DMEM containing 2 mg/mL glutamine, 10% FBS, 100 µg/mL streptomycin and 100 UI/mL penicillin (DMEM-C) (viscosity 0.94 cP) and kept at 37°C for 24 hours. Size and polydispersity at each sampling time were measured by DLS using a short program of six runs of 4 seconds to be able to highlight aggregation. Position and attenuator were fixed at 4.65 cm and 8, respectively.

2.12. Cell culture

The immortalized human umbilical vein endothelial cell line EA.hy926 (ATCC® CRL-2922™) and the likely human glioblastoma cell line U-87 MG (ATCC® HTB-14™) were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, USA). The EA.hy926 were cultured in DMEM-C (37°C, 5% CO_2). The U-87 MG cells were cultured in EMEM supplemented by 10% FBS, 100 µg/mL streptomycin and 100 UI/mL penicillin (37°C, 5% CO_2).

2.13. Morphological effect of fisetin on EA.hy926 endothelial cells

Exponentially growing EA.hy926 endothelial cells were plated onto 96-wells plates at 5,000 cells/well and cultured for 24 hours (37°, 5% CO_2), then free fisetin, F4 fisetin-loaded liposomes or blank liposomes were added to the wells to reach concentrations ranging from 17 to 350 µM. After 2 hours exposure, medium was removed and cells were fixed and colored and observed at magnification of x125 using an Olympus IM microscope. Cell morphology was assessed by contouring the cells to obtain morphological parameters using the ImageJ software. Circularity was calculated by the following formula: 4π x area x perimeter^{-2} and the form factor was defined as 1-circularity. The mean form factor of the control endothelial cells was 0.4. The results were expressed as a percent of the controls using the following formula: 100 × [1-(circularity of treated cells)/(circularity of control cells)] (Touil et al., 2009).

2.14. Cytotoxicity assay on EA.hy926 and U 87-MG

Exponentially growing cells were plated onto 96-wells plates at 10,000 cells/well and cultured for 24 hours (37°, 5% CO_2). Then free fisetin, free cisplatin, F4 fisetin-loaded liposomes, F4-cisplatin-loaded liposomes, a mixture of F4 cisplatin-loaded and F4 fisetin loaded liposomes (ratio 1:5), F4 co-loaded liposomes and F4 empty liposomes were added to the wells to reach concentrations ranging from 3 to 100 µM for cisplatin and from 18 to 700 µM for fisetin. Control cells were exposed to DMSO or HEPES buffer. Viability was assessed using the MTT ((1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenyltetrazolium) test and absorbance was read at 550 nm in a microplate reader 800 TS (Biotek Instrument, Vermont, USA). Results are expressed in percent of viability compared to the same concentration of solvent (DMSO for free fisetin and HEPES buffer for free cisplatin and liposomal suspensions).

To evaluate the potential synergistic effect of the combination of cisplatin and fisetin, the combination index was calculated using the Chou and Talalay equation: $CI = (IC50_{F/F}/IC50_{F/F+C}) + (IC50_{C/C}/IC50_{C/F+C})$ were IC50 is the concentration required to kill 50% of the cells, $IC50_{F/F}$ the IC50 of fisetin in fisetin-loaded liposomes, $IC50_{F/F+C}$ the IC50 of fisetin in co-loaded liposomes, $IC50_{C/C}$ the IC50 of cisplatin in cisplatin liposomes and $IC50_{C/F+C}$ is the IC50 of cisplatin in co-loaded liposomes. $CI < 0.9$

indicates synergism, CI between 0.9 and 1.1 indicates additivity and CI > 1.1 indicates antagonism (Chou, 2010).

2.15. Statistics

Each experiments were usually carried out in triplicate. For each test (except for the transmission electron microscopy), three samples of each formulation were taken and measured in triplicate. All measurements are presented as mean ± standard deviation. Non parametric Mann-Whitney test was used to calculate significant differences; p-values less than 0.05 were considered to be significant. All calculations and statistical tests were performed using GraphPad Prism® software.

3. Results and discussion

The liposomal formulation previously developed by our group for fisetin encapsulation (Mignet et al., 2012) has been chosen as the basic formulation to improve. Preliminary experiments have been performed on blank liposomes to establish the preparation protocol and the lipid compositions of liposomes to investigate in this work (data not shown). The Table 21 summarize the liposomal compositions tested in this work.

Table 21. Lipid formulations of the liposomes assayed (molar ratio)

Composition	**F1**	**F3**	**F4**	**F5**	**F1'**	**F4'**
DOPC	87.0	79.0	75.3	66.7	-	-
DSPC		-	-	-	85.8	75.3
Cholesterol	8.9	17.0	20.8	29.6	6.8	21.0
DODA-GLY-PEG2000	4.1	4.0	3.9	3.7	7.4	3.7

3.1. Study of the influence of fisetin incorporation into the lipid bilayer

Fisetin is a lipophilic compound as its octanol-water partition coefficient is estimated at 3.2 (Mignet et al., 2012). It is consequently presumed to be located into the lipid bilayer of the liposomes. Mignet *et al* determined that the maximum proportion of fisetin incorporated (3.2wt%) was observed within liposomes containing 4wt% (8.9mol%) of cholesterol (Mignet et al., 2012; Seguin et al., 2013). However, literature review showed that cisplatin-loaded liposomal formulations needed a higher cholesterol proportion to reduce the membrane fluidity and prevent the leakage of cisplatin, from 12mol% (Catanzaro et al., 2018) to 46mol% (Lee et al., 2002), with most of them between 30 and 40mol% of cholesterol (Carvalho Júnior et al., 2007; Lv et al., 2013; Shein et al., 2016; Vieira et al., 2013; Toro-Cordova et al., 2018; Ghaferi et al., 2020). Therefore, to encapsulate both fisetin and

cisplatin into the same liposomes, an increase of the cholesterol/phospholipids ratio was mandatory in comparison to the basic formulation. Fisetin is incorporated inside the lipid bilayer, with its non-polar part inside the hydrophobic bilayer and the more polar ones forming hydrogen bonds with the polar head groups of the phospholipids (Mohapatra and Mishra, 2011; Mignet et al., 2013). This comportment is similar to cholesterol and Mohapatra *et al* showed a cholesterol-induced expulsion of fisetin from dimyristoylphosphatidylcholine liposome membrane (Mohapatra and Mishra, 2011). Consequently, we investigated the influence of the cholesterol/phospholipids ratio on the incorporation of fisetin into the lipid bilayer. DSC has been previously used to determine the solubility of paclitaxel (Zhao et al., 2007) and lidocaine (Bakonyi et al., 2017) into the lipid bilayer using the main transition temperature and the enthalpy of the main phospholipid composing liposomes. In this work, DSC experiments were performed by analyzing the evolution of the melting event of DOPC as a function of the addition of other components.

As it is well known that a high proportion of cholesterol can lead to the disappearance of the endothermic peak of neighboring phospholipids (Oldfield and Chapman, 1972; Davis and Keough, 1983; Filippov et al., 2003; Fritzsching et al., 2013), we first investigated the maximum cholesterol/other lipids ratio for which the DOPC peak could still be observed. Liposomes with increasing cholesterol proportion were prepared at a fixed initial mass ratio of fisetin of 3.2%. Figure 19A shows a decreasing onset temperature of the DOPC main transition peak (from -21.0 to -26.1°C), a decreasing enthalpy of this thermal event (from 21663 to 535 J/mol) and a broadening of the peak with the increase of the cholesterol proportion as expected. With a cholesterol proportion of 26.7mol%, the DOPC endothermic peak is almost completely removed, and at higher ratio this peak is undetectable. It is to note that a peak at -15.7°C appeared when DODA-Gly-PEG2000 was introduced in the liposomal formulation.

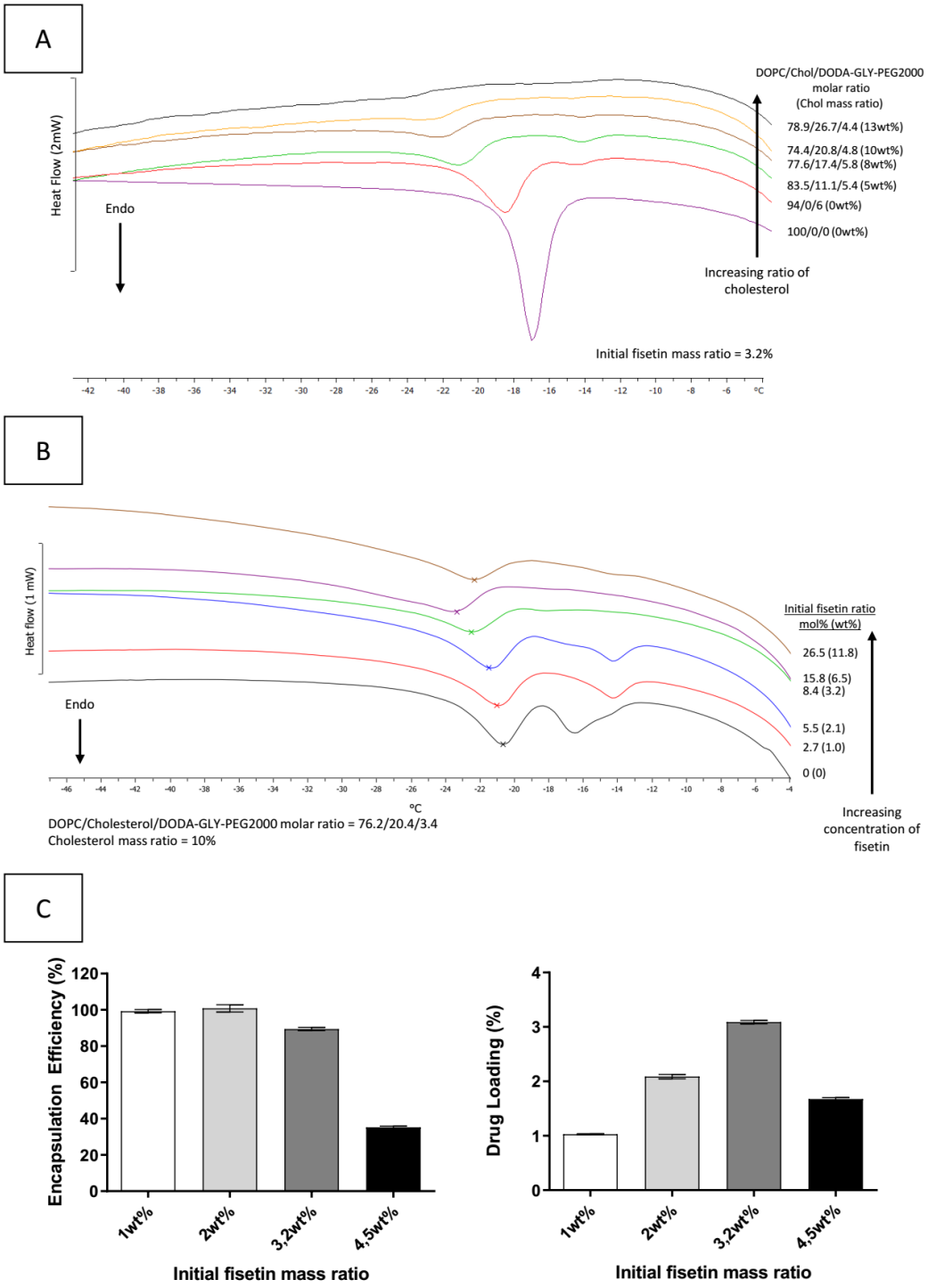


Figure 19. Influence of fisetin insertion into lipid bilayer. A: Representative DSC thermograms of the melting of DOPC contained in the lipid bilayer of liposomes with increasing proportion of cholesterol (from 0 to 13wt%) at fisetin 3.2wt% (n = 2); cholesterol proportions of 20 and 30% led to an undectable main transition and thus data are not shown. B: Representative DSC thermograms of the melting of DOPC contained in the lipid bilayer of liposomes with increasing amount of fisetin at cholesterol 10wt% (n = 3). C: Encapsulation efficiency and drug loading of fisetin-loaded liposomes with increasing amount of fisetin incorporated into the formulation (n = 2).

We consequently investigated the influence of an increasing initial fisetin ratio on a lipid bilayer with 20.4mol% (10wt%, F4, Table 21) of cholesterol using DSC (Figure 19B). Figure 19B shows that the onset temperature of the DOPC transition decreases from -23.3 to -25.8°C with the increase of the initial fisetin amount from 0 to 3.2wt%; with higher initial proportion of fisetin, the onset temperature of the DOPC transition remains stable around 25.8°C. The decrease in the transition onset temperature demonstrate the incorporation of the fisetin into the lipid bilayer. Because fisetin proportion higher than 3.2wt% showed no further disturbance, the maximum incorporation of fisetin into the lipid bilayer can be estimated around 3.2wt%.

Then, fisetin-loaded liposomes (F4, Table 21) with increasing initial amount of fisetin, from 1 to 4.5wt% were prepared. As the solubility of fisetin in water was experimentally estimated as inferior to 5 µg/mL, these fisetin-loaded liposomes were purified by a simple filtration to remove non-encapsulated and precipitated fisetin. Figure 19C shows that at 1 and 2wt%, all of the fisetin is encapsulated into the liposomes but at 3.2wt% only 90% is encapsulated. However, the DL is the highest for 3.2wt%, suggesting that the best loading of fisetin into the liposomes is obtained with 3.2wt% initial fisetin. Higher initial amount of fisetin led to a drastic decrease of the EE and DL, implying a disturbance of the lipid bilayer by the too large proportion of fisetin. Those results confirm DSC results with a maximum solubility of fisetin into the lipid bilayer around 3.2wt%, which is the same as determined by Mignet *et al* for a lower content of cholesterol (Mignet et al., 2012). To conclude the cholesterol/other lipids ratio in the range studied does not seem to have a significant impact on the incorporation of fisetin into the lipid bilayer.

3.2. Impact of the cholesterol ratio on fisetin-loaded and cisplatin-loaded liposomes

Several liposomal formulations encapsulating either fisetin or cisplatin were prepared with increasing cholesterol proportion as described in Table 21. F1 formulation (8.9mol% of cholesterol) corresponded to the composition already published in our group (Mignet et al., 2012). F4 formulation (20.8mol% of cholesterol) was used for DSC experiments. F3 and F5 formulations were composed with respectively, a lower (17) and higher (29.6) proportion of cholesterol than F4.

To be able to estimate at this point which formulation to use for the co-encapsulation, the liposomes were purified using a method able to eliminate both free lipophilic and hydrophobic drug. Fisetin-loaded liposomes and cisplatin-loaded liposomes were then purified using size-exclusion chromatography: liposomes would not be trapped into the sephadex gel whereas the free drugs would remain into the porous beads. Size, PDI and encapsulation of those liposomes are reported in Table 22.

Table 22. Size, PDI and drug encapsulation of fisetin-loaded, cisplatin-loaded and fisetin and cisplatin-co-loaded liposomes.

	Diameter (nm)	PDI	EE (%) fisetin	DL (%) fisetin	Drug to lipids ratio (mg/g) fisetin	EE (%) cisplatin	DL (%) cisplatin
Fisetin-loaded liposomes							
Formulation 3 (n = 3)	176 ± 3	0.13 ± 0.02	49.5 ± 21,2	1.6 ± 0.7	16.5 ± 7.0		
Formulation 4 (n = 2)	176 ± 11	0.14 ± 0.04	37.8 ± 0,3	1.3 ± 0.1	12.8 ± 0.1		
Formulation 5 (n = 2)	175 ± 8	0.12 ± 0.01	30.5 ± 13,7	1.0 ± 0.5	10.5 ± 5.4		
Cisplatin-loaded liposomes							
Formulation 3 (n = 2)	169 ± 12	0.12 ± 0.02				14.6 ± 3.4	0.8 ± 0.2
Formulation 4 (n = 2)	179 ± 2	0.13 ± 0.01				12.9 ± 1.1	0.7 ± 0.1
Formulation 5 (n = 1)	175	0.14				13.7	0.7
Co-loaded liposomes							
Formulation 3 (n = 4)	166 ± 8	0.14 ± 0.02	47.8 ± 6.3	1.6 ± 0.3	16.2 ± 2.9	13.7 ± 2.7	0.8 ± 0.1
Formulation 4 (n = 5)	173 ± 8	0.12 ± 0.01	50.3 ± 6.8	1.7 ± 0.3	16.8 ± 2.5	14.5 ± 1.5	0.8 ± 0.1

Fisetin encapsulated in the fisetin-loaded liposomes with the highest proportion of cholesterol (F5) precipitated the day of preparation and was not considered for further development. There was no difference in fisetin encapsulation in formulations F3 and F4. However, the fisetin to lipid ratio (respectively 16.5 and 12.5 mg/g) was relatively lower than the liposomal formulation (F1) developed by Mignet *et al* (18 mg/g) (Mignet et al., 2012). This can be explained by the higher quantity of cholesterol used in F3 and F4 to prevent the leakage of cisplatin outside the liposomes. Results showed that cisplatin encapsulation and percentage of cisplatin leakage were no significantly divergent considering formulations 3 and 4. Moreover, purification by size-exclusion chromatography led to a clear loss of fisetin: DL of 1.3% for F4 in table 2 compared to DL above 3% for F4 purified by filtration (Figure 19C).

In the literature, encapsulation of cisplatin was higher than in this work (Carvalho Júnior et al., 2007; Zhou et al., 2015; Stras et al., 2016; Ghaferi et al., 2020; Toro-Cordova et al., 2018). However, they used different formulation approaches: increase of the apparent solubility of cisplatin by heating at 80°C to reach 17 mg/mL (Stras et al., 2016), use of higher lipid concentration (Liu et al., 2015), conjugation of the cisplatin to a phospholipid (Zhou et al., 2015), use of a higher

cholesterol/phospholipids ratio (Carvalho Júnior et al., 2007; Shein et al., 2016; Toro-Cordova et al., 2018; Ghaferi et al., 2020) or use of saturated phospholipids.

However the encapsulation of each drug already appeared sufficient for further biological evaluation.

3.3. Impact of the saturation of the phospholipid

Among the strategies described to increase the loading of cisplatin into liposomes, the increase of cholesterol/phospholipids ratio is widely used but could not be envisaged for a co-encapsulation with fisetin. Heating at 80°C was not considered further as flavonoids can be heat sensitive (Chaaban et al., 2017). Then, a modification of the phospholipid composing the liposomes has been investigated.

Saturated lipids are known to rigidify the lipid bilayer (De Gier et al., 1968), as they have a high transition temperature (Li et al., 2015). The vesicle would always be in the ordered gel phase, where the hydrocarbon chains are fully extended and closely packed. Using a saturated lipid could prevent the leakage of cisplatin from the liposomes. Hence, most of the cisplatin-loaded liposomes reported in the literature are formulated with saturated lipids : DSPC (Patent US20140271821, n.d.; Shibata et al., 1990; Zisman et al., 2011; Wang et al., 2013), DPPC (Dou et al., 2014; Liu et al., 2015; Zisman et al., 2011), HSPC (Marzban et al., 2015; Patent US6126966, n.d.; Toro-Cordova et al., 2018), etc. However, more packed phospholipids could mean less room for fisetin or cholesterol. Considering this, we tried to encapsulate fisetin in liposomes formulated with DSPC and a low (F1') or a high (F4') ratio of cholesterol (Table 21). Both fisetin-loaded F'1 and F'4 led to a very low drug loading (0.23%). Moreover, the preparation process needed to be at 65°C (temperature above the gel-liquid crystalline phase transition, 55°C), and fisetin is known to be degraded by temperature in aqueous solution (Wang and Zhao, 2016). Therefore, we chose not to pursue with those formulations.

3.4. Impact of the co-encapsulation on the encapsulation of each drug

Formulations 3 and 4 were chosen for co-encapsulation of fisetin and cisplatin. Size, PDI and encapsulation of those liposomes are reported in Table 22. The particle diameters of all formulations were below 200 nm with polydispersity below 0.2. Liposomes were spherical according to TEM pictures (data not shown). The co-encapsulation of cisplatin and fisetin evidenced drug loading of respectively 0.8 ± 0.1% and 1.6 ± 0.3% for formulation 3 (cholesterol 17.0mol%) and 0.8 ± 0.1% and 1.7 ± 0.3% for formulation 4 (cholesterol 20.8mol%). There was no significant difference in term of fisetin or cisplatin encapsulation between both formulations or between single-drug encapsulation or co-encapsulation. Consequently, co-encapsulation does not affect the encapsulation of each drug. At this stage liposomes co-encapsulating cisplatin and fisetin could be prepared with a weight ratio of 1:2 and a cholesterol proportion between 17.0 and 20.8mol% with success. However it is to note that the

amounts of cisplatin and fisetin loaded into these liposomal formulations are promising to investigate *in vitro* their biological effect.

3.5. Stability over time of the liposomes

First liposomes stability was investigated. Liposomal formulations were stored at 5 ± 3°C and purified again after 10 days. Size, PDI and drug concentration remaining into liposomes were assayed. Results are presented in Figure 20A. There was no modification of size and PDI over time, however, leakage of the encapsulated drugs was evidenced. Percentage of fisetin leakage in the co-encapsulated liposomes or fisetin-loaded liposomes (74.5 ± 9.9% for fisetin-loaded F3, 66.4% for fisetin-loaded F4, 72.9 ± 2.3% for co-loaded F3 and 74.5 ± 0.6% for co-loaded F4) was much higher than in the liposomal formulation of fisetin developed by Mignet *et al* (around 20% after 32 days) (Mignet et al., 2012). The increase of cholesterol content seems to dramatically influence the leakage of the fisetin. Moreover, the loss of cisplatin seemed higher when the two drugs were co-encapsulated than when it was encapsulated alone. This could be explained by a disruption of the bilayers induced by the fisetin encapsulation into the bilayer: indeed, TEM experiments evidenced disruption of the lipid bilayer 3 days after the preparation (Figure 20B).

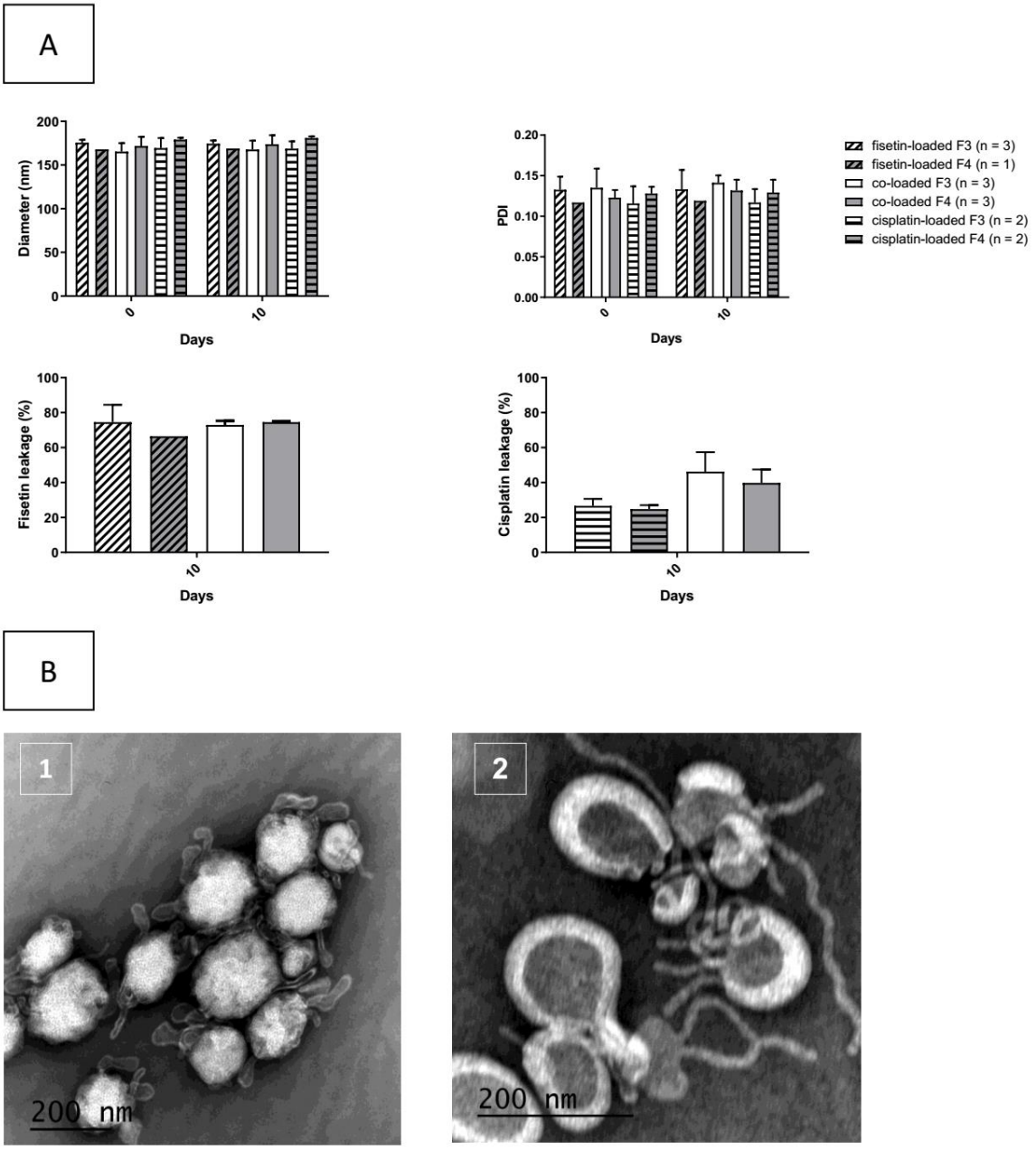


Figure 20. Stability of the liposomal formulations. A: stability of size, PDI and drug leakage of the different liposomal formulations over 10 days. B: TEM of the liposomal formulations co-encapsulating cisplatin and fisetin three days after the preparation (1: formulation 3 and 2: formulation 4).

To further investigate the leakage of fisetin, we hypothesized that even if the solubility of fisetin into the lipid bilayer was the same with 8.9mol% (F1) or 20.4% (F4) of cholesterol, maybe the higher cholesterol proportion combined with a high amount of fisetin induced a destabilization of the lipid bilayer over time leading to the expulsion of fisetin. To confirm this hypothesis, four different fisetin-loading liposomes with 1wt%, 2wt%, 3.2wt% or 4.5wt% were prepared and purified using filtration.

The leakage of fisetin was followed over 30 days (Figure 21). However, encapsulating less fisetin did not lead to a better stability of the fisetin encapsulation. Moreover, the leakage of fisetin was lower using filtration purification (<10% for F4 after 10 days) than using Sephadex purification (74.5% for F4, Figure 20A). Sephadex purification might not be the more appropriate purification method due to its potential destabilization of the membrane containing fisetin.

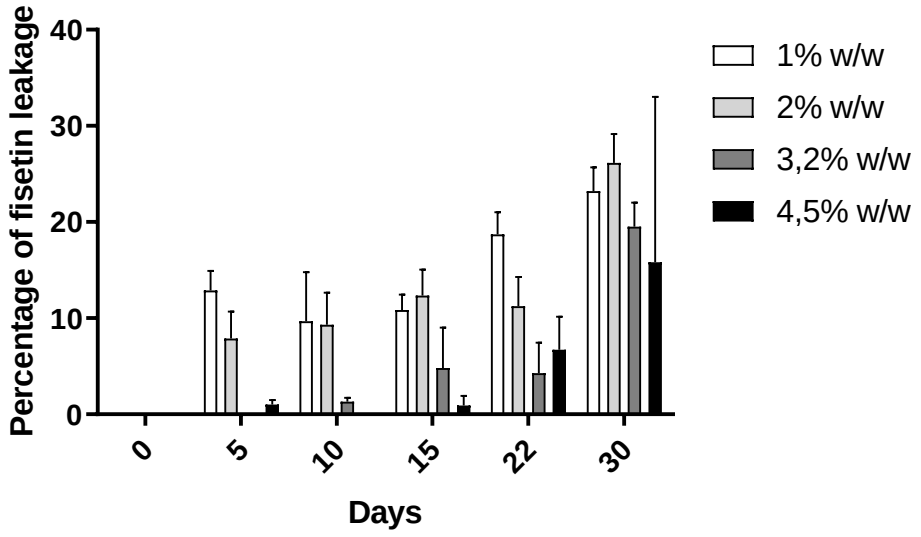


Figure 21. Stability of fisetin-loaded liposomes F4 with initial 1, 2, 3.2 or 4.5wt% fisetin (n = 2). Liposomes were purified using filtration to remove non-encapsulated and precipitated fisetin at each sampling time.

An alternative purification method was envisaged: elimination of free cisplatin by ultracentrifugation, followed by the suspension of the pellet in fresh buffer with a finishing step consisting in elimination of the free non water-soluble fisetin by filtration. However, ultracentrifugation led to filter plugging and could not be used, and thus the alternative purification process could not be completed.

To improve the stability of the formulations throughout time, freeze-drying of the liposomes would be further investigated. Fresh liposomal formulations F4 were chosen to be used for the *in vitro* evaluation.

3.6. Release study of the co-loaded formulation 4 in PBS

Before assaying the efficacy of our formulation on cell lines, we explored its capacity to release fisetin and cisplatin *in vitro*. *In vitro* release study in PBS at 37°C of F4 co-loaded liposomes were conducted by dialysis to evidence a release of the two drugs from the liposomes. The *in vitro* release of cisplatin from the liposomes is compared with free cisplatin in Figure 22.

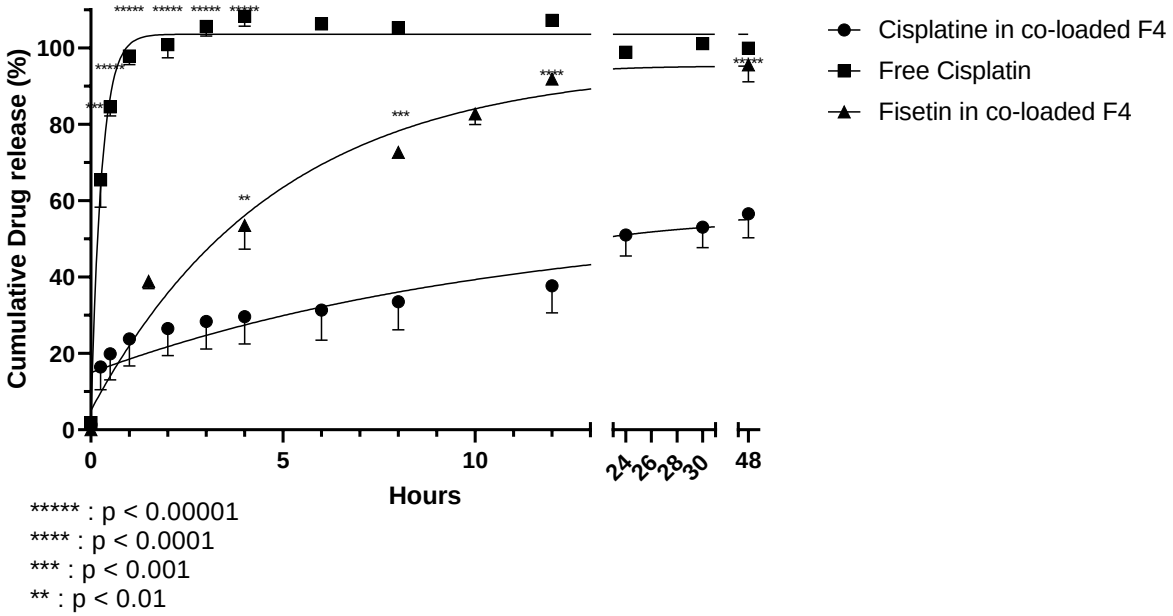


Figure 22. In vitro release of cisplatin and fisetin by formulation 4 co-encapsulating cisplatin and fisetin in PBS. Liposomal cisplatin (circle), free cisplatin (square) and liposomal fisetin (triangle) (n = 6).

A biphasic release was observed in both cases with a fast release up to one hour. After one hour, almost all the free cisplatin was released from the dialysis bag *versus* only 23.8 ± 7.1% for encapsulated cisplatin. After one hour, a sustained release of cisplatin from the liposomes was observed, to reach 56.6 ± 6.3% of cisplatin release after 48 hours. After fifteen minutes, a difference between the release of free cisplatin and encapsulated cisplatin was observed and remain significant until 48 hours. The release of fisetin from the liposomes could not be compared to free fisetin as it is not soluble in water and solubility is under the limit of quantification of our dosage method. However, Figure 22 shows that the release of fisetin is significantly higher than the release of cisplatin, with 91.9 ± 0.2% and 95.5 ± 4.4% of release after 12 hours and 48 hours respectively.

3.7. Colloidal stability and release study in culture medium of F4

We also investigated the behavior of the co-loaded liposomes F4 in the cell culture medium. As shown in Figure 23A, the size and PDI of the formulation was stable for 24 hours in DMEM-C. Figure 23B indicates the release of cisplatin and fisetin from the co-loaded liposomes F4 in DMEM-C at 37°C. Fisetin and cisplatin are released more quickly in the culture medium than in PBS, with a burst release during the first hour followed by a sustained release to reach 100% of release in 6 hours for fisetin and 67% of release in 48 hours for cisplatin.

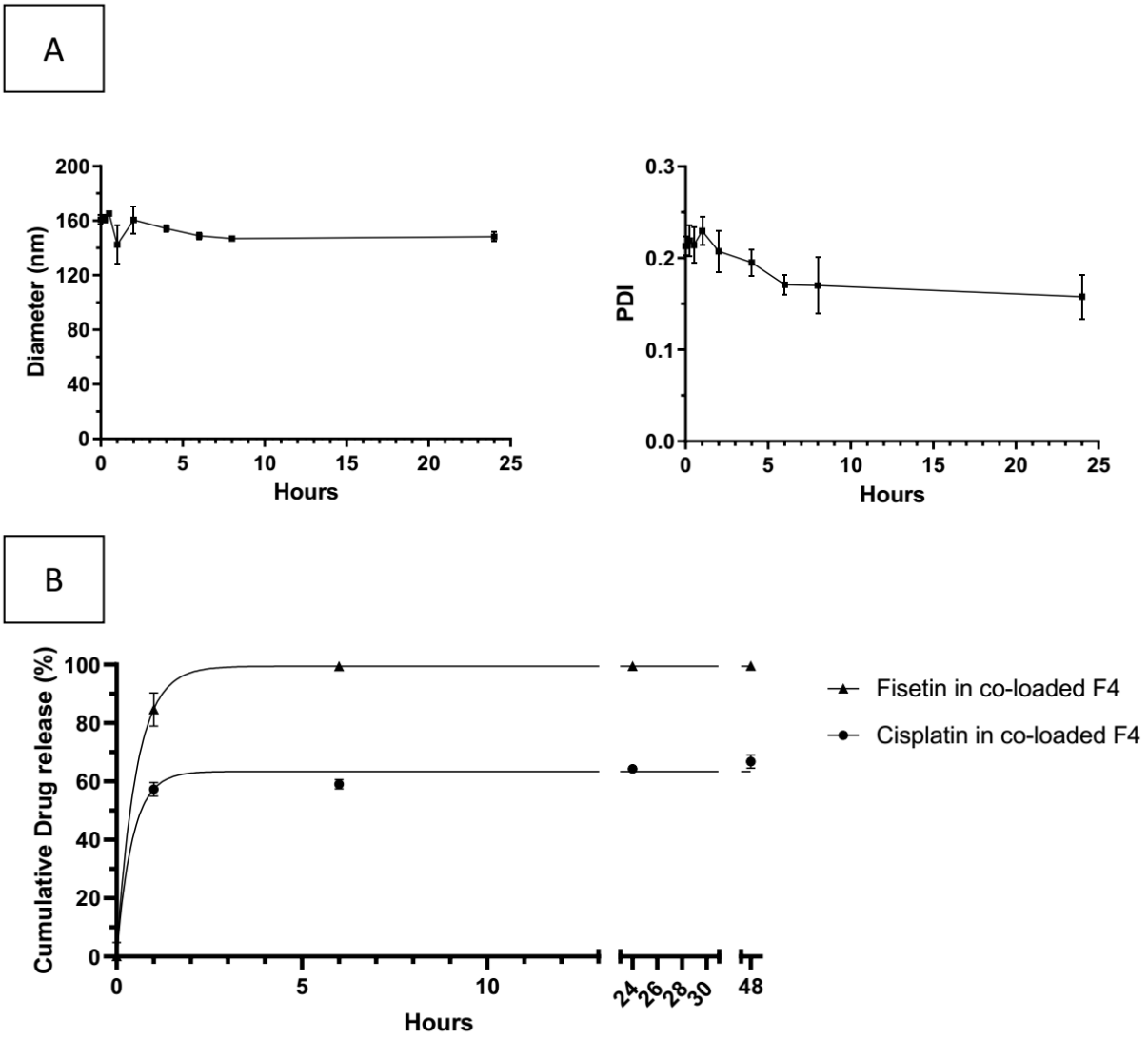


Figure 23. Stability of the formulation 4 co-encapsulating cisplatin and fisetin in complete culture medium (n = 3). A: stablity of size and PDI. B:* In vitro *release of cisplatin and fisetin by formulation 4 co-encapsulating cisplatin and fisetin in DMEM-C: liposomal cisplatin (circle) and liposomal fisetin (triangle).

Liposomes F4 co-encapsulating fisetin and cisplatin were able to release the drugs into the medium and were then evaluated in term of efficacy on EA.hy926 cell line to evaluate the antiangiogenic effect and on U 87-MG cell line to evaluate the cytotoxic effect. As cisplatin is toxic for EA.hy926, the antiangiogenic effect will be evaluated only on fisetin loaded liposomes.

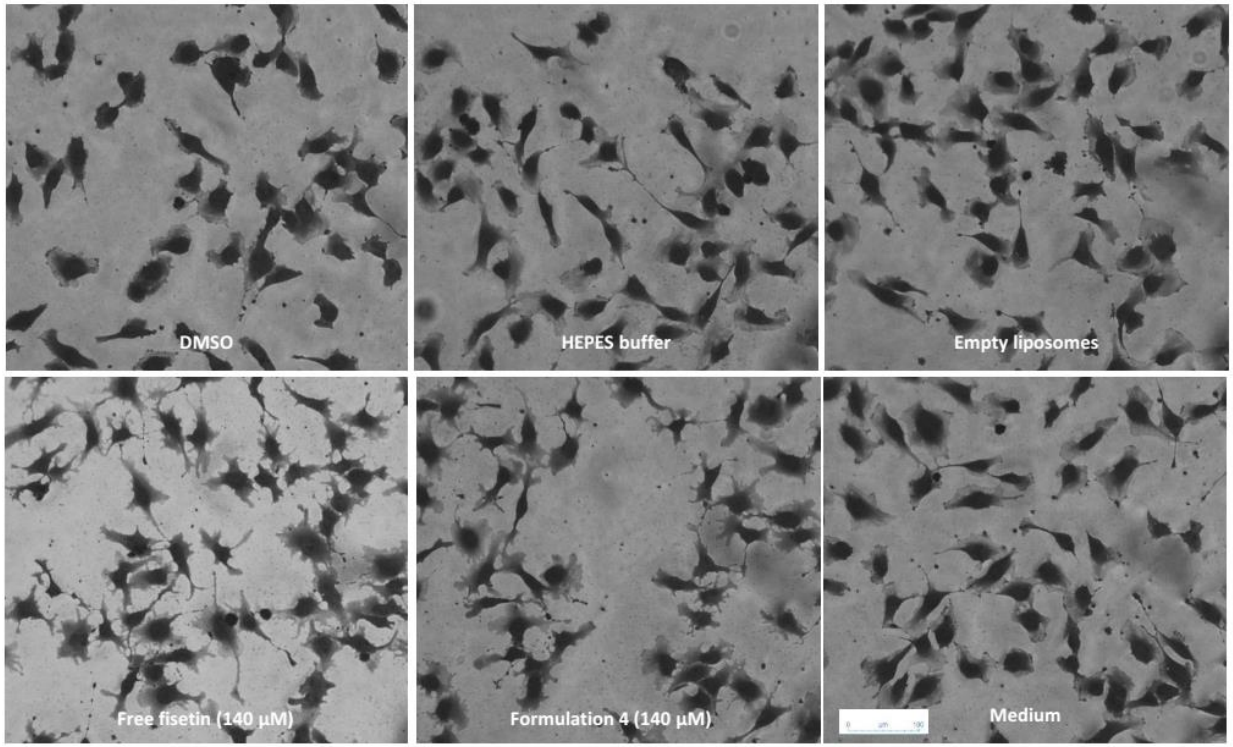
3.8. Effects of fisetin on endothelial cells EA.hy 926

As an anti-angiogenic agent, fisetin is known to have a morphological effect on endothelial cells after 2 hours of exposure at nontoxic concentration, and exert a cytotoxic effect after 24 and 48 hours of exposure (Touil et al., 2009). Therefore, we tested the fisetin-loaded liposomes F4 on EA.hy926 cells to assess if liposomal fisetin had the same effect. Figure 24A depicts the EA.hy926 cells after 2 hours

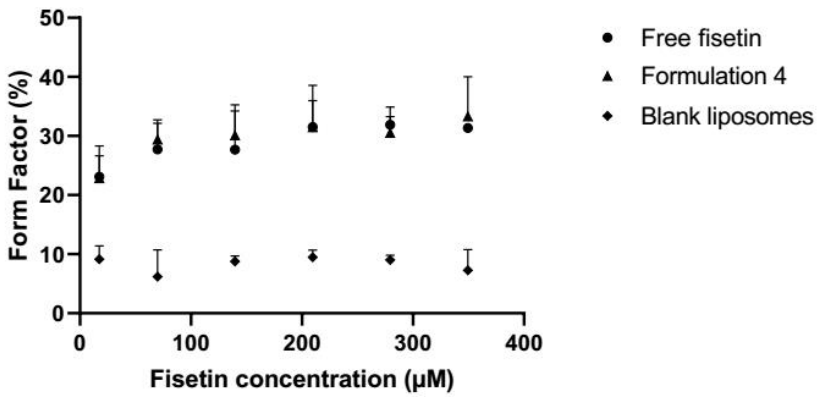
of exposure to free fisetin (control: DMSO), fisetin-loaded F4, empty liposomes F4 (control: HEPES buffer). Endothelial cells exposed to empty liposomes, HEPES buffer and DMSO are similar to the control endothelial cells, whereas endothelial cells exposed to fisetin free or loaded into liposomes F4 show some cell extensions. To quantify those morphological modifications, contouring of the cells was performed using ImageJ software and the form factor was determined: the form factor was the same for fisetin-loaded liposomes F4 than for free fisetin (Figure 24B).

Figure 24. Effect of free fisetin and liposomal fisetin on endothelial Ea.hy926 cell line. A: modification of EA.hy926 cells' morphology (magnification x125). B: form factor of empty liposomes (diamond), free fisetin (circle) and fisetin-loaded formulation 4 (triangle).

A



B



Moreover, there was a significant decrease in concentration required to kill 50% of the cells (IC50) between free fisetin and the fisetin-loaded liposomes F4 after 24 hours of exposure and a similar trend was observed after 48 hours (Table 23). Those results demonstrate that the encapsulated fisetin retained its biological activity on EA.hy926 cells. The fact that the morphological effect after two hours of exposure was similar between free fisetin and liposomal was expected because the release of fisetin in the culture medium was quick, with 85% after one hour and almost 100% after 6 hours.

Table 23. IC50 values (µM) as function of fisetin on EA.hy926 cell line (n = 4). *: p<0.05 versus free drug.

	IC50 (µM)	
	Free fisetin	Formulation 4
24 h exposure	183 ± 18	135 ± 10*
48 h exposure	131 ± 6	99 ± 8

3.9. *In vitro* cytotoxicity assay on glioblastoma cells U 87-MG

Cisplatin alone can exhibit a high cytotoxicity at low concentration on U 87-MG cell line (Dhami et al., 2014). To be able to discriminate the effect of fisetin, the *in vitro* cytotoxicity on glioma cells have been performed using a fisetin/cisplatin ratio of 5:1 w/w.

A standard colorimetric assay MTT was used to assay the antiproliferative effect of free cisplatin, free fisetin, a mixture of fisetin-loaded liposomes F4 and cisplatin-loaded liposomes F4, co-loaded liposomes F4 and empty liposomes F4. Results are reported in Figure 25 and Table 24. Empty liposomes showed no cytotoxic effect on the U 87-MG cell line. The IC50 of the U 87-MG cells was significantly higher for cisplatin-loaded liposomes F4 than for free cisplatin (15 ± 8 µM *versus* 6 ± 3 µM after 48 hours of exposure, $p < 0.05$). Those results were expected because of the sustained release of cisplatin from the liposomes. Fisetin also exhibit a cytotoxic effect on U 87-MG cell line with an IC50 of 44 ± 32 µM after 48 hours. There was no difference between the cytotoxicity of free fisetin and fisetin-loaded liposomes F4. It is to note that the addition of fisetin enables the mixture of the liposomes and the co-loaded liposomes F4 to reach the same cytotoxic activity than free cisplatin.

As a cytotoxicity of fisetin against U 87-MG was observed, we explored the potential synergism between fisetin and cisplatin on the cytotoxicity against U 87-MG using the Chou-Talalay equation. The

combination index determined was 1.1 for 24 hours and 48 hours of exposure, highlighting additivity (Chou, 2010), indicating that the ratio between fisetin and cisplatin could be optimized. However, fisetin was chosen for its antiangiogenic effect and the combination of the two drugs must be studied *in vivo.*

It would be interesting to compare the co-encapsulating liposomes with the co-administration of the two drugs both encapsulated in an optimal nanocarriers. If Markovsky *et al* evidenced that paclitaxel and doxorubicin conjugated to PGA nanoparticles increased significantly the tumor inhibition rate on MDA-MB-231 tumor-bearing mice in comparison to a mixture of individually-conjugated drugs or the combination of free drugs (Markovsky et al., 2014), few studies reporting co-encapsulation has compared it to co-adminsitration.

.

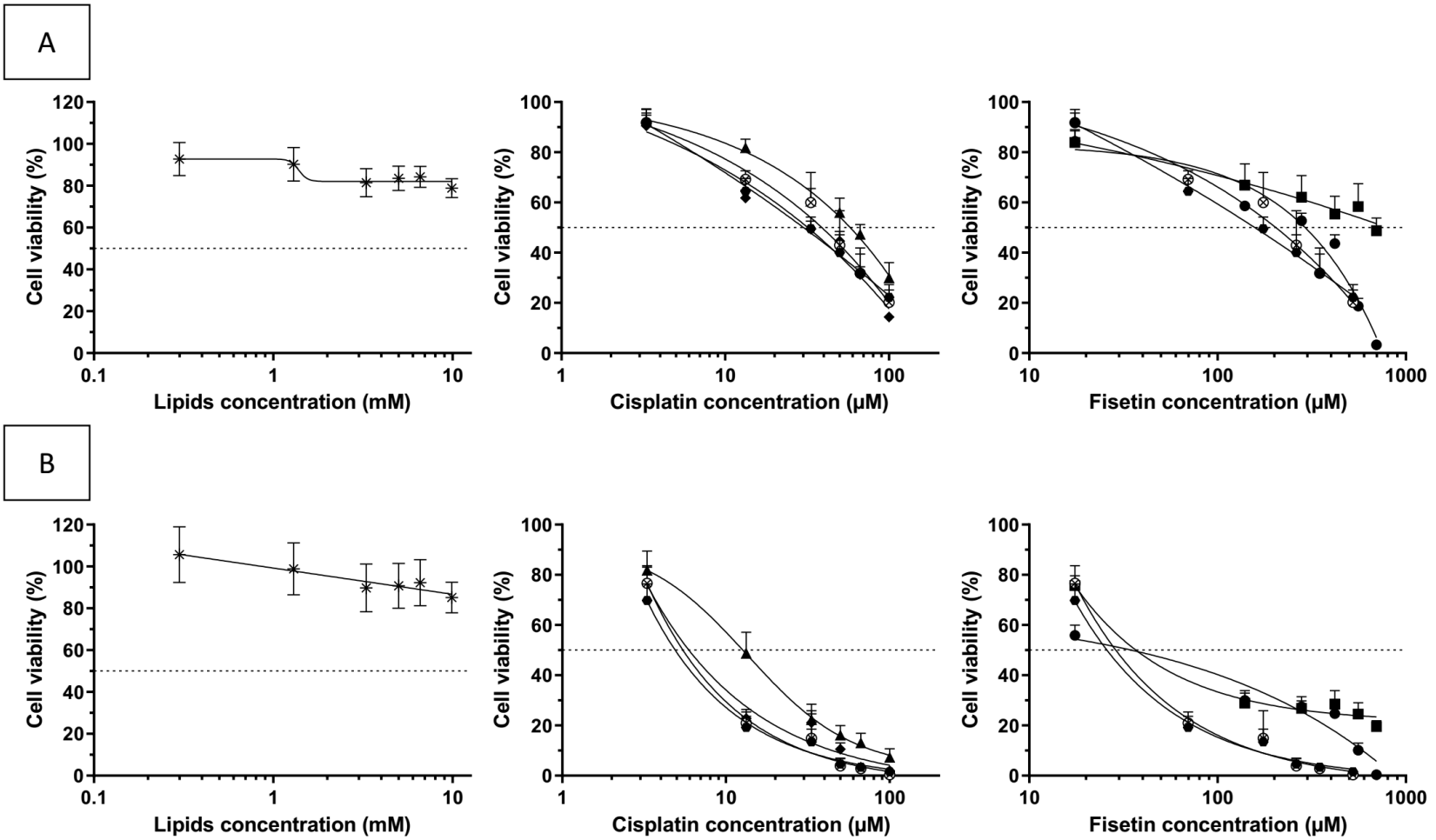


Figure 25. Comparison of the cytotoxicity of empty liposomes (star), free fisetin (circle), free cisplatin (diamond), fisetin-loaded liposomes (square), cisplatin-loaded liposomes (triangle), mixture of fisetin-loaded liposomes and cisplatin-loaded liposomes (cross in cirle) and liposomes co-encapsulating fisetin and cisplatin (hexagone) after 24 hours (A) or 48 hours (B) of exposure (n = 5).

Table 24. IC50 values (µM) as function of cisplatin and fisetin on U-87 MG cell line (n = 5). *: p<0.05 versus free drug. $: p<0.05 versus liposomal drug encapsulated alone.

		IC50 (µM)					
		Free cisplatin	Free fisetin	Cisplatin-loaded liposomes F4	Fisetin-loaded liposomes F4	Mixture of fisetin-loaded and cisplatin-loaded liposomes F4	Liposomes F4 co-encapsulating fisetin and cisplatin
24 hours exposure	Cisplatin	34 ± 12		58 ± 23		42 ± 23	36 ± 20
	Fisetin		300 ± 77		366 ± 305	215 ± 119	190 ± 103
48 hours exposure	Cisplatin	6 ± 3		15 ± 8*		7 ± 2$	6 ± 2$
	Fisetin		44 ± 32		45 ± 30	35 ± 11	32 ± 10

4. Conclusion

Thanks to DSC experiments, a compromise in the cholesterol content in the liposomal formulation has been found to insert the maximum of fisetin into the lipid bilayer and sufficient proportion of cholesterol to limit cisplatin release. The calibration and the purification methods have been identified as the critical parameters of the preparation process. The limited stability of the drugs encapsulation into liposomes appeared related to the choice of the purification method. However the developed co-loaded formulation was able to retain the activity of fisetin and was effective against glioblastoma cells. Those results could be improved *in vivo* where could be investigated the addition of the cytotoxic effect of cisplatin and fisetin with the anti-angiogenic effect of fisetin. We report for the first time to our knowledge a cytotoxic activity of fisetin on glioblastoma U 87-MG cells.

5. References

Report to section Références, page 159.

Supplementary content to article 1

In the previous article, we highlighted some several points that needed to be explored. First, we noted that a secondary peak was sometimes present in the DSC thermograms when DODA-Gly-PEG2000 was introduced into the formulations (Figure 19A et B) and it needed to be identified. Second, we evidenced the need of the cisplatin/fisetin ratio modulation. Third, we observed an impact of the purification process in term of fisetin encapsulation into the liposomes.

In this supplementary content, we report our investigations on the interactions between DOPC and DODA-Gly-PEG2000 using DSC, the influence of the cisplatin concentration in the hydration solution in an aim to modulate the cisplatin/fisetin ratio, and our experiments to assess a new purification method.

1. Materials and methods

1.1. Study of the interaction of DOPC with DODA-Gly-PEG2000 DSC

Liposomal vesicle composed of DOPC and DODA-Gly-PEG2000 at different ratios and DODA-Gly-PEG2000 micelles were prepared in deionized water and analyzed using DSC as described in the previous chapter, section 2.5.5.

1.2. Influence of the cisplatin concentration of the hydration solution.

Cisplatin-loaded liposomes were prepared as described in the previous chapter, section 2.2, using cisplatin at a concentration of either 1 mg/mL or 2 mg/mL in HEPES buffer. They were purified using size exclusion chromatography on Sephadex G-25 columns (GE Healthcare). The liposomal suspensions were compared in term of size, PDI and DL.

1.3. Influence of the purification process

1.3.1. Evaluation of fisetin leakage without a purification step

Fisetin-loaded liposomes with 1wt%, 2wt%, 3.2wt% or 4.5wt% of fisetin were prepared as described in the previous chapter, section 2.2, purified by filtration, and stored at 5 ± 3°C. At each sampling time, 10 µL of each liposomal suspension were diluted in 990 µL of HEPES buffer and analyzed using a Perkin Elmer fluorimeter. Samples were excited at 370 nm and the emission spectra was recorded from 370 to 800 nm. Datas were processed with BL Studio Software.

1.3.2.Investigation on a new purification process

Fisetin-loaded or cisplatin-loaded liposomes were prepared as described in the previous chapter, section 2.2. Fisetin-loaded liposomes were purified using either size-exclusion chromatography on Sephadex G-25 columns (GE Healthcare) or filtration under vacuum through a 0.45 µm filter (Sartorius). Cisplatin-loaded liposomes were purified using size-exclusion chromatography on Sephadex G-25 columns (GE Healthcare), or dialysis against HEPES buffer (20 mM, pH = 7.4) at 5°C ± 3°C. The liposomal suspensions were compared in term of size, PDI, DL and stability.over 10 or 30 days.

2. Results and discussion

Analysing lipid bilayer of DOPC with increasing concentration of DODA-Gly-PEG2000 surprisingly showed no modification of the onset temperature of the main transition peak of DOPC. Moreover, a an increase of enthalpy was observed. A minor secondary peak could be seen (see arrows, Figure 26). It is known that pegylated lipids such as DSPE-PEG2000 can form micelles with a low micellar critical concentration within the micromolar range (Ashok et al., 2004; Vuković et al., 2011) and that depending on the ratio phospholipid/pegylated lipids some structure different than liposomes can be observed, such as micelles (Arleth et al., 2005). With that in mind, DODA-Gly-PEG2000 micelles were prepared with the same process than liposomes. They had a diameter, determined using DLS, of 21 ± 1 nm. Figure 26 shows that the transition peak for pure micelles of DODA-Gly-PEG2000 has an onset temperature of -17.0°C, different of the onset temperature of the secondary peak found with the empty liposome (-15.7°C) and with both the liposomes of DOPC/DODA-Gly-PEG2000 (-15.1°C) (Table 25). The presence of the secondary peak on some of the thermograms (in heating mode) of the liposomal suspension could be due to the formation of mixed micelles, either during the preparation step if the pegylated lipid is not entirely included into the lipid bilayer, or during the conservation stage if the pegylated lipids induce some modification to the lipid bilayer, such as flip-flop of the lipids (Belsito et al., 2001; Paolino et al., 2017).

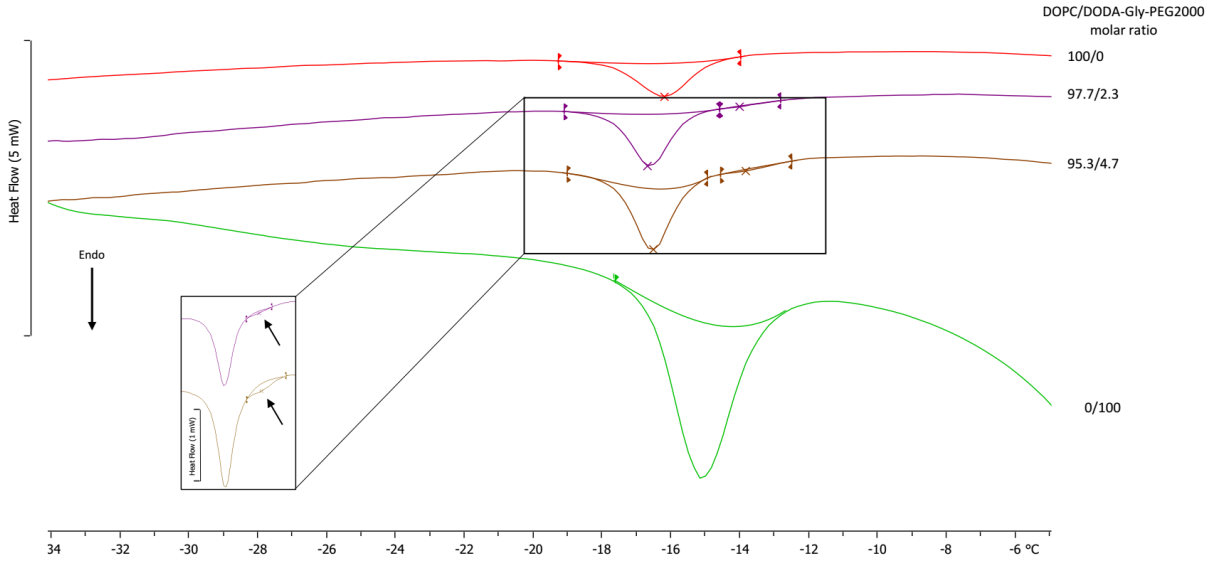


Figure 26. Thermograms, in heating mode, of DOPC bilayers with increasing ratio of DODA-Gly-PEG2000 (from 0 to 4.7mol%) and of DODA-Gly-PEG2000 micelles.

Table 25. Enthalpie and onset temperature of thermic events evidenced on the thermograms of DOPC bilayers with increasing ratio of DODA Gly PEG2000 (from 0 to 4.7mol%) and of DODA Gly PEG2000 micelles.

	Melting of DOPC		Secondary event	
Molar ratio DOPC/DODA-Gly-PEG2000	Enthalpie DOPC (J/moL DOPC)	Onset Temperature (°C)	Enthalpie DOPC (J/moL DODA-Gly-PEG2000)	Onset Temperature (°C)
100/0	14372	-17,9		
97.7/2.3	22619	-17,9	71975	-15.1
95.3/4.7	23056	-17,8	139822	-15.1
0/100			48685	-17.0

2.1. Influence of the cisplatin concentration of the hydration solution

In the previous chapter, we prepared cisplatin-loaded liposomes using a 2 mg/mL solution of cisplatin in HEPES buffer. In the aim of being able to modulate the fisetin/cisplatin ratio, we prepared cisplatin-loaded liposomes using a HEPES buffer containing only 1 mg/mL of cisplatin as a hydration solvent of the lipid film. We compared the incorporation of cisplatin into the liposomes using these two different hydration solution. As presented in Figure 27, there was no modification of the size or PDI, but a decrease in DL in comparison with the liposomes prepared with a 2 mg/mL solution of cisplatin. Thus modulating the ratio by decreasing the concentration of cisplatin inserted is feasible.

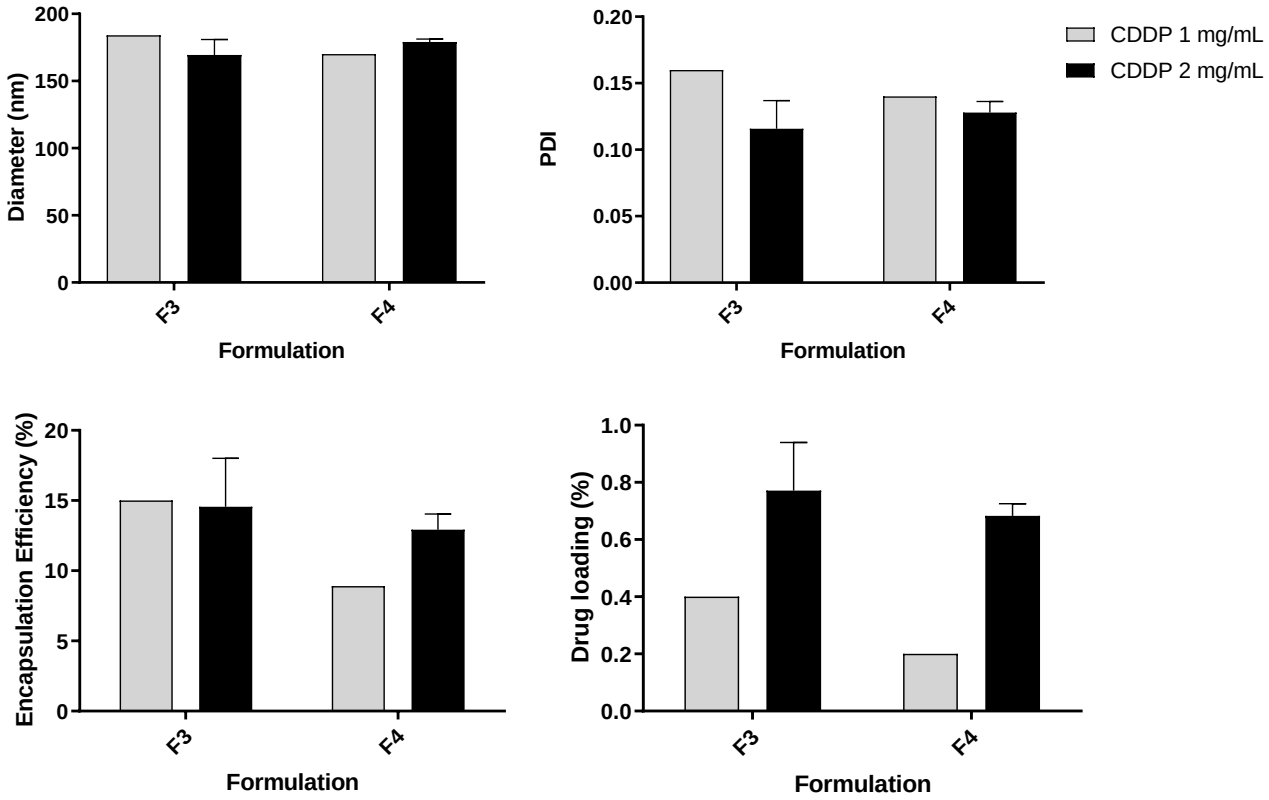


Figure 27. Comparison of liposomes hydrated using a 1 mg/mL (grey) or 2 mg/mL (black) solution of cisplatin, in term of size (A), PDI (B), encapsulation efficiency (C) and drug-loading (D).

2.2. Influence of the purification process

2.2.1. Evaluation of fisetin leakage without a purification step

As we observed that fisetin seemed to adsorb onto surfaces, we tried to find a way to follow the leakage of cisplatin over time without using a purification step. It is known that the absorption and emission spectra of fisetin are solvent-dependent (Mohapatra and Mishra, 2011): with an excitation wavelength of 370 nm, fisetin in water has a maximum emission wavelength of 486 nm whereas fisetin in lipid bilayer has a maximum emission wavelength of 538 nm (Figure 28). By using the ratio of the signal at 486 nm and the signal at 538 nm, we could follow the leakage of fisetin: the signal at 486 nm would increase and the one at 538 nm would decrease.

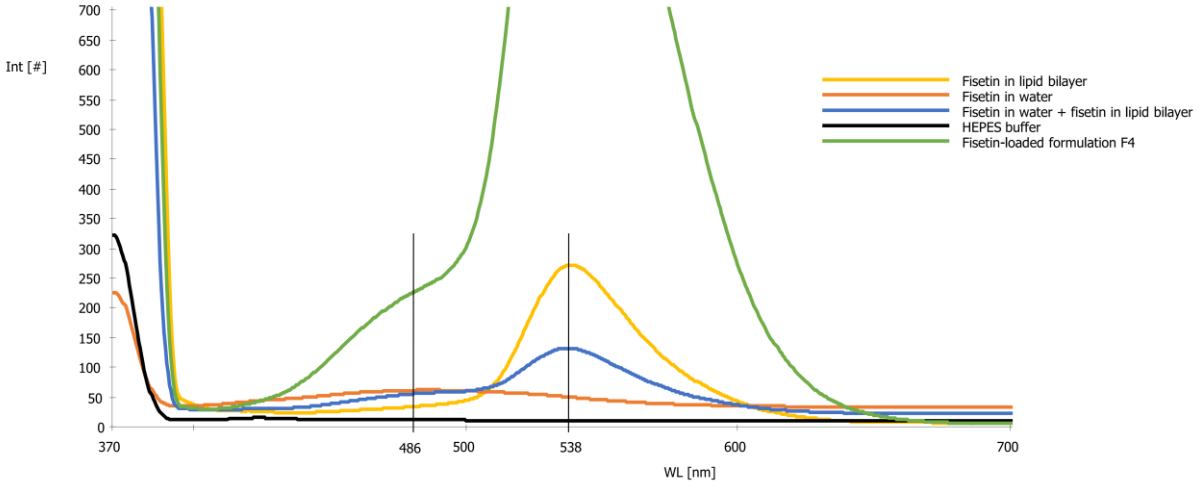


Figure 28. Emission spectrum of fisetin in lipid bilayer (yellow line), fisetin in water (orange line), a mixture of fisetin in lipid bilayer and fisetin in water (blue line), fisetin-loaded liposomes (green line) and hepes buffer (black line) from 370 to 700 nm with an excitation wavelength of 370 nm. Fisetin in water maximum emission wavelength is 486 nm and fisetin in lipid bilayer maximum emission wavelength is 538 nm.

Four different fisetin-loading liposomes with initial proportion of 1wt%, 2wt%, 3.2wt% or 4.5wt% were prepared and the leakage of fisetin was followed over 10 days (Figure 29): no clear of leakage of fisetin was observed. On the contrary, when a purification step was used to separate the possible leaked fisetin, a huge leakage was observed (Figure 20A). These results indicate that the leakage of fisetin observed in the previous chapter might be overevaluated due to the choice of an inadequate purification method.

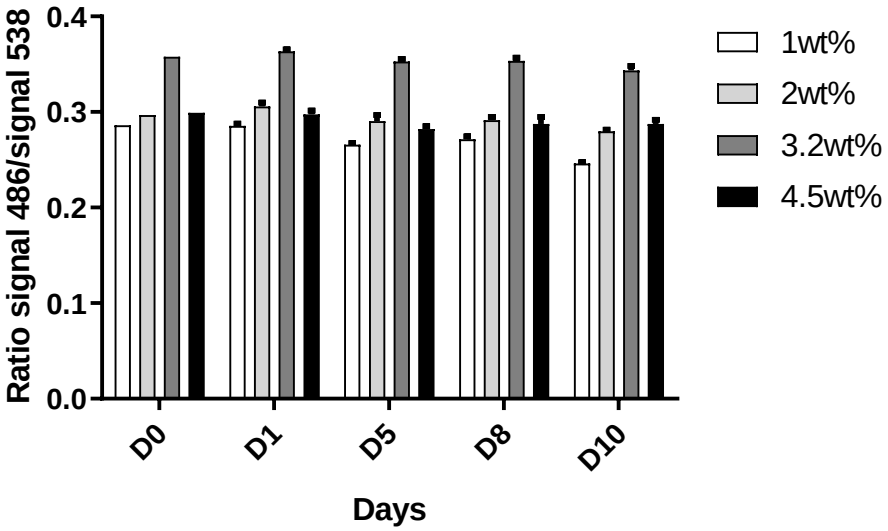


Figure 29. Ratio between the signal at 486 nm and the signal at 538 nm as a function of storage time and initial amount of fisetin in formulations.

2.2.2.Investigation on a new purification process

Fisetin being co-encapsulated with cisplatin, a step of purification is compulsory to remove free drugs. As fisetin seemed to adsorb on the sephadex beads, we investigated alternative ways to purify the liposomal suspensions: dialysis against HEPES buffer to remove free cisplatin followed by filtration to remove free fisetin. We first tried to use this purification process on liposomes encapsulating only one drug.

2.2.2.1. Fisetin-loaded liposomes

Purification by filtration led to significant higher amount of incorporated fisetin ($p < 0.01$ for formulation 3) in comparison with size-exclusion chromatography purification (Table 26). Formulations 3 and 4 allowed reaching a DL of 3%.

Table 26. Size, PDI and encapsulation of the fisetin-loaded liposomes purified by filtration.

	Filtration purification			
	Diameter (nm)	PDI	EE (%)	DL (%)
Formulation 3 (n = 3)	170 ± 6	0.12 ± 0.01	88.2 ± 6,3	2.9 ± 0.2
Formulation 4 (n = 2)	171 ± 4	0.14 ± 0.03	94.8 ± 3.2	3.1 ± 0.1

We then studied the stability of the fisetin-loaded liposomes purified by the two methods. Figure 30 showed that liposome size and PDI did not vary significantly over 30 days (formulation 3). Fisetin leaked differently from the liposomes using filtration or size-exclusion purification method, showing a good stability over 30 days with the filtration method (21% of fisetin leakage) and was not stable at 10 days with the size-exclusion purification method (74.3 ± 3.7% of fisetin leakage). The purification of fisetin by filtration was proven effective with much better encapsulation and less leaking over time, leading us to think that using size-exclusion chromatography for purification was destabilizing the liposomes.

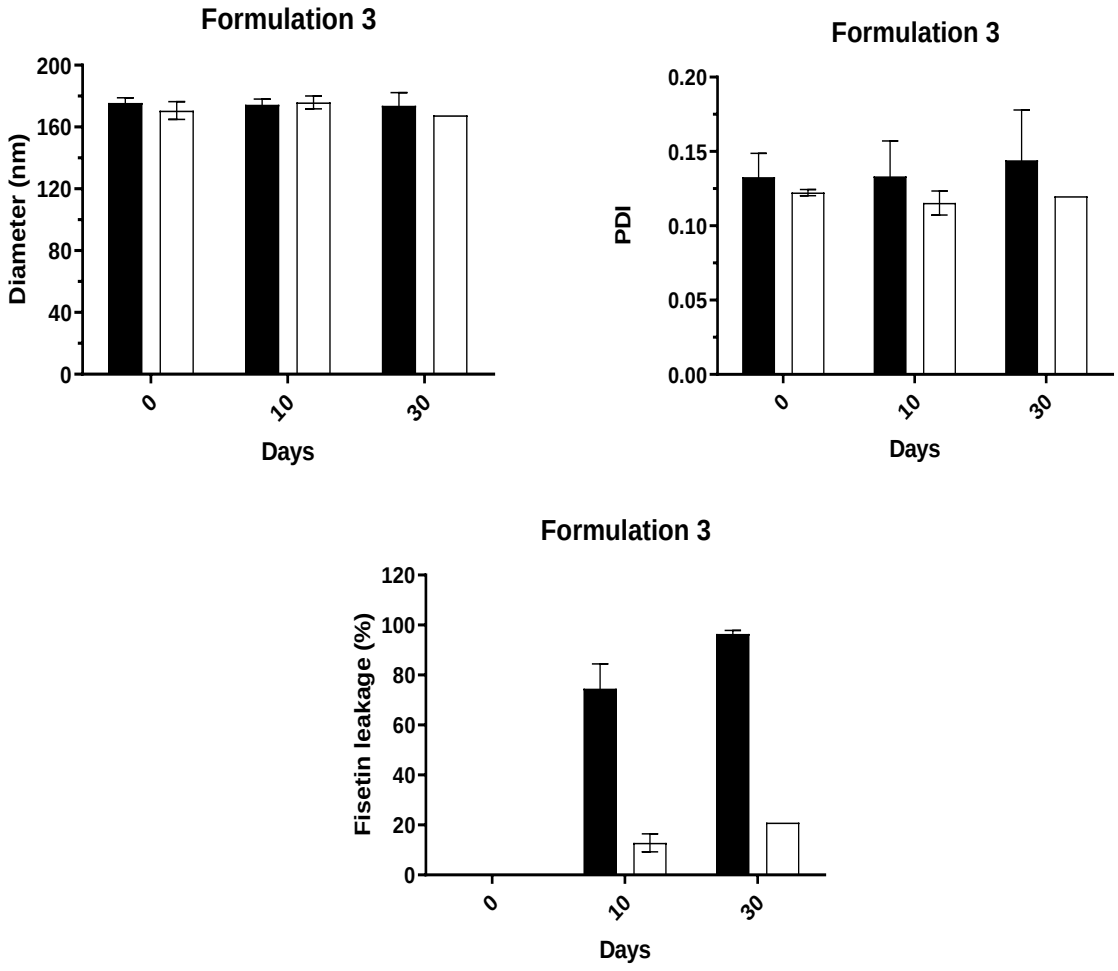


Figure 30. Comparison of the F3 fisetin-loaded liposomes stability as a function of the purification and repurification process (black: sephadex purification; white: filtration purification). (n = 2).

2.2.2.2. Cisplatin-loaded liposomes

Results for the purification of cisplatin-loaded liposomes by dialysis are presented in Table 27. Encapsulation seemed similar to the one obtained by size-exclusion chromatography purification.

Table 27. Size, PDI and encapsulation of the cisplatin-loaded liposomes purified by dialysis.

	Dialysis purification			
	Diameter (nm)	PDI	EE (%)	DL (%)
Formulation 3 (n = 1)	235	0.26	10.5	0.6
Formulation 4 (n = 2)	162 ± 28	0.14 ± 0.01	15.9 ± 7.2	0.8 ± 0.3

We then studied the stability of the cisplatin-loaded liposomes purified by the two methods. As presented in Figure 31, liposome size and PDI did not vary over 10 days. Cisplatin leakage seemed to be lower for the dialysis method but there was not enough repletion of the experiment to conclude.

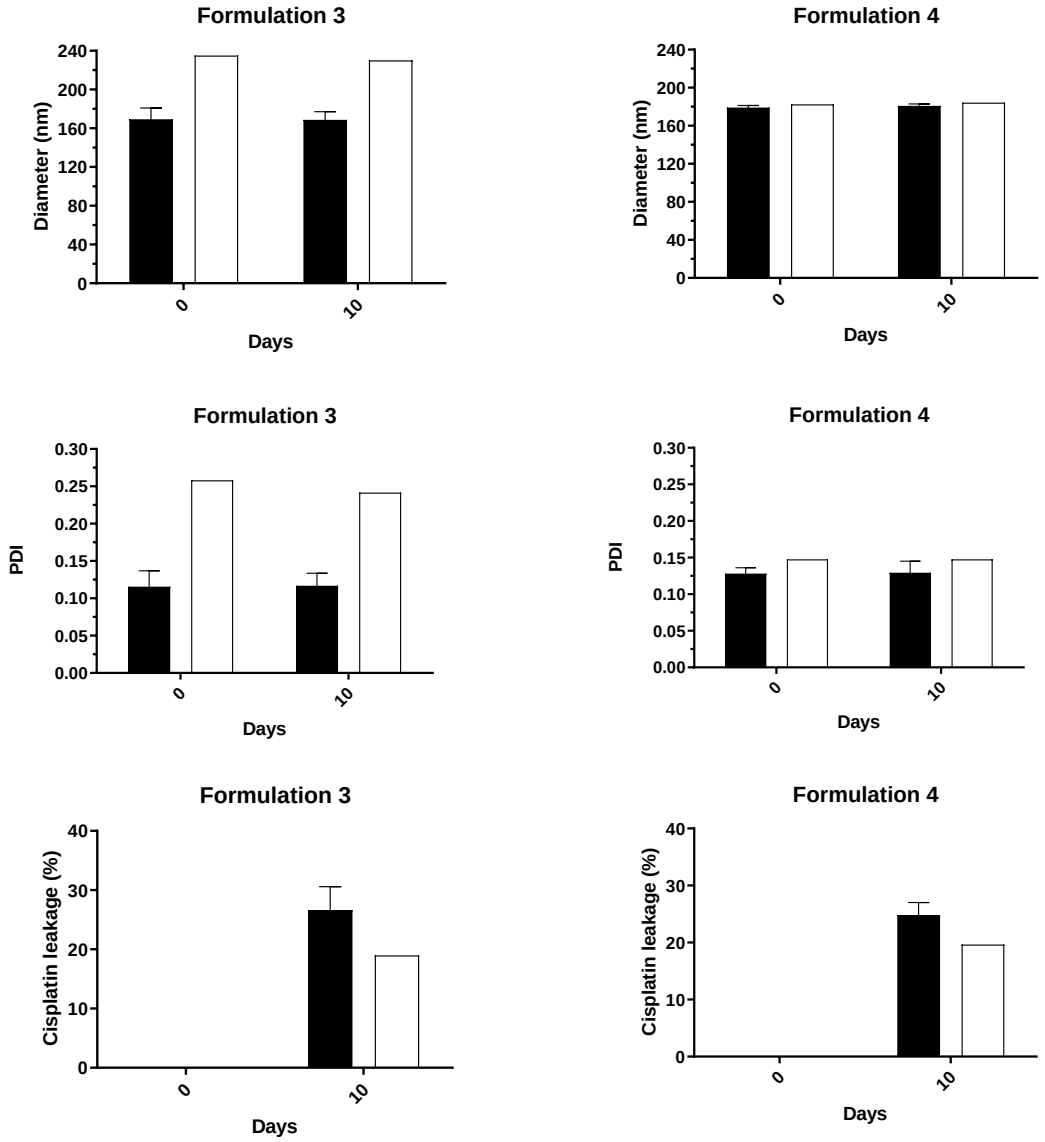


Figure 31. Comparison of the different cisplatin-loaded liposomes stability as a function of the purification and repurification process (black: sephadex purification (n = 2); white: dialysis purification (n = 1)).

To improve the liposomal formulation of co-encapsulated fisetin and cisplatin, purification by filtration followed by dialysis is promising to allow a better encapsulation of fisetin and less leakage of both drugs. However, this process should be experimented on the co-loaded liposomes with several repetitions to conclude with certainty.

3. Additional references

Report to section Références, page 159.

Co-encapsulation of fisetin and cisplatin into liposomes: stability considerations and in vivo efficacy on lung cancer animal model

Résumé en français:

Le cancer du poumon est le deuxième cancer le plus diagnostiqué et est associé à un faible taux de survie à 5 ans, de 19%. Le cisplatine, molécule de choix pour le traitement du cancer du poumon, présente l'inconvénient d'une forte toxicité pour les tissus sains, principalement au niveau du rein. L'utilisation de nanovecteurs est proposée comme une stratégie pour diminuer ces toxicités. De plus l'angiogénèse associée au cancer bronchique non à petites cellules présente un mauvais pronostic.

Notre projet a consisté à proposer une approche thérapeutique de ce cancer basée sur la co-encapsulation dans des liposomes d'un agent anti-angiogénique, la fisétine, en association avec le cisplatine. Des travaux précédents avaient permis de mette au point une formulation liposomale de composition optimale pour leur co-encapsulation qui a été reprise dans ce travail, à part le remplacement du DODA-Gly-PEG2000 synthétisé au laboratoire par un produit commercial, le DSPE-PEG2000 en vue d'essais *in vivo* : DOPC/cholestérol/DSPE-PEG2000 : 75,3:20,8:3,9.

La méthode de purification des liposomes pour éliminer les substances actives non encapsulées a été optimisée afin de limiter la perte de celles-ci. Le procédé de préparation finalement établi a consisté en la méthode d'hydratation de film suivie d'une extrusion au travers de membranes de polycarbonate de porosité 0,4 et 0,2 µm et d'une purification par dialyse suivie d'une filtration.

L'optimisation de la méthode a permis de préparer des liposomes de 166 ± 14 nm de diamètre (PDI = 0,13 ± 0,04) compatible avec une administration intraveineuse pour un ciblage tumoral et encapsulant la fisétine et le cisplatine avec une charge (*drug loading*) de 2,10 ± 0,33% et 0,85 ± 0,09% respectivement, compatible avec une activité thérapeutique.

Afin de stabiliser la formulation au long terme, une méthode de lyophilisation a été mise au point. L'utilisation d'une solution à 20% de saccharose comme cryoprotectant permet de maintenir après reconstitution immédiate la taille des liposomes mais aussi l'encapsulation de la fisétine et du cisplatine au sein de ces liposomes.

Les formulations liposomales ont ensuite été évaluées *in vitro* sur une culture de cellules de cancer du poumon 3LL montrant des activités anticancéreuses similaires pour la fisétine encapsulée ou non (IC50 = 42 µM) mais légèrement diminuées pour le cisplatine encapsulé dans les liposomes

(IC50 = 33 µM au lieu de 12 µM) en raison de sa libération prolongée dans le milieu de culture (publication 1). Toutefois les résultats ont montré un effet synergique de la fisétine et du cisplatine co-encapsulés dans des liposomes ou en association chacun dans les liposomes.

Ainsi cette formulation avec ce rapport de molécules actives a été choisie pour évaluer son activité anti-cancéreuse *in vivo* sur un modèle ectopique de carcinome de poumon de Lewis. Malgré une forte dose de cisplatine qui a conduit à une très forte mortalité des souris, cet essai a permis de mettre en évidence une claire réduction de la toxicité *in vivo* du cisplatine grâce à la co-encapsulation avec la fisétine dans les liposomes.

Co-encapsulation of fisetin and cisplatin into liposomes: stability considerations and in vivo efficacy on lung cancer animal model

Morgane Renault-Mahieux[1,2], Johanne Seguin[1], Victoire Vieillard[2], Dang-Tri Le[1], Philippe Espeau[1], René Lai-Kuen[3], Cyrille Richard[1], Nathalie Mignet[1], Muriel Paul[2], Karine Andrieux[1]

1. Unité des Technologies Chimiques et Biologiques pour la Santé (UTCBS), CNRS UMR8258, INSERM U1267, Faculté de Pharmacie, Université de Paris, 75006 Paris, France

2. Pharmacy Department, Henri Mondor Hospital Group, AP-HP, 94000 Créteil, France

3. Plateau Technique Imagerie Cellulaire et Moléculaire, CNRS UMS3612, INSERM US25, Université de Paris, 75006 Paris, France

Keywords:

Co-encapsulation, liposomes, Lewis Lung Carcinoma, fisetin, cisplatin.

1. Introduction

Lung cancer is the second most diagnosed cancer in both genders, and its five-year relative survival rate is only 19%. For all stage combined it is responsible for 18,4% of deaths by cancer in the world and almost 25% in the USA (Siegel et al., 2018; Globocan, 2018; American Cancer Society, 2019).

The therapeutic approach for the treatment of advanced stage of non-small-cell lung cancer (NSCLC) consists in radiotherapy associated with chemotherapy, principally a combination of cytotoxic drugs (paclitaxel, gemcitabine, docetaxel, vinorelbine) and platinum chemotherapy, preferentially cisplatin, an alkylating drug (Eberhardt et al., 2015). For metastatic cancer, the treatment consists in the combination of pembrolizumab (an antibody anti-PD-1) with pemetrexed and cisplatin for metastatic lung cancer. However, cisplatin can be the source of several toxicities, principally nephrotoxicity, neurotoxicity and induction of nausea and vomiting that can limits its use (Adams et al., 1989). Formulating cisplatin into nanoparticles could prevent the toxic effects of cisplatin by accumulating the nanoparticles into the tumor using the EPR effect (Peer et al., 2007). Several nanoformulations have been developed with significant reduction of the toxicity while preserving its cytotoxic effect (Fantini et al., 2011; Tan and Wang, 2018; B. Xu et al., 2018).

Angiogenesis is frequent in NSCLC and is associated with bad prognosis (Popper, 2016). Bevacizumab, an antibody directed against the vascular endothelial growth factor, is already used in clinic in association with chemotherapy, principally with platinum compounds (Reck et al., 2010; Soria et al., 2013; Alshangiti et al., 2018).

In a previous work, we designed liposomes co-encapsulating fisetin and cisplatin (publication 1). Fisetin is a natural flavonoid with an antiangiogenic activity *in vitro* and *in vivo* (Fotsis et al., 1997; Touil et al., 2009; Ansó et al., 2010; Touil et al., 2011b; Bhat et al., 2012; Seguin et al., 2013; J. H. Park et al., 2013). Moreover, it has demonstrated a cytotoxic activity on murine Lewis Lung carcinoma *in vitro* (Mignet et al., 2012) and *in vivo* (Ragelle et al., 2012; Seguin et al., 2013). Fisetin could also reverse cisplatin resistance on A549 cells *in vitro* (Zhuo et al., 2015). Finally, fisetin possess an anti-oxidative action and a study reported that fisetin could decrease the nephrotoxicity of cisplatin (Sahu et al., 2014). A combination of cisplatin and fisetin might be a promising approach against NSCLC.

In this work, we report an optimization of the stability of the liposomes co-encapsulating fisetin and cisplatin and we investigate its activity *in vitro* and *in vivo*.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Fisetin (98% purity) was purchased from Shanghai FWD Chemicals Limited (Shanghai, China), cisplatin, cholesterol, mannitol, trehalose, acetonitrile (ACN), methanol, HEPES, PBS (phosphate buffer saline), 3-(Trimethylsilyl)propionique-2,2,3,3-d4 acid (TMSP), triton X-100 solution from Sigma-Aldrich (Missouri, USA) and dioleyl-phosphatidylcholine (DOPC) 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-2000] (DSPE-PEG2000) from Polar Avanti Lipids, Inc (Coger, Paris, France). Chloroform, absolute ethanol, sodium hydroxide (NaOH) 1N and deuterated methanol (CD_3OD) were purchased from Carlo Erba Reagents (Val de Reuil, France), acetic acid (98-100%) and nitric acid 65% from Merck Millipore (Darmstadt, Germany), hydrochloric acid 37% from VWR Chemicals (Fontenay-sous-Bois, France) and sodium chloride and sucrose from Cooper (Melun, France). Dubelcco's modified Eagle's medium (DMEM), fœtal bovine serum (FBS), streptomycin and penicillin were purchased from Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA). Deionized water was obtained using a Direct-Q3 device from Millipore.

2.2. Preparation of liposomes

The process, except the extrusion, was carried out in a heating bath at 40°C. All liposomes were prepared using the film-hydration method (Bangham et al., 1965). Briefly, lipids with or without fisetin were dissolved in a chloroform-ethanol mixture and introduced in a clean dry round-bottom flask and

connected to a Buchi evaporator R-100 equipped with a V-100 pump and a F-105 recirculating cooler. The mixture was exposed to a starting pressure at 250 mbar and then 100 mbar to form a regular film on the bottom. The pressure was then decreased to reach 10 mbar which was maintained during three hours. HEPES buffer (20 mM, pH = 7.4) with or without cisplatin dissolved in it was added to the flask and the rehydration process was performed overnight providing an aqueous suspension of liposomes.

The size calibration was performed using extrusion of the liposomes through 0.4 and 0.2 µm polycarbonate membranes (Whatman) three times each using a Mini-extruder (Avanti Polar Lipids, Inc) at room temperature.

2.3. Formulation tested

Liposomes encapsulating cisplatin and fisetin were composed of DOPC/cholesterol/DSPE-PEG2000 (75.3:20.8:3.9 molar ratio). This formulation has been developed in our previous work (publication 1) except that DODA-Gly-PEG2000 has been replaced by the commercial product DSPE-PEG2000.

2.4. Characterization of liposomes

2.4.1. Determination of size and morphology

2.4.1.1. Dynamic light scattering (DLS)

The liposome's diameter and the polydispersity index (PDI) were determined after dilution in HEPES buffer at a lipid concentration of approximatively 0.5 mg/mL by DLS using a Zeta Sizer NanoSeries Malvern (Malvern Instrument, Venissieux, France) at 25°C with a measurement angle of 173°. Position was fixed at 4.65 cm. Results presented in this article corresponds to the diameter calculated by using the intensity of the signal. Aggregation was defined by the appearance of a second population at higher diameter.

2.4.1.2. Transmission electronic microscopy (TEM)

Liposomal suspension were deposed on a Formvar/carbon copper grid 200 mesh from Agar Scientific and uranyl acetate as a contrasting agent. TEM observations were performed on a microscope JEOL, JEM 100S with an accelerating voltage of 80 kV.

2.4.2. Fisetin quantification

Fisetin was assayed after purification using a reverse phase HPLC system (Dionex U3000) equipped with a polymeric PRP-1 250*4.6 mm, 5 µm (Nevada, United States). The injected volume was 10 µL. Eluent A consisted of 2% acetic acid in deionized water and eluent B was ACN. The flow rate was 1 mL/min. The elution gradient started with 15% B for 3 minutes. From 3 to 6 minutes, the percentage

of eluent B was increased to achieve 50% which was maintained for 6 minutes, to turn back to 15% in 2 minutes, followed by an equilibrium phase of 2 minutes. The UV detection of the drugs was carried out at 360 nm. Data were processed using the Chromeleon® (v 6.8) software.

The calibration curve was prepared by dissolving fisetin in methanol. This method was validated according to ICH Q2(R1) ($Peak\ area = 0{,}17732 \times Concentration + 0{,}85565$, R^2 = 0,999 ± 0,001).

The purified fisetin-loaded or co-loaded liposomes were diluted in methanol prior the injection to range in the calibration curve (5-100 µg/mL).

2.4.3.Cisplatin quantification

Cisplatin was assayed after purification against a standard curve (300-2500 ng/mL) using a Zeeman Atomic Absorption Spectrometer AA240Z (Agilent Technologies) with a graphite tube atomizer (GTA120) connected to a programmable sample dispenser (PSD120) as previously described (Meerum Terwogt et al., 2000). The detection was monitored at 265.9 nm with a slit band width of 0.2 nm (lamp current fixed at 10 mA). The program consisted of a drying stage from 50 to 250°C, an ashing stage at 1400°C, an atomization phase at 2700°C and a burning-clean stage at 2700°C with cooling down at 50°C. The standard solutions were prepared using a solution of cisplatin 3.07 µg/mL in HEPES buffer 20 mM pH = 7.4 mixed with a suspension of blank liposomes; this stock solution was directly diluted by the autosampler with an acidic buffer (hydrochloric acid 0.6% in physiological serum). A matrix modifying solution of Triton X-100 0.1% + nitric acid 0.2% was applied to each standard solution and sample. Samples were diluted with the acidic buffer to fit in the range of the calibration range.

2.4.4.Determination of encapsulation efficiency (EE) and drug loading (DL)

Encapsulation Efficiency was determined as EE (%, w/w) = (drug concentration after purification/total amount of drug in the formulation) x 100.

Drug Loading was determined as DL (%, w/w) = (drug concentration after purification/(concentration of lipids + drug concentration after purification)) x 100.

2.4.5.Lipid quantification

The liposomes' lipid content was assayed by NMR using TMSP as an internal standard (δ = 0 ppm) with a method adapted from (Hein et al., 2016). Briefly, the water was removed from the liposomal suspension using a lyophilizator alpha 2-4 LD Christ freeze-drier (Bioblock Scientific, France). The dried-content was then dissolved in 480 µL of CD_3OD and 20 µL of TMSP at 50 µM was added.

^{1}H NMR measurements were made at room temperature on a Bruker 400 Ultrashield NMR spectrometer operating at 400 MHz (Massachusetts, United-States). Locking and shimming was

performed on the signal of CD_3OD before each sample followed by 64 scans. Datas were processed and the peaks (0.88 ppm for the lipids and 0 ppm for TMSP) were integrated using SpinWorks 3.1. The peak at 0.88 ppm was chosen amongst several options as it corresponds to two terminal $–CH_3$ of all lipids and showed no overlapping with the other components of the liposomal suspension. This allowed to determine the total lipid content without having to check if the ratio of the three mixed lipids was maintained during the process.

The total lipid concentration (C_L) was calculated comparing peak area of TMSP (A_{IS}) (known concentration C_{EI}) with the peak area of lipids (A_L) using the following equation:

$$C_L = \frac{9A_L C_{IS} V_{IS}}{4A_{IS} V_L}$$

With V_{IS} being the volume of TMSP introduced and V_L the volume of the liposomal suspension.

2.5. Stability studies

Drug encapsulation into liposomes was followed as a function of time. Liposomal suspensions were stored at 5°C ± 3°C. Samples were withdrawn, purified again and characterized at each sampling time. Percentage of each drug leakage during storage was calculated as 100 - (concentration of drug still encapsulated at day of sampling/EE at day 0) x 100.

2.6. Impact of the purification method

Liposomes were prepared as described above, with the addition of fisetin in the lipid phase in order to obtain a theoretical concentration of 1.2 mg/mL in the final suspensions and with the addition of cisplatin at a concentration of 2 mg/mL in HEPES buffer.

Purification was carried out by size-exclusion chromatography on Sephadex G-25 columns (GE Healthcare) or by dialysis HEPES buffer (20 mM, pH = 7.4) at 5°C ± 3°C followed by filtration through 0.45 µm filter (Sartorius). The cisplatin concentration into the liposomes after purification was then assayed. The liposomal suspensions were compared in term of diameter, PDI, DL and stability over 10 days.

2.7. Optimization of a freeze-drying process to improve the stability of the liposomes

2.7.1. Freeze-drying process

Freeze-drying of liposomes was conducted by freezing the liposomal suspension at -80°C for 3 hours using a FRYKA Kaltetechnik freezer, then subliming the ice using a freeze-drier Alpha 1-4 LSC (Bioblock Scientific, France) and a Rotary Vane Vacuum Pump. Primary dessication was performed with a

temperature of -40°C and pressure setting at 0.001 mbar for 16 hours. The dried mixture was reconstituted with deionized water.

2.7.2.Choice of the lyopotectant and its concentration

Empty liposomes were prepared with a lipid concentration of 15 µmol/mL. Lipid films after evaporation were hydrated with 1 mL sucrose or trehalose solution with a lyoprotectants to lipid ratio of 5:1, 10:1 and 20:1 (w/w). A mixture of sucrose and mannitol at ratio 1:9, 5:5 and 9:1 with a lyoprotectants to lipid ratio of 20:1 was also investigated. The liposomal suspensions were freeze-dried then rehydrated. Diameter and PDI were measured before and after freeze-drying.

2.7.3.Choice of the filling volume

Empty liposomes were prepared with a lipid concentration of 15 µmol/mL using sucrose with a lyoprotectant to lipid ratio of 20:1 (w/w). Several filling volumes ranging from 0.5 mL to 4 mL were compared in terms of aspects of the freeze-dried cake, diameter, PDI and aggregation.

The residual water in the freeze-dried cakes of two conditions (filling volume of 1 mL or 1.5 mL) was measured by Mettler Toledo TGA 1100 (Greifensee, Switchzerland) with a heating rate of 100K/min starting from 25°C to 200°C.

2.7.4. Impact of the process of freeze-drying on co-loaded liposomes

Co-loaded liposomes were prepared using a sucrose to lipids ratio of 20:1 and purified using dialysis followed by filtration. The freeze-drying process was carried out using as described in section 2.7.1 using a filling volume of 1.5 mL.

To evaluate the impact of the freeze-drying process on the stability of the liposomes, half of the liposomes prepared went under a second purification immediately after the first purification while the second half was submitted to the freeze-drying process. After reconstitution with purified water, a second purification was performed using dialysis, and the diameter, PDI, morphology and encapsulation of fisetin and cisplatin were compared before and after freeze-drying, and with the liposomes twice purified.

2.8. *In vitro* cytotoxicity on 3LL cell line

The murine lewis lung carcinoma cell line LL/2 (LLC1) (ATCC® CRL-1642™) also called 3LL were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, USA) and were cultured in DMEM 2 mg/mL glutamine, 10% fetal bovine serum (FBS), 100 µg/mL streptomycin and 100 UI/mL penicillin (37°C, 5% CO_2). Exponentially growing cells were plated onto 96-wells plates at 10,000 cells/well and cultured for 24 hours (37°, 5% CO_2). Then free fisetin, free cisplatin, fisetin-loaded liposomes, cisplatin-

loaded liposomes, a mixture of cisplatin-loaded and fisetin loaded liposomes (ratio 1:3.5), co-loaded liposomes and empty liposomes were added to the wells to reach concentrations ranging from 3 to 100 µM for cisplatin and from 18 to 700 µM for fisetin. Control cells were exposed to DMSO or HEPES buffer. After 24 hours of exposure, viability was assessed using the MTT ((1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenyltetrazolium) test and absorbance was read at 550 nm in a microplate reader 800 TS (Biotek Instrument, Vermont, USA). Results are expressed in percent of viability compared to the same concentration of solvent (DMSO for free fisetin and HEPES buffer for free cisplatin and liposomal suspensions).

To evaluate the potential synergic effect of the combination of cisplatin and fisetin, the combination index was calculated using the Chou and Talalay equation: $CI = (IC50_{F/F}/IC50_{F/F+C}) + (IC50_{C/C}/IC50_{C/F+C})$ were IC50 is the concentration required to kill 50% of the cells, $IC50_{F/F}$ the IC50 of fisetin in fisetin-loaded liposomes, $IC50_{F/F+C}$ the IC50 of fisetin in co-loaded liposomes, $IC50_{C/C}$ the IC50 of cisplatin in cisplatin liposomes and $IC50_{C/F+C}$ is the IC50 of cisplatin in co-loaded liposomes. $CI < 0.9$ indicate synergism, CI between 0.9 and 1.1 indicate additivity and $CI > 1.1$ indicate antagonism (Chou, 2010).

2.9. *In vivo* anti-tumour evaluation in mice

Animal experiments were conducted according to European and national guidelines and were approved by the institutional ethics committee.

Female 6-weeks old C57BL/6J mice (Janvier, St Genest de Lisle, France) were used for anti-tumor evaluation. Lewis lung tumour fragments (about 3 mm^3) were injected subcutaneously (s.c.) bilaterally into mouse flanks on day 1 and 5 days after tumor implantation mice were randomly divided into 5 groups (n = 7 or 8) and received either free cisplatin 6 mg/kg/injection, liposomal cisplatin 6 mg/kg/injection, a mixture of liposomal cisplatin 6 mg/kg/injection and fisetin-loaded liposomes 21 mg/kg/injection or liposomes co-encapsulating cisplatin (6 mg/kg/injection) and fisetin (21 mg/kg/injection) (fisetin/cisplatin ratio 3.5:1). All treatments were administered *via* intraperitoneal (i.p.) route at day 5, 6, 8, and 9 post tumor injection. The volumes of injection were comprised between 200 and 500 µL depending of the formulation. The weight, behavior and external aspect of the mice were controlled every day in order to detect any suffering and the mice were sacrificed when more than 20% of weight loss was observed or when they expressed suffering. Tumour growth was assessed every 2 days using bi-dimensional measurements with a caliper. Tumour volume (mm^3) was calculated according to the formula: $width^2 \times length \times 0.5$ (mm), and mice were sacrificed when the total of tumor volume reached 800 mm^3 or when the tumor was necrotic.

The tumor growth delay (treated–control, or T–C) in days was determined as the number of additional days for median tumor to reach 100°mm^3 in the treated groups in comparison with the control group.

The tumor growth inhibition value (T/C) was calculated by TC (%) = (median tumor weight of the treated mice/median tumor weight of the control mice) x 100. According to the NCI standards a T/C < 42% is the minimum level for activity. A T/C < 10% is considered as a high antitumor activity level which justifies further development (Bissery et al., 1991).

2.10. Statistics

Each experiments was usually carried out in triplicate. For each characterization test (except for the transmission electron microscopy and the lipid quantification), three samples of each formulation were taken and measured in triplicate. All measurements are presented as mean ± standard deviation for the *in vitro* experiment and as mean ± SEM for the *in vivo* experiments. Non parametric Mann-Whitney test was used to calculate significant differences; p-values less than 0.05 were considered to be significant. The evolution of tumor volumes were compared using a multiple t test with Bonferroni-Dunn method. All calculations and statistical tests were performed using GraphPad Prism® software.

3. Results and discussion

3.1. Impact of the purification method

In a previous work, our team had optimized the preparation process of liposomes co-encapsulating fisetin and cisplatin but highlighted the fact the size-exclusion chromatography might not be the best purification method for fisetin-loaded liposomes, leading to a rapid and huge leakage (publication 1). In Table 28 are presented the characterization of co-loaded liposomes purified by size-exclusion chromatography or by dialysis and filtration. The purification method had a very limited impact on the encapsulation of cisplatin or on the recovery of the lipids at the end of the process. However, it had a significant impact on the encapsulation of fisetin ($p < 0.05$). Purification by size-exclusion chromatography seemed to disturb the lipid bilayer enough to lead to a leakage of fisetin but not to the leakage of lipids or cisplatin, indicating that fisetin must be located near to the polar heads of the phospholipids present in the outside layer of the vesicle. Those results are consistent with previous studies that localized fisetin at the head group region of the lipid bilayer membrane using spectrophotometric studies (Sengupta et al., 2004; Mohapatra and Mishra, 2011).

Table 28. Impact of the purification process on the size, PDI and encapsulation of fisetin and cisplatin in co-loaded liposomes (n = 4). *p < 0.05 in comparison to size-exclusion chromatography.

	Diameter (nm)	**PDI**	**Fisetin**		**Cisplatin**		**Lipids recovery (%)**
			EE (%)	DL (%)	EE (%)	DL (%)	
Size-exclusion chromatography (n = 4)	166 ± 15	0.13 ± 0.04	16.2 ± 6.7	0.55 ± 0.24	14.6 ± 3.6	0.83 ± 0.14	97.0 ± 0.6
Dialysis + filtration (n = 4)	166 ± 14	0.13 ± 0.04	63.1 ± 8.9*	2.10 ± 0.33*	15.0 ± 2.4	0.85 ± 0.09	90.5 ± 2.5

The stability over ten days of the liposomes as a function of the purification process is presented in Figure 32. This study highlights once again the fact that size-exclusion chromatography is not adapted for the encapsulation of fisetin into liposomes. Purification method by dialysis against PBS buffer (20 mM, pH 7.4) at 5°C ± 3°C followed by filtration through 0.45 µm filter was chosen for the rest of the experiments.

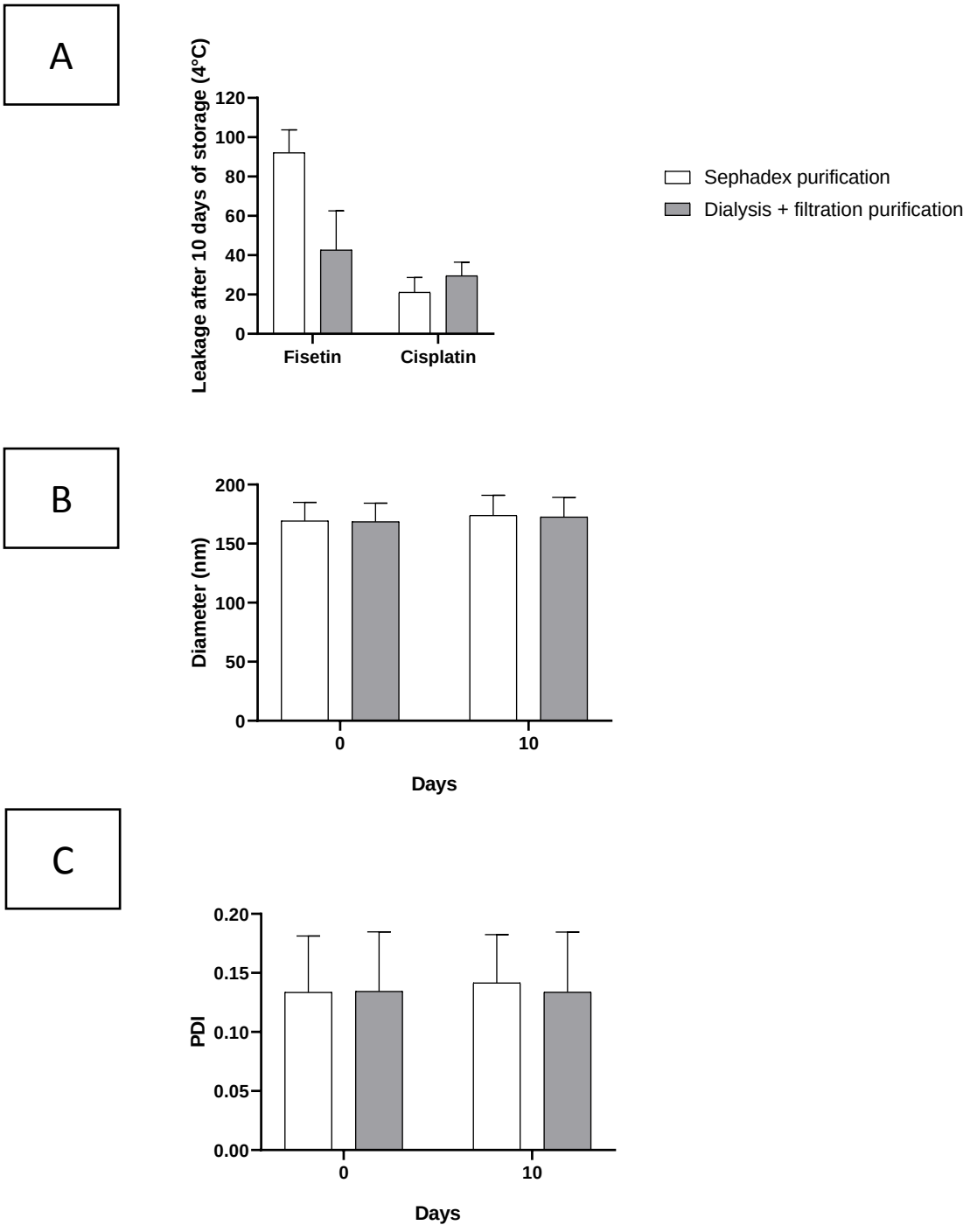


Figure 32. Impact of the purification process on the stability of the co-loaded liposomes (n = 3): on the leakage of the drugs (A), average diameter (B) and the polydispersity (C) of the liposomes.

3.2. Stability of the liposomes in suspensions

After optimizing the purification process, a stability study was conducted over 30 days on fisetin-loaded, cisplatin-loaded and co-loaded liposomes to assess if the preparations were stable as function of time. Results are presented in Figure 33. Size and PDI were not modified over 30 days, as the diameter remained around 170 nm and the PDI around 0.11 at each sampling days. However, the loss of fisetin was over 20% after 10 days and around 40% after 30 days, and the loss of cisplatin around 20% and 30% after 10 and 30 days respectively.

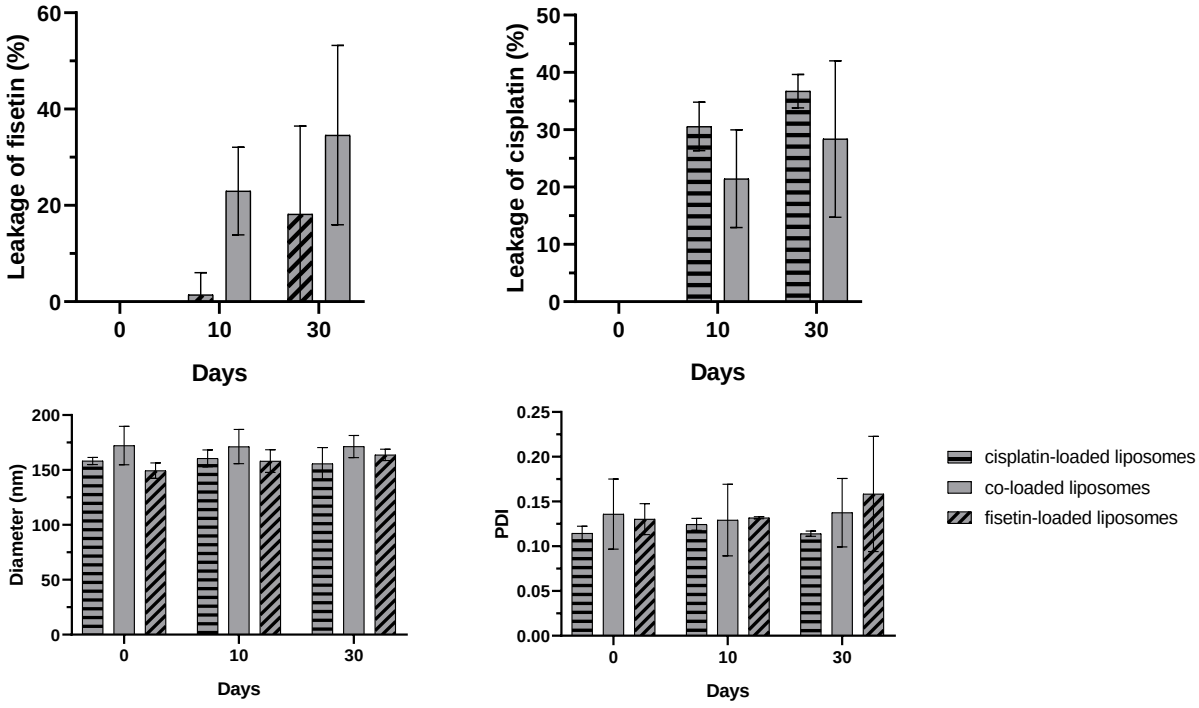


Figure 33. Stability over 30 days of the fisetin-loaded, cisplatin-loaded and co-loaded liposomes (n = 3).

The formulations did not allow the stability of the fisetin and cisplatin inside the liposomes after 10 days. This observations are currently observed in some liposomes on the market that are consequently freeze-dried for long storage (Ambisome®, Vyxeos®) (Bulbake et al., 2017).

To improve the long-term shelf stability, freeze-drying of the liposomes was investigated.

3.3. Freeze-drying of the liposomes

Amongst the critical parameters of the reconstituted liposomal suspension, conservation of size, PDI, structure of the liposomes, the prevention of the drug leakage and the ability of the freeze-dried cake

to easily be resuspended are the most important. Those parameters are not easily achieved and in a lot of studies the freeze-drying process did not prevent the leakage of the drug (Franzé et al., 2018). Even if the composition of the lipid bilayer itself has an influence (Franzé et al., 2018), here the lipid composition was optimized for the co-encapsulation of fisetin and cisplatin and could not be modified. The study focused on the choice of the lyoprotectants, their proportion and the filling volume of the vials.

3.3.1.Choice of the lyoprotectant and lyoprotectant-to-lipid ratio

Firstly, the lyoprotectant and the lyoprotectant-to-lipid ratio were investigated for their effect in term of size preservation on empty liposomes by assessing the diameter and PDI before and after freeze-drying. Indeed, liposomes without any cryoprotectant aggregates and lose the encapsulated drug upon reconstitution (Miyajima, 1997). Saccharide are widely used for freeze-drying process. However, it is well known that monosaccharide such as glucose or sorbitol are not efficient for the freeze-drying of liposomes and that disaccharide such as sucrose or trehalose should be preferred (van Winden, 2003; Chen et al., 2010; Arshinova et al., 2012; Franzé et al., 2018). In Table 29 are presented the size and PDI of empty liposomes formulated with trehalose or sucrose at different lyoprotectant-to-lipid ratio and a filling volume of 1 mL before and after freeze-drying. Lyoprotectant-to-lipids ratio of 5:1 and a sucrose-to-lipid ratio of 10:1 were not able to prevent the aggregation of the liposomes, as can be seen by the huge increase in diameter and PDI. A trehalose-to-lipid ratio of 10:1 could prevent the increase of mean diameter but some aggregation was reported.

Only a lyoprotectant-to-lipid ratio of 20:1 was able to lead to a satisfactory preservation of size and PDI. As aggregates were sometimes observed upon reconstitution after freeze-drying with trehalose as a lyoprotectant, sucrose-to-lipid ratio 20:1 was chosen for further experiments. Those conditions were able to preserve the size and PDI of the liposomal suspension, but led to an inhomogeneous aspect of the cake which seemed to still contain water. Indeed, when thermogravimetric analysis were performed on those freeze-dried cake, 7.0% of residual water were found suggesting that the process conditions could be improved.

Table 29. Impact of lyoprotectant and lyoprotectant-to-lipids ratio on freeze-drying of empty liposomes.

		None	**Sucrose**			**Trehalose**		
Lyoprotectant-to-lipid ratio		0:1	5:1	10:1	20:1	5:1	10:1	20:1
	n	6	2	2	3	2	2	3
Before freeze-drying	Diameter (nm)	183 ± 11	193 ± 3	195 ± 4	172 ± 2	209 ± 3	187 ± 10	178 ± 8
	PDI	0,20 ± 0,05	0,11± 0,02	0,16 ± 0,01	0,09 ± 0,02	0,18 ± 0,02	0,15 ± 0,03	0,09 ± 0,01
	Aggregates	No	No	No	No	No	No	No
After freeze-drying	Aspect of the freeze-dried cake	Inhomogeneous	Inhomogeneous	Inhomogeneous	Inhomogeneous	Inhomogeneous	Inhomogeneous	Inhomogeneous
	Diameter (nm)	2468 ± 1351	1342 ± 1256	483 ± 81	175 ± 3 (NS)	1068 ± 807	185 ± 11	200 ± 6 (NS)
	PDI	0,92 ± 0,18	0,54 ± 0,17	0,60 ± 0,10	0,12 ± 0,02 (NS)	0,73 ± 0,28	0,25 ± 0,02	0,17 ± 0,02 (NS)
	Aggregates	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Sometimes

Mannitol is used in freeze-drying process as a bulking agent able to speed the drying process and consequently stabilize the porous structure of the freeze-dried samples (Nail et al., 2002). Table 30 reports the effect of the addition of mannitol at different ratio in the lyoprotecant solution. Mannitol was effective in improving the aspect of the freeze-dried cake but led to the aggregation of the liposomes with an increase of the mean diameter and PDI. This can be explained by the fact that mannitol can crystallized within the liposomes and disrupt their bilayers (Chen et al., 2010; Franzé et al., 2018).

Table 30. Effect of the additive mannitol on the aspect of the freeze-dried cake and the preservation of size and PDI of empty liposomes (n = 1).

	Sucrose to mannitol ratio	**9:1**	**5:5**	**1:9**
	Lyoprotectant-to-lipid ratio	20:1	20:1	20:1
	Volume in the vial (mL)	1	1	1
Before freeze-drying	Diameter (nm)	160	174	164
	PDI	0.11	0.10	0.10
	Aggregates	-	-	-
After freeze-drying	Aspect of the freeze-dried cake	Incorrect	Homogenous, porous	Homogenous, porous
	Diameter (nm)	168	235	267
	PDI	0.12	0.57	0.30
	Aggregates	-	-	-

3.3.2.Determination of the filling volume

To optimize the aspect of the cake and minimize the residual water, different filling volumes of the vial were investigated using sucrose as a lyoprotectant at sucrose-to-lipid ratio 20:1. Results are shown in Table 31 and Figure 34. Whatever the filling volume, size and PDI were preserved. However, only with a filling volume from 1.5 mL to 2.5 mL the reconstitution was quick and easy (other filling volume led to foam upon reconstitution) and the aspect of the cake satisfactory. Moreover, thermogravimetric analysis evidenced a reduced residual water content: 4.2% of residual water for a 1.5 mL filling volume against 7.0% for a 1 mL filling volume that could explain the better aspect of the cake.

Table 31. Effect of the filling volume on the aspect of the freeze-dried cake and the preservation of size and PDI of empty liposomes (n = 1).

	Volume of liposomal suspension in the vial **Lyoprotectant-to-lipid ratio**	**0.5**	**1.5**	**2**	**2.5**	**4**
Before freeze-drying	Diameter (nm)	168	163	163	124	161
	PDI	0.07	0.13	0.09	0.06	0.11
	Aggregates	-	-	-	-	-
After freeze-drying	Aspect of the freeze-dried cake	Incorrect	Homogenous, porous	Homogenous, porous	Homogenous, porous	Incorrect
	Diameter (nm)	176	162	167	132	160
	PDI	0.13	0.12	0.13	0.10	0.15
	Aggregates	-	-	-	-	yes

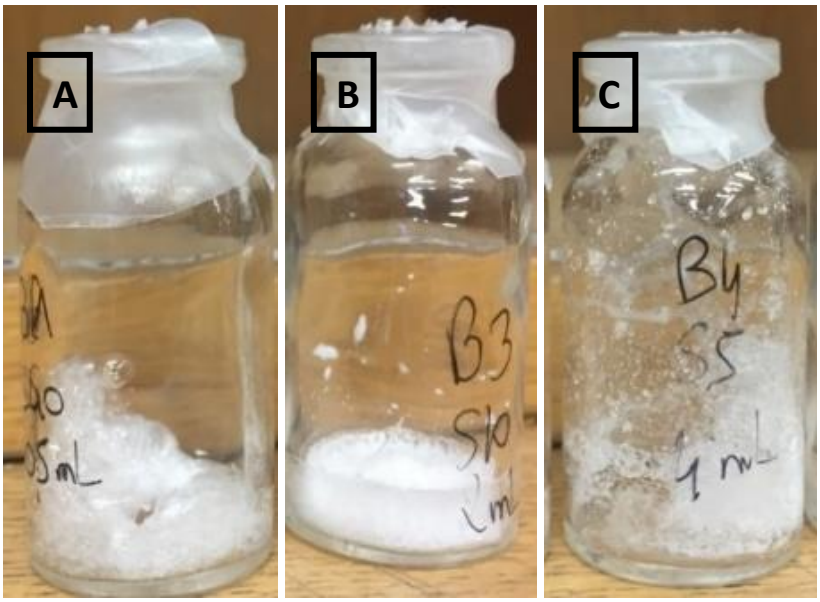


Figure 34. Influence of the filling volume on the aspect of the cake. A: 0.5 mL, B: 2 mL, C: 4 mL.

The optimized freeze-drying process used for the study of the leakage of the drug was a sucrose-to-lipid ratio of 20:1 with a filling volume of 2 mL.

3.3.3.Freeze-drying of the co-encapsulating liposomes

To study the efficacy of the lyoprotectant addition on the preservation of liposomes during freeze-drying, the stability of the liposomes undergoing the freeze-drying process was compared to the stability of the liposomes undergoing a second purification step. Results are presented in Figure 35. As expected, size and PDI were not modified either by the freeze-drying step or by the second purification step. Similarly, there was no difference between the leakage of the drugs between the two process: around 20% for fisetin and around 5% for cisplatin (Figure 35A). Morever, TEM experiments (Figure 35B) shows that there was no modification of the morphology of the liposomes induced by the freeze-drying process (see black arrows). This process of freeze-drying using a sucrose-to-lipids ratio 20:1 appeared to stabilize the co-loaded liposomes. This validated process of freeze-drying of our formulation would be used a key element in the future for the development of this nanomedicine.

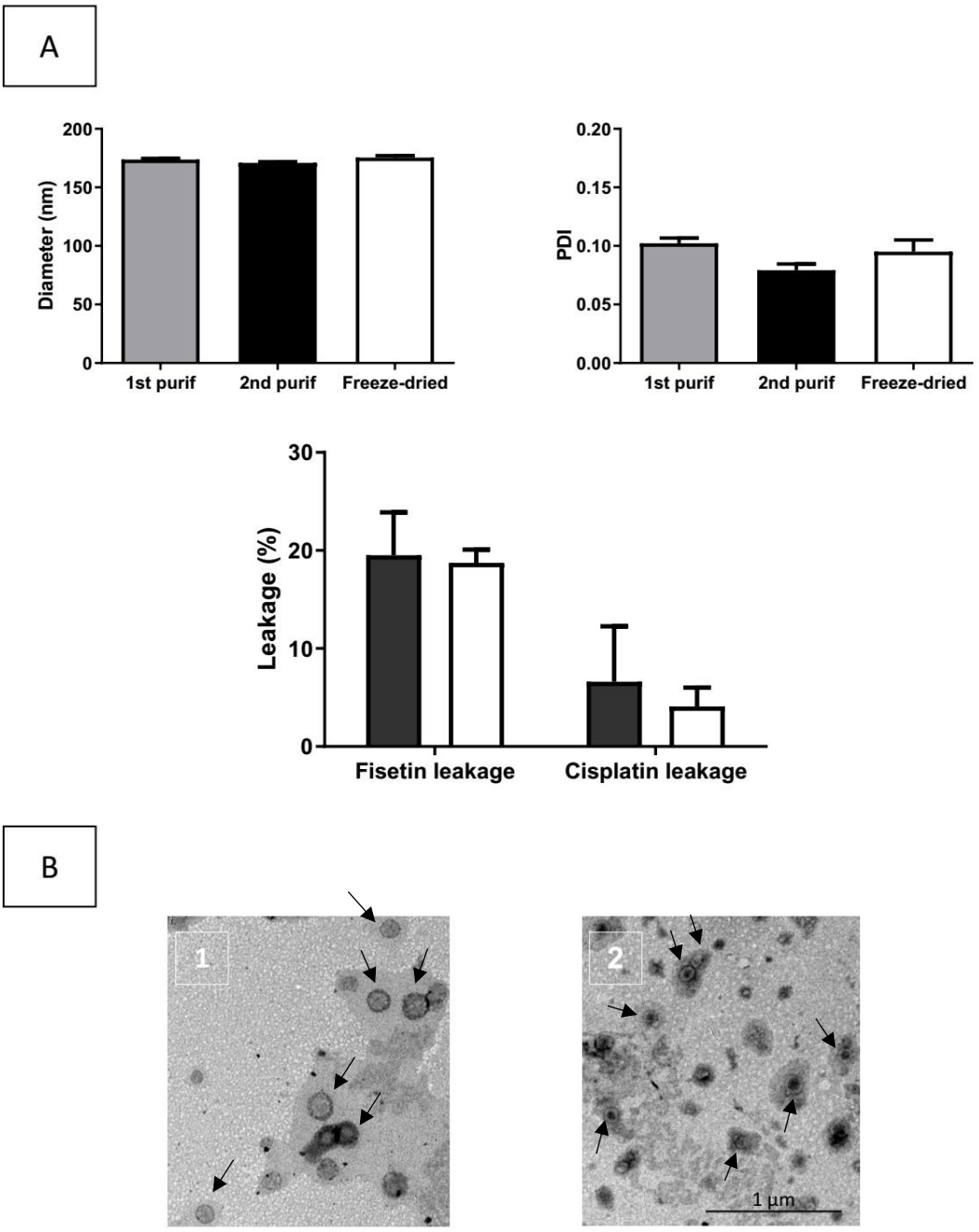


Figure 35. Influence of the freeze-drying process on the stability of co-loaded liposomes. A: Comparison of the size, PDI and encapsulation stability between liposomes undergoing the process of freeze-drying after the first purification step (white) and liposomes undergoing the process of a second purification immediatly after the first purification step (black); grey represents co-loaded liposomes F4 characterized after the first purification step. B: TEM of co-loaded liposomes before (1) and after (2) undergoing the freeze-drying process.

3.4. *In vitro* cytotoxicity assay on LL/2 cell line

The viability of 3LL cell lines has been evaluated after 24 hours of exposure to free cisplatin, free fisetin, cisplatin-loaded liposomes, fisetin-liposomes, a mixture of cisplatin-loaded and fisetin-loaded liposomes F4 (ratio fisetin/cisplatin 3.5:1) and liposomes co-encapsulating fisetin and cisplatin. The results are reported in Table 32. As expected, cisplatin and fisetin showed cytotoxic activity on the 3LL cell line (Mignet et al., 2012; Touil et al., 2011b). There was no difference between the free fisetin and the liposomal fisetin in the fisetin concentration required to kill 50% of cells (IC50) which was 42.6 ± 17.3 µM for free fisetin and 42.0 ± 9.2 µM for fisetin-loaded liposomes. There was a significant difference between the IC50 of free cisplatin (11.9 ± 0.3 µM) and cisplatin-loaded liposomes (32.9 ± 4.6 µM) that can be explained by the sustained release of cisplatin from the liposomes (publication 1, Figure 23B).

The combination index between liposomal fisetin and liposomal cisplatin on 3LL cell line after 24 hours of exposure was calculated using the Chou-Talalay equation and showed clear synergism (CI = 0.7 for the co-loaded liposomes and CI = 0.9 for the mixture of cisplatin-loaded and fisetin-loaded liposomes F4) (Chou, 2010).

Table 32. IC50 values (µM) as function of cisplatin and fisetin on 3LL cell line (n = 4). Combination index were calculated using the Chou Talalay equation. *: p<0.05 versus free drug

		IC50 (µM)					
		Free cisplatin	Free fisetin	Cisplatin-loaded liposomes F4	Fisetin-loaded liposomes F4	Mixture of fisetin-loaded and cisplatin-loaded liposomes F4	Liposmes F4 co-encapsuting fisetin and cisplatin
24 hours exposure	Cisplatin	11.9 ± 0.3		32.9 ± 4.6*		12.2 ± 1.5	8.0 ± 4.1
	Fisetin		42.6 ± 17.3		42.0 ± 9.2	21.0 ± 7.0	21.0 ± 10.7
Combination index						0.9	0.7

3.5. Anti-tumour activity on mice

The anti-tumour efficacy of the liposomal formulations was evaluated on an ectopic model of lewis lung murine carcinoma on C54BL/6JRJ female mice. The fisetin/cisplatin ratio of 3.5:1 was selected as it showed synergism *in vitro*. Previous study identified a dosage of liposomal fisetin of at least 21 mg/kg/injection to exert an antitumor efficacy on murine Lewis Lung Carcinoma *in vivo* (Seguin et al., 2013). However, for this fisetin dosage, the corresponding cisplatin dosage was 6mg/kg/injection, which is the maximal daily dosage of cisplatin tolerated (Fan et al., 2015). As liposomal formulation can prevent cytotoxicity thanks to a better tumor accumulation due to the EPR effect (Peer et al., 2007), we decided to use this treatment protocol with a schedule incorporating a day break in the treatment, while monitoring closely the mice for toxicity.

Figure 36 shows the tumor growth inhibition induced by the liposomal formulation or free cisplatin. All of them showed a T/C under 42% evidencing the efficacy of the formulations (Table 33). However, a major toxicity was evidenced for all the treatment protocol, with a mean body weight change around -27% for free cisplatin and liposomal cisplatin, and around -18% for the mixture of liposomal cisplatin and liposomal fisetin and for the co-loaded liposomes, leading to the sacrifice of several mice in each group except in the group receiving the co-encapsulated treatment, where no mice were sacrificed (Figure 37, Table 33). The liposomal encapsulation of cisplatine alone did not prevent the toxic side effects while the co-administration with fisetin loaded liposomes and the co-encapsulation of both drugs decrease the weight loss. Consequently, the tumor growth delay for the median tumor volume to reach 100 mm^3 could only be calculated for the co-loaded liposomes receiving group. It was of 4.6 days.

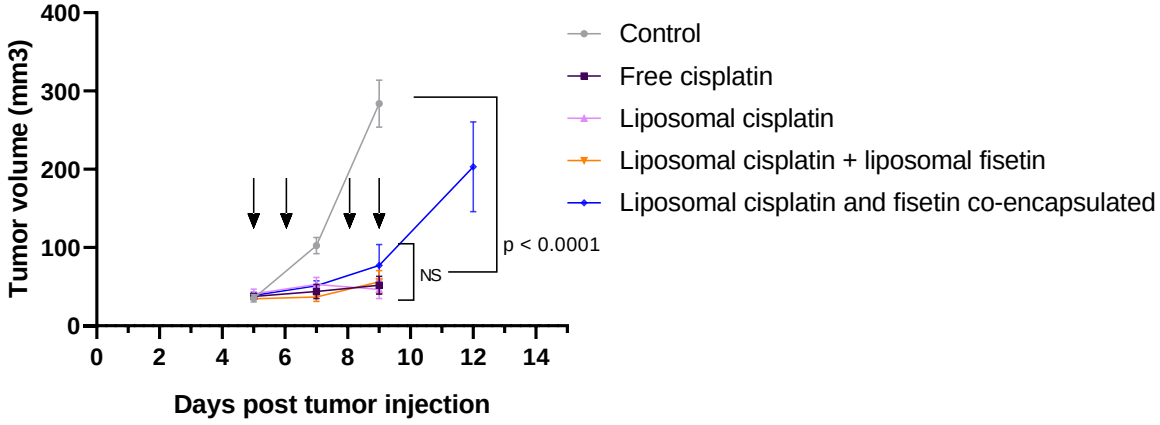


Figure 36. Tumor growth inhibition of free cisplatin, cisplatin-loaded liposomes, mixture of fisetin-loaded and cisplatin-loaded liposomes and liposmes co-encapsuting fisetin and cisplatin in 3LL Lewis Lung carcinoma murine model. Black arrows show the days of i.p. administration.

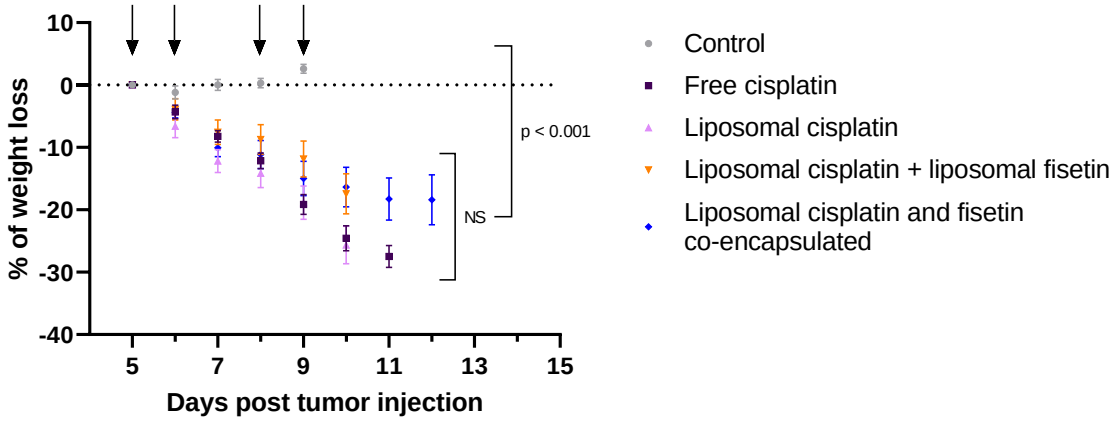


Figure 37. Percent of weight loss of C54BL/6JRJ mice induced by the cisplatin and fisetin treatment. Weight was estimated every two days and expressed as a percentage of weight at day 5 of the experimentation. Black arrows show the days of i.p. administration.

Table 33. Antitumoral effect of free cisplatin, cisplatin-loaded liposomes, mixture of fisetin-loaded and cisplatin-loaded liposomes and liposomes co-encapsuting fisetin and cisplatin. $ could not be calculated because of the toxicity leading to mice sacrifice.

Treatment	Schedule	Fisetin dosage (mg/kg/dose)	Total dose fisetin (mg/kg)	Cisplatin dosage (mg/kg/dose)	Total dose cisplatin (mg/kg)	Mean body weight change (%) [day of nadir]	Median tumor volume (mm^3)	% T/C	Time for median tumor to reach 100 mm^3 (days)	T-C (days)
Control	-	-	-	-	-	-	276.7		7.1	
Free cisplatin		-	-	6	24	-27.5 ± 1.8 [D11]	39.7	14.3	$	
Cisplatin-loaded liposomes F4		-	-	6	24	-26.6 ± 4.1 [D11]	29.5	10.7	$	
Mixture of fisetin-loaded and cisplatin-loaded liposomes F4	1 dose d5, d6 d8 and d9	21	84	6	24	-18.2 ± 4.0 [D11]	33.5	12.1	$	
Liposmes F4 co-encapsuting fisetin and cisplatin		21	84	6	24	-18.3 ± 3.4 [D11]	49.4	17.9	11.7	4.6

The the log rank Mantel-Cox test represented in Figure 38 evidenced a significant difference between the survival of the control group and the free-cisplatin and co-loaded groups ($p < 0.05$). Indeed, the median of survival was of 12 days for the control group, 16 days for the free cisplatin receiving group and 17.5 days for the group treated by the co-loaded liposomes. There was no difference between the survival of the control group, the liposomal cisplatin receiving group (median of survival = 12 days) and the group treated by the co-administration of fisetin-loaded liposomes and cisplatin-loaded liposomes (13 days). This was attributed to the toxicity of the treatment. Indeed, Figure 36 shows a significant improvement of antitumor efficacy compared to the control group, but some mice had to be sacrificed due to toxicity (4 out of 7 for the group receiving the liposomal cisplatin and 3 out of 8 for the group receiving the co-administration). No difference in survival between the free cisplatin group and the co-loaded F4 group was evidenced: even if the toxicity was higher for the free cisplatin group (3 mice sacrificed out of 7), the efficacy of cispaltin on the surviving mice led to the same median survival than the one obtained with the group receiving the co-encapsulating liposomes.

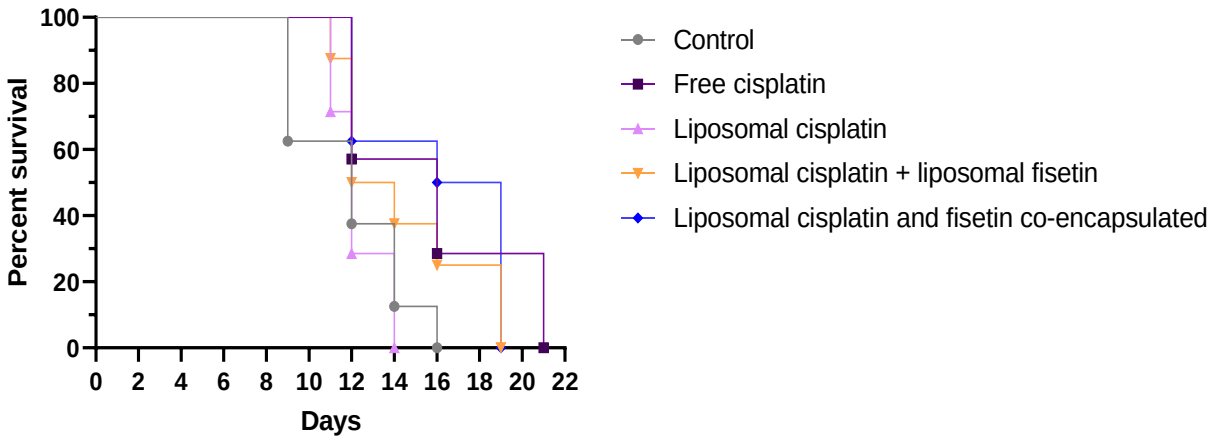


Figure 38. Kaplan-Meier survival curves of 3LL cancer bearing C54BL/6JRJ mice treated by free cisplatin, cisplatin-loaded liposomes, mixture of fisetin-loaded and cisplatin-loaded liposomes and liposmes co-encapsuting fisetin and cisplatin.

4. Conclusion

This work presents the successful co-encapsulation of fisetin and cisplatin into liposomes and the efficacy of this formulation. The purification process was optimized by using the combination of dialysis process followed by the filtration of the liposomal suspension. Stability of the formulation was improved by freeze-drying of the liposomal suspensions. Liposomal fisetin and liposomal cisplatin showed a synergistic activity *in vitro* on murine Lewis Lung carcinoma cell line at a ratio 3.5:1, either co-administered using a mixture of fisetin-loaded liposomes and cisplatin-loaded liposomes, or

co-encapsulated into the same liposomes. The co-encapsulating formulation also showed *in vivo* efficacy against an ectopic murine model of Lewis Lung Carcinoma.

However, the *in vivo* treatment showed too much toxicity of cisplatin, either administered as a solution or encapsulated into liposomes. Even if the addition of fisetin led to less toxicity, the fisetin/cisplatin ratio must be reconsidered. It could be interesting to evaluate higher fisetin/cisplatin ratio *in vitro* assess if the lead to a synergistic activity, and assay them *in vivo* in order to evaluate the formulation with a reduce toxicity of the treatment. Moreover, the effect of the fisetin in the co-loaded liposomes should be evaluated on its ability to prevent the angiogenesis process with a plug-matrigel test as previously realized by Touil *et al* (Touil et al., 2011b; Seguin et al., 2013).

5. References

Report to section Références, page 159.

DISCUSSION GENERALE, CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif principal de ce travail était de co-encapsuler dans un même nanovecteur deux molécules aux propriétés physico-chimiques et biologiques différentes, afin de les véhiculer à différents sites d'action, le glioblastome et les tumeurs pulmonaires. La fisétine a été choisie pour ses propriétés anti-angiogénique, mais du fait de sa très faible solubilité dans l'eau elle nécessitait une encapsulation dans un nanovecteur afin de permettre son administration intraveineuse. Le cisplatine, agent alkylant de l'ADN, molécule de choix dans le cancer du poumon et active *in vitro* sur le glioblastome, possède cependant une toxicité limitant son utilisation. Une encapsulation dans un nanovecteur permettrait, d'une part, de réduire sa toxicité et d'autre part, de le véhiculer au sein des tumeurs (Peer et al., 2007). Le choix du nanovecteur s'est porté sur des liposomes, réputés faiblement toxiques (Olson et al., 1982; Mayhew et al., 1987), et capables d'encapsuler des molécules aux propriétés physico-chimiques divergentes. Afin de mener à bien ce projet, il s'est déroulé en plusieurs étapes.

Afin de pouvoir **caractériser leur encapsulation dans les liposomes**, les méthodes de dosage des molécules sélectionnées ont dû être développées. Nos méthodes de dosage se sont révélées exactes, répétables et faciles à mettre en œuvre sur un intervalle de concentrations adapté à notre utilisation. Il est à noter que pour la fisétine, pour des études de dégradation ou des études futures de passage transcellulaire, il pourrait être important de réduire la limite de quantification ; ceci a déjà été évalué et s'est révélé possible, soit en préparant des gammes sur un intervalle moins élargi de concentration (1 à 10 µg/mL) soit en utilisant un facteur de pondération ($1/x^2$) sur la gamme de 1 à 100 µg/mL. Doser en dessous de 1 µg/mL semble compliqué au vu du faible signal obtenu. Cependant, une étape d'évaporation du méthanol ainsi qu'une reprise du résidu dans un volume plus faible de méthanol permettrait de doser des concentrations plus faibles.

La deuxième partie du travail a consisté en **l'optimisation de la formulation et du procédé préparation des liposomes**.

Concernant l'optimisation de la **formulation**, le facteur le plus important à optimiser était la proportion de cholestérol introduite dans la formulation. En effet, la fisétine s'incorpore dans la bicouche

lipidique, sa partie hydrophile au niveau de la tête polaire des phospholipides tandis que la partie hydrophobe se trouve au niveau des chaines carbonées (Sengupta et al., 2005; Mohapatra and Mishra, 2011; Mignet et al., 2013). Ce comportement rappelle celui du cholestérol, expliquant la faible proportion de cholestérol (4,1 mol%) utilisée dans les liposomes de fisétine précédemment développés (Mignet et al., 2012, 2013). Cependant, les liposomes de cisplatine nécessitent une forte proportion de cholestérol pour maintenir le cisplatine au sein du cœur aqueux du liposome (Table 8). Le défi de ce projet était donc de trouver le meilleur compromis dans la proportion de cholestérol afin de pouvoir incorporer la fisétine tout en rigidifiant suffisamment la bicouche lipidique pour prévenir la fuite du cisplatine hors des liposomes. L'évaluation de l'augmentation de la proportion de cholestérol a été évaluée selon plusieurs axes.

L'incorporation maximale de la fisétine dans la bicouche lipidique a été étudiée en premier lieu. L'effet de la proportion de cholestérol sur l'encapsulation de la fisétine a tout d'abord été évalué en DSC, en suivant l'évolution de la température de fusion du phospholipide principal, la DOPC. Une augmentation de la masse de fisétine introduite dans une formulation liposomale contenant 20,4% en mole de cholestérol a montré que la fisétine s'incorporait jusqu'à 3,2% en masse de fisétine introduite dans la formulation. Au-delà, il n'y avait plus de modification de la température de fusion de la DOPC. Afin de confirmer cette valeur, des liposomes avec des masses croissantes de fisétine introduite dans la formulation ont été préparés et purifiés par filtration. L'encapsulation de la fisétine était totale pour 1 et 2% en masse de fisétine introduite, et de 89,4 ± 2,6% pour 3,2% en masse. Avec 4,2% en masse, l'encapsulation chutait drastiquement à 35,3 ± 1,8%. La charge en fisétine des liposomes étant meilleure pour 3,2% en masse de fisétine introduite, cette proportion a donc été choisie pour la suite des expériences. Ces résultats sont concordants avec ce qu'avaient déterminé expérimentalement Mignet *et al*. En effet, des observations en MET avait mis en évidence une déstabilisation des liposomes lorsque 6% en masse de fisétine était introduit alors qu'ils gardaient leur structure avec 1,5 et 3,0% de fisétine introduite (Mignet et al., 2012).

Ensuite, l'évaluation de **l'influence de la proportion de cholestérol sur l'incorporation de la fisétine et du cisplatine** a été évaluée. Trois formulations variant dans leur proportion de cholestérol ont été étudiées. Les analyses de DSC ayant été faites pour 20,4% en mole de cholestérol, une proportion plus faible (17,0%) et plus forte (29,6%) ont été choisies pour affiner la valeur de la proportion de cholestérol optimale. Si une proportion de 29,6% en mole de cholestérol s'est révélée être délétère pour l'incorporation de la fisétine, celle-ci fuyant du liposome et précipitant dans les 24 heures suivant la préparation, il n'y a pas eu de différence de l'incorporation de la fisétine et du cisplatine, encapsulés seuls ou séparément, avec 17,0 ou 20,4% en mole de cholestérol dans la bicouche lipidique. Cette nécessité d'ajuster le pourcentage de cholestérol aux propriétés physicochimiques différentes de deux

substances avait déjà été mise en évidence par Wong *et al* qui ont co-encapsulé la quercétine et la vincristine dans des liposomes. Ils avaient déterminé une proportion optimale de 18,4% en mole de cholestérol, permettant le meilleur compromis (Wong and Chiu, 2010).

L'influence de la saturation du phospholipide a également été étudiée : l'utilisation d'un phospholipide saturé, la DSPC au lieu de la DOPC, a eu un fort effet délétère sur l'incorporation de la fisétine, qui n'a pas pu être encapsulée quelle que soit la proportion de cholestérol introduite (6,8 ou 21,0% en mole). L'insaturation du phospholipide, entrainant un désordre de la bicouche lipidique, semble nécessaire pour l'incorporation de la fisétine dans la bicouche lipidique. Mignet *et al* ainsi que Moolakkadath *et al* avaient également réussi à encapsuler la fisétine dans des liposomes ou éthosomes composés principalement de PHOSPHOLIPON® 90 G (diacyl-phosphatidylcholine insaturée avec 94 à 100% de phosphocholine), ou de la phosphatidylcholine de soja (Lipoid S 100) présentant également des insaturations (Mignet et al., 2012; Moolakkadath et al., 2018, 2019). Cependant, cette nécessité d'une insaturation n'est pas retrouvée dans la littérature : Wong *et al* ont utilisés de la sphingomyéline d'oeuf (Tm ~40°C, (Nyholm et al., 2003)) et ont pu encapsuler 78,3 ± 1.9 % de la quercétine introduite (rapport molaire quercétine/lipides = 5:95) (Wong and Chiu, 2010); Ochi *et al* ont co-encapsulés de la silibinine et de l'acide glycyrrhizique dans des liposomes dont le constituant principal était la DPPC (Tm = 41°C, données fabriquant), mais seulement 24.37% en mole de la silibinine a été incorporée. Ces résultats semblent indiquer que la nature du flavonoïde encapsulé a une influence sur sa capacité à être incorporé dans la bicouche lipidique des liposomes. En effet, Goniotaki *et al* avait montré que l'incorporation de quatre flavonoïdes (deux aglycones et deux glycosylés) dans des liposomes de phosphatidylcholine d'œuf, dépendait de la lipophilicité, de la présence de glycosides et de la position de l'hydroxyle qui influençait la position du flavonoïde dans la membrane et donc son effet sur la fluidité de la bicouche lipidique (Goniotaki et al., 2004).

La nature du phospholipide PEGylé a montré une forte influence sur l'encapsulation de la fisétine. En effet, pour la réalisation des expérimentations *in vivo*, la quantité de liposomes à préparer était importante et nous avons choisi d'utiliser un lipide commercial, le DSPE-PEG2000. Le remplacement du DODA-Gly-PEG2000 par celui-ci a conduit à une diminution significative de l'incorporation de la fisétine dans les liposomes (DL = 1,6 ± 0,3 avec le DODA-Gly-PEG2000 et DL = 0,55 ± 0,24 avec la DSPE-PEG2000 avec une purification par chromatographie d'exclusion stérique, $p < 0,05$). Malgré tout, les essais cellulaires et *in vivo* ont montré que malgré cette différence, on retrouvait une efficacité de la formulation. La différence entre le DODA-Gly-PEG2000 et le DSPE-PEG2000 se situe au niveau de la tête polaire (Figure 39). Il serait intéressant d'identifier les interactions responsables de cette différence d'incorporation.

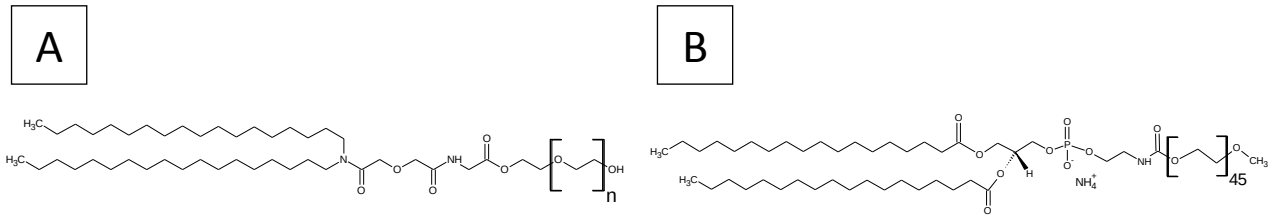


Figure 39. Structure du DODA-Gly-PEG2000 (A) et du DSPE-PEG2000 (B)

Des études plus poussées pour connaitre la position de la fisétine au sein de membranes composées de DOPC, de DSPE-PEG2000 et de cholestérol, par exemple par extinction de fluorescence en utilisation les propriétés de fluorescence de la fisétine (Mohapatra and Mishra, 2011), ou en utilisant la RMN (Rodrigues et al., 2003) auraient donc leur intérêt pour mieux comprendre le comportement de la fisétine dans notre liposome. L'impact de l'incorporation de la fisétine sur la conformation des lipides et la fluidité membranaire, ainsi que la perméabilité membranaire, mériterait également d'être investiguée (Mingeot-Leclercq et al., 2001; Bensikaddour et al., 2008). Développer ces méthodes d'études d'incorporation des SA dans la bicouche lipidique permettrait une sélection plus rapide et un choix éclairé des lipides constituants les liposomes, adaptés à la SA. Cela permettrait d'affiner les formulations, nature et proportion des lipides stabilisants la SA dans la bicouche, de façon à obtenir des liposomes les plus stables possibles, sans avoir à tester empiriquement par étude de stabilité toutes les formulations envisagées.

Concernant **l'optimisation du procédé de préparation**, deux facteurs principaux ont démontré une influence majeure sur la qualité de la suspension liposomale.

Tout d'abord, lors de l'étude préliminaire sur les liposomes vides, seule la **méthode de calibration de taille** avait une influence critique sur le diamètre moyen et la polydispersité des liposomes. L'extrusion successive au travers de membranes de polycarbonates 0,4 et 0,2 µm a permis d'obtenir un diamètre autour de 170 nm et un PDI < 0,2. Il est à noter que l'incorporation des SA dans les liposomes n'a pas impacté leur diamètre hydrodynamique. La proportion de cholestérol, ainsi que la méthode d'hydratation du film n'ont pas eu d'impact sur le diamètre des liposomes et la discrimination de ces paramètres s'est faite *via* l'encapsulation de la fisétine. La substitution de la DOPC par de la DSPC a provoqué une légère augmentation du diamètre des liposomes (194 ± 13 nm). La méthode de préparation peut aussi avoir une influence sur la taille des liposomes. Des essais utilisant une autre technologie développée au laboratoire, la combinaison de l'injection éthanolique avec une technique de microfluidique par un système de pousse-seringues (Ahmed et al., 2019), a conduit à la formation de liposomes de plus petit diamètre (125 ± 12 nm) mais avec une moins bonne homogénéité (PDI = 0,36) sans étape d'extrusion. L'étape de calibration de taille par extrusion est donc une étape

indispensable pour homogénéiser la taille des liposomes et pour obtenir une taille compatible avec l'application anti-tumorale recherchée.

Lors de l'évaluation de l'influence de la formulation, il nous est apparu que la **méthode de purification** avait une influence certaine sur l'encapsulation de la fisétine. En effet, la purification des liposomes par chromatographie d'exclusion stérique au lieu de la filtration a conduit à une nette diminution de l'encapsulation, avec des charges (DL) de 3,1 ± 0,1% et de 1,3 ± 0,1% respectivement. De plus, lorsque deux purifications successives ont été faites par dialyse suivi d'une filtration, il y a eu une perte de 19,5 ± 4,3% de fisétine (Figure 35). Ceci nous laisse penser que la fisétine s'adsorbe sur les surfaces. La méthode de purification va donc jouer à deux niveaux. Tout d'abord sur l'encapsulation, lors de la purification au niveau du procédé de préparation : comme la fisétine est co-encapsulée avec le cisplatine, une étape de purification est nécessaire et il a fallu choisir celle qui permettait de conserver le plus de fisétine. C'est pourquoi nous avons choisi la méthode par dialyse et filtration, permettant d'obtenir une charge de 2,10 ± 0,33, et non la méthode par chromatographie d'exclusion stérique. Il est à noter qu'aucune différence significative sur l'encapsulation du cisplatine n'a été mise en évidence. Sur un second plan, ces résultats montrent qu'il est fort probable que la fuite de la fisétine hors des liposomes ait été surestimée lors de nos études de stabilité, vu qu'une étape de purification a été nécessaire avant dosage afin de ne quantifier que les SA encore encapsulées.

Pour pouvoir estimer la réelle fuite de la fisétine hors des liposomes, une approche utilisant la différence de la longueur d'onde d'émission maximale de la fisétine excitée à 370 nm quand elle est en solution aqueuse (486 nm) ou incorporée dans la bicouche lipidique (538 nm) a été envisagée. L'augmentation du rapport de l'intensité du signal à 486 nm par rapport à l'intensité du signal à 538 nm permettrait de mettre en évidence la fuite de la fisétine hors de la bicouche lipidique. Les premiers résultats (n = 1) semblent montrer une stabilité de la fisétine dans la bicouche lipidique à 10 jours.

Afin d'améliorer la stabilité de la formulation liposomale co-encapsulant la fisétine et le cisplatine, **un procédé de lyophilisation** a été mis au point. L'utilisation de saccharose avec un rapport massique saccharose/lipides de 20:1 a permis de conserver la taille, l'homogénéité et l'encapsulation des deux SA au cours du procédé. Des études sont en cours pour évaluer la stabilité après plusieurs mois des liposomes lyophilisés. Afin de vérifier si l'ajout du lyoprotectant n'a pas eu d'impact sur la conformation des lipides, il serait intéressant d'évaluer la libération *in vitro* ainsi que l'activité *in vitro* des liposomes remis en suspension après lyophilisation. Afin de parfaire le processus, l'impact du procédé de lyophilisation, notamment la vitesse de congélation et la durée de la dessiccation primaire, pourraient être évaluées. En effet, une congélation lente pourrait minimiser l'apparition de cristaux de glace dans le cœur aqueux des liposomes, réduire le nombre de liposomes présents à l'interface de la

formation de la glace, les répartissant de façon homogène dans la matrice congelée, et laisser le temps aux liposomes de se reformer suite aux déformations induites par la pression osmotique. D'un autre côté, une congélation très rapide conduirait à la formation de petits cristaux de glace et à une distribution homogène du cryoprotectant de part et d'autre de la bicouche lipidique, ce qui pourrait réduire la déstabilisation de la bicouche lipidique (Franzé et al., 2018). Mettre au point le procédé le moins agressif pour la bicouche lipidique permettrait peut-être de réduire la quantité de cryoprotectant nécessaire pour stabiliser les liposomes. De plus, optimiser les étapes de dessication permettrait de réduire la proportion d'eau résiduelle.

L'utilisation d'un autre nanovecteur permettant une meilleure stabilité d'encapsulation de la fisétine et du cisplatine pourrait être envisagée. Une revue de la littérature sur la co-encapsulation de flavonoïdes a montré plusieurs choix possibles pour l'incorporation de deux molécules aux propriétés physico-chimiques différentes dans un même nanovecteur : nanoémulsion eau dans huile dans eau (Pangeni et al., 2018), liposomes (Wong and Chiu, 2010; S. N. Park et al., 2013; Li et al., 2018), nanoparticules polymériques (Narayanan et al., 2014; Ray et al., 2017), nanovecteurs hybrides lipides-polymères (Zhu et al., 2017) et nanoparticules mésoporeuses de silice (Murugan et al., 2016). Cependant, une seule de ces études rapporte la stabilité de l'encapsulation des molécules dans le temps : Pangeni *et al* ont montré une fuite inférieure à 3% des SA après 3 mois de conservation à température ambiante. De plus, seulement deux ont étudié la stabilité de taille dans le temps (Wong and Chiu, 2010; Pangeni et al., 2018). Il est à noter que même lorsque le flavonoïde était co-encapsulé avec une autre molécule lipophile, les études de stabilité ont rarement été réalisées. Sur 21 études de co-encapsulation, seulement 6 ont étudié la stabilité de taille et 4 la stabilité de l'encapsulation au cours du temps (Table 34).

Table 34. Stabilité de taille, de PDI et de l'encapsulation des substances actives lors de la conservation des nanovecteurs co-encapsulant un flavonoïde et une molécule anti-cancéreurse.

BCL = baicaleine, DOX = doxorubicine base, GCA = acide glycyrrhizique, PMX = pemetrexed, PTX = paclitaxel, QUE = quercétine, SA = substance active, SIL = silibinine, TMX = tamoxifène, VIN = vincristine.

Flavonoïde / SA co-encapsulée	Type de nanovecteur	Stabilité au cours de la conservation			Références
		Conditions	Diamètre (nm) (PDI)	Fuite de la SA (%)	
QUE/DOX	Micelles	1 mois, 4°C			(Ramasamy et al., 2017)
		PBS pH 7.4	Stable	-	
		Sérum	Stable	-	
BCL/PTX	Nanoémulsion	6 mois; 4°C	169.5 ± 6.0 (0.115 ± 0.001)	BCL < 1% PTX < 1%	(Meng et al., 2016)
QUE/PMX	Nanoémulsion	3 mois 25 ± 2°C (HR 60 ± 5%)	Stable	<3% fuite	(Pangeni et al., 2018)
QUE/VIN	Liposomes	180 jours, 4°C	Stable	-	(Wong and Chiu, 2011, 2010)
SIL/GCA	Liposomes	3 months, 4°C	58.2 ± 3.8	SIL: 22% GCA: 61%	(Ochi et al., 2016)
QUE/TMX	Nanoparticules polymériques	5±2°C (HR 55 ± 2%) 3 mois lyophilisées	Stable	Stable	(Jain et al., 2013)

Il est donc difficile d'évaluer la pertinence d'un autre nanovecteur, même si la nanoémulsion eau dans huile dans eau montre des résultats prometteurs.

La troisième partie du travail s'est focalisée sur **l'évaluation *in vitro* et *in vivo* de la formulation**.

Tout d'abord nous avons voulu évaluer **l'activité anti-angiogénique *in vitro*** de la fisétine liposomale et la comparer à l'effet de la fisétine libre. Une étude de modification de morphologie et de cytotoxicité a donc été réalisée sur des cellules endothéliales EA.hy926. La fisétine liposomale a pu provoquer la même formation de pseudopodes par les cellules endothéliales après 2 heures d'exposition et a été significativement plus cytotoxique que la fisétine libre. L'activité de la fisétine liposomale était donc équivalente à celle de la fisétine libre, ce qui est expliqué par le fait que la fisétine est rapidement libéré dans le milieu de culture.

L'effet synergique de deux SA dépend du rapport des doses des deux molécules. Cependant, la différence de pharmacocinétique et de biodistribution des deux SA lors de leur administration séparée pourrait empêcher leur synergie au sein de la tumeur. L'utilisation de nanovecteurs co-encapsulant plusieurs SA avec des propriétés physicochimiques différentes pourrait permettre le maintien du rapport synergique *in vivo* au sein de la tumeur (Gurunathan et al., 2018; Mayer et al., 2006; Tardi et al., 2009, 2007).

Même si la combinaison d'effets recherchée était un remodelage de la vascularisation de la tumeur par la fisétine couplé à un effet cytotoxique du cisplatine, du fait d'une part de la cytotoxicité connue de la fisétine sur les cellules 3LL (Touil et al., 2011b; Mignet et al., 2012), et d'autre part de la cytotoxicité mise en évidence au cours de nos essais sur les cellules U 87-MG, **le synergisme de l'association a été tout d'abord évalué *in vitro***. Une première sélection des rapports massiques de cisplatine/fisétine pour obtenir un effet synergique *in vitro* en utilisant les molécules libres n'a pu être effectuée du fait de la faible solubilité de la fisétine. En effet, la fisétine devait être dissoute dans le DMSO, qui a la propriété de désactiver le cisplatine (Fischer et al., 2008; Hall et al., 2014), et nos essais n'ont pu aboutir. Le synergisme n'a donc pu être évalué que sur les formulations liposomales, et au vu du temps nécessaire à ces expériences seulement deux rapports massiques ont pu être testés. Un rapport massique cisplatine/fisétine de 1:5 a montré une additivité sur les cellules tumorales de glioblastome U 87-MG (CI = 1,1) tandis qu'un rapport 1:3.5 a montré un synergisme sur les cellules de cancer du poumon 3LL (CI = 0,7). Dans les deux cas, l'IC50 du cisplatine encapsulé dans les liposomes s'est révélée significativement supérieure au cisplatine libre, ce qui s'explique par la libération prolongée du cisplatine par les liposomes dans le PBS et le milieu de culture cellulaire à 37°C. Nous rapportons ici pour la première fois à notre connaissance une activité cytotoxique de la fisétine sur les cellules de la lignée U 87-MG. Une seule autre étude à notre connaissance avait étudiée l'activité cytotoxique de la fisétine sur des lignées cellulaires de FBM, rapportant une action anti-prolifération sur les lignées DBTRG-05MG et U-251 après 24 heures d'exposition à 50 et 100 µM de fisétine (Wang et al., 2016).

Afin d'évaluer si le rapport massique cisplatine/fisétine était conservé nous avons réalisé des **études de libération** *in vitro* dans le PBS pH 7,4 ou le milieu de culture cellulaire supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal. Si dans le PBS les cinétiques de libération étaient différentes entre la fisétine et le cisplatine, dans le DMEM-C elles avaient le même profil, la fisétine étant libérée deux fois plus que le cisplatine. Dans les deux cas, la libération du cisplatine des liposomes était prolongée. Des essais pour contenir le relargage rapide (*burst release)* du cisplatine pourrait être effectués en poussant plus loin la formulation et en introduisant un polymère permettant de viscosifier le cœur aqueux (Mendes et al., 2014; Pitorre et al., 2017; Zhang et al., 2018), nous affranchissant d'une augmentation de cholestérol dans la bicouche lipidique. Ceci nécessiterait cependant un nouveau développement galénique.

La libération rapide de la fisétine dans un milieu de culture contenant du sérum pourrait s'expliquer par une affinité plus grande de la fisétine pour les protéines du sérum que pour les lipides constituants la membrane du liposome. D'autres études de co-encapsulation de flavonoïdes avec une autre SA cytotoxique ont montré que même si le rapport massique des deux SA n'était pas conservé, il y avait

toujours une efficacité antitumorale supérieure *in vivo* par rapport au mélange des deux SA libres (Jain et al., 2013) ou par rapport à l'encapsulation d'une seule SA (Ramasamy et al., 2017). Si l'efficacité antitumorale n'était pas améliorée par la co-encapsulation, une diminution de la toxicité pour les tissus sains était mise en évidence (Li et al., 2018). Une autre équipe a elle décidé d'évaluer le meilleur ratio *in vivo* lorsque les résultats de la libération *in vitro* n'ont pas montré un maintien du rapport massique des deux SA lors de la libération (Mendes et al., 2014).

Cependant, lors de nos expériences préliminaires de libération *in vitro*, une dégradation de la fisétine dans le PBS à 37°C a été mise en évidence. En effet, la première méthode envisagée ne consistait pas en un prélèvement des liposomes suivi du dosage du cisplatine et de la fisétine encore encapsulée mais en un prélèvement à chaque temps défini de 200 µL du PBS pH 7.4 constituant le compartiment receveur. Nous nous sommes aperçus de trois choses : à partir de 4 heures, la quantité de fisétine présente dans le compartiment receveur n'augmentait pas et à partir de 10 heures, elle diminuait (Figure 40) ; des pics d'impuretés apparaissaient ou augmentaient sur les chromatogrammes au cours du temps ; et à la fin de l'expérience, les membranes de dialyse ressortaient jaunes, indiquant une probable adsorption de la fisétine sur les membranes. Malgré plusieurs essais d'extraction avec différents solvants dans lesquels la fisétine est soluble (méthanol ou éthanol), les quantités de fisétine extraite des membranes n'équivalaient qu'à 1% de la fisétine introduite au début de l'expérience.

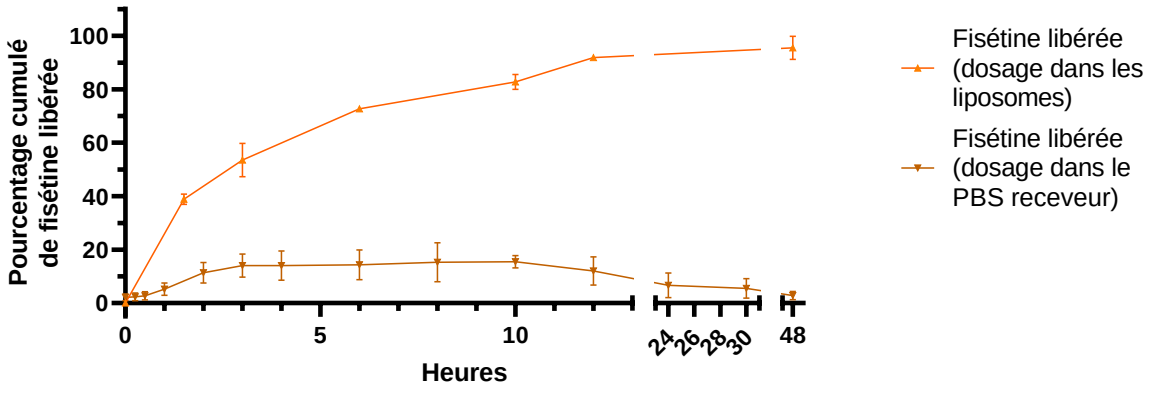


Figure 40. Libération in vitro de la fisétine des liposomes F4 dans le PBS pH 7.4

Nous avons donc voulu étudier le comportement de la fisétine libre ou liposomale dans le PBS ou le DMEM-C à 37°C. Tout d'abord, il a été constaté l'évolution différente des pics d'impuretés sur les chromatogrammes en fonctions de si la fisétine était ou non encapsulée. De plus, dans le PBS, la fisétine libre a été totalement dégradée en 12 heures alors que le pourcentage de fisétine liposomale restante est resté autour de 100% (Figure 41A). Dans le DMEM-C, par contre, la fisétine encapsulée dans les liposomes s'est dégradée à la même vitesse que la fisétine non encapsulée (Figure 41B). Il est

aussi intéressant de noter que la solubilité de la fisétine libre est augmentée en présence de protéines, avec une concentration initiale retrouvée d'environ 15 µg/mL contre environ 3 µg/mL dans le PBS.

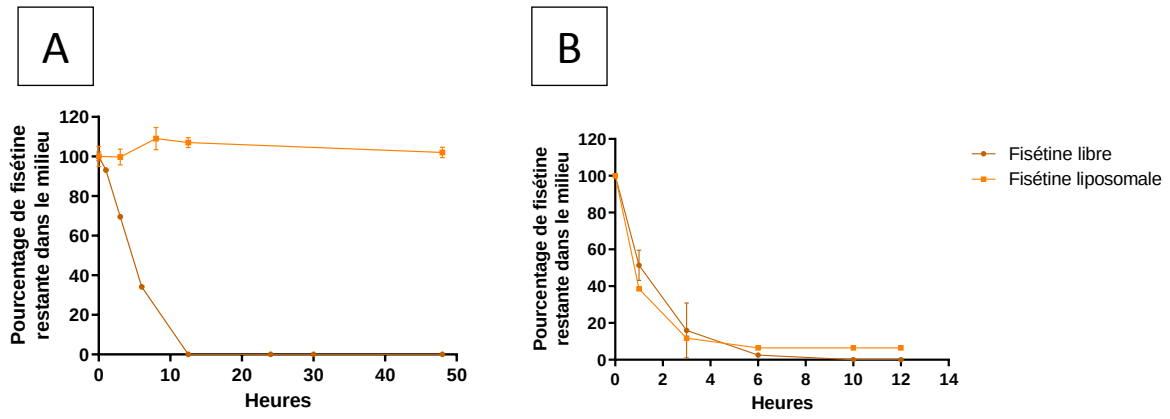


Figure 41. Dégradation de la fisétine libre ou liposomale en milieu aqueux supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal.

La capacité de la fisétine à se lier aux protéines est connue et peut expliquer l'augmentation de la solubilité de la fisétine dans le milieu de culture cellulaire (Sengupta et al., 2005). La dégradation de la fisétine en milieu aqueux à 37°C était attendue (Ramešová et al., 2015; Wang and Zhao, 2016), mais pas en totalité. La disparition de la totalité de la fisétine encapsulée ou non en 6 heures dans le milieu de culture cellulaire supplémenté en sérum de veau fœtal a été plus surprenante, du fait de la stabilisation théorique des polyphénols par les protéines (Bandyopadhyay et al., 2012; Song et al., 2015) et d'autant plus que les tests de cytotoxicité ont montré une activité supérieure de la fisétine libre ou liposomale après 48 heures d'exposition par rapport à 24 heures d'exposition. Une hypothèse envisagée pourrait être la formation d'un métabolite actif non détecté par notre méthode de dosage. Plusieurs métabolites de la fisétine ont été identifiés *in vitro* and *in vivo* par spectrométrie de masse ; la plupart des réactions identifiées contenaient une étape d'oxydation ou de perte d'oxygène (X. Zhang et al., 2017). Un métabolite de la fisétine, le géraldol obtenu par méthoxylation de la fisétine, a montré une cytotoxicité supérieure à la fisétine sur les cellules endothéliales et les cellules tumorales de carcinome murin de Lewis (Touil et al., 2011a; Jo et al., 2016). Il serait intéressant d'étudier les produits de dégradation de la fisétine et d'identifier lesquels ont un effet et sur quelles cibles ils agissent.

Au vu de cette dégradation apparente, la question se pose de la pertinence du modèle *in vitro* associant les tests de cytotoxicité aux essais de libération *in vitro* comme outil prédictif de l'action synergique *in vivo* pour notre formulation. Ces essais étaient quand même indispensables afin de valider les activités cytotoxiques des deux molécules et d'appréhender leur synergisme, mais il est nécessaire de garder à l'esprit que le rapport massique cisplatine/fisétine administré pourrait ne pas aboutir à la même action synergique *in vivo.* L'évaluation *in vivo* nous est donc encore plus apparue comme un impératif.

L'évaluation *in vivo* de notre formulation a été réalisée sur un modèle murin de tumeur ectopique de carcinome du poumon de Lewis. Le rapport massique cisplatine/fisétine 1:3,5 a été choisi car un effet synergique avait montré *in vitro*. La dose minimale de fisétine pour obtenir un effet anti-angiogénique sur ces tumeurs étant de 21 mg/kg/jour (Seguin et al., 2013), le cisplatine a par conséquent été administré à la dose maximale journalière (Fan et al., 2015). L'encapsulation du cisplatine dans des liposomes n'a malheureusement pas permis une diminution de la toxicité de celui-ci, probablement du fait d'un « *burst release »* du cisplatine dans les premières heures (mis en évidence lors de l'évaluation de la libération *in vitro*) combiné avec une haute dose de cisplatine administrée. Cependant, l'apport de fisétine co-encapsulée avec le cisplatine dans les liposomes a permis de diminuer la toxicité : aucune souris n'a dû être sacrifiée pour cause de toxicité, contrairement aux autres groupes traités. Ceci a permis de mettre en évidence une activité antitumorale de la formulation co-encapsulant la fisétine et le cisplatine. En effet, si tous les traitements ont montré une efficacité, avec une d'inhibition de la tumeur aboutissant à une taille de tumeur inférieur à 42% de la taille des tumeurs du groupe contrôle (Bissery et al., 1991), seul le groupe recevant la formulation co-encapsulant la fisétine et le cisplatine a survécu assez longtemps pour calculer le ralentissement de la croissance tumorale, avec 4,6 jours de de délai pour que la tumeur médiane atteigne 100 mm^3. Malheureusement, la comparaison avec le cisplatine libre n'a pu être effectuée.

Nous avons décidé d'étudier également *in vivo* l'efficacité et la toxicité de la co-administration de liposomes encapsulant la fisétine et de liposomes encapsulant le cisplatine. En effet, si plusieurs équipes ont mis en évidence la supériorité *in vivo* de la co-encapsulation par rapport à la co-administration (Markovsky et al., 2014; Peng et al., 2019; Liu et al., 2019), aucune des formulations co-encapsulant un flavonoïde et une autre substance active n'avait été comparé à la co-administration (Wong and Chiu, 2011; Jain et al., 2013; Wang et al., 2015; Murugan et al., 2016; Lv et al., 2016; Meng et al., 2016; Dong et al., 2017; Zhu et al., 2017; Li et al., 2017; Ramasamy et al., 2017; Sandhu et al., 2017; Fang et al., 2018; Li et al., 2018; Pangeni et al., 2018; Wang et al., 2019). Au vu du défi que représentait la co-encapsulation de nos deux SA aux propriétés physico-chimiques différentes, il était légitime de se poser la question de l'utilité de cette co-encapsulation par rapport à la co-administration de deux nanovecteurs parfaitement adaptés l'un à la fisétine et l'autre au cisplatine. Co-encapsuler la fisétine et le cisplatine a permis une réduction de la mortalité par toxicité par rapport à la co-administration. Toutefois nous n'avions pas utilisé de formulation optimisée pour chacune des SA dans cet essai.

La stratégie de co-encapsulation du cisplatine avec une autre molécule cytotoxique ou avec une molécule photosensibilisante a déjà montré son efficacité. En effet, Zhang *et al* ont montré une efficacité anti-tumorale de nanoparticules formées par des prodrogues du cisplatine et de la gemcitabine supérieure à celle des nanoparticules encapsulant uniquement une des prodrogues, et une absence de toxicité systémique ; le cisplatine et la gemcitabine (rapport massique 1:1) étaient administrés à la dose de 5 mg/kg/injection tous les trois jours pendant 3 semaines (R. Zhang et al., 2017). La co-encapsulation du cisplatine et de la metformine dans des nanoparticules de metformine polymérique a montré une efficacité anti-tumorale *in vivo* similaire à celle du cisplatine libre, mais avec une réduction de la toxicité systémique (Xiong et al., 2016). Peng *et al* ont co-encapsulé le cisplatine et un agent photosensibilisant, la chlorine e6, dans des liposomes, et ont évalué l'efficacité anti-tumorale de la combinaison administrée une unique fois associé à un traitement de photodynamie (photo irradiation de la tumeur générant des espèces réactives de l'oxygène lorsqu'un photosensibilisant est administré). L'efficacité par rapport à l'absence de traitement augmentait avec la taille de la tumeur au moment où le traitement était administré, et avec la dose de cisplatine administrée (de 1,75 à 4,75 mg/kg) (Peng et al., 2019). Un point important à relever est l'efficacité supérieure de la co-encapsulation des deux SA dans les liposomes par rapport à la co-administration de liposomes encapsulant le cisplatine et de liposomes encapsulant la chlorine e6 (Peng et al., 2019).

La co-administration de fisétine liposomale avec du cyclophosphamide sous-cutané avait démontré une efficacité supérieure à l'administration de cyclophosphamide seul, avec un délai pour que la tumeur médiane atteigne 500 mm^3 de 7,2 et 4,2 jours respectivement, et n'avait pas montré de toxicité systémique.

Nos résultats *in vivo* sont donc prometteurs mais nécessite la réévaluation des doses administrées, et donc du rapport massique cisplatine/fisétine. Augmenter la dose de fisétine à 36 mg/kg/injection pourrait augmenter son efficacité comme précédemment mis en évidence (Seguin et al., 2013), et diminuer la dose de cisplatine semble nécessaire pour obtenir une toxicité acceptable ainsi que pour comparer notre formulation au cisplatine libre. En effet, celui-ci reste un médicament de référence en association avec d'autres molécules cytotoxiques, et parfois associé à l'immunothérapie, dans le traitement du CBNPC (Aupérin et al., 2010; Gandhi et al., 2018). Le schéma d'administration pourrait aussi être optimisé. L'évaluation de l'action anti-angiogénique devra également être réalisée, afin de mettre en évidence l'action de la fisétine. Pour se faire, des essais *in vivo* à l'aide d'implant de matrigel mélangé aux liposomes et aux cellules tumorales pourront être réalisés. Le poids des implants et la teneur en hémoglobine des implants récoltés 14 jours après l'implantation chez la souris permettront d'observer un potentiel effet anti-angiogénique.

La co-administration devra également être étudiée afin d'évaluer l'apport de la co-encapsulation sur l'efficacité et la diminution de toxicité *in vivo.* Ceci permettra de statuer sur la nécessité d'affronter les difficultés de formulation qu'impose cette co-encapsulation.

Afin d'atteindre le GBM, les nanovecteurs peuvent traverser au niveau des espaces inter-endothéliaux des néo-vaisseaux (néo-angiogenèse de vaisseaux fenêtrés) de façon passive et/ou être conjugués à des molécules spécifiques (ciblage actif). En effet, les néo-vaisseaux du GBM sont hétérogènes : tandis que la plupart présentent un endothélium discontinu avec la perte des jonctions serrées et la présence de pores, d'autres, au sein de la même tumeur, présentent un endothélium continu et non fenêtré similaire à l'endothélium sain (Hendricks et al., 2015). Des liposomes PEGylés de doxorubicine (Caelyx®) ont permis d'obtenir des concentrations intratumorales 13 à 19 fois supérieures aux concentrations retrouvées dans le tissu cérébral sain (Koukourakis et al., 2000). L'évaluation de la formulation *in vivo* sur le glioblastome nécessiterait donc des évaluations et optimisations préliminaires : détermination des rapports massiques cisplatine/fisétine permettant la synergie, essai de passage des liposomes à travers un modèle *in vitro* de la BHE et/ou ajout d'un ligand ciblant le GBM. Un ligand spécifique du CD-133 (marqueur de mauvais pronostic dans le GBM) (An et al., 2015) ou de l'EFGR (surexprimé dans les cellules de gliome) pourrait être conjugué au lipide PEGylé pour cibler activement les cellules du GBM. Un ligand du récepteur à la transferrine pourrait également être utilisé pour traverser la BHE et cibler le GBM, puisque les cellules de gliome surexpriment aussi les récepteurs de la transferrine (Kim et al., 2015; Mujokoro et al., 2016).

Une autre possibilité serait d'incorporer le nanovecteur dans une formulation gélifiée et de l'injecter localement dans la tumeur. Bastiancich *et al* ont développé l'encapsulation d'une prodrogue de la gemcitabine, la lauroyl-gemcitabine, dans des nanocapsules lipidiques formant spontanément un hydrogel grâce à la présence de la lauroyl-gemcitabine. Cette statégie a montré une activité *in vivo* sur un modèle de GBM chez le rat et a permis de retarder la rechute. Par ailleurs, la co-encapsulation du paclitaxel dans cette formulation a eu une action synergique *in vitro* sur des lignées cellulaires de GBM du rat ou de la souris, pouvant présager d'une meilleure efficacité *in vivo* (Bastiancich et al., 2018, 2019). Cette technique nécessiterait cependant un nouveau développement galénique complet.

L'augmentation de la quantité de lipides PEGylés afin de former des *brain penetrating nanoparticles*, limitant les interactions adhésives avec la matrice, pourrait permettre une administration locale de nos liposomes. Par exemple, des nanoparticules de cisplatine recouvertes d'une haute densité de PEG ont permis, administrées par CED, d'augmenter de façon significative la survie de rats porteurs d'un gliome implanté de façon orthotopique (80% de survivants à long terme) par rapport à des

nanoparticules non PEGylées de cisplatine (SG médiane de 40 jours), du cisplatine libre (SG médiane de 12 jours) et du sérum physiologique (SG médiane de 28 jours) (C. Zhang et al., 2017). Des premiers essais avaient été réalisés pour étudier l'impact de l'augmentation de la proportion de lipides PEGylés dans la formulation, mais les films lipidiques obtenus ayant un aspect très particulier, comme si ils étaient troués de façon régulière, les effets avaient été arrêtés (Figure 17).

En conclusion, ce travail de thèse a permis de mettre au point une formulation liposomale co-encapsulant la fisétine et le cisplatine optimisée du point de vue de la formulation et du procédé de préparation. Elle a été stabilisée par lyophilisation. C'est, à notre connaissance, la première étude évaluant la stabilité au cours du temps et l'impact d'un procédé de lyophilisation sur des liposomes co-encapsulant un flavonoïde et une autre molécule aux propriétés physico-chimiques différentes. Les études *in vitro* et *in vivo* sont prometteuses mais nécessitent d'être poursuivies pour déterminer le meilleur rapport massique cisplatine/fisétine à administrer, ainsi que le meilleur schéma d'administration.

RÉFÉRENCES

Adams, M., Kerby, I.J., Rocker, I., Evans, A., Johansen, K., Franks, C.R., 1989. A comparison of the toxicity and efficacy of cisplatin and carboplatin in advanced ovarian cancer. The Swons Gynaecological Cancer Group. Acta Oncol 28, 57–60. https://doi.org/10.3109/02841868909111182

Ahmed, S., Corvis, Y., Gahoual, R., Euan, A., Lai-Kuen, R., Couillaud, B.M., Seguin, J., Alhareth, K., Mignet, N., 2019. Conception of nanosized hybrid liposome/poloxamer particles to thicken the interior core of liposomes and delay hydrophilic drug delivery. Int J Pharm 567, 118488. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118488

Aldape, K., Zadeh, G., Mansouri, S., Reifenberger, G., von Deimling, A., 2015. Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. Acta Neuropathol 129, 829–848. https://doi.org/10.1007/s00401-015-1432-1

Alfayez, M., Kantarjian, H., Kadia, T., Ravandi-Kashani, F., Daver, N., 2020. CPX-351 (vyxeos) in AML. Leuk. Lymphoma 61, 288–297. https://doi.org/10.1080/10428194.2019.1660970

Alfayez, M., Kantarjian, H., Kadia, T., Ravandi-Kashani, F., Daver, N., 2019. CPX-351 (vyxeos) in AML. Leukemia & Lymphoma.

Alshangiti, A., Chandhoke, G., Ellis, P.M., 2018. Antiangiogenic therapies in non-small-cell lung cancer. Curr Oncol 25, S45–S58. https://doi.org/10.3747/co.25.3747

Ameratunga, M., Pavlakis, N., Wheeler, H., Grant, R., Simes, J., Khasraw, M., 2018. Anti-angiogenic therapy for high-grade glioma. Cochrane Database of Systematic Reviews. https://doi.org/10.1002/14651858.CD008218.pub4

American Cancer Society, 2019. Cancer Facts & Figures 2019 | American Cancer Society [WWW Document]. URL https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2019.html (accessed 2.23.20).

An, S.S., Jang, G.-B., Lee, H.-Y., Hong, I.-S., Nam, J.-S., 2015. Targeting cancer stem cells by using the nanoparticles. International Journal of Nanomedicine 251. https://doi.org/10.2147/IJN.S88310

Anselmo, A.C., Mitragotri, S., 2019. Nanoparticles in the clinic: An update. Bioeng Transl Med 4. https://doi.org/10.1002/btm2.10143

Ansó, E., Zuazo, A., Irigoyen, M., Urdaci, M.C., Rouzaut, A., Martínez-Irujo, J.J., 2010. Flavonoids inhibit hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression by a HIF-1

independent mechanism. Biochemical Pharmacology 79, 1600–1609. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.02.004

Antonia, S.J., Villegas, A., Daniel, D., Vicente, D., Murakami, S., Hui, R., Yokoi, T., Chiappori, A., Lee, K.H., de Wit, M., Cho, B.C., Bourhaba, M., Quantin, X., Tokito, T., Mekhail, T., Planchard, D., Kim, Y.-C., Karapetis, C.S., Hiret, S., Ostoros, G., Kubota, K., Gray, J.E., Paz-Ares, L., de Castro Carpeño, J., Wadsworth, C., Melillo, G., Jiang, H., Huang, Y., Dennis, P.A., Özgüroğlu, M., 2017. Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III Non–Small-Cell Lung Cancer. New England Journal of Medicine 377, 1919–1929. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1709937

Arleth, L., Ashok, B., Onyuksel, H., Thiyagarajan, P., Jacob, J., Hjelm, R.P., 2005. Detailed Structure of Hairy Mixed Micelles Formed by Phosphatidylcholine and PEGylated Phospholipids in Aqueous Media. Langmuir 21, 3279–3290. https://doi.org/10.1021/la047588y

AROME, 2016. Guidelines, "minimal requirements" and standard of care in glioblastoma around the Mediterranean Area: A report from the AROME (Association of Radiotherapy and Oncology of the Mediterranean arEa) Neuro-Oncology working party. Critical Reviews in Oncology/Hematology 98, 189–199. https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.10.014

Arshinova, O.Y., Sanarova, E.V., Lantsova, A.V., Oborotova, N.A., 2012. Lyophilization of liposomal drug forms (Review). Pharmaceutical Chemistry Journal 46, 228–233.

Ashok, B., Arleth, L., Hjelm, R.P., Rubinstein, I., Önyüksel, H., 2004. In vitro characterization of PEGylated phospholipid micelles for improved drug solubilization: Effects of PEG chain length and PC incorporation. Journal of Pharmaceutical Sciences 93, 2476–2487. https://doi.org/10.1002/jps.20150

Aupérin, A., Le Péchoux, C., Rolland, E., Curran, W.J., Furuse, K., Fournel, P., Belderbos, J., Clamon, G., Ulutin, H.C., Paulus, R., Yamanaka, T., Bozonnat, M.-C., Uitterhoeve, A., Wang, X., Stewart, L., Arriagada, R., Burdett, S., Pignon, J.-P., 2010. Meta-analysis of concomitant versus sequential radiochemotherapy in locally advanced non-small-cell lung cancer. J. Clin. Oncol. 28, 2181–2190. https://doi.org/10.1200/JCO.2009.26.2543

Baklaushev, V.P., Nukolova, N.N., Khalansky, A.S., Gurina, O.I., Yusubalieva, G.M., Grinenko, N.P., Gubskiy, I.L., Melnikov, P.A., Kardashova, K.S., Kabanov, A.V., Chekhonin, V.P., 2015. Treatment of glioma by cisplatin-loaded nanogels conjugated with monoclonal antibodies against Cx43 and BSAT1. Drug Deliv 22, 276–285. https://doi.org/10.3109/10717544.2013.876460

Bakonyi, M., Berkó, S., Budai-Szűcs, M., Kovács, A., Csányi, E., 2017. DSC for evaluating the encapsulation efficiency of lidocaine-loaded liposomes compared to the ultracentrifugation method. J Therm Anal Calorim 130, 1619–1625. https://doi.org/10.1007/s10973-017-6394-1

Ballas, M.S., Chachoua, A., 2011. Rationale for targeting VEGF, FGF, and PDGF for the treatment of NSCLC. Onco Targets Ther 4, 43–58. https://doi.org/10.2147/OTT.S18155

Bandyopadhyay, P., Ghosh, A.K., Ghosh, C., 2012. Recent developments on polyphenol–protein interactions: effects on tea and coffee taste, antioxidant properties and the digestive system. Food Funct 3, 592–605. https://doi.org/10.1039/c2fo00006g

Bangham, A.D., Standish, M.M., Watkins, J.C., 1965. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. Journal of Molecular Biology 13, 238-IN27. https://doi.org/10.1016/S0022-2836(65)80093-6

Barenholz, Y. (Chezy), 2012. Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. Journal of Controlled Release, Past, current and future applications of liposomes - Grand Challenges and Opportunities in Nanomedicine 160, 117–134. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.03.020

Bastiancich, C., Bozzato, E., Luyten, U., Danhier, F., Bastiat, G., Préat, V., 2019. Drug combination using an injectable nanomedicine hydrogel for glioblastoma treatment. International Journal of Pharmaceutics 559, 220–227. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.01.042

Bastiancich, C., Lemaire, L., Bianco, J., Franconi, F., Danhier, F., Préat, V., Bastiat, G., Lagarce, F., 2018. Evaluation of lauroyl-gemcitabine-loaded hydrogel efficacy in glioblastoma rat models. Nanomedicine 13, 1999–2013. https://doi.org/10.2217/nnm-2018-0057

Batzri, S., Korn, E.D., 1973. Single bilayer liposomes prepared without sonication. Biochim. Biophys. Acta 298, 1015–1019. https://doi.org/10.1016/0005-2736(73)90408-2

Bayat Mokhtari, R., Homayouni, T.S., Baluch, N., Morgatskaya, E., Kumar, S., Das, B., Yeger, H., 2017. Combination therapy in combating cancer. Oncotarget 8, 38022–38043. https://doi.org/10.18632/oncotarget.16723

Belsito, S., Bartucci, R., Sportelli, L., 2001. Lipid chain length effect on the phase behaviour of PCsrPEG:2000-PEs mixtures. A spin label electron spin resonance and spectrophotometric study 12.

Bensikaddour, H., Fa, N., Burton, I., Deleu, M., Lins, L., Schanck, A., Brasseur, R., Dufrêne, Y.F., Goormaghtigh, E., Mingeot-Leclercq, M.-P., 2008. Characterization of the Interactions between Fluoroquinolone Antibiotics and Lipids: a Multitechnique Approach. Biophys J 94, 3035–3046. https://doi.org/10.1529/biophysj.107.114843

Bhat, T.A., Nambiar, D., Pal, A., Agarwal, R., Singh, R.P., 2012. Fisetin inhibits various attributes of angiogenesis in vitro and in vivo--implications for angioprevention. Carcinogenesis 33, 385–393. https://doi.org/10.1093/carcin/bgr282

Bianco, J., Bastiancich, C., Jankovski, A., des Rieux, A., Préat, V., Danhier, F., 2017. On glioblastoma and the search for a cure: where do we stand? Cellular and Molecular Life Sciences 74, 2451–2466. https://doi.org/10.1007/s00018-017-2483-3

Bilello, K.S., Murin, S., Matthay, R.A., 2002. Epidemiology, etiology, and prevention of lung cancer. Clinics in Chest Medicine, Lung Cancer 23, 1–25. https://doi.org/10.1016/S0272-5231(03)00057-1

Bissery, M.-C., Guénard, D., Guéritte-Voegelein, F., Lavelle, F., 1991. Experimental Antitumor Activity of Taxotere (RP 56976, NSC 628503), a Taxol Analogue. Cancer Res 51, 4845–4852.

Bothiraja, C., Yojana, B.D., Pawar, A.P., Shaikh, K.S., Thorat, U.H., 2014. Fisetin-loaded nanocochleates: formulation, characterisation, *in vitro* anticancer testing, bioavailability and biodistribution study. Expert Opinion on Drug Delivery 11, 17–29. https://doi.org/10.1517/17425247.2013.860131

Brandes, A.A., Basso, U., Reni, M., Vastola, F., Tosoni, A., Cavallo, G., Scopece, L., Ferreri, A.J., Panucci, M.G., Monfardini, S., Ermani, M., 2004. First-Line Chemotherapy With Cisplatin Plus Fractionated Temozolomide in Recurrent Glioblastoma Multiforme: A Phase II Study of the Gruppo Italiano Cooperativo di Neuro-Oncologia. Journal of Clinical Oncology 22, 1598–1604. https://doi.org/10.1200/JCO.2004.11.019

Brandes, A.A., Tosoni, A., Franceschi, E., Reni, M., Gatta, G., Vecht, C., 2008. Glioblastoma in adults. Critical Reviews in Oncology/Hematology 67, 139–152. https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2008.02.005

Bulbake, U., Doppalapudi, S., Kommineni, N., Khan, W., 2017. Liposomal Formulations in Clinical Use: An Updated Review. Pharmaceutics 9. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics9020012

Caffo, M., Barresi, V., Caruso, G., Fata, G.L., Pino, M.A., Raudino, G., Alafaci, C., Tomasello, F., 2013. Gliomas Biology: Angiogenesis and Invasion. Evolution of the Molecular Biology of Brain Tumors and the Therapeutic Implications. https://doi.org/10.5772/53487

Carvalho Júnior, A.D., Vieira, F.P., De Melo, V.J., Lopes, M.T.P., Silveira, J.N., Ramaldes, G.A., Garnier-Suillerot, A., Pereira-Maia, E.C., De Oliveira, M.C., 2007. Preparation and cytotoxicity of cisplatin-containing liposomes. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 40, 1149–1157.

Catanzaro, D., Nicolosi, S., Cocetta, V., Salvalaio, M., Pagetta, A., Ragazzi, E., Montopoli, M., Pasut, G., 2018. Cisplatin liposome and 6-amino nicotinamide combination to overcome drug resistance in ovarian cancer cells. Oncotarget 9, 16847–16860. https://doi.org/10.18632/oncotarget.24708

Chaaban, H., Ioannou, I., Chebil, L., Slimane, M., Gérardin, C., Paris, C., Charbonnel, C., Chekir, L., Ghoul, M., 2017. Effect of heat processing on thermal stability and antioxidant activity of six

flavonoids. Journal of Food Processing and Preservation 41, e13203. https://doi.org/10.1111/jfpp.13203

Charest, G., Sanche, L., Fortin, D., Mathieu, D., Paquette, B., 2013. Optimization of the route of platinum drugs administration to optimize the concomitant treatment with radiotherapy for glioblastoma implanted in the Fischer rat brain. Journal of Neuro-Oncology 115, 365–373. https://doi.org/10.1007/s11060-013-1238-8

Charest, G., Sanche, L., Fortin, D., Mathieu, D., Paquette, B., 2012. Glioblastoma Treatment: Bypassing the Toxicity of Platinum Compounds by Using Liposomal Formulation and Increasing Treatment Efficiency With Concomitant Radiotherapy. International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics 84, 244–249. https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2011.10.054

Chen, C., Han, D., Cai, C., Tang, X., 2010. An overview of liposome lyophilization and its future potential. Journal of Controlled Release 142, 299–311. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.10.024

Chen, C.-M., Hsieh, Y.-H., Hwang, J.-M., Jan, H.-J., Hsieh, S.-C., Lin, S.-H., Lai, C.-Y., 2014. Fisetin suppresses ADAM9 expression and inhibits invasion of glioma cancer cells through increased phosphorylation of ERK1/2. Tumour Biol. https://doi.org/10.1007/s13277-014-2975-9

Chen, Y., Wu, Q., Song, L., He, T., Li, Y., Li, L., Su, W., Liu, L., Qian, Z., Gong, C., 2015. Polymeric Micelles Encapsulating Fisetin Improve the Therapeutic Effect in Colon Cancer. ACS Applied Materials & Interfaces 7, 534–542. https://doi.org/10.1021/am5066893

Chou, T.-C., 2010. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. Cancer Res. 70, 440–446. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1947

Chu, B.F., Otterson, G.A., 2016. Incorporation of Antiangiogenic Therapy Into the Non–Small-Cell Lung Cancer Paradigm. Clinical Lung Cancer 17, 493–506. https://doi.org/10.1016/j.cllc.2016.05.020

Couvreur, P., 2010. Les nanomédicaments : une approche intelligente pour le traitement des maladies sévères. La Chimie et la Santé 105–125.

Dailey, L.A., 2018. Pharmaceutical quality by design in academic nanomedicine research: stifling innovation or creativity through constraint? Journal of Interdisciplinary Nanomedicine 3, 175–182. https://doi.org/10.1002/jin2.52

Davis, M.E., 2016. Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. Clin J Oncol Nurs 20, S2–S8. https://doi.org/10.1188/16.CJON.S1.2-8

Davis, P.J., Keough, K.M.W., 1983. Differential scanning calorimetric studies of aqueous dispersions of mixtures of cholesterol with some mixed-acid and single-acid phosphatidylcholines. Biochemistry 22, 6334–6340. https://doi.org/10.1021/bi00295a045

Dazzi, C., Cariello, A., Giannini, M., Del Duca, M., Giovanis, P., Fiorentini, G., Leoni, M., Rosti, G., Turci, D., Tienghi, A., Vertogen, B., Zumaglini, F., De Giorgi, U., Marangolo, M., 2000. A sequential chemo-radiotherapeutic treatment for patients with malignant gliomas: a phase II pilot study. Anticancer Res. 20, 515–518.

De Gier, J., Mandersloot, J.G., Van Deenen, L.L.M., 1968. Lipid composition and permeability of liposomes. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 150, 666–675. https://doi.org/10.1016/0005-2736(68)90056-4

Dhami, N.K., Pandey, R.S., Jain, U.K., Chandra, R., Madan, J., 2014. Non-aggregated protamine-coated poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles of cisplatin crossed blood–brain barrier, enhanced drug delivery and improved therapeutic index in glioblastoma cells: *in vitro* studies. Journal of Microencapsulation 31, 685–693. https://doi.org/10.3109/02652048.2014.913725

Dong, X.-Y., Lang, T.-Q., Yin, Q., Zhang, P.-C., Li, Y.-P., 2017. Co-delivery of docetaxel and silibinin using pH-sensitive micelles improves therapy of metastatic breast cancer. Acta Pharmacol. Sin. 38, 1655–1662. https://doi.org/10.1038/aps.2017.74

Dou, Y.N., Dunne, M., Huang, H., Mckee, T., Chang, M.C., Jaffray, D.A., Allen, C., 2016. Thermosensitive liposomal cisplatin in combination with local hyperthermia results in tumor growth delay and changes in tumor microenvironment in xenograft models of lung carcinoma. Journal of Drug Targeting 24, 865–877. https://doi.org/10.1080/1061186X.2016.1191079

Dou, Y.N., Zheng, J., Foltz, W.D., Weersink, R., Chaudary, N., Jaffray, D.A., Allen, C., 2014. Heat-activated thermosensitive liposomal cisplatin (HTLC) results in effective growth delay of cervical carcinoma in mice. Journal of Controlled Release 178, 69–78. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.01.009

Eberhardt, W.E.E., De Ruysscher, D., Weder, W., Le Péchoux, C., De Leyn, P., Hoffmann, H., Westeel, V., Stahel, R., Felip, E., Peters, S., Stahel, Rolf, Felip, Enriqueta, Peters, Solange, Kerr, K., Besse, B., Vansteenkiste, J., Eberhardt, W., Edelman, M., Mok, T., O'Byrne, K., Novello, S., Bubendorf, L., Marchetti, A., Baas, P., Reck, M., Syrigos, K., Paz-Ares, L., Smit, E.F., Meldgaard, P., Adjei, A., Nicolson, M., Crinó, L., Van Schil, P., Senan, S., Faivre-Finn, C., Rocco, G., Veronesi, G., Douillard, J.-Y., Lim, E., Dooms, C., Weder, Walter, De Ruysscher, Dirk, Le Pechoux, C., De Leyn, Paul, Westeel, Virginie, 2015. 2nd ESMO Consensus Conference in Lung Cancer: locally advanced stage III non-small-cell lung cancer. Annals of Oncology 26, 1573–1588. https://doi.org/10.1093/annonc/mdv187

Fan, J., Du, J., Wu, J., Fu, S., Hu, D., Wan, Q., 2015. Antitumor effects of different administration sequences of cisplatin and Endostar on Lewis lung carcinoma. Oncol Lett 9, 822–828. https://doi.org/10.3892/ol.2014.2783

Fang, J., Zhang, S., Xue, X., Zhu, X., Song, S., Wang, B., Jiang, L., Qin, M., Liang, H., Gao, L., 2018. Quercetin and doxorubicin co-delivery using mesoporous silica nanoparticles enhance the efficacy of gastric carcinoma chemotherapy. Int J Nanomedicine 13, 5113–5126. https://doi.org/10.2147/IJN.S170862

Fantini, M., Gianni, L., Santelmo, C., Drudi, F., Castellani, C., Affatato, A., Nicolini, M., Ravaioli, A., 2011. Lipoplatin treatment in lung and breast cancer. Chemother Res Pract 2011, 125192. https://doi.org/10.1155/2011/125192

Feng, C., Yuan, X., Chu, K., Zhang, H., Ji, W., Rui, M., 2019. Preparation and optimization of poly (lactic acid) nanoparticles loaded with fisetin to improve anti-cancer therapy. International Journal of Biological Macromolecules 125, 700–710. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.003

Filippov, A., Orädd, G., Lindblom, G., 2003. The Effect of Cholesterol on the Lateral Diffusion of Phospholipids in Oriented Bilayers. Biophys J 84, 3079–3086.

Fischer, S.J., Benson, L.M., Fauq, A., Naylor, S., Windebank, A.J., 2008. Cisplatin and dimethyl sulfoxide react to form an adducted compound with reduced cytotoxicity and neurotoxicity. Neurotoxicology 29, 444–452. https://doi.org/10.1016/j.neuro.2008.02.010

Fong, K.M., Minna, J.D., 2002. Molecular biology of lung cancer: clinical implications. Clin. Chest Med. 23, 83–101. https://doi.org/10.1016/s0272-5231(03)00062-5

Fotsis, T., Pepper, M.S., Aktas, E., Breit, S., Rasku, S., Adlercreutz, H., Wähälä, K., Montesano, R., Schweigerer, L., 1997. Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis. Cancer research 57, 2916–2921.

Franzé, S., Selmin, F., Samaritani, E., Minghetti, P., Cilurzo, F., 2018. Lyophilization of Liposomal Formulations: Still Necessary, Still Challenging. Pharmaceutics 10. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10030139

Friedman, H.S., Prados, M.D., Wen, P.Y., Mikkelsen, T., Schiff, D., Abrey, L.E., Yung, W.K.A., Paleologos, N., Nicholas, M.K., Jensen, R., Vredenburgh, J., Huang, J., Zheng, M., Cloughesy, T., 2009. Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. J. Clin. Oncol. 27, 4733–4740. https://doi.org/10.1200/JCO.2008.19.8721

Fritzsching, K.J., Kim, J., Holland, G.P., 2013. Probing lipid–cholesterol interactions in DOPC/eSM/Chol and DOPC/DPPC/Chol model lipid rafts with DSC and 13C solid-state NMR. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1828, 1889–1898. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.03.028

Gallego, O., 2015. Nonsurgical treatment of recurrent glioblastoma. Curr Oncol 22, e273–e281. https://doi.org/10.3747/co.22.2436

Gandhi, L., Rodríguez-Abreu, D., Gadgeel, S., Esteban, E., Felip, E., De Angelis, F., Domine, M., Clingan, P., Hochmair, M.J., Powell, S.F., Cheng, S.Y.-S., Bischoff, H.G., Peled, N., Grossi, F., Jennens,

R.R., Reck, M., Hui, R., Garon, E.B., Boyer, M., Rubio-Viqueira, B., Novello, S., Kurata, T., Gray, J.E., Vida, J., Wei, Z., Yang, J., Raftopoulos, H., Pietanza, M.C., Garassino, M.C., KEYNOTE-189 Investigators, 2018. Pembrolizumab plus Chemotherapy in Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer. N. Engl. J. Med. 378, 2078–2092. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1801005

Garcia-Garcia, E., Andrieux, K., Gil, S., Couvreur, P., 2005. Colloidal carriers and blood–brain barrier (BBB) translocation: A way to deliver drugs to the brain? International Journal of Pharmaceutics 298, 274–292. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.03.031

Garon, E.B., Ciuleanu, T.-E., Arrieta, O., Prabhash, K., Syrigos, K.N., Goksel, T., Park, K., Gorbunova, V., Kowalyszyn, R.D., Pikiel, J., Czyzewicz, G., Orlov, S.V., Lewanski, C.R., Thomas, M., Bidoli, P., Dakhil, S., Gans, S., Kim, J.-H., Grigorescu, A., Karaseva, N., Reck, M., Cappuzzo, F., Alexandris, E., Sashegyi, A., Yurasov, S., Pérol, M., 2014. Ramucirumab plus docetaxel versus placebo plus docetaxel for second-line treatment of stage IV non-small-cell lung cancer after disease progression on platinum-based therapy (REVEL): a multicentre, double-blind, randomised phase 3 trial. Lancet 384, 665–673. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60845-X

Ghaferi, M., Asadollahzadeh, M.J., Akbarzadeh, A., Ebrahimi Shahmabadi, H., Alavi, S.E., 2020. Enhanced Efficacy of PEGylated Liposomal Cisplatin: In Vitro and In Vivo Evaluation. International Journal of Molecular Sciences 21, 559. https://doi.org/10.3390/ijms21020559

Ghosh, P., Singha Roy, A., Chaudhury, S., Jana, S.K., Chaudhury, K., Dasgupta, S., 2016. Preparation of albumin based nanoparticles for delivery of fisetin and evaluation of its cytotoxic activity. International Journal of Biological Macromolecules 86, 408–417. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.082

Globocan, 2018. Global Cancer Observatory [WWW Document]. World Health Organization. URL http://gco.iarc.fr/ (accessed 2.23.20).

Goniotaki, M., Hatziantoniou, S., Dimas, K., Wagner, M., Demetzos, C., 2004. Encapsulation of naturally occurring flavonoids into liposomes: physicochemical properties and biological activity against human cancer cell lines. J. Pharm. Pharmacol. 56, 1217–1224. https://doi.org/10.1211/0022357044382

Gonzalez-Urias, A., Zapata-Gonzalez, I., Licea-Claverie, A., Licea-Navarro, A.F., Bernaldez-Sarabia, J., Cervantes-Luevano, K., 2019. Cationic versus anionic core-shell nanogels for transport of cisplatin to lung cancer cells. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 182, 110365. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110365

Groot, J.F. de, Lamborn, K.R., Chang, S.M., Gilbert, M.R., Cloughesy, T.F., Aldape, K., Yao, J., Jackson, E.F., Lieberman, F., Robins, H.I., Mehta, M.P., Lassman, A.B., DeAngelis, L.M., Yung, W.K.A., Chen, A., Prados, M.D., Wen, P.Y., 2011. Phase II Study of Aflibercept in Recurrent Malignant

Glioma: A North American Brain Tumor Consortium Study. Journal of Clinical Oncology 29, 2689. https://doi.org/10.1200/JCO.2010.34.1636

Grossman, S.A., Wharam, M., Sheidler, V., Kleinberg, L., Zeltzman, M., Yue, N., Piantadosi, S., 1997. Phase II study of continuous infusion carmustine and cisplatin followed by cranial irradiation in adults with newly diagnosed high-grade astrocytoma. J. Clin. Oncol. 15, 2596–2603. https://doi.org/10.1200/JCO.1997.15.7.2596

Guillamo, J.-S., 2011. Stratégies anti-angiogéniques dans le glioblastome. Revue Neurologique 167, 662–667. https://doi.org/10.1016/j.neurol.2011.07.008

Gurunathan, S., Kang, M.-H., Qasim, M., Kim, J.-H., 2018. Nanoparticle-Mediated Combination Therapy: Two-in-One Approach for Cancer. Int J Mol Sci 19. https://doi.org/10.3390/ijms19103264

Guzzo, M.R., Uemi, M., Donate, P.M., Nikolaou, S., Machado, A.E.H., Okano, L.T., 2006. Study of the complexation of fisetin with cyclodextrins. J Phys Chem A 110, 10545–10551. https://doi.org/10.1021/jp0613337

Hall, M.D., Telma, K.A., Chang, K.-E., Lee, T.D., Madigan, J.P., Lloyd, J.R., Goldlust, I.S., Hoeschele, J.D., Gottesman, M.M., 2014. Say no to DMSO: dimethylsulfoxide inactivates cisplatin, carboplatin, and other platinum complexes. Cancer Res. 74, 3913–3922. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0247

Hanif, F., Muzaffar, K., Perveen, K., Malhi, S.M., Simjee, S.U., 2017. Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. Asian Pac J Cancer Prev 18, 3–9. https://doi.org/10.22034/APJCP.2017.18.1.3

Harashima, H., Sakata, K., Funato, K., Kiwada, H., 1994. Enhanced Hepatic Uptake of Liposomes Through Complement Activation Depending on the Size of Liposomes. Pharm Res 11, 402–406. https://doi.org/10.1023/A:1018965121222

Hein, R., Uzundal, C.B., Hennig, A., 2016. Simple and rapid quantification of phospholipids for supramolecular membrane transport assays. Org. Biomol. Chem. 14, 2182–2185. https://doi.org/10.1039/C5OB02480C

Hendricks, B.K., Cohen-Gadol, A.A., Miller, J.C., 2015. Novel delivery methods bypassing the blood-brain and blood-tumor barriers. FOC 38, E10. https://doi.org/10.3171/2015.1.FOCUS14767

Hirsch, F.R., Scagliotti, G.V., Mulshine, J.L., Kwon, R., Curran, W.J., Wu, Y.-L., Paz-Ares, L., 2017. Lung cancer: current therapies and new targeted treatments. The Lancet 389, 299–311. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30958-8

Hoffman, P.C., Mauer, A.M., Vokes, E.E., 2000. Lung cancer. Lancet 355, 479–485. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)82038-3

Hu, J., Wang, J., Wang, G., Yao, Z., Dang, X., 2016. Pharmacokinetics and antitumor efficacy of DSPE-PEG2000 polymeric liposomes loaded with quercetin and temozolomide: Analysis of their effectiveness in enhancing the chemosensitization of drug-resistant glioma cells. Int J Mol Med 37, 690–702. https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2458

Huncharek, M., Muscat, J., 1998. Treatment of recurrent high grade astrocytoma; results of a systematic review of 1,415 patients. Anticancer Res. 18, 1303–1311.

Jain, A.K., Thanki, K., Jain, S., 2013. Co-encapsulation of Tamoxifen and Quercetin in Polymeric Nanoparticles: Implications on Oral Bioavailability, Antitumor Efficacy, and Drug-Induced Toxicity. Mol. Pharmaceutics 10, 3459–3474. https://doi.org/10.1021/mp400311j

Jain, R.K., di Tomaso, E., Duda, D.G., Loeffler, J.S., Sorensen, A.G., Batchelor, T.T., 2007. Angiogenesis in brain tumours. Nat Rev Neurosci 8, 610–622. https://doi.org/10.1038/nrn2175

Jo, J.H., Jo, J.J., Lee, J.-M., Lee, S., 2016. Identification of absolute conversion to geraldol from fisetin and pharmacokinetics in mouse. Journal of Chromatography B 1038, 95–100. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.10.034

Kang, K.A., Piao, M.J., Hyun, J.W., 2015. Fisetin induces apoptosis in human nonsmall lung cancer cells via a mitochondria-mediated pathway. In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim. 51, 300–309. https://doi.org/10.1007/s11626-014-9830-6

Kang, K.A., Piao, M.J., Madduma Hewage, S.R.K., Ryu, Y.S., Oh, M.C., Kwon, T.K., Chae, S., Hyun, J.W., 2016. Fisetin induces apoptosis and endoplasmic reticulum stress in human non-small cell lung cancer through inhibition of the MAPK signaling pathway. Tumor Biol. 37, 9615–9624. https://doi.org/10.1007/s13277-016-4864-x

Karim, R., Palazzo, C., Evrard, B., Piel, G., 2016. Nanocarriers for the treatment of glioblastoma multiforme: Current state-of-the-art. Journal of Controlled Release 227, 23–37. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.02.026

Kazmi, F., Soon, Y.Y., Leong, Y.H., Koh, W.Y., Vellayappan, B., 2018. Re-irradiation for recurrent glioblastoma (GBM): a systematic review and meta-analysis. Journal of Neuro-Oncology. https://doi.org/10.1007/s11060-018-03064-0

Khan, N., Afaq, F., Khusro, F.H., Adhami, V.M., Suh, Y., Mukhtar, H., 2012. Dual inhibition of PI3K/AKT and mTOR signaling in human non-small cell lung cancer cells by a dietary flavonoid fisetin. Int J Cancer 130, 1695–1705. https://doi.org/10.1002/ijc.26178

Khansur, E., Shah, A.H., Lacy, K., Komotar, R.J., 2019. Novel Immunotherapeutics for Treatment of Glioblastoma: The Last Decade of Research. Cancer Investigation 1–7. https://doi.org/10.1080/07357907.2018.1479414

Kieler-Ferguson, H.M., Chan, D., Sockolosky, J., Finney, L., Maxey, E., Vogt, S., Szoka, F.C., 2017. Encapsulation, controlled release, and antitumor efficacy of cisplatin delivered in liposomes

composed of sterol-modified phospholipids. Eur J Pharm Sci 103, 85–93. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.03.003

Kim, S.-S., Harford, J.B., Pirollo, K.F., Chang, E.H., 2015. Effective treatment of glioblastoma requires crossing the blood–brain barrier and targeting tumors including cancer stem cells: The promise of nanomedicine. Biochemical and Biophysical Research Communications, Nanomedicine 468, 485–489. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.06.137

Koukourakis, M.I., Koukouraki, S., Fezoulidis, I., Kelekis, N., Kyrias, G., Archimandritis, S., Karkavitsas, N., 2000. High intratumoural accumulation of stealth® liposomal doxorubicin (Caelyx®) in glioblastomas and in metastatic brain tumours. Br J Cancer 83, 1281–1286. https://doi.org/10.1054/bjoc.2000.1459

Kreisl, T.N., Kim, L., Moore, K., Duic, P., Royce, C., Stroud, I., Garren, N., Mackey, M., Butman, J.A., Camphausen, K., Park, J., Albert, P.S., Fine, H.A., 2009. Phase II trial of single-agent bevacizumab followed by bevacizumab plus irinotecan at tumor progression in recurrent glioblastoma. J. Clin. Oncol. 27, 740–745. https://doi.org/10.1200/JCO.2008.16.3055

Lee, C.K., Wu, Y.-L., Ding, P.N., Lord, S.J., Inoue, A., Zhou, C., Mitsudomi, T., Rosell, R., Pavlakis, N., Links, M., Gebski, V., Gralla, R.J., Yang, J.C.-H., 2015. Impact of Specific Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Mutations and Clinical Characteristics on Outcomes After Treatment With EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors Versus Chemotherapy in EGFR-Mutant Lung Cancer: A Meta-Analysis. J. Clin. Oncol. 33, 1958–1965. https://doi.org/10.1200/JCO.2014.58.1736

Lee, C.M., Tanaka, T., Murai, T., Kondo, M., Kimura, J., Su, W., Kitagawa, T., Ito, T., Matsuda, H., Miyasaka, M., 2002. Novel chondroitin sulfate-binding cationic liposomes loaded with cisplatin efficiently suppress the local growth and liver metastasis of tumor cells in vivo. Cancer research 62, 4282–4288.

Li, J., Wang, X., Zhang, T., Wang, C., Huang, Z., Luo, X., Deng, Y., 2015. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences 10, 81–98. https://doi.org/10.1016/j.ajps.2014.09.004

Li, S., Wang, L., Li, N., Liu, Y., Su, H., 2017. Combination lung cancer chemotherapy: Design of a pH-sensitive transferrin-PEG-Hz-lipid conjugate for the co-delivery of docetaxel and baicalin. Biomedicine & Pharmacotherapy 95, 548–555. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.08.090

Li, Y., Yang, D., Wang, Y., Li, Z., Zhu, C., 2018. Co-delivery doxorubicin and silybin for anti-hepatoma via enhanced oral hepatic-targeted efficiency. Int J Nanomedicine 14, 301–315. https://doi.org/10.2147/IJN.S187888

Liao, Y.-C., Shih, Y.-W., Chao, C.-H., Lee, X.-Y., Chiang, T.-A., 2009. Involvement of the ERK signaling pathway in fisetin reduces invasion and migration in the human lung cancer cell line A549. J. Agric. Food Chem. 57, 8933–8941. https://doi.org/10.1021/jf902630w

Liu, H., Zhang, Y., Han, Y., Zhao, S., Wang, L., Zhang, Z., Wang, J., Cheng, J., 2015. Characterization and cytotoxicity studies of DPPC:M2+ novel delivery system for cisplatin thermosensitivity liposome with improving loading efficiency. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 131, 12–20. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.04.029

Liu, J., Chi, D., Pan, S., Zhao, L., Wang, X., Wang, D., Wang, Y., 2019. Effective co-encapsulation of doxorubicin and irinotecan for synergistic therapy using liposomes prepared with triethylammonium sucrose octasulfate as drug trapping agent. International Journal of Pharmaceutics 557, 264–272. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.12.072

Louis, D.N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W.K., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Kleihues, P., Ellison, D.W., 2016. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. Acta Neuropathologica 131, 803–820. https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1

Lv, L., Liu, C., Chen, C., Yu, X., Chen, G., Shi, Y., Qin, F., Ou, J., Qiu, K., Li, G., 2016. Quercetin and doxorubicin co-encapsulated biotin receptor-targeting nanoparticles for minimizing drug resistance in breast cancer. Oncotarget 7, 32184–32199. https://doi.org/10.18632/oncotarget.8607

Lv, Q., Li, L.-M., Han, M., Tang, X.-J., Yao, J.-N., Ying, X.-Y., Li, F.-Z., Gao, J.-Q., 2013. Characteristics of sequential targeting of brain glioma for transferrin-modified cisplatin liposome. International Journal of Pharmaceutics 444, 1–9. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.01.025

Markovsky, E., Baabur-Cohen, H., Satchi-Fainaro, R., 2014. Anticancer polymeric nanomedicine bearing synergistic drug combination is superior to a mixture of individually-conjugated drugs. Journal of Controlled Release 187, 145–157. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.05.025

Marzban, E., Alavizadeh, S.H., Ghiadi, M., Khoshangosht, M., Khashayarmanesh, Z., Abbasi, A., Jaafari, M.R., 2015. Optimizing the therapeutic efficacy of cisplatin PEGylated liposomes via incorporation of different DPPG ratios: In vitro and in vivo studies. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 136, 885–891. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.10.046

Mayer, L.D., Harasym, T.O., Tardi, P.G., Harasym, N.L., Shew, C.R., Johnstone, S.A., Ramsay, E.C., Bally, M.B., Janoff, A.S., 2006. Ratiometric dosing of anticancer drug combinations: Controlling drug ratios after systemic administration regulates therapeutic activity in tumor-bearing mice. Mol Cancer Ther 5, 1854–1863. https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0118

Mayhew, E., Ito, M., Lazo, R., 1987. Toxicity of non-drug-containing liposomes for cultured human cells. Exp. Cell Res. 171, 195–202. https://doi.org/10.1016/0014-4827(87)90262-x

Meerum Terwogt, J.M., Tibben, M.M., Welbank, H., Schellens, J.H., Beijnen, J.H., 2000. Validated method for the determination of platinum from a liposomal source (SPI-77) in human plasma using graphite furnace Zeeman atomic absorption spectrometry. Fresenius J Anal Chem 366, 298–302.

Mendes, L.P., Gaeti, M.P.N., Ávila, P.H.M. de, Vieira, M. de S., Rodrigues, B. dos S., Marcelino, R.I. de Á., Santos, L.C.R. dos, Valadares, M.C., Lima, E.M., 2014. Multicompartimental Nanoparticles for Co-Encapsulation and Multimodal Drug Delivery to Tumor Cells and Neovasculature. Pharm Res 31, 1106–1119. https://doi.org/10.1007/s11095-013-1234-x

Meng, L., Xia, X., Yang, Y., Ye, J., Dong, W., Ma, P., Jin, Y., Liu, Y., 2016. Co-encapsulation of paclitaxel and baicalein in nanoemulsions to overcome multidrug resistance via oxidative stress augmentation and P-glycoprotein inhibition. International Journal of Pharmaceutics 513, 8–16. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.09.001

Mignet, N., Seguin, J., Chabot, G.G., 2013. Bioavailability of Polyphenol Liposomes: A Challenge Ahead. Pharmaceutics 5, 457–471. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics5030457

Mignet, N., Seguin, J., Ramos Romano, M., Brullé, L., Touil, Y.S., Scherman, D., Bessodes, M., Chabot, G.G., 2012. Development of a liposomal formulation of the natural flavonoid fisetin. Int J Pharm 423, 69–76. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.04.066

Mingeot-Leclercq, M.-P., Gallet, X., Flore, C., Van Bambeke, F., Peuvot, J., Brasseur, R., 2001. Experimental and Conformational Analyses of Interactions between Butenafine and Lipids. Antimicrob Agents Chemother 45, 3347–3354. https://doi.org/10.1128/AAC.45.12.3347-3354.2001

Miyajima, K., 1997. Role of saccharides for the freeze-thawing and freeze drying of liposome. Advanced Drug Delivery Reviews 24, 151–159. https://doi.org/10.1016/S0169-409X(96)00454-1

Mohapatra, M., Mishra, A.K., 2011. Photophysical Behavior of Fisetin in Dimyristoylphosphatidylcholine Liposome Membrane. The Journal of Physical Chemistry B 115, 9962–9970. https://doi.org/10.1021/jp1123212

Molina, J.R., Yang, P., Cassivi, S.D., Schild, S.E., Adjei, A.A., 2008. Non–Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Treatment, and Survivorship. Mayo Clin Proc 83, 584–594.

Moolakkadath, T., Aqil, M., Ahad, A., Imam, S.S., Iqbal, B., Sultana, Y., Mujeeb, M., Iqbal, Z., 2018. Development of transethosomes formulation for dermal fisetin delivery: Box–Behnken design, optimization, in vitro skin penetration, vesicles–skin interaction and dermatokinetic studies. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology 0, 1–11. https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1469025

Moolakkadath, T., Aqil, Mohd., Ahad, A., Imam, S.S., Praveen, A., Sultana, Y., Mujeeb, M., Iqbal, Z., 2019. Fisetin loaded binary ethosomes for management of skin cancer by dermal application on UV exposed mice. International Journal of Pharmaceutics 560, 78–91. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.01.067

Mozafari, M.R., 2005. Liposomes: an overview of manufacturing techniques. Cell. Mol. Biol. Lett. 10, 711–719.

Mujokoro, B., Adabi, Mohsen, Sadroddiny, E., Adabi, Mahdi, Khosravani, M., 2016. Nano-structures mediated co-delivery of therapeutic agents for glioblastoma treatment: A review. Materials Science and Engineering: C 69, 1092–1102. https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.07.080

Murugan, C., Rayappan, K., Thangam, R., Bhanumathi, R., Shanthi, K., Vivek, R., Thirumurugan, R., Bhattacharyya, A., Sivasubramanian, S., Gunasekaran, P., Kannan, S., 2016. Combinatorial nanocarrier based drug delivery approach for amalgamation of anti-tumor agents in bresat cancer cells: an improved nanomedicine strategies. Sci Rep 6. https://doi.org/10.1038/srep34053

Nail, S.L., Jiang, S., Chongprasert, S., Knopp, S.A., 2002. Fundamentals of freeze-drying. Pharm Biotechnol 14, 281–360. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0549-5_6

Nakada, M., Kita, D., Watanabe, T., Hayashi, Y., Teng, L., Pyko, I.V., Hamada, J.-I., 2011. Aberrant Signaling Pathways in Glioma. Cancers (Basel) 3, 3242–3278. https://doi.org/10.3390/cancers3033242

Narayanan, S., Pavithran, M., Viswanath, A., Narayanan, D., Mohan, C.C., Manzoor, K., Menon, D., 2014. Sequentially releasing dual-drug-loaded PLGA–casein core/shell nanomedicine: Design, synthesis, biocompatibility and pharmacokinetics. Acta Biomaterialia 10, 2112–2124. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.12.041

Newlands, E.S., Stevens, M.F., Wedge, S.R., Wheelhouse, R.T., Brock, C., 1997. Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. Cancer Treat. Rev. 23, 35–61. https://doi.org/10.1016/s0305-7372(97)90019-0

Neyns, B., 2012. Correlation of EGFR, IDH1 and PTEN status with the outcome of patients with recurrent glioblastoma treated in a phase II clinical trial with the EGFR-blocking monoclonal antibody cetuximab. International Journal of Oncology. https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1539

Novak, I., Janeiro, P., Seruga, M., Oliveira-Brett, A.M., 2008. Ultrasound extracted flavonoids from four varieties of Portuguese red grape skins determined by reverse-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. Anal. Chim. Acta 630, 107–115. https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.10.002

Nyholm, T.K.M., Nylund, M., Slotte, J.P., 2003. A Calorimetric Study of Binary Mixtures of Dihydrosphingomyelin and Sterols, Sphingomyelin, or Phosphatidylcholine. Biophys J 84, 3138–3146.

Ochi, M.M., Amoabediny, G., Rezayat, S.M., Akbarzadeh, A., Ebrahimi, B., 2016. In Vitro Co-Delivery Evaluation of Novel Pegylated Nano-Liposomal Herbal Drugs of Silibinin and Glycyrrhizic Acid (Nano-Phytosome) to Hepatocellular Carcinoma Cells. Cell J 18, 135–148. https://doi.org/10.22074/cellj.2016.4308

Oldfield, E., Chapman, D., 1972. Dynamics of lipids in membranes: Heterogeneity and the role of cholesterol. FEBS Letters 23, 285–297. https://doi.org/10.1016/0014-5793(72)80300-4

Olson, F., Mayhew, E., Maslow, D., Rustum, Y., Szoka, F., 1982. Characterization, toxicity and therapeutic efficacy of adrïamycin encapsulated in liposomes. European Journal of Cancer and Clinical Oncology 18, 167–169. https://doi.org/10.1016/0277-5379(82)90060-8

Omuro, A., DeAngelis, L.M., 2013. Glioblastoma and Other Malignant Gliomas: A Clinical Review. JAMA 310, 1842–1850. https://doi.org/10.1001/jama.2013.280319

Ostrom, Q.T., Gittleman, H., Truitt, G., Boscia, A., Kruchko, C., Barnholtz-Sloan, J.S., 2018. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2011–2015. Neuro-Oncology 20, iv1–iv86. https://doi.org/10.1093/neuonc/noy131

Pangeni, R., Panthi, V.K., Yoon, I.-S., Park, J.W., 2018. Preparation, Characterization, and In Vivo Evaluation of an Oral Multiple Nanoemulsive System for Co-Delivery of Pemetrexed and Quercetin. Pharmaceutics 10. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10030158

Paolino, D., Accolla, M.L., Cilurzo, F., Cristiano, M.C., Cosco, D., Castelli, F., Sarpietro, M.G., Fresta, M., Celia, C., 2017. Interaction between PEG lipid and DSPE/DSPC phospholipids: An insight of PEGylation degree and kinetics of de-PEGylation. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 155, 266–275. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.04.018

Parhi, P., Mohanty, C., Sahoo, S.K., 2012. Nanotechnology-based combinational drug delivery: an emerging approach for cancer therapy. Drug Discovery Today 17, 1044–1052. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.05.010

Park, J.H., Jang, Y.-J., Choi, Y.J., Jang, J.W., Kim, J.-H., Rho, Y.-K., Kim, I.J., Kim, H.-J., Leem, M.J., Lee, S.-T., 2013. Fisetin inhibits matrix metalloproteinases and reduces tumor cell invasiveness and endothelial cell tube formation. Nutr Cancer 65, 1192–1199. https://doi.org/10.1080/01635581.2013.828090

Park, J.K., Hodges, T., Arko, L., Shen, M., Dello Iacono, D., McNabb, A., Olsen Bailey, N., Kreisl, T.N., Iwamoto, F.M., Sul, J., Auh, S., Park, G.E., Fine, H.A., Black, P.M., 2010. Scale to predict

survival after surgery for recurrent glioblastoma multiforme. J. Clin. Oncol. 28, 3838–3843. https://doi.org/10.1200/JCO.2010.30.0582

Park, S.N., Lee, M.H., Kim, S.J., Yu, E.R., 2013. Preparation of quercetin and rutin-loaded ceramide liposomes and drug-releasing effect in liposome-in-hydrogel complex system. Biochem. Biophys. Res. Commun. 435, 361–366. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.04.093

Patent US6126966, n.d. Brevet US6126966 - Liposomes containing a cisplatin compound - Google Brevets [WWW Document]. URL http://www.google.com/patents/US6126966 (accessed 2.25.16).

Patent US20140271821, n.d. Brevet US20140271821 - Liposomal cisplatin compositions for cancer therapy - Google Brevets [WWW Document]. URL http://www.google.com/patents/US20140271821 (accessed 2.25.16).

Pawar, A., Singh, S., Rajalakshmi, S., Shaikh, K., Bothiraja, C., 2018. Development of fisetin-loaded folate functionalized pluronic micelles for breast cancer targeting. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology 0, 1–15. https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1423991

Peer, D., Karp, J.M., Hong, S., Farokhzad, O.C., Margalit, R., Langer, R., 2007. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. Nature Nanotech 2, 751–760. https://doi.org/10.1038/nnano.2007.387

Peng, P.-C., Hong, R.-L., Tsai, T., Chen, C.-T., 2019. Co-Encapsulation of Chlorin e6 and Chemotherapeutic Drugs in a PEGylated Liposome Enhance the Efficacy of Tumor Treatment: Pharmacokinetics and Therapeutic Efficacy. Pharmaceutics 11. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11110617

Peng, X.-H., Wang, Yiqing, Huang, D., Wang, Yuxiang, Shin, H.Juc., Chen, Z., Spewak, M.B., Mao, H., Wang, X., Wang, Ying, Chen, Z. (Georgia), Nie, S., Shin, D.M., 2011. Targeted Delivery of Cisplatin to Lung Cancer Using ScFvEGFR-Heparin-Cisplatin Nanoparticles. ACS Nano 5, 9480–9493. https://doi.org/10.1021/nn202410f

Peters, S., Camidge, D.R., Shaw, A.T., Gadgeel, S., Ahn, J.S., Kim, D.-W., Ou, S.-H.I., Pérol, M., Dziadziuszko, R., Rosell, R., Zeaiter, A., Mitry, E., Golding, S., Balas, B., Noe, J., Morcos, P.N., Mok, T., ALEX Trial Investigators, 2017. Alectinib versus Crizotinib in Untreated ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. N. Engl. J. Med. 377, 829–838. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1704795

Pitorre, M., Gondé, H., Haury, C., Messous, M., Poilane, J., Boudaud, D., Kanber, E., Rossemond Ndombina, G.A., Benoit, J.-P., Bastiat, G., 2017. Recent advances in nanocarrier-loaded gels: Which drug delivery technologies against which diseases? Journal of Controlled Release 266, 140–155. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.09.031

Popescu, A.M., Purcaru, S.O., Alexandru, O., Dricu, A., 2016. New perspectives in glioblastoma antiangiogenic therapy. Współczesna Onkologia 2, 109–118. https://doi.org/10.5114/wo.2015.56122

Popper, H.H., 2016. Progression and metastasis of lung cancer. Cancer Metastasis Rev 35, 75–91. https://doi.org/10.1007/s10555-016-9618-0

Qi, S.-S., Sun, J.-H., Yu, H.-H., Yu, S.-Q., 2017. Co-delivery nanoparticles of anti-cancer drugs for improving chemotherapy efficacy. Drug Delivery 24, 1909–1926. https://doi.org/10.1080/10717544.2017.1410256

Qiang, H., Chang, Q., Xu, J., Qian, J., Zhang, Y., Lei, Y., Han, B., Chu, T., 2020. New advances in antiangiogenic combination therapeutic strategies for advanced non-small cell lung cancer. J Cancer Res Clin Oncol. https://doi.org/10.1007/s00432-020-03129-6

Qu, J., Zhang, Y., Chen, X., Yang, H., Zhou, C., Yang, N., 2017. Newly developed anti-angiogenic therapy in non-small cell lung cancer. Oncotarget 9, 10147–10163. https://doi.org/10.18632/oncotarget.23755

Ragelle, H., Crauste-Manciet, S., Seguin, J., Brossard, D., Scherman, D., Arnaud, P., Chabot, G.G., 2012. Nanoemulsion formulation of fisetin improves bioavailability and antitumour activity in mice. International Journal of Pharmaceutics 427, 452–459. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.02.025

Ramasamy, T., Ruttala, H.B., Chitrapriya, N., Poudal, B.K., Choi, J.Y., Kim, S.T., Youn, Y.S., Ku, S.K., Choi, H.-G., Yong, C.S., Kim, J.O., 2017. Engineering of cell microenvironment-responsive polypeptide nanovehicle co-encapsulating a synergistic combination of small molecules for effective chemotherapy in solid tumors. Acta Biomaterialia 48, 131–143. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.10.034

Ramešová, Š., Sokolová, R., Degano, I., 2015. The study of the oxidation of the natural flavonol fisetin confirmed quercetin oxidation mechanism. Electrochimica Acta 182, 544–549. https://doi.org/10.1016/j.electacta.2015.09.144

Ray, L., Pal, M.K., Ray, R.S., 2017. Synergism of co-delivered nanosized antioxidants displayed enhanced anticancer efficacy in human colon cancer cell lines. Bioactive Materials 2, 82–95. https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.02.003

Reck, M., von Pawel, J., Zatloukal, P., Ramlau, R., Gorbounova, V., Hirsh, V., Leighl, N., Mezger, J., Archer, V., Moore, N., Manegold, C., BO17704 Study Group, 2010. Overall survival with cisplatin-gemcitabine and bevacizumab or placebo as first-line therapy for nonsquamous non-small-cell lung cancer: results from a randomised phase III trial (AVAiL). Ann. Oncol. 21, 1804–1809. https://doi.org/10.1093/annonc/mdq020

Rodrigues, C., Gameiro, P., Prieto, M., de Castro, B., 2003. Interaction of rifampicin and isoniazid with large unilamellar liposomes: spectroscopic location studies. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects 1620, 151–159. https://doi.org/10.1016/S0304-4165(02)00528-7

Sahu, B.D., Kalvala, A.K., Koneru, M., Mahesh Kumar, J., Kuncha, M., Rachamalla, S.S., Sistla, R., 2014. Ameliorative Effect of Fisetin on Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in Rats via Modulation of NF-κB Activation and Antioxidant Defence. PLoS One 9. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105070

Sandhu, P.S., Kumar, R., Beg, S., Jain, S., Kushwah, V., Katare, O.P., Singh, B., 2017. Natural lipids enriched self-nano-emulsifying systems for effective co-delivery of tamoxifen and naringenin: Systematic approach for improved breast cancer therapeutics. Nanomedicine 13, 1703–1713. https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.03.003

Schijns, V.E.J.C., Pretto, C., Devillers, L., Pierre, D., Hofman, F.M., Chen, T.C., Mespouille, P., Hantos, P., Glorieux, P., Bota, D.A., Stathopoulos, A., 2015. First clinical results of a personalized immunotherapeutic vaccine against recurrent, incompletely resected, treatment-resistant glioblastoma multiforme (GBM) tumors, based on combined allo- and auto-immune tumor reactivity. Vaccine 33, 2690–2696. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.03.095

Schiller, J.H., Harrington, D., Belani, C.P., Langer, C., Sandler, A., Krook, J., Zhu, J., Johnson, D.H., Eastern Cooperative Oncology Group, 2002. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. N. Engl. J. Med. 346, 92–98. https://doi.org/10.1056/NEJMoa011954

Sechi, M., Syed, D.N., Pala, N., Mariani, A., Marceddu, S., Brunetti, A., Mukhtar, H., Sanna, V., 2016. Nanoencapsulation of dietary flavonoid fisetin: Formulation and in vitro antioxidant and α-glucosidase inhibition activities. Materials Science and Engineering: C 68, 594–602. https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.06.042

Seguin, J., Brullé, L., Boyer, R., Lu, Y.M., Ramos Romano, M., Touil, Y.S., Scherman, D., Bessodes, M., Mignet, N., Chabot, G.G., 2013. Liposomal encapsulation of the natural flavonoid fisetin improves bioavailability and antitumor efficacy. Int J Pharm 444, 146–154. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.01.050

Sengupta, B., Banerjee, A., Sengupta, P.K., 2005. Interactions of the plant flavonoid fisetin with macromolecular targets: Insights from fluorescence spectroscopic studies. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 80, 79–86. https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2005.03.005

Sengupta, B., Banerjee, A., Sengupta, P.K., 2004. Investigations on the binding and antioxidant properties of the plant flavonoid fisetin in model biomembranes. FEBS Letters 570, 77–81. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.06.027

Shang, C., Hong, Y., Guo, Y., Liu, Y.-H., Xue, Y.-X., 2015. Influence of the MACC1 gene on sensitivity to chemotherapy in human U251 glioblastoma cells. Asian Pac. J. Cancer Prev. 16, 195–199.

Shein, S.A., Kuznetsov, I.I., Abakumova, T.O., Chelushkin, P.S., Melnikov, P.A., Korchagina, A.A., Bychkov, D.A., Seregina, I.F., Bolshov, M.A., Kabanov, A.V., Chekhonin, V.P., Nukolova, N.V., 2016. VEGF and VEGFR2-targeted Liposomes for Cisplatin Delivery to Glioma Cells. Mol. Pharmaceutics. https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b00519

Sheleg, S.V., Korotkevich, E.A., Zhavrid, E.A., Muravskaya, G.V., Smeyanovich, A.F., Shanko, Y.G., Yurkshtovich, T.L., Bychkovsky, P.B., Belyaev, S.A., 2002. Local chemotherapy with cisplatin-depot for glioblastoma multiforme. J. Neurooncol. 60, 53–59.

Shi, C., Yu, H., Sun, D., Ma, L., Tang, Z., Xiao, Q., Chen, X., 2015. Cisplatin-loaded polymeric nanoparticles: Characterization and potential exploitation for the treatment of non-small cell lung carcinoma. Acta Biomaterialia 18, 68–76. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.02.009

Shibata, S., Ochi, A., Mori, K., 1990. Liposomes as Carriers of Cisplatin into the Central Nervous System. Neurologia medico-chirurgica 30, 242–245.

Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D., Keshet, E., 1992. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. Nature 359, 843–845. https://doi.org/10.1038/359843a0

Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A., 2018. Cancer statistics, 2018. CA Cancer J Clin 68, 7–30. https://doi.org/10.3322/caac.21442

Skupin-Mrugalska, P., 2019. Chapter 6 - Liposome-Based Drug Delivery for Lung Cancer, in: Kesharwani, P. (Ed.), Nanotechnology-Based Targeted Drug Delivery Systems for Lung Cancer. Academic Press, pp. 123–160. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815720-6.00006-X

Song, B.J., Manganais, C., Ferruzzi, M.G., 2015. Thermal degradation of green tea flavan-3-ols and formation of hetero- and homocatechin dimers in model dairy beverages. Food Chem 173, 305–312. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.026

Soria, J.-C., Mauguen, A., Reck, M., Sandler, A.B., Saijo, N., Johnson, D.H., Burcoveanu, D., Fukuoka, M., Besse, B., Pignon, J.-P., meta-analysis of bevacizumab in advanced NSCLC collaborative group, 2013. Systematic review and meta-analysis of randomised, phase II/III trials adding bevacizumab to platinum-based chemotherapy as first-line treatment in patients with advanced non-small-cell lung cancer. Ann. Oncol. 24, 20–30. https://doi.org/10.1093/annonc/mds590

Stras, S., Holleran, T., Howe, A., Sofou, S., 2016. Interstitial Release of Cisplatin from Triggerable Liposomes Enhances Efficacy Against Triple Negative Breast Cancer Solid Tumor Analogues. Molecular Pharmaceutics. https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b00439

Stupp, R., Hegi, M.E., Gilbert, M.R., Chakravarti, A., 2007. Chemoradiotherapy in malignant glioma: standard of care and future directions. J. Clin. Oncol. 25, 4127–4136. https://doi.org/10.1200/JCO.2007.11.8554

Stupp, R., Hegi, M.E., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Taphoorn, M.J.B., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Allgeier, A., Fisher, B., Belanger, K., Hau, P., Brandes, A.A., Gijtenbeek, J., Marosi, C., Vecht, C.J., Mokhtari, K., Wesseling, P., Villa, S., Eisenhauer, E., Gorlia, T., Weller, M., Lacombe, D., Cairncross, J.G., Mirimanoff, R.-O., European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumour and Radiation Oncology Groups, National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group, 2009. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. Lancet Oncol. 10, 459–466. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70025-7

Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J.B., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J.G., Eisenhauer, E., Mirimanoff, R.O., 2005. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. New England Journal of Medicine 352, 987–996. https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330

Sun, C., Fu, J., Chen, J., Jiang, L., Pan, Y., 2010. On-line HPLC method for screening of antioxidants against superoxide anion radical from complex mixtures. J Sep Sci 33, 1018–1023. https://doi.org/10.1002/jssc.200900588

Taghavi, M.S., Akbarzadeh, A., Mahdian, R., Azadmanesh, K., Javadi, G., 2013. Cisplatin downregulates BCL2L12, a novel apoptosis-related gene, in glioblastoma cells. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal 49, 465–472. https://doi.org/10.1007/s11626-013-9622-4

Tan, S., Wang, G., 2018. Lung cancer targeted therapy: Folate and transferrin dual targeted, glutathione responsive nanocarriers for the delivery of cisplatin. Biomedicine & Pharmacotherapy 102, 55–63. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.046

Tardi, P., Johnstone, S., Harasym, N., Xie, S., Harasym, T., Zisman, N., Harvie, P., Bermudes, D., Mayer, L., 2009. In vivo maintenance of synergistic cytarabine:daunorubicin ratios greatly enhances therapeutic efficacy. Leukemia Research 33, 129–139. https://doi.org/10.1016/j.leukres.2008.06.028

Tardi, P.G., Gallagher, R.C., Johnstone, S., Harasym, N., Webb, M., Bally, M.B., Mayer, L.D., 2007. Coencapsulation of irinotecan and floxuridine into low cholesterol-containing liposomes that coordinate drug release in vivo. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1768, 678–687. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.11.014

Thanasupawat, T., Bergen, H., Hombach-Klonisch, S., Krcek, J., Ghavami, S., Del Bigio, M.R., Krawitz, S., Stelmack, G., Halayko, A., McDougall, M., Meier, M., Stetefeld, J., Klonisch, T., 2015. Platinum (IV) coiled coil nanotubes selectively kill human glioblastoma cells. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine 11, 913–925. https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.01.014

Thomas, A.A., Ernstoff, M.S., Fadul, C.E., 2012. Immunotherapy for the Treatment of Glioblastoma. Cancer J 18, 59–68. https://doi.org/10.1097/PPO.0b013e3182431a73

Toro-Cordova, A., Flores-Cruz, M., Santoyo-Salazar, J., Carrillo-Nava, E., Jurado, R., Figueroa-Rodriguez, P., Lopez-Sanchez, P., Medina, L., Garcia-Lopez, P., 2018. Liposomes Loaded with Cisplatin and Magnetic Nanoparticles: Physicochemical Characterization, Pharmacokinetics, and In-Vitro Efficacy. Molecules 23, 2272. https://doi.org/10.3390/molecules23092272

Torok, J.A., Wegner, R.E., Mintz, A.H., Heron, D.E., Burton, S.A., 2011. Re-irradiation with radiosurgery for recurrent glioblastoma multiforme. Technol. Cancer Res. Treat. 10, 253–258.

Touil, Y.S., Auzeil, N., Boulinguez, F., Saighi, H., Regazzetti, A., Scherman, D., Chabot, G.G., 2011a. Fisetin disposition and metabolism in mice: Identification of geraldol as an active metabolite. Biochem. Pharmacol. 82, 1731–1739. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.07.097

Touil, Y.S., Fellous, A., Scherman, D., Chabot, G.G., 2009. Flavonoid-Induced Morphological Modifications of Endothelial Cells Through Microtubule Stabilization. Nutrition and Cancer 61, 310–321. https://doi.org/10.1080/01635580802521346

Touil, Y.S., Seguin, J., Scherman, D., Chabot, G.G., 2011b. Improved antiangiogenic and antitumour activity of the combination of the natural flavonoid fisetin and cyclophosphamide in Lewis lung carcinoma-bearing mice. Cancer Chemotherapy and Pharmacology 68, 445–455. https://doi.org/10.1007/s00280-010-1505-8

Tseng, Y.-Y., Wang, Y.-C., Su, C.-H., Yang, T.-C., Chang, T.-M., Kau, Y.-C., Liu, S.-J., 2015. Concurrent delivery of carmustine, irinotecan, and cisplatin to the cerebral cavity using biodegradable nanofibers: In vitro and in vivo studies. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 134, 254–261. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.06.055

Turpin, A., Sharif, A., Stoven, L., Blond, S., Maurage, C.-A., Rhun, É.L., 2015. La niche des cellules souches tumorales dans le glioblastome : des aspects fondamentaux au ciblage thérapeutique. /data/revues/00074551/v102i1/S0007455114000101/.

van Winden, E.C.A., 2003. Freeze-Drying of Liposomes: Theory and Practice, in: Methods in Enzymology, Liposomes, Part A. Academic Press, pp. 99–110. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(03)67008-4

Vauthier, C., Couvreur, P., 2008. Nanotechnologies pour la thérapeutique et le diagnostic, in: Biomédical - Pharma | Médicaments et Produits Pharmaceutiques, Techniques de l'ingénieur.

Vieira, F.P., Mesquita, T.L., Lara, P.C.P., Ramaldes, G.A., Beinner, M.A., Silva, J.B.B., Oliveira, M.C., Silveira, J.N., 2013. ET AAS evaluation of the stability and pH-sensitivity of, pH-sensitive stealth liposomes containing cisplatin in mouse plasma. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 84, 135–139. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.05.044

Vuković, L., Khatib, F.A., Drake, S.P., Madriaga, A., Brandenburg, K.S., Král, P., Onyuksel, H., 2011. Structure and Dynamics of Highly PEG-ylated Sterically Stabilized Micelles in Aqueous Media. J Am Chem Soc 133, 13481–13488. https://doi.org/10.1021/ja204043b

Wang, A., Lin, W., Liu, D., He, C., 2013. Application of liposomal technologies for delivery of platinum analogs in oncology. International Journal of Nanomedicine 3309. https://doi.org/10.2147/IJN.S38354

Wang, B., Zhang, W., Zhou, X., Liu, M., Hou, X., Cheng, Z., Chen, D., 2019. Development of dual-targeted nano-dandelion based on an oligomeric hyaluronic acid polymer targeting tumor-associated macrophages for combination therapy of non-small cell lung cancer. Drug Delivery 26, 1265–1279. https://doi.org/10.1080/10717544.2019.1693707

Wang, G., Wang, J.-J., Du, L., Fei, L., To, S.T., 2016. Inhibitory Kinetics and Mechanism of Flavonoids Extracted from *Cotinus coggygria* Scop. Against Glioblastoma Cancer. Nutrition and Cancer 68, 1357–1368. https://doi.org/10.1080/01635581.2016.1225105

Wang, J., Huang, S., 2018. Fisetin inhibits the growth and migration in the A549 human lung cancer cell line via the ERK1/2 pathway. Exp Ther Med 15, 2667–2673. https://doi.org/10.3892/etm.2017.5666

Wang, J., Zhao, X.-H., 2016. Degradation kinetics of fisetin and quercetin in solutions as effected by pH, temperature and coexisted proteins. Journal of the Serbian Chemical Society 81, 243–253. https://doi.org/10.2298/JSC150706092W

Wang, L., Zhang, D.-Z., Wang, Y.-X., 2017. Bioflavonoid Fisetin Loaded α-Tocopherol-Poly(lactic acid)-Based Polymeric Micelles for Enhanced Anticancer Efficacy in Breast Cancers. Pharmaceutical Research 34, 453–461. https://doi.org/10.1007/s11095-016-2077-z

Wang, W., Xi, M., Duan, X., Wang, Y., Kong, F., 2015. Delivery of baicalein and paclitaxel using self-assembled nanoparticles: synergistic antitumor effect in vitro and in vivo. Int J Nanomedicine 10, 3737–3750. https://doi.org/10.2147/IJN.S80297

Wang, Y., Kong, X., Guo, Y., Wang, R., Ma, W., 2017. Continuous dose-intense temozolomide and cisplatin in recurrent glioblastoma patients. Medicine (Baltimore) 96. https://doi.org/10.1097/MD.0000000000006261

Weller, M., Cloughesy, T., Perry, J.R., Wick, W., 2013. Standards of care for treatment of recurrent glioblastoma--are we there yet? Neuro-Oncology 15, 4–27. https://doi.org/10.1093/neuonc/nos273

Wen, P.Y., Chang, S.M., Lamborn, K.R., Kuhn, J.G., Norden, A.D., Cloughesy, T.F., Robins, H.I., Lieberman, F.S., Gilbert, M.R., Mehta, M.P., Drappatz, J., Groves, M.D., Santagata, S., Ligon, A.H., Yung, W.K.A., Wright, J.J., Dancey, J., Aldape, K.D., Prados, M.D., Ligon, K.L., 2014. Phase I/II study of erlotinib and temsirolimus for patients with recurrent malignant gliomas: North American Brain Tumor Consortium trial 04-02. Neuro-Oncology 16, 567–578. https://doi.org/10.1093/neuonc/not247

Wong, M.-Y., Chiu, G.N.C., 2011. Liposome formulation of co-encapsulated vincristine and quercetin enhanced antitumor activity in a trastuzumab-insensitive breast tumor xenograft model. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine 7, 834–840. https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.02.001

Wong, M.-Y., Chiu, G.N.C., 2010. Simultaneous liposomal delivery of quercetin and vincristine for enhanced estrogen-receptor-negative breast cancer treatment. Anticancer Drugs 21, 401–410. https://doi.org/10.1097/CAD.0b013e328336e940

Woodle, M.C., 1995. Sterically stabilized liposome therapeutics. Advanced Drug Delivery Reviews, Long-circulating Drug Delivery Systems 16, 249–265. https://doi.org/10.1016/0169-409X(95)00028-6

Wu, G.X., Raz, D.J., 2016. Lung Cancer Screening, in: Reckamp, K.L. (Ed.), Lung Cancer: Treatment and Research, Cancer Treatment and Research. Springer International Publishing, Cham, pp. 1–23. https://doi.org/10.1007/978-3-319-40389-2_1

Xiao, X., Zou, J., Fang, Y., Meng, Y., Xiao, C., Fu, J., Liu, S., Bai, P., Yao, Y., 2018. Fisetin and polymeric micelles encapsulating fisetin exhibit potent cytotoxic effects towards ovarian cancer cells. BMC Complement Altern Med 18. https://doi.org/10.1186/s12906-018-2127-7

Xiong, Y., Zhao, Y., Miao, L., Lin, C.M., Huang, L., 2016. Co-delivery of polymeric metformin and cisplatin by self-assembled core-membrane nanoparticles to treat non-small cell lung cancer. Journal of Controlled Release 244, 63–73. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.11.005

Xu, B., Zeng, M., Zeng, J., Feng, J., Yu, L., 2018. Meta-analysis of clinical trials comparing the efficacy and safety of liposomal cisplatin versus conventional nonliposomal cisplatin in nonsmall cell lung cancer (NSCLC) and squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN). Medicine (Baltimore) 97, e13169. https://doi.org/10.1097/MD.0000000000013169

Xu, Y., Yuan, F.-E., Chen, Q.-X., Liu, B.-H., 2018. Molecular mechanisms involved in angiogenesis and potential target of antiangiogenesis in human glioblastomas. Glioma 1, 35. https://doi.org/10.4103/glioma.glioma_10_17

Yang, F.-Y., Horng, S.-C., 2013. Chemotherapy of glioblastoma by targeted liposomal platinum compounds with focused ultrasound. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc 2013, 6289–6292. https://doi.org/10.1109/EMBC.2013.6610991

Zappa, C., Mousa, S.A., 2016. Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. Transl Lung Cancer Res 5, 288–300. https://doi.org/10.21037/tlcr.2016.06.07

Zhang, C., Nance, E.A., Mastorakos, P., Chisholm, J., Berry, S., Eberhart, C., Tyler, B., Brem, H., Suk, J.S., Hanes, J., 2017. Convection enhanced delivery of cisplatin-loaded brain penetrating nanoparticles cures malignant glioma in rats. J Control Release 263, 112–119. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.03.007

Zhang, J., Jiang, K., An, K., Ren, S.-H., Xie, X., Jin, Y., Lin, J., 2015. Novel water-soluble fisetin/cyclodextrins inclusion complexes: Preparation, characterization, molecular docking and bioavailability. Carbohydrate Research 418, 20–28. https://doi.org/10.1016/j.carres.2015.09.013

Zhang, M., Ye, G., Li, J., Wang, Y., 2015. Recent advance in molecular angiogenesis in glioblastoma: the challenge and hope for anti-angiogenic therapy. Brain Tumor Pathol 32, 229–236. https://doi.org/10.1007/s10014-015-0233-5

Zhang, R., Ru, Y., Gao, Y., Li, J., Mao, S., 2017. Layer-by-layer nanoparticles co-loading gemcitabine and platinum (IV) prodrugs for synergistic combination therapy of lung cancer. Drug Des Devel Ther 11, 2631–2642. https://doi.org/10.2147/DDDT.S143047

Zhang, X., Yin, J., Liang, C., Sun, Y., Zhang, L., 2017. UHPLC-Q-TOF-MS/MS Method Based on Four-Step Strategy for Metabolism Study of Fisetin in Vitro and in Vivo. J. Agric. Food Chem. 65, 10959–10972. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04265

Zhang, Y., Wang, F., Li, M., Yu, Z., Qi, R., Ding, J., Zhang, Z., Chen, X., 2018. Self-Stabilized Hyaluronate Nanogel for Intracellular Codelivery of Doxorubicin and Cisplatin to Osteosarcoma. Advanced Science 5, 1700821. https://doi.org/10.1002/advs.201700821

Zhao, L., Feng, S.-S., Kocherginsky, N., Kostetski, I., 2007. DSC and EPR investigations on effects of cholesterol component on molecular interactions between paclitaxel and phospholipid within lipid bilayer membrane. International Journal of Pharmaceutics 338, 258–266. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.01.045

Zhou, X., Wang, J., Wu, J., Yang, X., Yung, B.C., Lee, L.J., Lee, R.J., 2015. Preparation and evaluation of a novel liposomal formulation of cisplatin. European Journal of Pharmaceutical Sciences 66, 90–95. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.10.004

Zhu, B., Yu, L., Yue, Q., 2017. Co-delivery of vincristine and quercetin by nanocarriers for lymphoma combination chemotherapy. Biomedicine & Pharmacotherapy 91, 287–294. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.02.112

Zhuo, W., Zhang, L., Zhu, Y., Zhu, B., Chen, Z., 2015. Fisetin, a dietary bioflavonoid, reverses acquired Cisplatin-resistance of lung adenocarcinoma cells through MAPK/Survivin/Caspase pathway. American journal of translational research 7, 2045.

Zisman, N., Dos Santos, N., Johnstone, S., Tsang, A., Bermudes, D., Mayer, L., Tardi, P., 2011. Optimizing Liposomal Cisplatin Efficacy through Membrane Composition Manipulations. Chemotherapy Research and Practice 2011, 1–7. https://doi.org/10.1155/2011/213848

ANNEXE

Co-encapsulation of flavonoids with anti-cancer drugs: a challenge ahead

Morgane Renault-Mahieux[1,2], Johanne Seguin[1], Khair Alhareth[1] Nathalie Mignet[1], Muriel Paul[2], Karine Andrieux[1]

1. Unité des Technologies Chimiques et Biologiques pour la Santé (UTCBS), CNRS UMR8258, INSERM U1267, Faculté de Pharmacie, Université de Paris, 75006 Paris, France

2. Pharmacy Department, Henri Mondor Hospital Group, AP-HP, 94000 Créteil, France

1. Introduction

1.1. Anti-cancer properties of flavonoids

Flavonoids are natural polyphenol found widely in fruits, vegetable and tea. They are composed of more than 6500 compounds and form one of the most important groups of plant metabolites (Panche et al., 2016).

Flavonoids are pleiotropic compounds with several properties such as antioxydative, antifungal, antibacterial, anti-carcinogenic, anti-angiogenic or anti-inflammatory activity (Dayoub et al., 2013; Nagaraju et al., 2013; Adan and Baran, 2015; Ahmad et al., 2016; Carvalho et al., 2017; Samie et al., 2018; Reyes-Farias and Carrasco-Pozo, 2019). They have demonstrated direct cytotoxicity on several cell lines by inhibiting the cell cycle or inducing apoptosis. They also have demonstrated anti-angiogenic effects by targeting the VEGF pathway or bFGF signaling pathway, as well as by having an activity on the matrix metalloprotease or directly on the endothelial cells (Su et al., 2005; Touil et al., 2009, 2011; Mirossay et al., 2017). In addition, their anti-inflammatory properties could decrease the chronic inflammation that supports tumor development, invasion and metastasis pathways (Gupta et al., 2018).

Combination of anticancer drug with flavonoids agent could maximize efficacy *via* an additional or a synergistic effect, thus enabling the administration of a lower dose of the anticancer drug and the decrease of the toxicity. Moreover, several flavonoids have shown an inhibition of P-gp, an efflux protein transporting some anticancer drugs outside the cells, and can inactivate several drug-resistance pathway (Chen et al., 2010; Cui et al., 2019; Kashyap et al., 2019). It could also minimize the

toxicity of the anti-cancer drugs by scavenging the free radicals, thus counteracting the ROS-mediated damages.

1.2. Flavonoids: a need for vectorization

Flavonoids are characterized by a common structure of two aromatic rings (A and B) which are linked through a three-carbon oxygenated heterocyclic ring (C) (Figure 42): this is the basic flavane skeleton. They are subdivided into flavonols, flavanols, flavones, flavanones, anthocyanidins and isoflavonoids depending on the degree of insaturation or oxidation of the C-rings, and depending on which carbon the B ring is attached to the C ring.

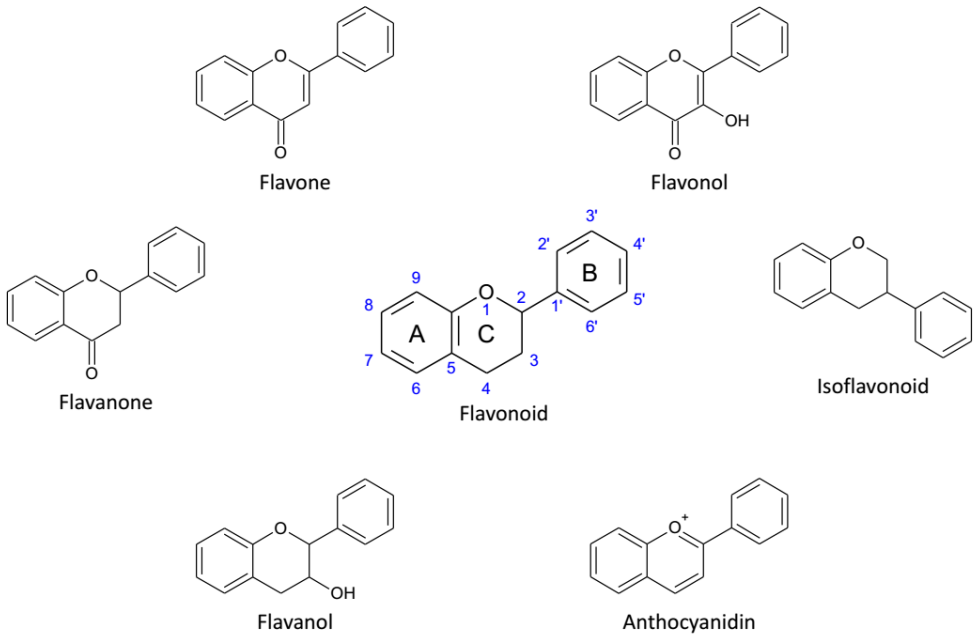


Figure 42. Chemical structure of flavonoid and their classes.

Flavonoids can exist as free aglycones and glycosidic conjugates (Bednarek et al., 2003; He, 2000). The aglycone flavonoids are hydrophobic molecules, but the glycosylation renders them more water-soluble (Table 35) (Plaza et al., 2014).

Table 35. Log P of the different flavonoids reviewed in this article. BAI = baicalin, QUE = querccetin, BCL = baicalein, SIL = silibinin, SLB = silybin, RUT = rutine, GEN = genistein, NG = naringenin.

Flavonoid	Classification	Partition coefficient Log P	Reference
BAI	Flavone glucuroside	1.27	(Liang et al., 2009)
QUE	Flavonol	1.82 ± 0.32	(Rothwell et al., 2005)
BCL	Flavones	1.07	(Fan et al., 2017)
SIL	Flavanone	2.63	Calculated, drugbank.ca
SLB	Flavanone	1.999 ± 0.023	(Kosina et al., 2018)
RUT	Flavonol diglycosid	-0.64 ± 0.05	(Rothwell et al., 2005)
GEN	Isoflavone	3.04 ± 0.02	(Rothwell et al., 2005)
NG	Flavanone	2.60 ± 0.03	(Rothwell et al., 2005)

Depending on their structure, flavonoids are sensitive to light exposure, pH, temperature, type of solvent (Jackman et al., 1987). For example, fisetin, quercetin (QUE), genistein (GEN) and myricetin are degraded in aqueous buffer at elevated temperature and at different rates depending on the pH (Yao et al., 2014; Wang and Zhao, 2016; Chaaban et al., 2017); QUE and fisetin, are fastly oxidized and degradated in water (Sokolová et al., 2012; Ramešová et al., 2015); flavonols are sensitive to light exposure, and the photodegradation is accelerated in the presence of aluminum ions (Smith et al., 2000).

Flavonoids are also subject to a rapid metabolism into the intestine by hydrolysis of the glucuroside, conjugation and deconjugation of the aglycone skeleton, in addition with efflux transporters for conjugated metabolites (Chen et al., 2003). There is also a first pass metabolism by the liver as they are conjugated by glucuronidation, sulfation, or methylation or metabolized to smaller phenolic compounds. Aglycon of flavones and flavanols are also degraded by a peroxidative mechanism and the resulting compounds can undergo further degradations by ring-fission reactions catalyzed by dioxygenase (Hinderer and Seitz, 1988).

The poor water solubility of flavonoids is a major drawback for their administration. It is, combined with their poor absorption, their sensitive to degradation and their rapid metabolism are the main factors for their poor oral bioavailability (Hinderer and Seitz, 1988; Chen et al., 2003; Crozier et al., 2010).

To overcome these limitations, the use of nanocarriers could be a good alternative. Indeed, co-encapsulation of the flavonoids could increase their apparent solubility and allow their systemic administration. The oral bioavailability could also be improved by the protection against metabolism of the flavonoids by the formulation. That's why the delivery of flavonoids using nanocarriers has been

widely explored, and had led to an increase of their bioavailability and efficacy (Khushnud and Mousa, 2013; Mignet et al., 2013; Aiello et al., 2019) (Figure 43).

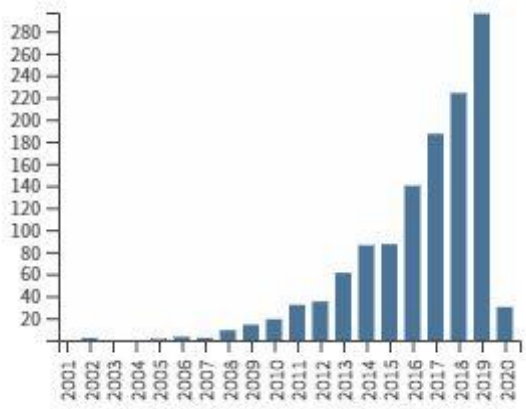


Figure 43. Total publications per year concerning flavonoids nanocarriers (web of science).

1.3. Co-encapsulation of flavonoids with anti-cancer agents

It is common practice to administrate a combination of anti-cancer agents to overcome cross-resistance and achieve synergistically enhanced therapeutic effect, as well as to prevent toxicity effects (Bayat Mokhtari et al., 2017). The synergistic effect of two drugs highly depends on the ratio of the dosage of the two drugs. However, the difference in pharmacokinetics and biodistribution of the two drugs could prevent their synergistic effect. Nanocarriers encapsulating multiple drugs with different physico-chemical and pharmaceutical properties could maintain the optimized synergistic drug ratio in a single carrier *in vivo* to the point of intra-cellular uptake into the target cancer cell (Mayer et al., 2006; Tardi et al., 2007, 2009; Gurunathan et al., 2018). A liposomal formulation (DSPC/DSPG/cholesterol (7:2:1 molar ratio)) encapsulating both cytarabin and daunorubicin at ratio 5:1 (CPX-351) against acute myeloid leukemia was recently approved by the FDA and the EMA (Tardi et al., 2009; Alfayez et al., 2020).

As described before, flavonoids have exerted interesting anti-cancer effects as well as reversal of anti-cancer drug resistance, or activity towards mechanisms involved in tumor invasion or development. The co-encapsulation of a flavonoid with an anti-cancer drug could lead to a synergistic or additive effect at the tumor site and delay the apparition of drug resistance by combining agents with different mechanisms of action. The use of nanocarriers could also target passively the tumor site using the enhanced permeability and retention (EPR) effect, leading to the accumulation of the drugs

into the tumor site and the decrease of toxicity, as well as the potential inhibition of drug resistance mediated by intracellular endocytic uptake (Choi et al., 2016).

This review aims to analyses how co-encapsulate flavonoids with anticancer agents. We first discuss the formulation strategy and the challenge of their optimization, then we will report how to predict their *in vitro* behavior and finally we will discuss their efficacy *in vivo.*

2. Formulation considerations

2.1. Choice of nanocarrier

Co-encapsulating flavonoid with another anti-cancer agents is challenging. Indeed, adding another drug into the system can create instability. The different nanocarriers developed to encapsulate flavonoids with another anti-cancer drug with their compositions and preparation methods are reported in Table 36 and their method of characterization in Table 37. The choice of the nanocarriers is important and is function of the drugs co-encapsulated and the target, considering each of them present advantages and drawbacks.

Polymeric micelles, spherical nanostructures formed by amphiphilic molecules able to encapsulate lipophilic drugs into their hydrophobic internal core surrounded by the hydrophilic parts enabling their suspension in aqueous medium, can release their load depending on specific stimulations. As they are formed by the self-assembly of block copolymers held together by non-covalent interactions (Savić et al., 2006), the copolymer can be designed to respond to specific stimuli: pH (Gao et al., 2017), temperature (Lee et al., 2015), redox mechanism (Zhou et al., 2017).

Solid-lipid nanoparticles are another type of nanocarriers able to only encapsulate hydrophobic drugs; they are submicron-sized lipid emulsions where the liquid lipid (oil) has been substituted by a solid lipid. They can only encapsulate lipophilic drugs; to overcome this, hydrophilic drugs can be conjugated to or complexed with the lipids (Mukherjee et al., 2009).

Nanoemulsions present the same drawback: oil-in-water nanoemulsion have been proven very effective in delivering lipophilic drug and increase the *in vivo* efficacy of anti-cancer agent (Tagne et al., 2008) or improve the bioavalaibility of flavonoids (Wu et al., 2018), but they encapsulate only drugs with same lipophilicity. To overcome this limitation, Pangeni *et al* designed water-in-oil-in-water nanoemulsion encapsulating both hydrophilic, amphiphilic and lipophilic compounds (Pangeni et al., 2016, 2018a).

Liposomes, lipid-polymer hybrid nanoparticles, polymeric nanoparticles and mesoporous silica nanoparticles are all able to encapsulate both hydrophobic and hydrophilic drugs using different properties.

Liposomes are spherical vesicles consisting of phospholipids associated to other lipids such as cholesterol which rigidifies the lipid bilayer and stabilizes it. Their amphiphilic properties enable them to self-assemble themselves and form bilayers. They are able to encapsulate hydrophobic drugs into their lipid bilayer and hydrophilic drugs into their aqueous core, and amphiphilic drugs at the interface (Hu et al., 2010; Cosco et al., 2011). Moreover, their properties can be altered by modifying their formulation by addition of functional groups, other lipids or polymers (Akbarzadeh et al., 2013).

Polymeric nanoparticles are formed by amphiphilic copolymer self-assembling in water into nanoparticles. They usually present better stability, sharper size distribution and more controlled drug-release profile than liposomes (Hu et al., 2010). They usually encapsulate hydrophobic drugs but are able to encapsulate hydrophilic drugs through conjugation to the polymer or attachment to the surface of the nanoparticle (Pan et al., 2019).

Lipid-polymer hybrid nanoparticles are multifunctional drug delivery platform, which combines mechanical advantages of polymeric core able to encapsulate lipophilic drugs and biomimetic advantages of the phospholipid shell into a single platform (Hadinoto et al., 2013).

Mesoporous silica nanoparticles are inorganic nanoparticles than can be functionalized. Their highly controlled porous structure and their functionalization enable them to encapsulate both hydrophobic and hydrophilic drugs (Narayan et al., 2018).

Table 36. Types, formulation, preparation method and targets of nanocarriers co-encapsulating a flavonoid with an anti-cancer agent.

ASP = aspirin, BAI = baicalin, BCL = baicalein, CUR = curcumin, DCK = N^{α}-deoxycholyl-L-lysyl-methylester, DL = Drug loading, DOX = doxorubicin base, DOX-HCL = doxorubicin hydrochloride, DSPE-PEG2000 = 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-2000], DTX = docetaxel, EE = encapsulation efficiency, EGCG = (-)-Epigallocatechin gallate, *ETO = etoposide, FLA = flavonoids, GCA = glycyrrhizic acid, GEN = genistein, NG = naringenin, NSCLC = non-small cell lung cancer, PEG = polyethylene glycol, PMX = pemetrexed, PTX = paclitaxel, QbD = quality by design, QUE = quercetin, SIL = silibinin, SLB = silybin,, SNEDDS = self-nano-emulsifying drug dlivery systems, TMX = tamoxifen, Tf-PEG-hz-GMS = transferrin-polyethylene glycol-hydrazone-lyceryl monostearate, TMZ = temozolomide, TPT = topotecan, VIN = vincristine.*

Flavonoid	Co-encapsulated drug	Flavonoids/drug encapsulation DL or EE (%)	Optimal wt ratio FLA/drug	Nanocarrier composition	Preparation method	Purification method	Formulation or optimisation process	Administration route	Cancer	References
Micelles										
BAI	CUR	DL BAI : 3.50 ± 0.34 CUR : 7.46 ± 1.70	3.5:7.5*	quercetin dithiodipropionic acid oligomeric hyaluronic acid mannose ferulic acid polymer	Solvent-exchange	Centrifugation		Parenteral	NSCLC	(Wang et al., 2019)
QUE	DOX	Active loading capacity QUE: ~18 DOX: ~24	1:5	Poly(phenylalanine)-b-poly(L-histidine)-b-poly(ethylene glycol	Solvent-exchange	Ultrafiltration		Parenteral	Squamous cell carcinomas	(Ramasamy et al., 2017)
SIL	DTX	DL SIL: 4.1 ± 0.2 DTX: 2.8 ± 0.3	6:4*	polyethylene glycol-blockpoly[(1,4-butanediol)-diacrylate-β-N,N-diisopropylethylenediamine]	Thin-film hydration	Dialysis		Parenteral	Metastatic breast cancer	(Dong et al., 2017)
Nanoemulsions										
BCL	PTX	EE BCL: 97.9 PTX: 97.1	1:1	Oil phase : Soybean oil and medium chaintriglycerides Aqueous phase : Soybean lecithin, poloxamer 188, glycerol	High pressure homogenization	Ultracentrifugation	Preparation of complex: BCL-PL and PTX-cholesterol	Parenteral	Breast cancer	(Meng et al., 2016)
QUE	PMX	Non specified	2:1	Surfactant : Labrasol, Tween 80, Oil phase:Labrafil M 1944 CS Cremophor EL:PEG 400 Deionized water	Low-energy spontaneous emulsification		Complexation of PMX with DCK Screening of surfactants and co-surfactants Wt ratio of surfactants Concentration of drugs	Oral	Lung carcinoma	(Pangeni et al., 2018b)
NG	TMX	Non specified	Non specified	corn oil-lipid, labrasol and transcutol P	Mixing (SNEDDS)		Pseudo ternary diagram QbD based model	Oral	Breast cancer	(Sandhu et al., 2017)
Solid lipid nanoparticles										
BAI	DTX	DL BAI: 4.9 ± 0.6 DTX: 8.3 ± 0.6	37:63*	Soya lecithin, glyceryl monostearate Tf-PEG-hz-GMS, poloxamer 188	Emulsification	Centrifugation + filtration		Parenteral	Lung cancer	(Li et al., 2017)
Liposomes										
QUE	TMZ	DL QUE: 23.42 ± 2.17 TMZ: 15.87 ± 1.96	6:4*	Tween 80, poloxamer 188, DSPE-PEG2000 Glyceyl behenate, soy lecithin, cholesterol	Emulsification-evaporation and low temperature curing	Dialysis		Parenteral	Glioma	(Hu et al., 2016)
QUE	VIN	EE* QUE: 78.5 VIN: 78.3	1:2	Egg sphingomyelin, sholesterol,, ceramide-PEG2000	Thin-film hydration	Size-exclusion chromatography	Optimization of the cholesterol ratio	Parenteral	Trastuzumab-insensitive breast tumor	(Wong and Chiu, 2011, 2010)

SIL	GCA	EE SIL: 24.37 GCA: 68.78		DPPC, cholesterol, PEG2000-DSPE	Loading of VIN with ionophore-mediated proton gradient Thin-film hydration	Dialysis		Non specified	Hepatocellular carcinoma	(Ochi et al., 2016)
SLB	DOX-HCL	EE SLB: 93.07 ± 3.07 DOX-HCL: 95.74 ± 9.09	3:1	DSPE-PEG-cholic acid, cholesterol, phospholipids	Ethanolic injection Loading of DOX-HCL with ammonium sulfate gradient	Ultrafiltration		Oral	Hepatocellular carcinoma	(Li et al., 2018)
Lipid-polymer hybrid nanoparticles										
QUE	VIN	LE QUE: 5.1 ± 0.9 VIN: 12.3 ± 2.5	1:1	Poly (lactic-co-glycolic acid), cholesterol, stearic acid, DSPE-PEG2000	Nanoprecipitation	Ultrafiltration		Parenteral	Non-Hodgkin's lymphoma	(Zhu et al., 2017)
GEN	PTX	EE GEN: 97.99 ± 2.90 PTX: 97.80 ± 2.21	12:0.2	Poly(lactic-co-glycolic acid) + Capric/caprylic triglyceride Pluronic F68 and F127 Phosphatidylcholine	Emulsification-evaporation Thin-film hydration	Filtration		Parenteral	Ehrlich Ascites Tumor	(Mendes et al., 2014)
Polymeric nanoparticles										
QUE QUE QUE	CUR ASP CUR + ASP	Similar entrapment QUE: 6.2 CUR: 1.5 ASP: 6.5	4.4:1:4.6*	Chitosan- sodium hexametaphosphate	Nanoprecipitation	Dialysis			Colorectal cancer	(Ray et al., 2017)
QUE	TMX	EE QUE: 68.60±1.58 TMX: 67.16±1.24	2:1	Poly (lactic-co-glycolic acid)	Emulsificaton-evaporation	Centrifugation	pH, type and concentration of PLGA, type and concentration of stabilizers, drugs loading ratio	Oral	Estrogen receptor positive breast cancer	(Jain et al., 2013)
QUE	DOX	DL QUE: 7.9 DOX: 3.6	6.9:3.1	Biotin-decorated poly(ethylene glycol)-b-poly(ε-caprolactone)	Thin-film hydration	Centrifugation		Parenteral	Breast cancer	(Lv et al., 2016)
BCL	PTX	EE BCL: 87.6 ± 3.1 PTX: 90.8 ± 2.9	5:1	Folate-valine-PTX Hyaluronic acid-lysine-BCL Poly(lactic-co-glycolic acid), poloxamer 188	Nanoprecipitation	Filtration		Parenteral	Lung cancer	(Wang et al., 2015)
QUE	ETO	EE QUE: non specified ETO: 62.46 ± 1.22	1:10	Poly(lactic-co-glycolic acid), poly-vinyl alcohol	Emulsification solvent evaporation	Centrifugation	O/W phase ratio polymers concentration Sonication time Drug:polymer ratio ETO:QUE ratio	Oral	Breast cancer	(Fatma et al., 2016)
EGCG	PTX	EE EGCG: 76.8 ± 9.1 PTX: 95.7 ± 7.3		Poly (lactic-co-glycolic acid) casein	Emulsion-precipitation	Centrifugation	Polymer/PTX ratio Casein/EGCG ratio	Parenteral	Breast tumor	(Narayanan et al., 2014)
Mesoporous silica nanoparticles										
QUE	DOX	Maximal DL QUE: 29.7 DOX: 32.6	1:1	Hyaluronic acid-silica	Nanoprecipitation	Centrifugation		Parenteral	Gastric carcinoma	(Fang et al., 2018)

QUE	TPT	DL QUE: 1,2 TPT: 1,8	4:6*	Silica, arginine-glycine-aspartic acid peptide, poly(acrylic) acid-chitosan	Nanoprecipitation	Centrifugation		Breast cancer (triple negative and MDR)	(Murugan et al., 2016)

- *Calculated using the drug loading reported

Table 37. Characteristics and characterization methods of nanocarriers co-encapsulating a flavonoid with an anti-cancer agent.

ASP = aspirin, BAI = baicalin, BCL = baicalein, CUR = curcumin, DOX = doxorubicin base, DOX-HCL = doxorubicin hydrochloride, DTX = docetaxel, EGCG = (-)-epigallocatechin gallate, *ETO = etoposide, GCA = glycyrrhizic acid, GEN = genistein, HPLC = high performance liquid chromatography, NG = naringenin, PMX = pemetrexed, PTX = paclitaxel, QUE = quercetin, SEM = scanning electron microscopy, SGF = simulated gastric fluid, SIF = simulated intestinal fluid, SIL = silibinin, SLB = silybin, TEM = transmission electron microscopy, TMX = tamoxifen, TMZ = temozolomide, TPT = topotecan, VIN = vincristine.*

Flavonoid / co-encapsulated drug	Minimal requirements					Additional characterization methods	References
	Size (nm)	PDI	Morphology	Zeta potential (mV)	Assay of flavonoid (direct or indirect)		
Micelles							
BAI/CUR	121.0 ± 15	0.129	Spherical (TEM)	-20.33 ± 4.02	HPLC (UV detection) (Direct method)	Proton nuclear magnetic resonance	(Wang et al., 2019)
QUE/DOX	82.0 ± 3.4		Spherical (TEM, AFM)	-20	HPLC (UV detection) (Indirect method)	Proton nuclear magnetic resonance Gel permeation chromatography Critical micellar concentration X-ray diffractometry Fourier transform infrared spectroscopy	(Ramasamy et al., 2017)
SIL/DTX	85.3 ± 0.4	0.190 ± 0.1	Spherical (TEM)		HPLC (UV detection) (not precised)	Proton nuclear magnetic resonance u Matrix-assisted laser desorption-ionization – time of flight mass spectrometry Nile red assay	(Dong et al., 2017)
Nanoemulsions							
BCL/PTX	170.5 ± 6.5	0.113 ± 0.005	Spherical (TEM)	-42.4 ± 3.7	HPLC (indirect method)		(Meng et al., 2016)
QUE/PMX	13.2 ± 0.132)	0.095 ± 0.015	Spherical (TEM)	−3.99 ± 1.11	Non specified		(Pangeni et al., 2018b)
NG/TMX	52 – 73		Spherical (TEM)		Non specified	Self-emulsification time	(Sandhu et al., 2017)
Solid lipid nanoparticles							
BAI/DTX	135.5 ± 4.7	0.16 ± 0.05	Spherical (TEM)	-31.6 ± 3.5	HPLC (UV detection)	Proton nuclear magnetic resonance Colloidal stability	(Li et al., 2017)
Liposomes							
QUE/TMZ	196.5 ± 47.3	0.32 ± 0.09 (DLS)	Spherical (TEM)	30.5 ± 6.9	HPLC (UV detection) (direct method and indirect)	UV-Vis spectra Fourier transform infrared spectroscopy	(Hu et al., 2016)
QUE/VIN	135.9 ± 12.	0.161 ± 0.032 (DLS)			UV-vis (direct method)		(Wong and Chiu, 2011, 2010)
SIL/GCA	46.3 ± 0.4		Spherical (SEM, TEM)	-23.25 ± 0.83	HPLC (UV detection) (direct method)	Fourier transform infrared spectroscopy	(Ochi et al., 2016)
SLB/DOX-HCL	97.03 ± 2.17	0.239 ± 0.026 (DLS)	Spherical (TEM)		HPLC (UV detection) (direct method)	Stability in SGF and SIF (12 hours) Colloidal stability in plasma	(Li et al., 2018)
Lipid-polymer hybrid nanoparticles							
QUE/VIN	115.7 ± 5.5	0.22 ± 0.05	Spherical (TEM)	-36.4 ± 3.5	HPLC (VIN) UV-vis (QUE) (direct method)	Colloidal stability	(Zhu et al., 2017)
GEN/PTX	151.53 ± 5.64	0.17 ± 0.03	Spherical (TEM)		HPLC (UC detection) (direct method)	Nanoparticles tracking analysis Multiple light scattering	(Mendes et al., 2014)

Polymeric nanoparticles							
QUE/CUR	118 ± 5.6				UV-vis		(Ray et al., 2017)
QUE/ASP	128 ± 0.9				(direct method)		
QUE/CUR/ASP	92 ± 0.7	0.12					
QUE/TMX	185.3 ± 1.20	0.184 ± 0.004			HPLC (UV detection)	Stability in SGF and in SIF	(Jain et al., 2013)
					(direct method)	X-ray diffractometry	
						Differential scanning calorimetry	
QUE/DOX	105.8 ± 1.4	0.168 ± 0.023	Spherical (TEM)	-9.56 ± 1.80	HPLC (UV detection)		(Lv et al., 2016)
					(Direct method)		
BCL/PTX	91.8 ± 2.3	0.1 ± 0.03	Spherical (TEM)	+3.3 ± 0.6	HPLC (UV detection)	Proton nuclear magnetic resonance	(Wang et al., 2015)
					(not specified)	Fourier transform infrared spectroscopy	
QUE/ETO	254.3	0.11	Spherical (TEM, SEM)		HPLC (UV detection)		(Fatma et al., 2016)
					(direct method)		
EGCG/PTX	230 ± 27	0.18 (SEM)	Spherical (SEM, TEM)	-41 ± 3.4	HPLC (UV detection)	Fourier transform infrared spectroscopy	(Narayanan et al., 2014)
	190 ± 12 (TEM)				(not specified)	Raman in confocal microscopy	
						BCA protein estimation assay	
						Degradation of casein	
						Colloidal stability	
Mesoporous silica nanoparticles							
QUE/DOX	101.6 ± 3.21	0.123 ± 0.06	Spherical (TEM)	−28.56 ± 2.31	UV-vis	Fourier transform infrared spectroscopy	(Fang et al., 2018)
					(indirect method)	Colloidal stability	
QUE/TPT	72.9	0.03	Spherical (SEM,TEM)	+42.80	UV-vis	Thermogravimetric analysis	(Murugan et al., 2016)
					(indirect method)	Nitrogen adsorption/desorption isotherm	
						Fourier transform infrared spectroscopy	

2.2. Optimization of the formulation and the process of preparation

Once the drugs and the carriers are chosen, several investigations must be conducted to optimize the formulation and the process. Excipients and process are usually chosen taking into account these critical parameters: size and polydispersity (PDI) and loading of the drugs into the nanocarriers.

After preparation, a purification step is necessary to remove the non-encapsulated drugs from the nanocarrier suspension. As the flavonoids are mostly hydrophobic, the choice of the purification method will depend on it. For example, hydrophobic flavonoids are located inside the lipid bilayer, near to the interface water/lipids (Mohapatra and Mishra, 2011; Mignet et al., 2013) and can leak from the liposomes when aggressive methods are used like ultrafiltration or centrifugation, whereas when flavonoids are covalently bound or inside a nanoparticle, they are less prone to leakage with those methods. One can also wonder about the use of centrifugation or ultrafiltration to purify nanocarriers from non-encapsulated hydrophobic drugs. If micelles are found in the supernatant, usually polymeric nanoparticles aren't and the non-encapsulated hydrophobic drugs would precipitate with them and not be separated. Most of the studies report several washing step of the nanoparticles. However, the washing medium was water (Fatma et al., 2016; Murugan et al., 2016; Zhu et al., 2017) or not defined (Jain et al., 2013; Narayanan et al., 2014; Li et al., 2018). Globally, it is regretful that the influence and the validation of the purification step was never reported.

Drug loading is evaluated after purification. As discussed in section 1.2, flavonoids are reactive and could be degraded during some preparation steps, depending on the pH or the temperature used (Gaber et al., 2017). An analytical method able to monitor the apparition of impurities, such as high performance liquid chromatography (HPLC) is highly recommended (Tsao, 2010; Corradini et al., 2011). Flavonoids are easily detected by UV. Indeed, due to their polyphenolic structure, most flavonoids present two absorption bands in the UV spectrum: band I between 320 and 385 nm and band II between 250 and 285 nm and are easily detected. It is to note that their maximum absorption wavelengths differ as a function of the functional groups attached to the skeleton (Kumar and Pandey, 2013). As seen in Table 37, most of the studies used reverse phase HPLC coupled to a UV detector to assay the drugs. However, some used an indirect method to estimate the loading of the drugs. The direct method, assaying the flavonoids remaining into the nanocarriers, must be preferred to the indirect method that could overestimate the loading if some degradation occurred during the process.

Few studies reported the impact of co-encapsulation in term of drug loading or size, and gave results on optimization of the nanocarriers taking into account the co-encapsulation.

Co-encapsulating flavonoids with another drug can have an impact of the loading of the two drugs. Indeed, the two drugs might be in competition in the site of incorporation, or one of them can destabilize the structure needed for the other.

All nanocarriers were used to successfully co-encapsulate lipophilic drugs, and some studies reports formulation or process optimization.

Jain *et al* compared the impact of the initial tamoxifen (TMX):QUE ratio (1:1, 1:2 and 1:3) introduced for the preparation of co-loaded polymeric nanoparticles. There was no impact of increasing QUE introduced into the preparation in term of size, PDI and TMX loading, but the QUE loading decreased significantly when the ratio TMX:QUE was 1:3 (from 4.10 ± 0.03 to 2.95 ± 0.23%), indicating that the best entrapment was obtained for an initial TMX:QUE ratio of 1:2 (Jain et al., 2013). Pangeni *et al* claim to have optimized the concentrations of pemetrexed (PMX) complexed with N^{α}-deoxycholyl-L-lysyl-methylester (DCK) (PMX/DCK) and QUE introduced in the water-in-oil-in-water nanoemulsion by determining the maximum drug loading capacity with the minimum concentration of surfactants and co-surfactants introduced able to produce transparent nanoemulsion (Pangeni et al., 2018b). However, it is to note that those investigations are not detailed and the loading of PMX/DCK and QUE not reported. Fatma *et al* optimized the co-encapsulation of etoposide (ETO) and QUE into nanoparticles by evaluating the drug-polymer ratio and the partition of the drug into the organic phase but the datas are not reported (Fatma et al., 2016). These two studies report detailed results on the choice and proportions of the surfactant and cosurfactant to obtain the best nanoemulsion (Pangeni et al., 2018b) or on the influence of the excipients for the encapsulation of one drug (Fatma et al., 2016), but fail to detail the co-encapsulation to the point where the loading of the two drugs into the co-encapsulating system is not even reported.

Some other team co-encapsulating flavonoids with another lipophilic drug checked that the encapsulation of each drug was the same when they were either encapsulated alone or co-encapsulated into the nanocarriers; However, the path to the optimized formulation was never reported (Mendes et al., 2014; Wang et al., 2015; Lv et al., 2016; Meng et al., 2016; Hu et al., 2016; Li et al., 2017).

The difficulty increases if the co-encapsulated drug presents different physicochemical characteristics than the flavonoid, as the nanocarriers optimized to incorporate and stabilize the flavonoid might not be the optimal one for the other drug. A compromise might be necessary and the effect of the co-encapsulation must be explored.

For example, micelles can only encapsulate lipophilic drugs. To be able to co-encapsulate, Ramasamy *et al* had to convert doxorubicin hydrochloride (DOX-HCL) into doxorubicin base (DOX) in order to

incorporate it into the micelles. In liposomes, flavonoids are inserted into the lipid bilayer, next to the polar head (Mignet et al., 2013), and hence can destabilize the bilayer. It is important to study the interaction of flavonoids with the lipid bilayer and characterized the influence of their incorporation. Wong *et al* optimized the best ratio of cholesterol into the bilayer to co-encapsulate QUE and vincristine (VIN) by determining the encapsulation of each drug as a function of the molar ratio of cholesterol. To prevent destabilization, Murugan *et al* formulated pH-responsive mesoporous silica nanoparticles loaded with hydrophilic topotecan (TPT) via electrostatic interaction into the pore; to stabilize QUE, co-loaded with TPT, they conjugated it to the pH-responsive polymer coating the nanoparticles (Murugan et al., 2016). They confirmed the encapsulation of TPT by thermogravimetric analysis and analysis of the pores by desorption curves, and the conjugation of QUE by and Fourier Transform InfraRed spectroscopy (FTIR). Narayanan *et al* designed poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA)–casein polymer–protein hybrid nanocarrier co-encapsulating (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) and paclitaxel (PTX) able temporally regulate drug release. PTX was trapped into the polymeric core while EGCG was retained by the protein shell. They optimized the PTX:PLGA:EGCG:casein ratio, and confirmed that precipitating casein around the PTX-loaded PLGA nanoparticles did not affect PTX entrapment (Narayanan et al., 2014).

However, other teams encapsulated both hydrophobic flavonoid with and hydrophilic drug by using the different compartments of the nanoparticle without further investigations detailed. Unstability potentially caused by the co-encapsulation was not reported, not during the process of preparation and neither during the storage. Li *et al* designed liposomes co-encapsulating the hydrophobic silybin (SLB) into the lipid bilayer and the hydrophilic DOX-HCL into the aqueous core at optimized ratio 3:1 (Li et al., 2018) but did not investigate further. Similarly, Zhu *et al* encapsulated both QUE and VIN into lipid-polymeric nanocarriers composed of PLGA, cholesterol, stearic acid and DSPE-PEG2000 (Zhu et al., 2017) but did not report any formulation optimization. Ray *et al* formulated spherical cross-linked chitosan-sodium hexametaphosphate nanoparticles encapsulating three drugs: QUE, curcumin (CUR) and aspirin (ASP). They also prepared two-drug loaded nanoparticles (Ray et al., 2017): no optimization or preliminary assays were reported.

Co-encapsulating two agents into one nanocarrier can sometimes increase its diameter. Ramasamy *et al* reported an increase of the co-loaded micelles' size compared to blank micelles identified by transmission electron microscopy (TEM) (Ramasamy et al., 2017) and Hu *et al* evidenced an increase in hydrodynamic diameter and PDI of the liposomes co-encapsulating QUE and temozolomide (TMZ) (Hu et al., 2016). Moreover, Narayanan *et al* identified by dynamic light scattering (DLS) and TEM an increase in size with the casein shell formation around the PLGA nanoparticles as well as with the loading of the drugs, from 168 ± 18 nm to 230 ± 27 nm (Narayanan et al., 2014). On the contrary, other

studies showed no impact of the co-encapsulation on the hydrodynamic diameter of the nanocarrier compared to blank nanocarrier (Li et al., 2017; Zhu et al., 2017; Pangeni et al., 2018b) or single-loaded nanocarrier (Wang et al., 2015; Lv et al., 2016; Li et al., 2017; Zhu et al., 2017). Mendes *et al* encapsulated GEN by coating the PTX-PLGA-nanoparticles with a lipid bilayer incorporating GEN, leading to an increase in the size of the lipid-polymer hybrid nanoparticles (Mendes et al., 2014). Moreover, some formulation optimization can lead to a better entrapment of the drug but also to an increase of size. For example, Jain *et al* showed that even if the use of PVA 1% as a surfactant increased the entrapment efficiency, the size was higher than 200 nm and the PDI unacceptable (Jain et al., 2013). The size of the nanocarriers is of high importance as its influence their *in vivo* behavior. Their pharmacokinetics can be modified by diameter under 5 nm, where nanocarriers will be excreted by renal excretion (Choi et al., 2007), or by diameter above 100 nm where they will recognized by the mononuclear phagocytic system (Moghimi et al., 2001). Their internalization into the cells (endocytosis) and their accumulation into the tumor *via* the EPR effect are also affected. The ideal diameter of a nanocarriers should be inferior to 200 nm (Peer et al., 2007). Many method to measure the size of the nanocarriers are avalaible: indirect methods such as light scattering (LS) or tunable resistive pulse sensing, and direct method such as electron microscopy (TEM or scanning electron microscopy (SEM)), field flow fractionation and capillary electrophoresis. A combination of several methods, one of which is a microscopical one to assess the morphology, is highly recommended (Gaumet et al., 2008). Most of the studies presented here assessed the size and polydispersity using DLS and TEM or SEM, and presented spherical particles with diameter under 200 nm.

From Table 37, we can observed that the minimal characterization of the nanocarriers are the same for co-encapsulation or single encapsulation: size, distribution, morphology and loading. Further characterization have been sometimes performed to better characterize the system, but are not specific to the co-encapsulation. When the formulation strategy included the synthesis of polymers or of prodrugs, the characterization of the synthetized molecule was always performed. For example, Wang *et al* synthetized prodrugs by conjugating baicalein (BCL) and PTX to polymers to form folate-valine-PTX and hyaluronic acid-lysine-BCL able to self-assemble into nanoparticles; structure of the prodrugs were confirmed by proton nuclear magnetic resonance and FTIR. Some characterizations might be interesting to apprehend the capacity of the system to co-encapsulated efficiently the two drugs. For instance, permeation study of the lipid bilayer after incorporation of the flavonoid into the liposome could be performed to assess if it can lead to the leakage of the hydrophilic drug (Mingeot-Leclercq et al., 2001; Bensikaddour et al., 2008).

2.3. Stability of the co-encapsulating nanocarriers

As discussed before, co-encapsulating a flavonoid with another anti-cancer agent can imply encapsulating two drugs with potential different physico-chemical properties. Thus, a compromise in the formulation might have to be chosen, leading to an optimal formulation for both drugs, but not necessary the best for the single-encapsulation of each drug. This can lead to an unstability as a function of time of the formulation, and its storage stability must be studied in term of conservation of size, polydispersity and drug encapsulation. Few studies reports the shelf-stability of their formulations. The results are reported in Table 38. The optimized formulations showed good size stability, but no information was given about the drug leakage. The nanoemulsion co-encapsulating BCL and PTX (Meng et al., 2016) or QUE and PMX (Pangeni et al., 2018b) showed a good stability over time with less than 1% drug leakage in 6 months at 4°C for BCL/PTX nanoemulsions and less than 3% of drug leakage after 3 months at 25°C for QUE/PMX nanoemulsions. However, co-loading liposomes with SIL and glycyrrhizic acid (GCA) into liposomes did not lead to a stable formulation, as 22% of SIL and 61% of GCA leaked from the liposomes after 3 months of storage at 4°C (Ochi et al., 2016). Co-encapsulating QUE and TMX in polymeric nanoparticles was reported stable in term of encapsulation only with a step of freeze-drying (Jain et al., 2013).

Table 38. Storage stability of nanocarriers co-encapsulating a flavonoid with another anti-cancer agent.

BCL = baicalein, DOX = doxorubicin base, GCA = glycyrrhizic acid, PMX = pemetrexed, PTX = paclitaxel, QUE = quercetin, SIL = silibinin, TMX = tamoxifen, VIN = vincristine.

Flavonoid / co-encapsulated drug	Type of nanocarrier	Storage stability			References
		Conditions	Size (nm) (PDI)	Drug leakage (%)	
QUE/DOX	Micelles	1 month, 4°C PBS pH 7.4 Serum media	 Stable Stable	 - -	(Ramasamy et al., 2017)
BCL/PTX	Nanoemulsion	6 months; 4°C	169.5 ± 6.0 (0.115 ± 0.001)	BCL < 1% PTX < 1%	(Meng et al., 2016)
QUE/PMX	Nanoemulsion	3 months 25 ± 2°C (60 ± 5% relative humidity)	Stable	<3% release	(Pangeni et al., 2018b)
QUE/VIN	Liposomes	180 days, 4°C	Stable	-	(Wong and Chiu, 2011, 2010)
SIL/GCA	Liposomes	3 months, 4°C	58.2 ± 3.8	Release SIL: 22%* GCA: 61%*	(Ochi et al., 2016)
QUE/TMX	Polymeric nanoparticles	5±2°C RH 55 ± 2% 3 months lyophilized	Stable	Stable	(Jain et al., 2013)

3. *In vitro* prediction of the behavior of the co-encapsulating nanocarrier

The aim of co-encapsulating flavonoids with another anti-cancer agent is to bring the two drugs at a synergistic ratio at the site of action. The use of a nanocarrier could translate the synergistic effect observed *in vitro* to a preclinical model by maintaining the fixed drug ratio (Harasym et al., 2007). Thus, we can hypothesized that the determination of the CI combined with *in vitro* release experiments could predict the *in vivo* efficacy of the formulation.

To formulate the best nanomedicine, some *in vitro* experiments can be performed to evaluate the behavior of the co-loaded nanocarriers: colloidal stability, *in vitro* release and calculation of the combination index evaluating the synergism. Those assays could permit to approach the *in vivo* behavior by combining the identification of the best ratio and verification of a similar release for both drug to always maintain the ratio.

3.1. Colloidal stability

Colloidal stability of the nanocarriers could be evaluated in plasma for a parenteral administration or in simulated intestinal fluid (SIF) and gastric fluid (SGF) in case of an oral route.

To predict its stability in plasma, only the size was usually studied using 10% fetal bovine serum (FBS) in phosphate buffer saline (PBS) (Li et al., 2017; Zhu et al., 2017) or 20% serum (Fang et al., 2018; Li et al., 2018) at 37°C. Sometimes, the encapsulation of the drugs were also monitored and showed a good retention of the encapsulated drugs. Narayanan *et al* suspended EGCG and PTX co-loaded nanoparticles in PBS buffer (pH 7.4) with or without 20% serum, and evidenced an increase of the particle size in the presence of serum, which could be due to the adsorption of serum proteins to the particle surface (Narayanan et al., 2014).

SGF and SIF are mimicking medium containing enzymes and tensioactives with a determined pH, 1.2 for SGF and 6.8 for SIF. In SGF and SIF liposomes of SLB and DOX were able to retain at least 80% of the encapsulated drug and underwent no modification of size for 12 hours (Li et al., 2018); freeze-dried nanoparticles co-encapsulating TMX and QUE were stable in term of size, PDI and encapsulation 2 hours in SGF and 6 hours in SIF (Jain et al., 2013), predicting a good stability of the nanocarriers in the digestive tractus.

3.2. *In vitro* release

To investigate if the synergistic drug ratio was conserved during the release of the drugs from the nanocarriers, *in vitro* release experiments were performed for most formulations in different buffer with or without addition of serum. All *in vitro* release assays were performed using the dialysis method

at 37°C. Briefly, samples of the nanocarriers studied were transferred into dialysis bags which were immerged in different release medium. For all pH-sensitive or reduction-sensitive nanocarriers, the release in a medium adapted to study the effect of pH (Fang et al., 2018; Li et al., 2017; Murugan et al., 2016; Ramasamy et al., 2017; Ray et al., 2017) or the effect of the GHS concentration (reduction of a disulfide bond) (Wang et al., 2015) is mandatory.

Most of the release medium contained tensioactives to solubilize the lipophilic flavonoid and maintain sink conditions (Fang et al., 2018; Jain et al., 2013; Li et al., 2018; Lv et al., 2016; Mendes et al., 2014; Meng et al., 2016; Wang et al., 2015).

The Table 39 reports the conditions of the *in vitro* release assays performed and their results. The release of the drugs is presented at the percentage of the drugs present in the nanocarriers at the beginning of the experiment. Thus, the ratio could be considered as maintain when the release curves of each drug were superposed.

Table 39. In vitro release profile of the nanocarriers co-encapsulating flavonoids with another anti-cancer agent.

ABS = acetate buffer saline, ASP = aspirin, BAI = baicalin, BCL = baicalein, CUR = curcumin, DOX = doxorubicin base, DOX-HCL = doxorubicin hydrochloride, DTX = docetaxel, EGCG = (-)-Epigallocatechin gallate, *ETO = etoposide, GCA = glycyrrhizic acid, GEN = genistein, GHS = gluthatione, HCl = hydrochloric acid, NG = naringenin, PBS = phosphate buffer saline, PMX = pemetrexed, PTX = paclitaxel, QUE = quercetin, SLB = silybin, SIL = silibinin, TMX = tamoxifen, TMZ = temozolomide, TPT = topotecan, VIN = vincristine.*

In vitro release study in aqueous buffer				
Flavonoid / co-encapsulated drug	Conditions	Release of flavonoid (%)/ release of other drug (%)	Ratio maintained	References
Micelles				
BAI/CUR	37°C PBS pH 7.4	Biphasic		(Wang et al., 2019)
	100 rpm 72 hours	0M GHS : ~30/~30	Yes	
	0.5% Tween 80	1 M GHS: ~50/~60	Yes	
	From 0 to 10 M GSH	10 M GHS: ~80/~70	Yes	
QUE/DOX	37°C	Biphasic		(Ramasamy et al., 2017)
	PBS pH 7.4			
	24 hours	~7/~40	No	
	72 hours	~10/~40	No	
	ABS pH 5.5			
	24 hours	~20/~68	No	
	72 hours	~25/~90	No	
SIL/DTX	37°C 48 hours	Biphasic		(Dong et al., 2017)
	PBS 0.1 M pH 7.4	21.4/23.2	Yes	
	Phosphate-citric acid buffered saline pH 5.5	79.7/82.3	Yes	
Nanoemulsions				
BCL/PTX	37°C PBS pH 7.4	Biphasic		(Meng et al., 2016)
	2 hours	~40/~40	Yes	
	24 hours	83.8/81.2	Yes	
	0.5% (w/v) Tween-80			
Solid lipid nanoparticles				
BAI/DTX	37°C PBS 100 rpm			(Li et al., 2017)
	pH 7.4			
	24 hours	~70/~70	Yes	
	48 hours	~85/~85	Yes	
	pH 5.0			
	24 hours	~85/~85	Yes	
	48 hours	~85/~85	Yes	

Liposomes				
QUE/VIN	37°C 0.9% w/w sodium chloride			(Wong and Chiu, 2011,
	72 hours		Yes	2010)
SIL/GCA	-37°C PBS pH 7.4 100 rpm			(Ochi et al., 2016)
	48 hours	~14/~88	No	
SLB/DOX-HCL	37°C 12 hours			(Li et al., 2018)
	3% v/v SDS			
	PBS pH 7.4	~50/~20	No	
	PBS pH 2.0	~20/~70	No	
Lipid-polymeric hybrid nanoparticles				
QUE/VIN	37°C PBS pH 7.4			(Zhu et al., 2017)
	100 rpm			
	6 days	~80-90/~80-90	Yes	
GEN/PTX	37°C 125 rpm			(Mendes et al., 2014)
	2% SLS	~80/~10		
	48 hours	~80/~70	No	
	60 days		No	
Polymeric nanoparticles				
QUE/CUR/ASP	37°C PBS 240h	Biphasic		(Ray et al., 2017)
	pH 7.4			
	24 hours	~20/~50/~60	No	
	7 days	~92/~85/~99		
	pH 6.5 24 hours	~25/~59/~66	No	
QUE/TMX	37°C PBS pH 7.4	Biphasic		(Jain et al., 2013)
	2.5 w/v Tween 80			
	24 hours	44.23/24.92	No	
	20 days	94.23/85.88		
QUE/DOX	37°C PBS pH 7.4 120 rpm	Biphasic		(Lv et al., 2016)
	0.5% Tween 80	Similar release		
	12 hours	~25/24.12	Yes	
	240 hours	~90/87.34	Yes	
QUE/ETO	37°C 100 rpm 0,1N HCl PBS pH 6.8			(Fatma et al., 2016)
	24 hours	65.8 ± 3.4/~58	No	
	48 hours	Not specified/65.6 ± 2.1	No	
EGCG/PTX	37°C PBS pH 7.4 50 rpm			(Narayanan et al., 2014)
	72 hours	~49/~26	No	
	10 days	~60/~28	No	
Mesoporous silica nanoparticles				
QUE/DOX	37°C PBS 100 rpm			(Fang et al., 2018)
	1% Tween 80			
	pH 7.4	~30/~30	Yes	
	pH 5.0	~80/~80	Yes	
QUE/TPT	37°C 48 hours			(Murugan et al., 2016)
	pH 7.4	12.03/8.7	Yes	
	pH 6.0	54.77/46.98	Yes	
	pH 5.0	80.72/76.24	Yes	
In vitro release study in buffer supplemented with serum				
Flavonoid / co-encapsulated drug	Conditions	Release of flavonoid (%)/ release of other drug (%)	Ratio maintained	References
Liposomes				
QUE/TMZ	37°C 10% human plasma (v/v) in PBS			(Hu et al., 2016)
	12 hours	~90/~75	No	
	24 hours	~90/~90		
Polymeric nanoparticles				
EGCG/PTX	37°C PBS pH 7.4			(Narayanan et al., 2014)
	20% serum			
	72 hours	~53/~25	No	

More than half of the formulations could keep the initial drug ratio. This could allow the synergistic ratio to be delivered to the tumor. However, very few teams studied the release in a complex medium supplemented with serum, and when they did, the ratio was not maintained. It is to note that the release of EGCG and PTX from polymeric nanoparticles coated with casein was the same aqueous buffer or complex medium.

The ratio of the drugs was not always maintained during the *in vitro* release. Fatma *et al* needed a sequential release for an optimal combined efficacy, with a quicker release of QUE in order to inhibit the P-gp and enhance ETO effect (Fatma et al., 2016). Similarly, Narayanan *et al* wanted to release first EGCG to sensitize PTX-resistant breast tumor through the inhibition of glucose-regulated protein 78 (Narayanan et al., 2014, 2015). Co-encapsulating TMX and QUE into polymeric nanoparticles did not manage to maintain the ratio of the co-encapsulated drug during *in vitro* release or *in vivo* pharmacokinetics; however, synergistic ratio was not determined but this formulation had a significant better efficacy *in vivo* than free TMX or mixture of free TMX and free QUE (Jain et al., 2013). When GEN and PTX were co-encapsulated into lipid-polymeric nanoparticles, a temporal drug release was observed, as GEN promptly is released from the lipid bilayer due to the reversibility of the phospholipid-drug interaction and PTX was released when PLGA underwent degradation in contact with water. This was found interesting as GEN, an antiangiogenic agent, could initiates the mechanism of inhibiting neoangiogenesis while the cytotoxic PTX sustainably released from the polymeric core in the tumoral tissue would promote its shrinkage. The best ratio of encapsulated GEN and PTX was evaluated *in vivo* on tumor growth and confirmed by assay of VEGF production and macroscopic evaluation of anti-angiogenic effect (Mendes et al., 2014). Encapsulating SLB and DOX-HCL into liposomes did not permit to maintain the most efficient *in* vitro ratio and *in vivo* experiments did not evidence an impact of the co-encapsulated SLB on the tumor growth of hepatic tumor in comparison with DOX-HCL encapsulated alone; however, addition of SLB could prevent cardiotoxicity. As the mixture of SLB-loaded liposomes and DOX-HCL-loaded liposomes was not studied, it is difficult to assess if co-encapsulation was responsible for this effect (Li et al., 2018). The release of DOX and QUE from the micelles did not maintain the synergistic ratio but *in vivo* experiments showed an improved efficacy of the antitumor effect of the co-loaded micelles in comparison with the mixture of the free drugs and the DOX-loaded micelles (Ramasamy et al., 2017). Encapsulating both SIL and GCA into liposomes could not maintain the drug ratio during the release and no *in vivo* study was conducted (Ochi et al., 2016).

As mentioned before, few teams characterized the drug release into complex medium containing serum. As flavonoids are known to bind to the serum proteins (Bolli et al., 2010; Liu et al., 2014), one can wonder if the release of the drugs would be the same than in aqueous buffer, and if the drug ratio would be maintained. Some teams preferred to directly study the pharmacokinetics *in vivo* but did not discuss the conservation of the ratio, (Jain et al., 2013; Hu et al., 2016; Sandhu et al., 2017; Pangeni et al., 2018a; Li et al., 2018), except for Wong *et al* who showed that the ratio was maintained (Wong and Chiu, 2011). Narayanan *et al* evidenced the sequential release desired (Narayanan et al., 2014).

3.3. Combination Index

The main aim of combination therapy is to reach synergistic effect in order to decrease the dose administered and toxicity. A combined effect better than each drug alone does not necessarily indicates synergism, as it can be the product of additivity or even a slight antagonist effect (Chou, 2010). An equation has been developed by Chou and Talalay to evaluate the synergism of two drugs by the combination index (CI):

$$CI = \frac{IC_{A/AB}}{IC_A} + \frac{IC_{B/AB}}{IC_B}$$

Where IC_A and IC_B are the concentrations of A or B required to kill 50% of cells when A or B are used as single agents and $IC_{A/AB}$ and $IC_{B/AB}$ are the concentrations of A and B in the combination system at the concentrations required to kill 50% of cells. Synergism is defined by CI < 0.9, additivity by CI between 0.9 and 1.1 and antagonism by CI > 1.1.

CI was not evaluated for all the nanocarriers. CI could be determined by using the free drugs (Wong and Chiu, 2010; Wang et al., 2015; Meng et al., 2016; Ramasamy et al., 2017) or the encapsulated drugs (Wong and Chiu, 2011; Wang et al., 2015; Ray et al., 2017; Li et al., 2017; Zhu et al., 2017; Fang et al., 2018). They are reported in Table 40. Evaluating the CI using free drugs can be really interesting to select a ratio before the formulation step, and to apprehend which loading of each drugs to reach. Evaluating the CI using the drugs encapsulated separately or together is more precise, because it will depend on the release of each drugs for both nanocarriers. If the drug ratio is not maintained during release, the synergistic ratio of the encapsulated drug could be different than the one of the free drugs. The CI was calculated using free or encapsulated drugs in only two studies. Wong *et al* reported that the best QUE:VIN ratio amongst 4 tested for synergistic effect was 1:2. They confirmed this result using single or co-encapsulated VIN and QUE; this result was expected because the QUE:VIN ratio was maintained during *in vitro* release Table 39 (Wong and Chiu, 2010). Wang *et al* tested 7 BCL:PTX ratios as free or encapsulated drug. The best ratio was 5:1 using the two conditions, and it was still the more synergistic one on cells resistant to PTX (Wang et al., 2015).

Table 40. Combination index (CI) of the flavonoids and the other anti-cancer drugs evaluated for free drugs or encapsulated drugs.

ASP = aspirin, BAI = baicalin, BCL = baicalein, CI = combination index, CUR = curcumin, DOX = doxorubicin base, DTX = docetaxel, PTX = paclitaxel, QUE = quercetin, VIN = vincristine.

Flavonoid / co-encapsulated drug	Synergistic studies		References
	Flavonoid:drug wt ratio with best CI (CI) study with free drugs	Flavonoid:drug wt ratio with best CI (CI) study with encapsulated drugs	
Micelles			
QUE/DOX	4 ratios tested 1:5 (0.35, 0.58, and 0.55 in MCF-7,SCC-7, and MDA-MB-231 cancer cells respectively)		(Ramasamy et al., 2017)
Nanoemulsions			
BCL/PTX	MCF/tax cells 7 ratios tested 1:1 (0.382)		(Meng et al., 2016)
Solid lipid nanoparticles			
BAI/DTX		A549 cell line 1 ratio tested 37:63 (CI < 1)	(Li et al., 2017)
Liposomes			
QUE/VIN	4 ratios tested MDA-MB-231 cells: 1:2 (0.01) JIMT-1 cells: 1:2 (0.0000223)	1 ratio tested MDA-MB-231 cells: 1:2 (0.113) JIMT-1 cells: 1:2 (0.0900)	(Wong and Chiu, 2011, 2010)
Lipid-polymer hybrid nanoparticles			
QUE/VIN		Raji cells resistant to VIN 5 ratios tested 1:1 (0.25)	(Zhu et al., 2017)
Polymeric nanoparticles			
QUE/CUR/ASP		HCT-116 cell line Against two-drugs loaded 1 ratios but 3 dosages 2 µg/mL (0.19304) 5 µg/mL (0.33455) 10 µg/mL (0.55627)	(Ray et al., 2017)
BCL/PTX	7 ratios tested A549 cells: 5:1 (0.836) A549/PTX cells: 5:1 (0.798)	7 ratios tested A549 cells : 5:1 (0.707) A549/PTX cells :5:1 (0.513)	(Wang et al., 2015)
Mesoporous silica nanoparticles			
QUE/DOX	-	SGC7901/ADR cells 5 ratios tested 1:1 (0.19)	(Fang et al., 2018)

The CI is a useful index to choose the ratio of the flavonoid and the anti-cancer drug to co-encapsulate. However when the CI was not determined, cytotoxicity assays were still performed to apprehend the efficacy of the formulation. Different methods were used: 1 + 1 > 2 effect was observed (Wang et al., 2019) the co-loaded nanocarriers was compared to free drugs alone (Jain et al., 2013; Narayanan et al., 2015; Lv et al., 2016; Hu et al., 2016; Murugan et al., 2016; Fatma et al., 2016; Dong et al., 2017; Li et al., 2018) or to the free mixture (Jain et al., 2013; Ochi et al., 2016; Lv et al., 2016; Murugan et al., 2016; Li et al., 2018). The co-encapsulating formulation could also be compared to the flavonoid single-loaded nanocarrier (Narayanan et al., 2015; Hu et al., 2016) or to the anti-cancer single loaded nanocarrier (Narayanan et al., 2015; Fatma et al., 2016; Lv et al., 2016; Dong et al., 2017; Li et al., 2018). The reversal index could also be evaluated by comparing the effect on cell lines resistant or not to the anti-cancer agent (Meng et al., 2016). Sometimes, only the free drugs and the mixture of the free drugs

were tested for cytotoxicity; we can regret that the ratios tested were not the same as the one administered *in vivo* (Pangeni et al., 2018b)

It is to note that several other *in vitro* experiments were performed to try to predict the *in vivo* behavior, such as cell uptake of the nanocarrier into the tumoral cells (Fatma et al., 2016; Hu et al., 2016; Lv et al., 2016; Meng et al., 2016; Murugan et al., 2016; Li et al., 2018; Wang et al., 2019), *in vitro* permeability assay using Caco-2 cells to assess the intestinal passage (Jain et al., 2013; Sandhu et al., 2017; Pangeni et al., 2018b), effect on protein expression of the tumor cells (Narayanan et al., 2015; Lv et al., 2016; Ramasamy et al., 2017; Fang et al., 2018), effect on the ROS and glutathione generation by the tumor cells (Meng et al., 2016; Murugan et al., 2016; Ramasamy et al., 2017), or *in vitro* migration assay to assess the inhibitory effect of the drug on the formation of metastases (Dong et al., 2017; Li et al., 2018; Pangeni et al., 2018b)

4. *In vivo* efficacy

Most of the nanocarriers reviewed here were assayed *in vivo* using animal experiments. It is to note than none of these studies compared the co-loaded nanocarrier to the mixture of single-loaded nanocarriers.

4.1. Breast cancer models

PTX/BCL co-loaded nanoemulsion evidenced a tumor inhibition rate of 77.0% on MCF-7/Tax tumor xenograft (Meng et al., 2016). Wong et al showed that the co-encapsulation of VIN and QUE in liposomes at synergistic ratio led to good antitumor efficacy and low toxicity in estrogen negative, progesterone negative-and trastuzumab-insensitive xenograft models, with a dose of vincristine given at two-thirds of its maximum tolerated dose (Wong and Chiu, 2011). Jain *et al* combination of QUE and TMX in nanoparticles resulted in higher antitumor tumor efficacy on breast tumor bearing female rats in contrast to the free drug combination. Moreover, co-encapsulation of antioxidant could reduce the free radical induced oxidative stress generated during the course of chronic therapy of TMX (Jain et al., 2013). QUE and DOX co-loaded nanoparticles significantly enhanced the *in vivo* anticancer efficacy of DOX in a drug-resistant MCF-7/ADR xenograft model (Lv et al., 2016). Micelles co-encapsulating docetaxel (DTX) and SIL displayed a better anti-tumor effect on 4T1 tumor-bearing mice than the mixture of the free drugs (Dong et al., 2017). Self-nano-emulsifying emulsion co-encapsulating TMX and NG administered orally for 30 days led to a lower tumor burden on breast cancer-bearing female rats compared to the mixture of the free drugs or the TMX encapsulated alone. Moreover, the mortality was decreased, with complete animals survival for the co-encapsulating formulation (Sandhu et al., 2017). Mesoporous silica nanoparticles co-encapsulating TPT and QUE showed higher tumor rate

inhibition on MDA-MB-231 breast tumor-bearing mice than free TPT or free QUE (Murugan et al., 2016).

4.2. Lung cancer models

Water-in-oil-in-water nanoemulsion co-encapsulating PMX and QUE for oral administration improved the oral bioavailability of both drugs *in vivo* with the result of a maximally suppressed tumor growth in A549 cell-bearing mice (62.7%) in comparison with the control group (Pangeni et al., 2018b). The pH-sensitive micelles co-encapsulating baicalin and CUR had a higher inhibition rate on A549 lung cancer-bearing mice than the free drugs and the single loaded CUR (Wang et al., 2019). PLGA-nanoparticles formed by prodrugs of BCL and PTX had a better effect than single-loaded nanoparticles *in vivo* (Wang et al., 2015). Co-encapsulated DTX and BAI in solid lipid nanoparticles could significantly increase the tumor inhibition rate in A549 resistant to DTX tumor bearing-mice in comparison to single-loaded solid lipid nanoparticles, free drugs or mixture of the free drugs (Li et al., 2017). DOX and QUE co-encapsulated into micelles demonstrated superior anti-cancer efficacy on SSC-7 tumor-bearing mice than free DOX, free QUE, mixture of free DOX and free QUE and micelles encapsulating DOX (Ramasamy et al., 2017), even if the *in vitro* release of the drugs did not maintain the synergistic drug ratio.

4.3. Other cancer models

QUE and DOX co-loaded mesoporous silica nanoparticles had a better anti-tumor effect on SG7901/ADR tumor-bearing mice (gastric cancer model) than the mixture of the free drugs and than the single-loaded mesoporous silica nanoparticles (Fang et al., 2018).

Cholic-acid functionalized liposomes co-encapsulating DOX-HCL and SLB displayed better liver accumulation and liver targeting, and more efficient inhibition of liver tumor growth in H22 tumor-bearing mice and HepG2 tumor-bearing nude mice (hepatocellular cancer models), but also induced significantly less pathological damage to the cardiac tissue relative to the damage caused by free DOX-HCL and cholic-acid functionalized liposomes encapsulating only QUE (Li et al., 2018).

VIN and QUE co-loaded in lipid-polymeric hybrid nanoparticles showed an enhanced antitumor efficacy on Raji resistant to VIN tumor-bearing mice (Burkitt's lymphoma model) compared to free drugs alone or in combination and to the single-loaded nanocarrier alone (Zhu et al., 2017).

5. Concluding remarks

Flavonoids has been successfully co-encapsulated with another anti-cancer agent into a broad range of nanocarriers. As the physicochemical properties of the drugs might differ, there is a need for

optimization of the formulation depending on the drugs, and sometimes a compromise has to be made (Wong and Chiu, 2011), or prodrug can be synthetized (Wang et al., 2015). The formulation needs to be optimized for each drug and each nanocarriers. If several studies detail some formulation optimization, too few report the optimization of the formulation specific to the co-encapsulation. Moreover, as very few studies have been made on the storage stability of the co-encapsulating nanocarriers, one can wonder if those nanocarriers developed are really the most suitable for the aim of co-encapsulating flavonoids with an anti-cancer drug.

It is difficult to conclude on the predictive value of the combination of *in vitro* release and CI. Surely, CI seems to be compulsory to choose the better drug ratio, and *in vitro* release is an almost mandatory characterization before *in vivo* experiments. However, not assessing the CI or not maintaining the drug ratio during release did not prevent *in vivo* efficacy. We can hypothesized than maybe the efficacy of the combination would be better at an optimized drug ratio and with a similar release, but this will need confirmation. Associating these two assays give at least a solid clue for the *in vivo* efficacy.

Co-encapsulation always led to a better *in vivo* anti-tumor effect compared to the free drugs, a mixture of the free drugs or to one drug encapsulated alone into the nanocarriers. As co-encapsulation can be a challenge, one can wonder if co-encapsulation is worth the trouble. For example, Mura *et al* evidenced than co-encapsulating sunitinib and gemcitabine in squalene nanoparticles was as efficient *in vitro* as the mixture of the drug encapsulated alone in squalene nanoparticles, but did not confirm this result *in vivo* (Mura et al., 2016). On the other hand, liposomes co-encapsulating cytarabin and daunorubicin at ratio 5:1 (CPX-351) against acute myeloid leukemia was approved by the FDA and the EMA (Alfayez et al., 2020; Tardi et al., 2009). Moreover, Markovsky *et al* evidenced that PTX and DOX conjugated to PGA nanoparticles increased significantly the tumor inhibition rate on MDA-MB-231 tumor-bearing mice in comparison to a mixture of individually-conjugated drugs or the combination of free drugs (Markovsky et al., 2014). This leads to think that co-encapsulation might be a promising approach. However, concerning the co-encapsulation of flavonoids with an anti-cancer agents, this review highlights the absence of mixture of the individually encapsulated drugs as a control group *in vitro* or *in vivo* to be able to evidence a significant advantage to the co-encapsulation.

6. References

Report to section Références, page 159.